

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KARINA BORA DE OLIVEIRA

**DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO EM *Salvia officinalis* L.,
LAMIACEAE, E AVALIAÇÃO DE SUA TOXICIDADE E INFLUÊNCIA NA
MELANOGÊNESE**

CURITIBA

2010

KARINA BORA DE OLIVEIRA

**DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO EM *Salvia officinalis* L.,
LAMIACEAE, E AVALIAÇÃO DE SUA TOXICIDADE E INFLUÊNCIA NA
MELANOGÊNESE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de concentração de Insumos, Medicamentos e Correlatos, Departamento de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira

CURITIBA

2010

TERMO DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

“Pela amizade que você me devota
por defeitos que você nem nota
Pelo silêncio que diz quase tudo
pelo olhar que me reprova mudo
Pela pureza dos seus sentimentos
pela presença em todos os momentos
Por ser feliz quando me vê contente
Pelo olhar que diz “Vá em frente!”
Por ficar triste, quando estou tristonho
por rir comigo quando estou risonho
Por repreender-me, quando estou errado
por meu segredo, sempre bem guardado
Por me apontar pra DEUS a todo o instante
por esse amor fraterno tão constante...”

As pessoas que me mostraram o melhor da vida:

Antonio Otávio, pai, mãe e Kamila

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por abençoar e iluminar meus passos.

Aos meus pais, Hamilton e Cida, pelo incondicional amor e incentivo, e por terem me educado e me preparado para a vida, me fortalecendo e ensinando com suas palavras e gestos a cada dia.

Ao meu esposo, Antonio Otávio, meu eterno companheiro, pelo apoio e amor, pelos momentos mais felizes e por me confortar e me fazer perseverar nos momentos difíceis.

A minha irmã e amiga, Kamila, parceria fundamental em minha vida, pelo carinho, compreensão e pelos momentos imparciais de felicidade.

Ao Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira, pela intensa dedicação a este trabalho, pelos ensinamentos, e por ter me incentivado a seguir carreira na ciência.

A Prof^a. Dra. Almeriane Weffort Santos, por ter me mostrado a gratificação e o valor de trabalhar com pesquisa científica, pela energia estimulante, e por ter acreditado e se dedicado ao trabalho com todo seu conhecimento.

Aos colegas e amigos de trabalho pela amizade, palavras de incentivo e pelas discussões científicas e não-científicas que tornaram o nosso trabalho mais agradável. Em particular a Dani, pelo carinho e por ter se tornado uma pessoa especial.

A toda a minha família, que está sempre ao meu lado, acreditando e me motivando a seguir em frente. Pelos inúmeros momentos de alegria, comemoração e por tornar a minha vida mais prazerosa.

As minhas amigas de todas as horas, Ingrid, Gaby, Juliana, Cláudia, Keylla e Bianca, pelo incentivo e pelos momentos agradáveis que vivemos juntas.

A todos os demais professores que disponibilizaram seus laboratórios ou colaboraram de outra forma, em especial ao Prof. Dr. Cid Aimbiré de Moraes Santos, ao Prof. Dr. José Domingos Fontana, ao Prof. Dr. Aguinaldo José do Nascimento, a Prof^a Dra. Maria Suely Soares Leonart; a Prof^a. Dra. Gláucia Regina Martinez, e aos professores do laboratório de Bioquímica Clínica.

Ao Prof. Dr. Obdúlio Gomes Miguel, pela dedicação dispensada na iniciação científica que estimulou meu apreço pela pesquisa.

Aos colegas Érica, Adélia, Marcela, Maurício, Irene e Geni, pela valiosa ajuda durante o trabalho.

Aos demais professores e colegas do curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, a Capes e a Universidade Federal do Paraná.

EPÍGRAFE

“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein

RESUMO

O ácido rosmarínico é um éster dos ácidos caféico e 3,4-di-hidroxifenilático, encontrado em diversas espécies vegetais, tais como a *Salvia officinalis* L. (sálvia) e o *Rosmarinus officinalis* (alecrim). Apresenta diversas atividades biológicas, tais como antiséptica, antioxidante, antiinflamatória, antiviral, hipoglicemiante, antitumoral e neuroprotetora. Prevendo o possível uso do ácido rosmarínico como fármaco e considerando seu amplo uso pela população através da sálvia, tanto a substância como a espécie devem ser objeto de estudo na área analítica e com relação às suas atividades biológicas. O presente trabalho teve por objetivo isolar o ácido rosmarínico da sálvia, otimizar e validar um método de extração e determinação deste analito na matéria-prima vegetal, e avaliar a toxicidade e a influência do ácido rosmarínico e de extratos de sálvia na melanogênese. Para o isolamento do ácido rosmarínico usou-se um extrato comercial de sálvia que foi submetido a fracionamento cromatográfico. O ácido rosmarínico isolado foi identificado por RMN de ^1H e ^{13}C e por espectrometria UV-VIS. Em seguida, realizou-se a otimização das melhores condições para extração do ácido rosmarínico de sálvia através de planejamento fatorial de experimentos, partindo-se de 100 mg de material vegetal com tamanho de partícula entre 310 e 740 μm . Diluição da droga em 10 mL de metanol 40%, contendo 1 mg/mL de ácido ascórbico e 10 mM de EDTA, sonicação por 20 minutos a 45 °C, com posterior filtração e diluição para injeção em cromatógrafo, foram as melhores condições estabelecidas para a extração do analito. Todas as amostras foram analisadas por CLAE em coluna C_{18} , eluídas com metanol:água (acidificada) nas proporções 45:55 (v/v) até 5 min. e 80:20 (v/v) de 5 a 10 min. de corrida, com fluxo de 1 mL/min. e detecção em 330 nm. O método foi posteriormente submetido à validação, com análise dos aspectos especificidade, seletividade, linearidade, faixa de aplicação, precisão repetibilidade e intermediária e exatidão. Todos os testes obtiveram resultados dentro do especificado pela legislação, possibilitando o uso do método para o fim desejado. A avaliação das atividades biológicas foi feita com o ácido rosmarínico isolado, com um extrato fluido 1:1 e com uma infusão 1:10 de sálvia. Todos foram avaliados com relação à toxicidade a náuplios da *A. salina*. Nenhum deles apresentou toxicidade significativa ($\text{C}_{\text{L50}} > 1000 \mu\text{g/mL}$). As mesmas amostras foram também testadas com relação à toxicidade às linhagens celulares McCoy e B16F10. A linhagem McCoy foi mais sensível aos tratamentos principalmente nas maiores concentrações. A linhagem celular de melanoma murino B16F10 apresentou maior resistência aos tratamentos, e as concentrações dos testes que não apresentaram toxicidade a essa linhagem foram avaliadas quanto à influência na melanogênese. Para tal, culturas de células B16F10, tratadas por 24 horas com as diferentes concentrações de ácido rosmarínico e de extratos de sálvia, tiveram a concentração de melanina e de atividade de tirosinase celular determinadas. Lisados de células não tratadas previamente foram incubados por 60 min. a 37 °C, na presença de L-DOPA e dos testes para determinação da atividade de tirosinase *in vitro*. A partir dos experimentos foi possível verificar que o ácido rosmarínico apresenta dupla ação melanogênica, sendo capaz de aumentar a síntese de melanina e de tirosinase em concentrações mais baixas (10 μM) e de inibi-la em concentrações mais altas (1000 μM). Esta substância foi uma das responsáveis pela indução da síntese de melanina pelo extrato fluido e pela infusão de sálvia na concentração de 10 μM de ácido rosmarínico. Mas os extratos não influenciaram a atividade de tirosinase da mesma forma que o ácido rosmarínico, em consequência das ações de outras substâncias presentes nos mesmos. A partir deste trabalho desenvolveram-se metodologias de extração e determinação que podem facilitar o estudo do ácido rosmarínico e da sálvia nas mais diversas áreas da pesquisa científica e, ainda, ampliou-se o conhecimento das atividades biológicas do ácido rosmarínico e da sálvia, abrindo espaço para estudos mais aprofundados de ambos na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos e/ou fitoterápicos para tratamento de patologias pigmentares.

ABSTRACT

Rosmarinic acid is an ester of caffeic and 3,4-dihydroxyphenyllactic acids, found in many species, such as *Salvia officinalis* L. (sage) and *Rosmarinus officinalis* (rosemary). It has several biological activities, such as antiseptic, antioxidant, anti-inflammatory, antiviral, hypoglycemic, antitumor and neuroprotective. Predicting the possible use of rosmarinic acid as a therapeutic drug and considering its widespread use by the population through the sage, both the substance and the species should be studied in the analytical and in relation to their biological activities. This study aimed to isolate the rosmarinic acid from sage, to optimize and validate a method of extraction and determination of this analyte in plant material and to evaluate the toxicity and the influence of rosmarinic acid and sage on melanogenesis. For the isolation of rosmarinic acid a commercial extract of sage was submitted to chromatographic separation. Isolated rosmarinic acid was identified by ^1H NMR and ^{13}C and UV-VIS spectrometry. After this, the optimization of the best conditions for the extraction of rosmarinic acid from sage by factorial design of experiments was carried out, starting from 100 mg of plant material with particle size between 310 and 740 micrometers. Dilution of the drug in 10 mL of methanol 40% containing 1 mg/mL ascorbic acid and 10 mM EDTA, sonication for 20 minutes at 45 ° C with subsequent filtration and dilution to injection in chromatographic system were the best conditions established for extraction of the analyte. All samples were analyzed by HPLC on C_{18} column, eluted with methanol: water (acidified) at 45:55 (v / v) until 5 min. and at 80:20 (v / v) from 5 to 10 min., flow rate of 1 mL / min. and detection at 330 nm. The method was subsequently subjected to validation, from the analysis of specificity, selectivity, linearity, range of application, repeatability, intermediate precision and accuracy parameters. All the values obtained for the analyzed parameters were in accordance with the established by national and international rules, allowing the use of the method for the intended purpose. Evaluation of biological activities was carried out with rosmarinic acid, a fluid extract and an infusion of sage. All were evaluated for toxicity to *A. salina* nauplii, and the results showed that none of them presented significant toxicity ($\text{LC}_{50} > 1000$ mg / mL). Both rosmarinic acid and sage extracts were also tested for toxicity to B16F10 and McCoy cell lines. McCoy cell cultures were more sensitive, especially at higher concentrations of the treatments. The murine melanoma B16F10 cell line was more resistant to treatment, and concentrations of tests that showed no toxicity to this strain were evaluated for their influence on melanogenesis. B16F10 cells treated for 24 hours with different concentrations of rosmarinic acid and extracts of sage had the concentration of melanin and tyrosinase activity determined. Non-pretreated cell lysates were incubated for 60 min. at 37 °C in the presence of L-DOPA and tests to determine the activity of tyrosinase *in vitro*. From the experiments we observed that rosmarinic acid has dual effect on melanogenic, being able to increase melanin synthesis and tyrosinase at lower concentrations (10 μM) and inhibit it at higher concentrations (1000 μM). This substance was the mainly responsible for the induction of melanin synthesis by fluid extract and infusion of sage in a concentration of 10 μM . But the extracts did not influence the activity of tyrosinase in the same way that rosmarinic acid, as a result of the actions of other present substances. From this work analytical methods to extract and determine rosmarinic acid were developed, which can facilitate the study of this substance and sage in several areas of scientific research. The knowledge of the biological activities of rosmarinic acid and sage was also expanded, collaborating with future studies of both on the research and development of new drugs and/or herbal medicines for the treatment of pigmentary disorders.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE ESTRUTURAS QUÍMICAS	16
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	17
1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3 REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1 <i>Salvia officinalis</i> L., LAMIACEAE	21
3.1.1 Aspectos Botânicos	22
3.1.2 Composição química	24
3.1.3 Usos populares e medicinais	26
3.1.4 Ações Biológicas	27
3.2 ÁCIDO ROSMARÍNICO	29
3.2.1 Propriedades Químicas	30
3.2.2 Biossíntese do ácido rosmarínico em plantas	32
3.2.3 Derivados	34
3.2.4 Metabolismo	34
3.2.5 Atividades Biológicas	36
3.3 MELANOGÊNESE	38
3.4 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	44
4 MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO	48
4.1.1 Preparação do extrato de sálvia para isolamento de ácido rosmarínico	48
4.1.2 Isolamento do ácido rosmarínico	48
4.1.3 Identificação do ácido rosmarínico isolado	50
4.2 IDENTIFICAÇÃO DA SÁLVIA OBTIDA COMERCIALMENTE	50
4.3 DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ROSMARÍNICO NA <i>Salvia officinalis</i>	50
4.3.1 Condições cromatográficas	50
4.3.2 Otimização da extração do ácido rosmarínico por planejamento fatorial	51
4.3.3 Método otimizado para determinação do ácido rosmarínico	52
4.3.4 Avaliação da adequação do sistema (<i>System suitability test</i>)	52
4.3.5 Avaliação da estabilidade das soluções de padrão e das soluções amostras	52
4.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	53
4.4.1 Especificidade e seletividade	53
4.4.2 Linearidade e intervalo de aplicação	53

4.4.3	Repetibilidade	53
4.4.4	Precisão intermediária	54
4.4.5	Exatidão	54
4.5	ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÁCIDO ROSMARÍNICO E DA SÁLVA	55
4.5.1	Preparo do extrato fluido e da infusão de sálvia	55
4.5.2	Determinação do peso seco e de ácido rosmarínico nos extratos de sálvia	55
4.5.3	Teste de letalidade para náuplios de <i>Artemia salina</i>	56
4.5.4	Toxicidade celular e influência na melanogênese	57
4.5.4.1	Soluções	57
4.5.4.2	Manutenção das linhagens McCoy e B16F10	59
4.5.4.3	Viabilidade celular	59
4.5.4.4	Toxicidade celular	60
4.5.4.5	Influência do ácido rosmarínico e dos extratos de sálvia na melanogênese	60
4.5.4.5.1	Doseamento de proteínas no lisado celular	61
4.5.4.5.2	Doseamento de melanina	61
4.5.4.5.3	Determinação de tirosinase no lisado celular	62
4.5.4.5.4	Determinação da atividade de tirosinase <i>in vitro</i>	62
4.5.4.5.5	Identificação de tirosinase por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida	63
4.5.5	Análises estatísticas	63
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.1	ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO	64
5.1.1	Preparação do extrato de sálvia para isolamento de ácido rosmarínico	64
5.1.2	Isolamento de ácido rosmarínico	66
5.1.3	Identificação do ácido rosmarínico	67
5.2	IDENTIFICAÇÃO DA SÁLVA OBTIDA COMERCIALMENTE	71
5.3	DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ROSMARÍNICO NA <i>Salvia officinalis</i>	73
5.3.1	Condições cromatográficas	73
5.3.2	Otimização da extração do ácido rosmarínico	76
5.3.2.1	Número de extrações necessárias pelo método otimizado	82
5.3.2.2	Aplicação do método em amostras de sálvia comerciais	83
5.3.3	Avaliação da adequação do sistema	84
5.3.4	Avaliação da estabilidade das soluções de padrão e das soluções amostras	85
5.4	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	86
5.4.1	Especificidade e seletividade	87
5.4.2	Linearidade e intervalo de aplicação	88
5.4.3	Repetibilidade	90
5.4.4	Precisão intermediária	90
5.4.5	Exatidão	91
5.5	ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÁCIDO ROSMARÍNICO E DA SÁLVA	93
5.5.1	Determinação do peso seco e de ácido rosmarínico nos extratos de sálvia	94

5.5.2	Teste de letalidade para náuplios de <i>Artemia salina</i> -----	95
5.5.3	Toxicidade celular -----	98
5.5.4	Influência do ácido rosmarínico e dos extratos de sálvia na melanogênese -----	103
5.5.4.1	Doseamento de proteína -----	106
5.5.4.2	Doseamento de melanina -----	107
5.5.4.3	Determinação da atividade de tirosinase celular e <i>in vitro</i> -----	110
6	CONCLUSÃO -----	121
7	REFERÊNCIAS -----	122

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PROPRIEDADES QUÍMICAS DO ÁCIDO ROSMARÍNICO	31
TABELA 2- CLASSIFICAÇÃO DOS MÉTODOS A SEREM VALIDADOS SEGUNDO A ANVISA .	44
TABELA 3- ENSAIOS DE VALIDAÇÃO A SEREM REALIZADOS PARA CADA CATEGORIA DE MÉTODO ANALÍTICO SEGUNDO A ANVISA	45
TABELA 4- FATORES AVALIADOS PARA TRIAGEM DA EXTRAÇÃO DE ÁCIDO ROSMARÍNICO DE SÁLVIA	51
TABELA 5- FATORES AVALIADOS NA OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE ÁCIDO ROSMARÍNICO DE SÁLVIA.	51
TABELA 6- FATORES AVALIADOS PARA A SEGUNDA OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE ÁCIDO ROSMARÍNICO DE SÁLVIA	51
TABELA 7- DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE ¹ H E ¹³ C DO ÁCIDO ROSMARÍNICO	71
TABELA 8- EXTRAÇÕES SUCESSIVAS DO ÁCIDO ROSMARÍNICO PELO MÉTODO OTIMIZADO	83
TABELA 9– TEOR DE ÁCIDO ROSMARÍNICO EM AMOSTRAS COMERCIAIS DE SÁLVIA.....	84
TABELA 10- RECOMENDAÇÕES PARA AVALIAÇÃO DA ADEQUAÇÃO DO SISTEMA ANALÍTICO	84
TABELA 11- ESTABILIDADE DAS AMOSTRAS DE SÁLVIA NOS TEMPOS 0,3 E 7 DIAS.....	86
TABELA 12- CONCENTRAÇÃO TEÓRICA DE ÁCIDO ROSMARÍNICO NAS DIFERENTES TOMADAS DE AMOSTRA DO MATERIAL VEGETAL.....	89
TABELA 13- PRECISÃO REPETIBILIDADE E INTERMEDIÁRIA PARA O MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO	91
TABELA 14- CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO ROSMARÍNICO NA CURVA PADRÃO E NA CURVA PADRÃO + AMOSTRA.....	91
TABELA 15– RECUPERAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE DE ÁCIDO ROSMARÍNICO NA SÁLVIA SECA	93

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1– <i>Salvia officinalis</i> L., LAMIACEAE	21
FIGURA 2– FOLHAS DE SÁLVIA.....	23
FIGURA 3– INFLORESCÊNCIA DE SÁLVIA	23
FIGURA 4 – FLORES DE SÁLVIA.....	23
FIGURA 5– CROMATOGRAMA DOS ENANTIÔMEROS.....	32
FIGURA 6– ROTA BIOSINTÉTICA DO ÁCIDO ROSMARÍNICO	33
FIGURA 7- ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA PELE (A) E CAMADAS BASAL E ESPINHOSA DA EPIDERME (B)	38
FIGURA 8- BIOSÍNTESE DA MELANINA	41
FIGURA 9– PREPARO DO EXTRATO DE PARTES AÉREAS DE SÁLVIA PARA ISOLAMENTO DE ÁCIDO ROSMARÍNICO.....	49
FIGURA 10– CCD DO EXTRATO DE SÁLVIA.....	65
FIGURA 11–CHROMATOTRON (A); SEPARAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS NA CROMATOPLACA, COM VISUALIZAÇÃO SOB LUZ UV EM 254 NM (B)	66
FIGURA 12– CCD DAS FRAÇÕES OBTIDAS NO ISOLAMENTO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO DO EXTRATO DE SÁLVIA POR CHROMATOTRON.....	67
FIGURA 13– CROMATOGRAMA DO ÁCIDO ROSMARÍNICO ISOLADO DO EXTRATO DE PARTES AÉREAS DE SÁLVIA.....	67
FIGURA 14– PERFIL ESPECTRAL DO ÁCIDO ROSMARÍNICO ISOLADO.....	68
FIGURA 15 – RMN DE ¹ H DO ÁCIDO ROSMARÍNICO.....	69
FIGURA 16 – RMN ¹³ C DO ÁCIDO ROSMARÍNICO.....	70
FIGURA 17 – RMN ¹³ C-DEPT-135 DO ÁCIDO ROSMARÍNICO	70
FIGURA 18– FOLHA DE SÁLVIA OBSERVADA ATRAVÉS DE LUPA	72
FIGURA 19– CORTES TRANSVERSAIS DA FOLHA DE SÁLVIA.....	72
FIGURA 20- CROMATOGRAMA, OBTIDO ATRAVÉS DE COLUNA VARIAN RESELUT C ₁₈ , DE UM EXTRATO DE SÁLVIA PRODUZIDO ATRAVÉS DAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS DESCRITAS NO ITEM 4.3.3.....	74
FIGURA 21- CROMATOGRAMA, OBTIDO ATRAVÉS DE COLUNA AGILENT ECLIPSE C ₁₈ , DE UM EXTRATO DE SÁLVIA PRODUZIDO ATRAVÉS DAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS DESCRITAS NO ITEM 4.3.3.....	74
FIGURA 22- PERFIS ESPECTRAIS DOS PICOS ENTRE 3,8 E 5,4 MIN DO CROMATOGRAMA OBTIDO COM COLUNA AGILENT ECLIPSE C ₁₈ (FIGURA 21).....	75
FIGURA 23- CROMATOGRAMA OBTIDO ATRAVÉS DE COLUNA AGILENT ECLIPSE C ₁₈ E COM FASE MÓVEL METANOL 40% ATÉ 6 MIN E METANOL 80% DE 6 A 10 MIN, DE UM EXTRATO DE SÁLVIA PRODUZIDO ATRAVÉS DAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS DESCRITAS NO ITEM 4.3.3.....	76

FIGURA 24- GRÁFICO DE PARETO PARA EFEITOS PADRONIZADOS- FATORES E INTERAÇÕES SIGNIFICATIVAS PARA A EXTRAÇÃO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO DA SÁLVIA.....	77
FIGURA 25- INFLUÊNCIA DOS FATORES INDIVIDUAIS NA EXTRAÇÃO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO DA SÁLVIA	78
FIGURA 26- INTERAÇÃO ENTRE OS FATORES AVALIADOS NA EXTRAÇÃO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO DA SÁLVIA	79
FIGURA 27- MAPA DE CONTORNO TEMPO <i>VERSUS</i> SOLVENTE DA OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE ÁCIDO ROSMARÍNICO DA SÁLVIA.....	80
FIGURA 28- MAPA DE CONTORNO TEMPERATURA <i>VERSUS</i> SOLVENTE DA OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE ÁCIDO ROSMARÍNICO DE SÁLVIA.....	80
FIGURA 29- MAPA DE CONTORNO TEMPERATURA <i>VERSUS</i> TEMPO DA OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE ÁCIDO ROSMARÍNICO DA SÁLVIA.....	81
FIGURA 30- MAPA DE CONTORNO % DE METANOL <i>VERSUS</i> TEMPO DA OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE ÁCIDO ROSMARÍNICO DA SÁLVIA.....	82
FIGURA 31- CURVAS DAS SOLUÇÕES PADRÕES DE ÁCIDO ROSMARÍNICO ANALISADAS EM 0, 7, 15 E 30 DIAS	85
FIGURA 32- COMPARAÇÃO DO PERFIL ESPECTRAL DO PADRÃO E DO ÁCIDO ROSMARÍNICO NAS AMOSTRAS	87
FIGURA 33- LINEARIDADE DO MÉTODO PARA O PADRÃO DE ÁCIDO ROSMARÍNICO.....	88
FIGURA 34- LINEARIDADE DO MÉTODO PARA O MATERIAL VEGETAL.....	89
FIGURA 35- RESÍDUOS OBTIDOS PELOS DADOS DE LINEARIDADE PARA A DROGA VEGETAL	90
FIGURA 36- CURVA DE PADRÃO E DE PADRÃO ADICIONADO À AMOSTRA.....	92
FIGURA 37- PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO FLUIDO (EF) DE SÁLVIA	95
FIGURA 38- PERFIL CROMATOGRÁFICO DA INFUSÃO AQUOSA (INF) DE SÁLVIA	95
FIGURA 39- TOXICIDADE DO ÁCIDO ROSMARÍNICO COM RELAÇÃO AOS NÁUPLIOS DE ARTEMIA.....	97
FIGURA 40- TOXICIDADE DO ÁCIDO ROSMARÍNICO COM RELAÇÃO AOS NÁUPLIOS DE ARTEMIA.....	97
FIGURA 41- TOXICIDADE DO EXTRATO FLUIDO 1:1 E DA INFUSÃO 1:10 DE SÁLVIA COM RELAÇÃO AOS NÁUPLIOS DE ARTEMIA.....	98
FIGURA 42- CÉLULAS MCCOY OBSERVADAS EM MICROSCÓPIO INVERTIDO.....	99
FIGURA 43- CÉLULAS MCCOY OBSERVADAS EM MICROSCÓPIO INVERTIDO APÓS TRATAMENTO COM VERMELHO NEUTRO	100
FIGURA 44- TOXICIDADE DO ÁCIDO ROSMARÍNICO COM RELAÇÃO ÀS CÉLULAS DAS LINHAGENS MCCOY E B16F10	101
FIGURA 45- TOXICIDADE DO EXTRATO FLUIDO DE SÁLVIA COM RELAÇÃO ÀS CÉLULAS DAS LINHAGENS MCCOY E B16F10	101
FIGURA 46- TOXICIDADE DA INFUSÃO DE SÁLVIA COM RELAÇÃO ÀS CÉLULAS DAS LINHAGENS MCCOY E B16F10	102

FIGURA 47- ALTERAÇÕES EM CULTURAS DE CÉLULAS B16F10 INDUZIDAS PELO ÁCIDO ROSMARÍNICO 10 μM NA PRESENÇA DE L-TIROSINA.....	105
FIGURA 48- CULTURA DE CÉLULAS B16F10 TRATADA COM ÁCIDO ROSMARÍNICO 10 μM	105
FIGURA 49- CURVA ANALÍTICA DE PROTEÍNA.....	107
FIGURA 50- CURVA ANALÍTICA DE MELANINA.....	107
FIGURA 51- INFLUÊNCIA DO NH_4Cl NA SÍNTESE DE MELANINA CELULAR.....	108
FIGURA 52- INFLUÊNCIA DO ÁCIDO ROSMARÍNICO E DOS EXTRATOS DE SÁLVIA NA SÍNTESE DE MELANINA CELULAR.....	109
FIGURA 53- INFLUÊNCIA DO ÁCIDO ROSMARÍNICO E DOS EXTRATOS DE SÁLVIA NA SÍNTESE DE MELANINA, NA PRESENÇA DE L-TIROSINA 500 μM	109
FIGURA 54- INFLUÊNCIA DO ÁCIDO ROSMARÍNICO E DOS EXTRATOS DE SÁLVIA NA ATIVIDADE DA TIROSINASE CELULAR.....	113
FIGURA 55- BANDAS DE TIROSINASE OBTIDAS POR ELETROFORESE EM GEL DOS LISADOS CELULARES TRATADOS COM ÁCIDO ROSMARÍNICO E EXTRATOS DE SÁLVIA: INFLUÊNCIA NA ATIVIDADE DA TIROSINASE CELULAR.....	113
FIGURA 56- INFLUÊNCIA DO ÁCIDO ROSMARÍNICO E DOS EXTRATOS DE SÁLVIA NA ATIVIDADE DA TIROSINASE <i>IN VITRO</i>	114

LISTA DE ESTRUTURAS QUÍMICAS

ESTRUTURA QUÍMICA I – α -TERPINEOL	25
ESTRUTURA QUÍMICA II – CRISINA	25
ESTRUTURA QUÍMICA III – LUTEOLINA	25
ESTRUTURA QUÍMICA IV – APIGENINA	25
ESTRUTURA QUÍMICA V – ÁCIDO SAGERÍNICO	26
ESTRUTURA QUÍMICA VI – ÁCIDO SALVIANÓLICO K	26
ESTRUTURA QUÍMICA VII – ÁCIDO ROSMARÍNICO	30
ESTRUTURA QUÍMICA VIII – (R)(+) ÁCIDO ROSMARÍNICO	31
ESTRUTURA QUÍMICA IX – (S)(-) ÁCIDO ROSMARÍNICO	31
ESTRUTURA QUÍMICA X – ÁCIDO ISORÍNICO	34
ESTRUTURA QUÍMICA XI – ÁCIDO LITOSPÉRMICO	34
ESTRUTURA QUÍMICA XII – ÁCIDO LITOSPÉRMICO B	34
ESTRUTURA QUÍMICA XIII – ÁCIDO 4-O-SULFATO- <i>TRANS</i> -CAFÉICO	35
ESTRUTURA QUÍMICA XIV - ÁCIDO 3-O-SULFATO- <i>TRANS-m</i> -COUMÁRICO	35
ESTRUTURA QUÍMICA XV - ÁCIDO 4-O-SULFATO <i>TRANS</i> -FERÚLICO	35
ESTRUTURA QUÍMICA XVI - ÁCIDO <i>TRANS</i> -CAFÉICO	35
ESTRUTURA QUÍMICA XVII - ÁCIDO <i>m</i> -HIDROXIFENILPROPIÔNICO	35
ESTRUTURA QUÍMICA XVIII - ÁCIDO <i>TRANS-m</i> -COUMÁRICO	35
ESTRUTURA QUÍMICA XIX - ÁCIDO ROSMARÍNICO	68

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CG	Cromatografia gasosa
UV-VIS	Ultravioleta-visível
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
DPPH	Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila
LDL	Low density lipoprotein
HDL	High density lipoprotein
H ⁺ /K ⁺ ATPase	Hydrogen potassium adenosine trifosfatase
EC	Eletroforese capilar
ROS	Espécies reativas de oxigênio
L-DOPA	3,4-diidroxifenilalanina
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
PKA	Proteína quinase A
MITF	Fator de transcrição associado a microftalmia
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
FDA	Food and Drug Administration
ICH	International Conference of Harmonization
USP	United States Pharmacopoeia
m/m	Relação massa-massa
CCD	Cromatografia em camada delgada
v/v	Relação volume-volume
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EF	Extrato fluido de sálvia
INF	Infusão de sálvia
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
LC	Lisado celular
SDS	Dodecil sulfato de sódio
ppm	Partes por milhão
DAD	Detector de arranjo de diodos
CL ₅₀	Concentração letal média

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas na terapêutica e prevenção de doenças pode ser detectada em diferentes formas de organização social, constituindo-se como uma prática milenar associada aos saberes populares e médicos e a rituais (FERNANDES, 2004). O emprego das plantas no tratamento das doenças começou de maneira empírica, e o uso passou de uma geração para outra pela transmissão oral e depois por descrições em livros deixados por todas as civilizações precedentes (CUNHA *et al.*, 2003).

A partir dos anos 60, com a disseminação da informação sobre os constituintes ativos e mecanismos farmacológicos de drogas vegetais, com o surgimento de novas formas farmacêuticas e diferentes vias de administração de medicamentos, concomitantemente ao desenvolvimento de métodos analíticos que asseguram a qualidade da matéria-prima e do medicamento, a fitoterapia deixou de se fundamentar no uso tradicional, passando a estar cada vez mais apoiada nos aspectos da qualidade, da eficácia e da segurança (CUNHA *et al.*, 2003).

Os fitoterápicos representam uma classe de medicamentos largamente utilizada no país e constituem um mercado em expansão. Para a produção de um medicamento fitoterápico é necessário conhecimento da droga vegetal com relação aos seus constituintes químicos e atividades biológicas. Além disso, o controle de qualidade da matéria-prima vegetal, envolvendo análises físico-químicas e microbiológicas, é etapa fundamental para alcançar um padrão de qualidade necessário a um medicamento (BARA *et al.*, 2006). Parte deste processo exige o desenvolvimento de métodos analíticos validados para análise da matéria-prima vegetal, com a finalidade de serem definidos seu perfil químico e a substância utilizada para padronização do material. Várias técnicas analíticas podem ser empregadas dentre as quais as mais usadas são a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia gasosa (CG), as quais exigem um padrão de referência comercial ou obtido através de técnicas de isolamento e purificação.

A espécie vegetal *Salvia officinalis* L., Lamiaceae (sálvia), nativa da região Mediterrânea, é muito utilizada tradicionalmente na culinária e para tratar vários problemas de saúde, desde sudorese e transpiração excessiva até problemas gastrointestinais e neurológicos. A sálvia é usada em formulações fitoterápicas e

cosméticas, sendo cada vez mais explorada cientificamente com relação à sua composição química e às suas atividades biológicas. O ácido rosmarínico é uma das substâncias presentes na sálvia que tem atraído a atenção devido ao amplo espectro de atividades biológicas que apresenta. Essa substância é também encontrada em outras espécies de uso culinário e terapêutico, tais como alecrim, tomilho, orégano, manjerição, “boldo falso”, erva-cidreira.

Vários estudos comprovaram o potencial terapêutico do ácido rosmarínico, que explicam o uso tradicional de várias plantas que o contém. Dentre outras atividades, ele possui relevante capacidade antioxidante e neuroprotetora, além de estudos já terem afirmado seu potencial fotoprotetor, por induzir a síntese de melanina na pele (LEE, KIM *et al.*, 2007; SANCHEZ-CAMPILLO *et al.*, 2009). Com relação à atividade melanogênica, não existem relatos na literatura de pesquisas com a sálvia. É provável que a alta concentração de ácido rosmarínico nesta espécie induza uma atuação fotoprotetora, que poderia ser explorada na indústria de alimentos e de fitoterápicos. Porém estudos aprofundados deste provável potencial da sálvia devem ser conduzidos.

Considerando a necessidade de novos agentes terapêuticos para tratamento de doenças relacionadas a patologias pigmentares da pele, o presente trabalho teve o objetivo de estudar o potencial melanogênico da sálvia e do ácido rosmarínico, e verificar a participação desta substância em possível atividade fotoprotetora da espécie. Além disso, considerando o amplo uso da sálvia e do ácido rosmarínico pela medicina popular e em formulações industriais, deseja-se desenvolver e validar uma metodologia analítica para extração e quantificação do ácido rosmarínico da sálvia. Através desse método seria possível, num futuro desenvolvimento de medicamento fitoterápico a base de sálvia, o controle de qualidade da matéria-prima vegetal com relação ao teor de ácido rosmarínico.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Isolar o ácido rosmarínico da espécie vegetal *Salvia officinalis* L., Lamiaceae, validar um método analítico para sua determinação na planta, estudar a toxicidade do ácido rosmarínico e da sálvia e determinar a influência de ambos na melanogênese.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar o ácido rosmarínico do extrato seco de partes aéreas de *Salvia officinalis* L., Lamiaceae;
- Caracterizar a substância por CLAE, espectrometria UV-VIS e por Ressonância Magnética Nuclear (RMN);
- Otimizar, por planejamento fatorial, a extração do ácido rosmarínico da sálvia;
- Desenvolver e validar uma metodologia analítica para determinação de ácido rosmarínico na sálvia;
- Avaliar a toxicidade do ácido rosmarínico e da sálvia com relação aos náuplios do crustáceo *Artemia salina* Leach;
- Determinar a toxicidade do ácido rosmarínico e da sálvia em células das linhagens McCoy e B16F10;
- Analisar a influência do ácido rosmarínico e de extratos de sálvia na melanogênese em células de melanoma murino B16F10.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Salvia officinalis* L., LAMIACEAE

A espécie vegetal *Salvia officinalis* L. (Figura 1) pertence à família Labiatae ou Lamiaceae (subfamília Nepetoideae), a qual compreende 200 gêneros com aproximadamente 7000 espécies distribuídas em todo o mundo. Dentre os gêneros da família destacam-se aqueles com espécies que são usadas como condimento, tais como erva-cravo (*Hyptis*), alfavaca (*Ocimum*), alecrim (*Rosmarinus*), hortelã-pimenta (*Mentha*), manjerição (*Origanum*), manjerona (*Majorana*), basilicão (*Basilicum*), orégano (*Origanum*), tomilho (*Thymus*), erva-cidreira (*Melissa*) e poejo (*Mentha*), entre outras (AREIAS *et al.*, 2000; JOLY, 1985).



FIGURA 1– *Salvia officinalis* L., LAMIACEAE
FONTE: FLICKR (2008)

A *S. officinalis* é conhecida popularmente como sálvia, sangue-de-adão, alegria-dos-jardins, chá-da-europa, chá-da-frança, chá-da-grécia, salva, sabiá, salva-de-remédio, erva-sacra, erva-santa, salva-das-boticas, salva-mansa, salva-dos-jardins e salva-ordinária (CUNHA *et al.*, 2003; JOLY, 1985; LORENZI e MATOS, 2002). A planta é encontrada em sua forma nativa na região Mediterrânea e no leste Adriático, principalmente no norte e centro da Espanha, no sul da França e no sul da Europa. Naturalizou-se no centro-sul da Europa e na Ásia Menor (BISSET e WICHTL, 2001; GRIEVE, 1998; 2000; TEUSCHER, 2006). As principais áreas de cultivo da sálvia são a antiga Iugoslávia (Dalmácia), Albânia, Hungria, Bulgária, Romênia, Espanha, Itália, Turquia, Argélia, República Checa, Alemanha, Federação Russa, Áustria, Índia, Indonésia, Tanzânia, sul da África, Antilhas e

Estados Unidos da América. A sálvia também é largamente cultivada em regiões subtropicadas, subtropicais e tropicais de altitude, como Bermudas, Cuba, Jamaica, Guatemala e Costa Rica. No Brasil, o cultivo da sálvia ocorre principalmente nas regiões sul e sudeste (TEUSCHER, 2006).

A sálvia é cultivada de preferência em terrenos calcários, de clima temperado e com muita luz (CUNHA *et al.*, 2003). Ela prefere solos secos em locais quentes, ensolarados e protegidos do vento. Solos úmidos não são tolerados (TEUSCHER, 2006). Nos países em que a sálvia é cultivada, a colheita ocorre no período de metade de julho até dezembro, dependendo da área. Outubro é o mês recomendado para a colheita da sálvia na antiga Iugoslávia. Sugere-se que a colheita seja feita a partir do segundo ano de vegetação, no início da floração e pela tarde (PDR, 2000). A secagem da planta pode ser feita na luz solar, porém mais de 25% de óleo essencial pode ser perdido. Secagem à sombra reduz a perda de óleo para 2 a 10%. Condição ótima de secagem para prevenir a perda de óleo essencial é dentro de uma câmara de secagem com correntes de ar verticais, à 50°C com 0,9% de umidade absoluta (PDR, 2000).

Todas as partes da planta possuem um odor forte e aromático, e um sabor picante, amargo e adstringente, devido à presença de óleos voláteis nos tecidos vegetais (BISSET e WICHTL, 2001; GRIEVE, 1998; PDR, 2000).

3.1.1 Aspectos Botânicos

A sálvia é um subarbusto verde, de caule lenhoso ereto ou decumbente, ramificado na base formando touceira, com altura entre 30-60 cm (LORENZI e MATOS, 2002; PDR, 2000), podendo chegar a 70 cm (BISSET e WICHTL, 2001) ou 80 cm (TEUSCHER, 2006). Possui folhas de coloração verde acinzentada, opostas cruzadas, inteiras, denso-pubescentes em ambas as faces, oblongas ou oblongo-lanceoladas, as inferiores são pecioladas e as superiores são sésseis, apresentando de 3-10 cm de comprimento e até 3 cm de largura (Figura 2). Apresenta flores vistosas, reunidas, de 6 a 8 (TEUSCHER, 2006) ou de 4 a 8 (PDR, 2000), em densas inflorescências (Figura 3) quase sempre axilares, com coloração que varia do violeta azulado, até rosa e branco (Figura 4) (BISSET e WICHTL, 2001; GRIEVE, 1998; JOLY, 1985; LORENZI e MATOS, 2002; PDR, 2000; TEUSCHER, 2006).



FIGURA 2– FOLHAS DE SÁLVA
FONTE: FLICKR (2008)



FIGURA 3– INFLORESCÊNCIA DE SÁLVA
FONTE: FLICKR (2008)



FIGURA 4 – FLORES DE SÁLVA
FONTE: FLICKR (2008)

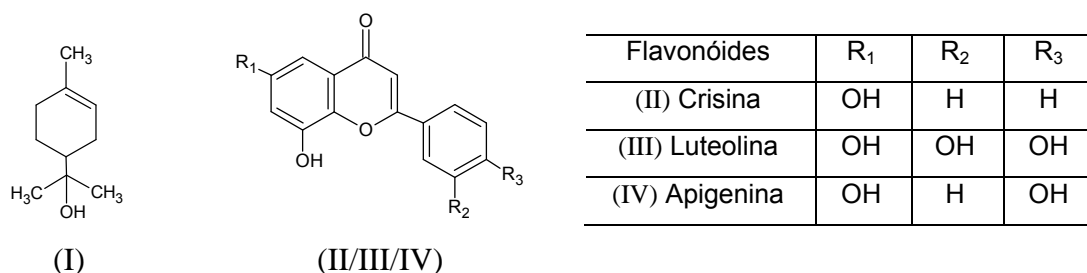
As flores (Figura 4) são diclamídeas, hermafroditas, pentâmeras, fortemente zigomorfas, bilabiadas. O androceu é formado por 2 a 4 estames. As anteras são modificadas, apresentando-se com uma só antera fértil e a outra transformada em alavanca. O ovário é súpero, bicarpelar, bilocular, com 2 óvulos em cada lóculo, sempre falsamente tetralocular por invaginação dos carpelos. Assenta sobre um disco glandular unilateral expandido e saliente. O estilete apresenta-se ginobásico. O fruto é seco, separando-se caracteristicamente em 4 frutículos parciais (núculas), sendo que cada núcula é uma pequena noz (BISSET e WICHTL, 2001; GRIEVE, 1998; JOLY, 1985; LORENZI e MATOS, 2002; PDR, 2000; TEUSCHER, 2006).

3.1.2 Composição química

O óleo essencial da sálvia (1-2,5%) contém α e β -tujona (20-60%), 1,8-cineol (6-16%), cânfora (14-37%), borneol, limoneno, mirceno, α -terpineol (I), manol, canfeno, linalol, α e β -pineno, viridiflorol, α e β -cariofileno (humuleno) (BISSET e WICHTL, 2001; LORENZI e MATOS, 2002; 2000; TEUSCHER, 2006). Estudo da fração volátil de várias espécies de *Salvia* (*S. officinalis*, *S. tomentosa*, *S. fruticosa*, *S. candelabrum*, *S. ringens*, *S. lavandulifolia*) demonstrou que as espécies *S. officinalis* e *S. fruticosa* são as que apresentam maior concentração da neurotoxina tujona (MATHE *et al.*, 2007). Mais de 50 substâncias foram identificadas no óleo essencial de caules e folhas de sálvia, sendo que 40 delas também foram encontradas em suas flores. O teor dos principais componentes do óleo da sálvia, como os terpenos, apresentou variação conforme a época do ano em que a espécie foi coletada. O composto α -tujona foi o encontrado em maior quantidade no caule, nas folhas e nas flores de sálvia (GOMES e FERREIRA, 2001; RAAL *et al.*, 2007).

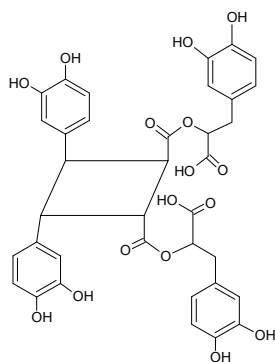
Apesar de a sálvia ser conhecida principalmente por seu conteúdo de óleo essencial, também é rica em substâncias mais polares, dentre as quais se destacam os compostos fenólicos. Como derivados do ácido hidroxicinâmico e ácidos carboxílicos fenólicos estão o ácido rosmarínico (0,1 a 3,3%), o ácido clorogênico, os cafeoil e *p*-hidroxibenzoil-glicosídeos, o ácido *p*-hidroxibenzóico, o ácido caféico e o 1-O-(2,3,4-tri-hidroxi-3-metil)-butil-6-O-feruloil- β -D-glicosídeo (BISSET e WICHTL, 2001; GLASBY, 1991; PDR, 2000; TEUSCHER, 2006). Dentre os flavonóides destacam-se a apigenina (II), a luteolina (III), a 6-hidroxluteolina, a

crisina (IV), a vicenina-2, e inúmeras agliconas metoxiladas, incluindo, entre outras, genkvanina, genkvanina-6-metiléter e salvigenina-5-metiléter (GLASBY, 1991; PDR, 2000; TEUSCHER, 2006).

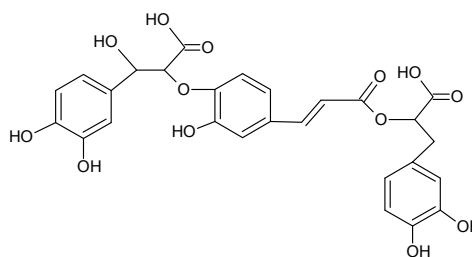


Os compostos fenólicos mais abundantes nos extratos metanólico e aquoso de *S. officinalis* são o ácido rosmarínico e a luteolina-7-O-glicosídeo. (LIMA, VALENTAO *et al.*, 2007). Essas duas substâncias, junto ao ácido caféico, a apigenina, a hispidulina e a cirsimaritina, foram os únicos derivados fenólicos em concentração suficiente para quantificação na *S. officinalis* (AREIAS *et al.*, 2000). Dois derivados do ácido rosmarínico, o ácido sagerínico (V) e o ácido salvianólico K (VI), foram identificados no extrato polar de sálvia (LU e FOO, 1999), e seis substâncias foram isoladas do extrato butanólico de folhas de sálvia, sendo elas o 1-O-(2,3,4-tri-hidroxi-3-metil)butil-6-O-feruloil-β-D-glicopiranosídeo, etil-β-D-glicopiranosil tuberonato, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido (-)-hidroxijasmônico, ácido caféico, e 4-hidroxiacetofenona-4-O-[5-O-(3,5-dimetóxi-4-hidroxibenzoil)-β-D-apiofuranosil]-(1→2)-β-D-glicopiranosídeo (WANG *et al.*, 2000).

Diterpenóides também são descritos na sálvia, com predominância do ácido carnosólico (salvina- 0,2-0,4%), o qual dá origem ao carnosol (picrosalvina). Dentre outros diterpenóides destacam-se o rosmanol, o manol, e a saficinolida. O ácido ursólico (2-5%), o ácido oleanólico e seus derivados são os representantes triterpenóides da sálvia (BISSET e WICHTL, 2001; GLASBY, 1991; PDR, 2000; TEUSCHER, 2006).



(V)



(VI)

Na análise realizada com a fração não-volátil do extrato de *S. officinalis*, foram identificados a feniletanolida martinósídeo, primeiro glicosídeo do tipo feniletanolida isolado do gênero e da subfamília Nepetoideae, e os diterpenóides carnosato de 7-metila, rosmanol-7-metiléter e sageona (MATHE *et al.*, 2007).

3.1.3 Usos populares e medicinais

As folhas de *S. officinalis* são amplamente empregadas como condimento na culinária de vários países desde tempos medievais, além de também ser cultivada no Hemisfério Norte como planta ornamental (LORENZI e MATOS, 2002). Na culinária, usam-se folhas frescas cortadas em pedaços ou inteiras, e também folhas secas fragmentadas ou trituradas para temperar carnes, sopas, molhos e saladas (TEUSCHER, 2006). O óleo de sálvia é usado na indústria de perfumes, e o extrato da planta é usado como antitranspirante, como antiséptico, para limpeza da pele e para tratamento de poros dilatados. Ele é usado também em produtos para banho, em desodorantes bucais e em produtos para gargarejo (TEUSCHER, 2006).

Na medicina popular, a *S. officinalis* é usada internamente para distúrbios gástricos, perda de apetite, inchaço, flatulência, diarreia, enterites, salivação, transpiração excessiva, problemas de fígado, dor de cabeça, exaustão nervosa, ansiedade, depressão, ataque cardíaco, tosse, laringite, faringite, problemas de menopausa, problemas menstruais e para cessar a lactação. É empregada como auxiliar no tratamento da gota, diabetes, bronquite crônica e constipação. Externamente, é usada para enxaguar/lavar lesões leves e inflamações na pele, e como agente anti-hemorrágico e coagulante (BISSET e WICHTL, 2001; LORENZI e

MATOS, 2002; PDR, 2000; TEUSCHER, 2006). Por sua ação em hiper-hidroses, a sálvia é usada em pacientes com tuberculose, os quais possuem sudorese excessiva durante a noite (BISSET e WICHTL, 2001). A sálvia possui ação antibacteriana, fungistática, virostática, adstringente e secretolítica, e seu óleo essencial apresenta ação bactericida, fungiosstática e virostática. Algumas dessas ações são exploradas por seu uso como enxaguatório bucal (PDR, 2000).

A droga vegetal, seus extratos (tinturas, extratos fluidos) e óleo essencial são componentes de vários medicamentos para a boca, garganta e trato gastrointestinal, como Salus[®] Salbei-Tropfen (gotas), Salviathymol[®] e Enterosanol[®], todos de origem alemã. A sálvia é geralmente comercializada para uso popular no Brasil na forma seca fragmentada ou triturada, e na forma de extratos, líquidos ou em pó. Para uso como tempero, também é encontrada na forma fresca.

3.1.4 Ações Biológicas

A *S. officinalis* é destacada por sua relevância no tratamento de desordens cognitivas, principalmente por inibir a acetilcolinesterase e por possuir atividades antiinflamatória e antioxidante, sendo considerada como agente para tratamento da doença de Alzheimer (IZZU e CAPASSO, 2007). O extrato de *S. officinalis* foi eficaz no tratamento da doença de Alzheimer leve a moderada em pacientes entre 65 e 80 anos, melhorando significativamente a função cognitiva sem ocorrência de efeitos colaterais, reduzindo inclusive a agitação com relação aos pacientes tratados com placebo (AKHONDZADEH *et al.*, 2003). Esse mesmo efeito da sálvia na cognição foi observado em pacientes mais novos, com idade média de 24 anos (KENNEDY *et al.*, 2006). Mostrou-se que o extrato etanólico de folhas de sálvia interage com os sistemas colinérgicos muscarínico e nicotínico, sendo capaz de potencializar a retenção de memória (EIDI *et al.*, 2006). Outro estudo realizado com a sálvia em pacientes entre 65 e 90 anos mostrou resultados positivos com relação à memória secundária e à atenção dos pacientes, e ainda confirmou através de testes *in vitro* a atividade anticolinesterásica da espécie (SCHOLEY *et al.*, 2008).

A *S. officinalis* possui significativa atividade antioxidante, já comprovada por diferentes métodos analíticos, que contribui para outras atividades biológicas desta espécie. Um estudo que avaliou a capacidade antioxidante de vários extratos de

sálvia através do método de redução do DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila) mostrou que o maior potencial antioxidante foi apresentado pelo extrato com maior concentração de polifenóis, como o ácido rosmarínico e o ácido caféico (OLLANKETO *et al.*, 2002). Grande parte da ação antioxidante da sálvia deve-se aos derivados do ácido caféico e rosmarínico, e aos flavonóides luteolina, apigenina e seus derivados glicosídeos. A ação antioxidante dos derivados do ácido rosmarínico apresentou-se de 15 a 20 vezes maior que a apresentada pelo padrão trolox (LU e FOO, 2001). Extração com acetona de brotos e de plantas adultas de sálvia originou extratos com comprovada capacidade de inibir a oxidação lipídica, sendo esta mais intensa para os brotos, considerando a possibilidade de utilização de culturas *in vitro* de sálvia como fonte de antioxidantes naturais (GRZEGORCZYK *et al.*, 2007).

Extratos aquoso e metanólico de sálvia, ricos em ácido rosmarínico e luteolina-7-O-glicosídeo, mostraram-se eficientes na proteção de células hepáticas HepG2 contra a morte por peroxidação lipídica, e ainda preveniram a depleção de GSH pelo toxicante, o que indica que os extratos induzem aumento na capacidade antioxidante das próprias células (Lima *et al.*, 2007). Chá de sálvia foi capaz de reduzir significativamente o nível de colesterol total e de LDL e de aumentar o nível de HDL após 4 semanas de tratamento em humanos. Essa ação mostrou-se associada à capacidade antioxidante da sálvia, sugerindo que esta pode contribuir positivamente no controle de dislipidemias, frequentemente observadas em pacientes diabéticos tipo II e em outras patologias (SA *et al.*, 2009). Além disso, esse mesmo chá de sálvia foi capaz de aumentar a capacidade antioxidante dos eritrócitos humanos, por aumentar a atividade da superóxido dismutase e da catalase após duas semanas de tratamento (LIMA *et al.*, 2005; LIMA, FERNANDES-FERREIRA *et al.*, 2007; SA *et al.*, 2009).

Um estudo testou um extrato aquoso de folhas de sálvia contra o vírus HIV-1 em células T humanas e em macrófagos primários, e mostrou que a sálvia é capaz de aumentar a densidade dos vírions, inibindo a infecção das células pelo HIV-1 (GEUENICH *et al.*, 2008). Extratos aquoso e, principalmente, etanólico 20% de *S. officinalis* apresentaram alta atividade virucida *in vitro* contra os vírus do herpes simples tipo 1 (HSV-1) e tipo 2 (HSV-2) (SCHNITZLER *et al.*, 2008).

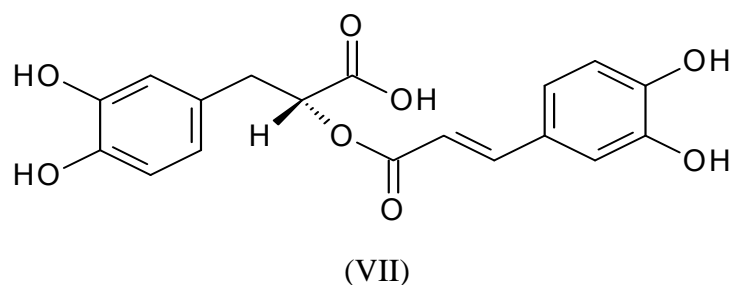
Resultados de uma pesquisa mostraram que o extrato metanólico de sálvia administrado intraperitonealmente reduziu significativamente a glicose sanguínea em camundongos com diabetes induzida, sem alterar os níveis de insulina, ao contrário do observado para o óleo essencial da espécie (EIDI *et al.*, 2005). O chá de sálvia reduziu os níveis de glicose plasmáticos em camundongos normais, mas não teve efeito na eliminação da glicose, indicando efeito na inibição da gliconeogênese hepática. O óleo essencial de sálvia aumentou a sensibilidade dos hepatócitos à insulina e também inibiu a gliconeogênese. Sugeriu-se que a sálvia pode ser usada como suplemento alimentício na prevenção do diabetes tipo II por reduzir a glicose plasmática em indivíduos em risco (LIMA *et al.*, 2006).

Um extrato hidroalcoólico de sálvia apresentou significativa atividade gastrointestinal, acelerando a cicatrização e reduzindo a formação de úlceras induzidas pelo ácido acético e pelo etanol, e diminuindo a acidez da secreção gástrica, e ainda mostrou inibição *in vitro* da atividade da bomba de H^+/K^+ -ATPase, sendo o carnosol o possível constituinte ativo com efeito gastroprotetor (MAYER *et al.*, 2009). Estudo dos extratos hexânico e clorofórmico da sálvia mostrou que ambos foram capazes de inibir o edema induzido na orelha de camundongos pelo óleo de Cróton de forma concentração- dependente, e esta atividade esteve relacionada com o ácido ursólico, que apresentou atividade antiinflamatória duas vezes maior que a indometacina, referência de agente antiinflamatório não-esteroidal (BARICEVIC *et al.*, 2001). O extrato de sálvia, rico em diterpenos, foi capaz de reduzir significativamente a formação de eritema induzido por ultravioleta, e o ácido carnósico e o carnosol, que apresentam alta capacidade antioxidante e antiinflamatória, foram relacionados a esta atividade, sugerindo que o extrato de sálvia com alto teor desses componentes pode ser útil para tratamento tópico de doenças inflamatórias da pele (REUTER *et al.*, 2007).

3.2 ÁCIDO ROSMARÍNICO

O ácido rosmarínico (VII) é um éster dos ácidos caféico e 3,4-dihydroxifenillático, encontrado como um metabólico secundário de várias espécies vegetais. Seu nome é proveniente do nome da primeira planta da qual foi isolado, o *Rosmarinus officinalis* (alecrim), e foi dado pelos químicos italianos Scarpati e

Oriente¹ (1958, citado por Petersen e Simmonds, 2003). Ele é encontrado principalmente em espécies da família Boraginaceae e da subfamília Nepetoideae da família Lamiaceae, mas já foi descrito em outras famílias vegetais, como nas Blechnaceae (samambaias), nas Zosteraceae, nas Potamogetonaceae e nas Cannaceae, entre outras (PETERSEN e SIMMONDS, 2003).



Dentre as espécies vegetais que contém o ácido rosmarínico destacam-se: *Anethum graveolens* (endro), *Artemisia dracunculus* (estragão), *Betonica officinalis* (betônica), *Borago officinalis* (borragem), *Glechoma hederacea* (erva-terrestre), *Hyssopus officinalis* (hissopo), *Lavandula angustifolia* (alfazema), *Lycopus europaeus* (licopus), *Majorana hortensis* (manjerona), *Melissa officinalis* (erva-cidreira), *Mentha arvensis piperascens* (hortelã), *Mentha pulegium* (poejo), *Mentha spicata* (hortelã-peluda), *Momordica charantia* (melão-de-são-caetano), *Monarda didyma* (bergamota), *Nepeta cataria* (gataria), *Ocimum basilicum* (manjeriço), *Origanum vulgare* (orégano), *Orthosiphon aristatus* (ortosifão), *Petroselinum crispum* (salsinha), *Prunella vulgaris* (brunela), *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Salvia officinalis* (sálvia), *Salvia sclarea* (sálvia-esclaréia), *Salvia sp.*, *Satureja hortensis* (segurelha), *Satureja montana* (segurelha), *Symphytum officinalis* (confrei), *Thymus serpyllum* (serpilho), *Thymus vulgaris* (tomilho) (Ácido rosmarínico, 2008).

3.2.1 Propriedades Químicas

O ácido rosmarínico possui fórmula molecular $C_{18}H_{16}O_8$, e também é designado pelos nomes ácido α -O-cafeoil-3,4-di-hidroxifenilático; ácido α -[3-(3,4-di-hidroxifenil)-1-oxo-2-propenil]-3,4-di-hidroxi-benzenopropanóico; ácido 3-(3,4-di-

¹ SCARPATI, M. L.; ORIENTE, G. Isolamento e costituzione dell'acido rosmarínico (dal *Rosmarinus off.*). *Ric. Sci.*, v.28, p. 2329-2333, 1958.

hidroxifenil)-2-[3-(3,4-di-hidroxifenil)-1-oxo-2-propeniloxi]-propanóico; ácido rosemarínico. Apresenta número de registro CAS 20283-92-5 (Rosmarinic acid, 2009).

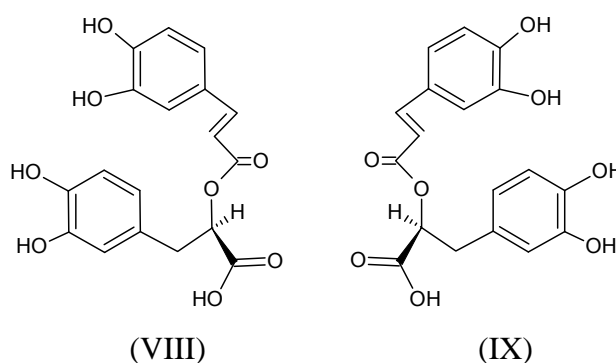
Algumas propriedades químicas do ácido rosemarínico estão descritas na Tabela 1.

TABELA 1 - PROPRIEDADES QUÍMICAS DO ÁCIDO ROSMARÍNICO

Ponto de ebulição (pressão 760 Torr)	694,7 ±55,0 °C
Densidade (pressão 760 Torr / 20 °C)	1,547 ±0,06 g/cm ³
Entalpia de vaporização (pressão 760 Torr)	106,87 ±3,0 kJ/mol
Ponto de fusão	254,5 ±25,0 °C
Solubilidade (água / pH 2,76 / 25 °C)	Ligeiramente solúvel (1,3 g/l) Molar – moderadamente solúvel (3,6E-3 mol/L)
Peso Molecular	360,31
pKa (meio ácido / 25 °C)	2,78 ±0,10
Pressão de vapor (25 °C)	2,92E-20 Torr

FONTE: Rosmarinic acid (2009)

O ácido rosemarínico possui um centro quiral e apresenta, portanto, duas formas enantioméricas (R)(+) (VIII) e (S)(-) (IX) (TRUTE e NAHRSTEDT, 1996).



Trute e Nahrstedt (1996) desenvolveram três métodos para a separação enantiomérica do ácido rosemarínico, aplicando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Eletroforese Capilar (EC) e Cromatografia gasosa. O cromatograma obtido a partir da análise por CLAE está representado na Figura 5. Neste trabalho ainda foi realizado o isolamento do ácido rosemarínico da espécie vegetal *Hedera helix* L. (Araliaceae), e este foi determinado, através dos métodos desenvolvidos para separação enantiomérica, como sendo o (R)(+)–ácido

rosmarínico. A atividade óptica e o ponto de fusão do ácido rosmarínico foram determinados como $+106^\circ$ (21°C / $c=0,175$ em etanol 96%) e 197°C , respectivamente (Trute e Nahrstedt, 1996).

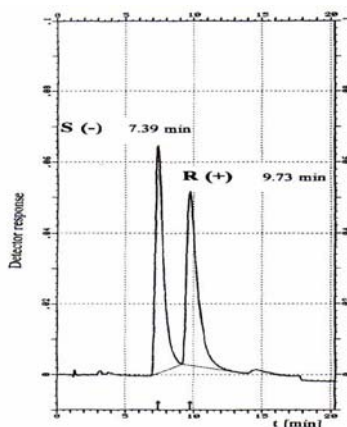


FIGURA 5– CROMATOGRAMA DOS ENANTIÔMEROS (R)-(+)¹ E (S)-(-)² DO ÁCIDO ROSMARÍNICO ISOLADO DE *H. helix*
 FONTE: TRUTE E NAHRSTEDT (1996)

Quando isolado pela primeira vez da espécie vegetal *Rosmarinus officinalis*, o ácido rosmarínico apresentou atividade óptica igual a $+140^\circ$ e foi caracterizada como a forma enantiomérica (R)(+)-ácido rosmarínico (Scarpati e Oriente, 1958², 1960³, *apud* Trute e Nahrstedt, 1996). Não existem relatos na literatura consultada até o momento sobre a forma enantiomérica do ácido rosmarínico isolado da sálvia.

3.2.2 Biossíntese do ácido rosmarínico em plantas

As enzimas envolvidas na biossíntese vegetal do ácido rosmarínico foram elucidadas por Petersen e colaboradores (1993, 1994, 1997), que utilizaram suspensões de culturas de *Anchusa officinalis* (Boraginaceae) e *Coleus blumei* (Lamiaceae) para tal (PETERSEN, 1997; PETERSEN *et al.*, 1993; PETERSEN *et al.*, 1994). A Figura 6 mostra a rota biossintética do ácido rosmarínico, que se inicia a partir dos aminoácidos fenilalanina e tirosina (PETERSEN e SIMMONDS, 2003).

² SCARPATI, M. L.; ORIENTE, G. Isolamento e costituzione dell'acido rosmarínico (dal *Rosmarinus off.*). *Ric. Sci.*, v.28, p. 2329-2333, 1958.

³ SCARPATI, M. L.; ORIENTE, G. Costituzione stereochemica dell'acido $\beta(3,4\text{-diossifenil})\alpha\text{-lattico}$ dal *Rosmarinus off.* *Ric. Sci.* v. 30, p. 255-259, 1960.

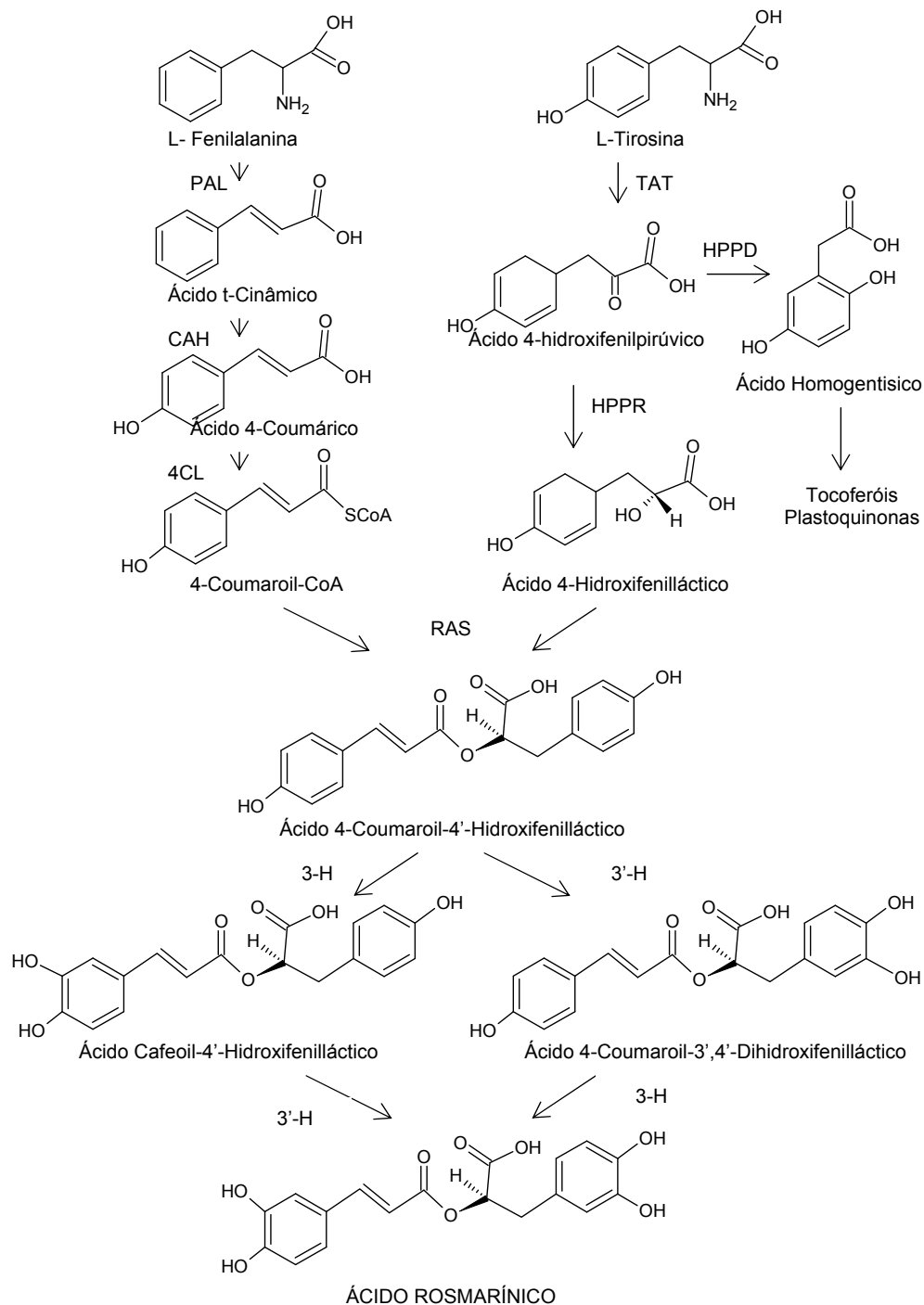


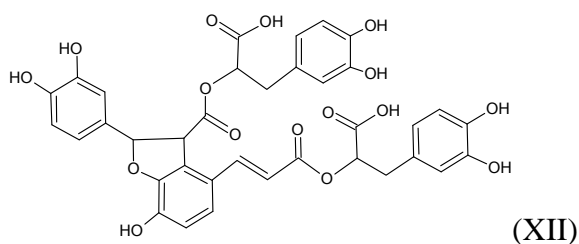
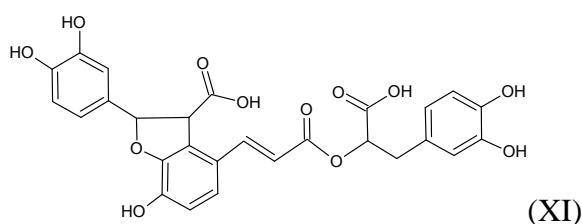
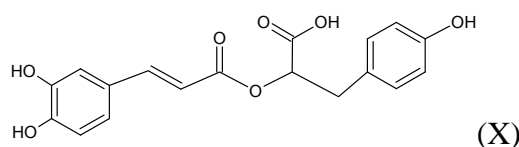
FIGURA 6– ROTA BIOSSINTÉTICA DO ÁCIDO ROSMARÍNICO

FONTE: PETERSEN e SIMMONDS (2003)

NOTA: PAL=fenilalanina amônia-transferase; CAH=ácido cinâmico 4-hidroxilase;
 4CL=hidroxicinamato:coenzima A ligase; TAT=tirosina aminotransferase;
 HPPR=hidroxifenilpiruvato redutase; HPPD=hidroxifenilpiruvato dioxidase;
 RAS=hidroxicinamoil-CoA:hidroxifenil-lactato hidroxicinamoil transferase;
 3-H, 3'-H=hidroxicinamoil-hidroxifenil-lactato 3- e 3'-hidroxilases.

3.2.3 Derivados

Um grande número de derivados do ácido rosmarínico foi identificado em espécies vegetais. Dentre eles destacam-se o ácido sagerínico e o ácido salvianólico K, presentes na *S. officinalis* (LU e FOO, 1999), e os ácidos isorínico (ácido 3'-deoxirosmarínico) (X), litospérmico (XI) e litospérmico B (XII), resultantes, respectivamente, da perda de um grupamento hidroxila do anel fenólico do grupo hidroxifenilático, da conjugação entre o ácido rosmarínico e o ácido caféico, e da dimerização do ácido rosmarínico (PETERSEN e SIMMONDS, 2003).

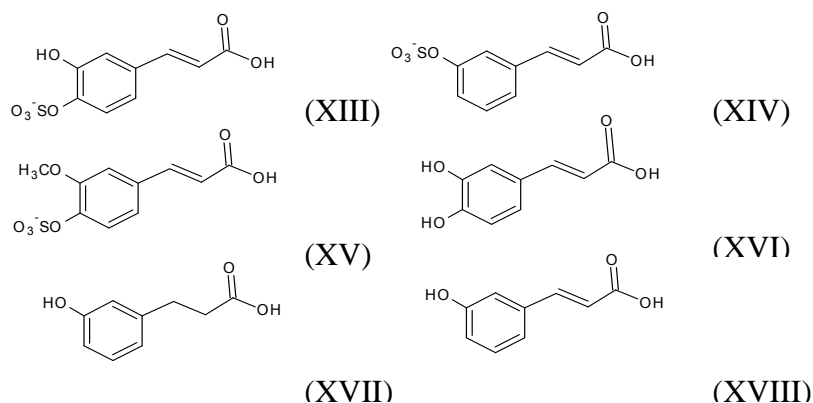


3.2.4 Metabolismo

Experimentos em camundongos demonstraram que o ácido rosmarínico, quando aplicado topicamente na pele, é absorvido e distribuído pela pele, sangue, ossos e músculos. Já quando administrado por via intravenosa, distribui-se por vários tecidos, como rins, coração, fígado e baço (Ritschel *et al.*, 1989⁴), *apud*

⁴ Ritschel, W. A., *et al.* Percutaneous absorption of rosmarinic acid in the rat. **Methods Find Exp Clin Pharmacol**, v.11, p.345-352. 1989.

(BABA *et al.*, 2004). Os principais metabólitos do ácido rosmarínico encontrados na urina, após administração oral da substância em camundongos, foram 4-O-sulfato-*trans*-caféico (XIII); ácido 3-O-sulfato *trans-m*-coumárico (XIV); ácido 4-O-sulfato *trans*-ferúlico (XV); ácido *trans*-caféico (XVI); ácido *m*-hidroxifenilpropiónico (XVII); ácido *trans-m*-coumárico (XVIII); e ácido rosmarínico inalterado. Os metabólitos (XIV), (XV), (XVII) e (XVIII) também foram detectados no plasma dos animais. (NAKAZAWA e OHSAWA, 1998), além do ácido rosmarínico inalterado e do ácido rosmarínico monometilado. Todos os metabólitos do sangue e da urina apresentaram-se predominantemente como glicuronídeos ou sulfatos. Pela ausência de metabólitos na bile sugeriu-se excreção preferencial do ácido rosmarínico pela urina, através de reações como quebra de grupamento éster, *para*-dehidroxilação seletiva, metilação e conjugação com sulfato. Os resultados sugerem que o ácido rosmarínico é absorvido e metabolizado nas formas conjugadas ou metiladas dos ácidos caféico, ferúlico e coumárico, antes de ser excretado na urina (BABA *et al.*, 2004; JIROVSKY *et al.*, 2007).



Outro estudo identificou a substância 1-O-(2,4,5-trimetoxicinamoil)- β -glicuronídeo como produto de excreção do ácido rosmarínico na urina, após administração oral de extrato de *Perilla frutescens* por humanos (NAKAZAWA e OHSAWA, 2000). O ácido rosmarínico não foi capaz de alterar as enzimas de metabolização de xenobióticos em fígado de camundongos, sugerindo-se que esta substância é metabolizada antes de chegar ao fígado (DEBERSAC *et al.*, 2001).

3.2.5 Atividades Biológicas

Diversas atividades biológicas vem sendo descritas para o ácido rosmarínico, dentre as quais podemos destacar: neuroprotetora, antioxidante, antiinflamatória, antimutagênica, antibacteriana e antiviral (PETERSEN e SIMMONDS, 2003). O ácido rosmarínico é um dos componentes mais ativos da *S. officinalis*, dentre outras espécies. Ele apresenta considerável atividade antioxidante, reduzindo inúmeros eventos deletérios ao organismo, como a formação de espécies reativas de oxigênio, a peroxidação lipídica e a fragmentação do DNA (IZZO e CAPASSO, 2007; JI e ZHANG, 2008).

Tanto o extrato de folhas de sálvia como o ácido rosmarínico isolado foram capazes de reduzir a morte de células feocromocitoma (PC12) de camundongos, provocada pelo peptídeo β -amilóide indutor da doença de Alzheimer. A substância isolada conseguiu inibir a formação de espécies reativas de oxigênio, a peroxidação lipídica e a fragmentação do DNA. Com isso, tem-se que tanto a espécie vegetal como o ácido rosmarínico possuem ação neuroprotetora e podem prevenir problemas de memória, explicando o uso tradicional da sálvia no tratamento da doença de Alzheimer (ALKAM *et al.*, 2007; IUVONE *et al.*, 2006). Investigou-se a ação anticolinesterásica do ácido rosmarínico através de experimentos *in vitro* e os resultados mostraram que essa substância liga-se à enzima e tem ação inibitória sobre a mesma, o que contribui para a melhora de distúrbios de memória em indivíduos idosos (YIN *et al.*, 2008). Em estudo no qual o ácido rosmarínico foi injetado intraperitonealmente em camundongos, mostrou ter efeitos no comportamento e na ansiedade, sugerindo atividade ansiolítica, sem afetar a memória de curta e longa duração (PEREIRA *et al.*, 2005).

Como citado anteriormente, o ácido rosmarínico apresenta atividade antioxidante considerável, a qual é em grande parte responsável pela ação neuroprotetora da substância. O ácido rosmarínico, isolado da *Perilla frutescens* var. *acuta*, apresentou significativa atividade antioxidante, podendo ser considerado um grande responsável pelo potencial de captação de radicais livres apresentado pela espécie (GU *et al.*, 2008). Os derivados do ácido rosmarínico do extrato de sálvia foram as substâncias que apresentaram maior potencial antioxidante, de 15 a 20 vezes maior que o potencial apresentado pelo padrão de antioxidante trolox,

podendo ser considerados muito importantes na ação antioxidante da espécie vegetal (LU e FOO, 2001). Estudo com outras espécies de *Salvia* também evidenciou o ácido rosmarínico e seus derivados como principais responsáveis pela atividade antioxidante observada (TEPE, 2008). O ácido rosmarínico foi capaz de atenuar a injúria celular induzida pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por suas atividades antiapoptóticas e antioxidantes, aumentando o potencial de membrana mitocondrial e inibindo a atividade da caspase-3, assim como atenuando o estresse oxidativo celular pela captação de espécies reativas de oxigênio (GAO *et al.*, 2005). A espécie *Plectranthus barbatus* (“falso boldo”) apresenta alta concentração de ácido rosmarínico, e esta substância foi a responsável por grande parte da atividade antioxidante e anticolinesterásica apresentada pela espécie (FALE *et al.*, 2009).

O ácido rosmarínico apresenta atividade antitumoral, principalmente relacionada à inibição da expressão de fatores tumorais (LEE *et al.*, 2006).

Um estudo sobre os efeitos do ácido rosmarínico na formação da placa aterosclerótica em camundongos deficientes em apolipoproteína E (ApoE), mostrou que essa substância pode reduzir o nível de lipídeos sanguíneos e de outros fatores no soro sanguíneo, controlando o aumento da placa aterosclerótica na cavidade aórtica. Com isso, concluiu-se que o ácido rosmarínico pode inibir a progressão da aterosclerose, o que provavelmente está relacionado às ações na regulação do metabolismo lipídico e na inibição da reação inflamatória do mesmo (LI *et al.*, 2008).

Realizou-se também um estudo no qual foi comprovada a atividade anti-HIV de derivados nitro do ácido rosmarínico. Foi testada a influência dos ácidos 6'-nitro e 6',6''-dinitrorosmarínico sobre a enzima HIV-1 integrase e ainda testou-se o efeito inibitório dos mesmos na contaminação celular por HIV-1 em culturas de células linfócitos MT-4 humanas. Ambos os derivados nitro do ácido rosmarínico foram ativos como inibidores da enzima HIV-1 integrase, e ainda foram capazes de inibir a replicação viral em células MT-4, sem causar toxicidade celular (DUBOIS *et al.*, 2008).

O ácido rosmarínico ainda mostrou atividade hipoglicemiante, reduzindo os níveis de glicose plasmática tanto via gliconeogênese como via glicogenólise, podendo ser usado como preventivo ao diabetes tipo II. (VALENTOVA *et al.*, 2007).

Estudou-se a ação do ácido rosmarínico na melanogênese em células de melanoma murino B16. O ácido rosmarínico foi capaz de induzir a síntese de

melanina através da ativação da proteína quinase A (PKA), e, dessa forma, atuar como preventivo contra fotocarcinogêneses epidérmicas (LEE, KIM *et al.*, 2007). Essa substância também apresentou ação estimulante da expressão da tirosinase *in vitro*, enzima chave da melanogênese, e capacidade de inibir alterações cutâneas (fotocarcinogêneses) causadas pela exposição à UVA, podendo ser estudada como um possível agente fotoprotetor (SANCHEZ-CAMPILLO *et al.*, 2009).

3.3 MELANOGÊNESE

A melanogênese é um processo que ocorre dentro dos melanócitos, células pigmentares de origem neuroectodérmica, localizadas nas camadas mais profundas (basal e espinhosa) da epiderme. Os melanócitos liberam de seu interior grânulos de pigmentos denominados melanossomos, onde a melanina é produzida e carregada aos queratinócitos circundantes (Figura 7). O conjunto formado por 36 queratinócitos e um melanócito constitui uma unidade epidérmica de pigmentação (HADLEY, 1996). Os queratinócitos se diferenciam e migram para as camadas mais superficiais da epiderme, e os melanossomos são degradados com liberação da melanina, conferindo pigmentação à pele (HOOGDUIJN *et al.*, 2004).

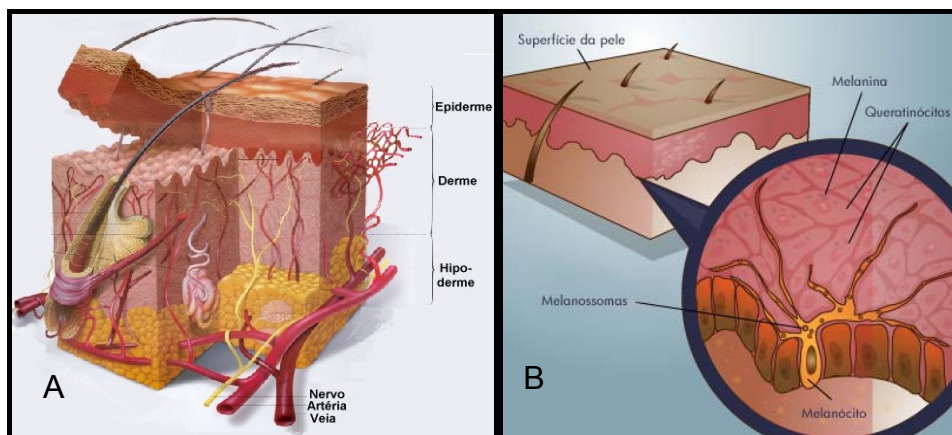


FIGURA 7- ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA PELE (A) E CAMADAS BASAL E ESPINHOSA DA EPIDERME (B)

FONTE: MELANINA (2010); PELE (2010)

NOTA: Estratificação da pele nas camadas epidérmica, dérmica e hipodérmica (A). Apresentação do melanócito na camada basal da epiderme, com protuberâncias que se estendem até a camada espinhosa e que carregam melanossomos com melanina para os queratinócitos circundantes (B).

A melanina é o pigmento mais bem distribuído na natureza. Ela pode ser encontrada em bactérias, fungos e plantas, e em animais ocorre principalmente na orelha interna, nos olhos, no cabelo e na pele de mamíferos (HOOGDUIJN *et al.*, 2004). A melanina é uma importante defesa da pele contra os efeitos deletérios da radiação ultravioleta (UV), já que ela é capaz de absorver e refletir raios UV e captar espécies reativas de oxigênio (ROS). Por esse motivo, a produção e a distribuição anormal da melanina causam uma série de problemas na pele (VIRADOR *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 2009), pois existe uma relação inversa entre a pigmentação da pele e a incidência de doenças malignas, como o melanoma, e de prejuízos à pele provocados pelo UV. Além disso, a pigmentação em humanos ainda desempenha um importante papel estético, que pode ser comprometido em certas situações de hipo e de hiperpigmentação da pele, como vitiligo, sardas, manchas relacionadas à idade e hiperpigmentação causada por inflamações na pele, como eczema, dermatite alérgica de contato e dermatite alérgica irritante (LEE, JUNG *et al.*, 2007; VIRADOR *et al.*, 1999). O vitiligo é caracterizado pela despigmentação de pequenas ou grandes áreas, ocorrendo uma completa ausência de produção de melanina nessas regiões (DUNN, 1986). Três possíveis mecanismos patogênicos estão associados a esta doença: autotoxicidade, causada pela produção excessiva de radicais provenientes da síntese de melanina; fator neurológico, causado pela destruição de porções terminais de nervos autonômicos; e fator imunológico, causado pela existência de anticorpos anti-tirosinase, ou pela excessiva ativação da imunidade celular (MACHADO FILHO *et al.*, 2005).

A melanina é um biopolímero heterogêneo do tipo polifenol com uma complexa estrutura e cores que variam desde o amarelo até o preto. A cor da pele e do pêlo de mamíferos é determinada pelo tipo, pela síntese e pela distribuição da melanina na região (KIM e UYAMA, 2005). O principal estímulo fisiológico à melanogênese humana é a radiação ultravioleta (UV). O escurecimento da pele humana resultante do aumento da melanina após exposição à luz do sol ou a fontes artificiais de luz UV é comumente conhecida como bronzeamento (ABERDAM *et al.*, 1993)

A síntese de melanina ocorre através de uma série de reações oxidativas envolvendo a tirosina na presença da tirosinase (KIM e UYAMA, 2005). O envolvimento da radiação UV no estímulo a essa síntese foi comprovado por vários

estudos, sendo que um deles demonstrou ocorrer um aumento da atividade da tirosinase, principalmente à sua ação DOPA oxidase, e um estímulo à síntese *de novo* de melanina quando a pele sofreu sucessivas irradiações UV (ABERDAM *et al.*, 1993)

A tirosinase (EC 1.14.18.1) é uma enzima que requer cobre como co-fator e que catalisa duas etapas da síntese de melanina. A primeira delas, limitante da melanogênese, é a hidroxilação da tirosina a 3,4-di-hidroxifenilalanina (L-DOPA) ou diretamente a *o*-dopaquinona pela tirosinase. A *o*-dopaquinona é convertida a L-DOPA e a dopacromo através de auto-oxidação em pH fisiológico. A L-DOPA também é substrato da tirosinase, sendo oxidada a *o*-dopaquinona enzimaticamente. Finalmente, a eumelanina é formada através de uma série de reações oxidativas a partir do dihidroxindol (DHI) e do ácido dihidroxindol-2-carboxílico (DHICA), os quais são formados a partir do dopacromo. Na presença de cisteína e de glutatona, a dopaquinona é convertida em cisteinildopa ou glutationildopa, a partir das quais a feomelanina é formada. A quantidade de eumelanina e de feomelanina formadas determina a aparência fenotípica do indivíduo (CHANG, 2009; KIM e UYAMA, 2005). A Figura 8 apresenta o esquema da biossíntese da melanina.

A tirosinase catalisa a oxidação tanto de monofenóis (atividade monofenolase) como de *o*-difenois (atividade difenolase) aos seus respectivos derivados *o*-quinonas (CHANG, 2009; KIM e UYAMA, 2005). Estudos demonstraram que o oxigênio incorporado ao substrato fenólico é derivado do oxigênio molecular e que os dois elétrons necessários para a redução do segundo átomo de oxigênio até água são fornecidos pelo substrato (KIM e UYAMA, 2005).

Vários fatores estão associados à síntese de tirosinase, sendo os principais o AMPc e a proteína quinase A (PKA). O AMPc, formado a partir do ATP pela adenilato ciclase, desempenha uma função chave na regulação da melanogênese, aumentando a atividade da tirosinase pré-formada e a quantidade de RNAm da tirosinase. Através da ativação da PKA e consequente fosforilação e ativação da proteína de ligação ao CRE (CREB; CRE: elemento responsivo a AMPc), o AMPc promove aumento na expressão do fator de transcrição associado a microftalmia (MITF), fator crucial para o desenvolvimento e diferenciação dos melanócitos. Como resultado, o MITF liga-se e ativa o promotor da tirosinase, estimulando sua síntese (LEE, JUNG *et al.*, 2007)

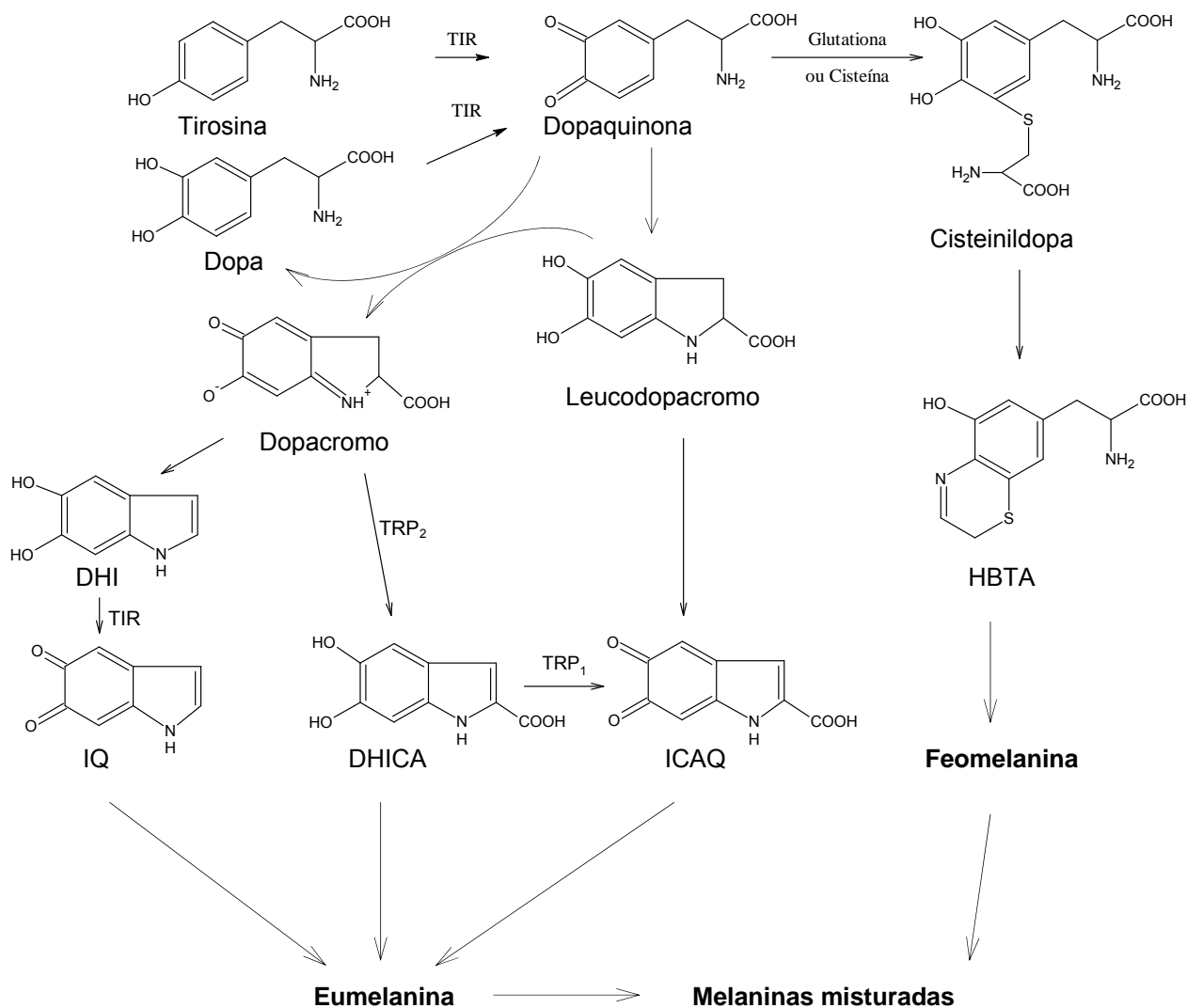


FIGURA 8- BISSÍNTESE DA MELANINA

FONTE: CHANG (2009)

NOTA: TIR: tirosinase; TRP₁ e TRP₂: proteínas relacionadas à tirosinase; DOPA: 3,4-dihidroxifenilalanina; DHI: 5,6-dihidroindol; IQ: indol-5,6-quinona; DHICA: ácido 5,6-dihidroindol-2-carboxílico; ICAQ: ácido indol-2-carboxílico-5,6-quinona; HBTA: 5-hidroxi-1,4-benzotiazinilalanina.

Sendo a tirosinase a enzima limitante para a melanogênese, o aumento ou diminuição tanto de sua expressão como de sua atividade podem levar a alteração na síntese de melanina (NEWTON *et al.*, 2007). Um grande número de inibidores naturais e sintéticos da tirosinase vem sendo identificados. Eles podem ser classificados como: agentes redutores, que causam redução da *o*-dopaquinona à L-DOPA; sequestrantes da *o*-dopaquinona, como certos tio-derivados; substratos enzimáticos alternativos, como os compostos fenólicos, cujos produtos quinóides de reação absorvem numa diferente faixa espectral que o dopacromo; inativadores não-

específicos enzimáticos, como alguns ácidos e bases que desnaturam a enzima; inativadores específicos da tirosinase, também chamados de substratos suicidas, já que se ligam irreversivelmente à enzima; e inibidores específicos da tirosinase, que se ligam reversivelmente à tirosinase reduzindo sua capacidade catalítica. Somente os inibidores específicos da enzima são considerados inibidores verdadeiros (CHANG, 2009).

Os polifenóis são a maior classe de substâncias inibidoras da tirosinase. Dentre eles, os flavonóides são os derivados fenólicos mais estudados, e são divididos em flavonas, flavonóis, flavanonas, flavanóis, isoflavonóides, chalconas e catequinas, os quais se distinguem pela adição de anéis oxigenados heterocíclicos, pelas diferentes posições do anel adicional, e por adição de grupos hidroxil, metil, isoprenóide e metoxil a molécula. Essas diferenças determinam o potencial de inibição da tirosinase. Os flavonóis, bem representados pela quercetina, geralmente causam inibição competitiva da enzima e também atuam quelando o íon cobre, cofator enzimático. Os derivados de benzaldeídos e de benzoatos, como o ácido benzóico, o ácido cinâmico, o ácido gálico e o ácido *p*-coumárico, caracterizam outra classe de inibidores da tirosinase, os quais atuam ligando-se diretamente ao sítio ativo enzimático. Esteróides e lipídeos de cadeia longa, como a trilinoleína, causam inibição da enzima por se ligarem a sítios da tirosinase diferentes do ativo, sendo caracterizados como inibidores não-competitivos (CHANG, 2009). Um grande número de espécies vegetais já tiveram atividade inibidora da tirosinase comprovada, podendo interferir em diversas etapas da síntese de melanina (YOON *et al.*, 2009; MOMTAZ *et al.*, 2008; WU *et al.*, 2009).

Por outro lado, várias substâncias e extratos vegetais já foram relatados como estimulantes da síntese de melanina. O geniposídeo, um glicosídeo iridóide isolado da fruta da *Gardenia jasminoides*, é usada na medicina tradicional chinesa para tratamento de vitiligo por sua ação indutora a melanogênese (LAN *et al.*, 2008). O extrato de *Piper nigrum* e seu principal alcalóide, a piperina, também apresentaram potencial para o tratamento de vitiligo, uma vez que foram testados em cultura de melanócitos normais Melan-a de camundongo e estimularam a proliferação destas células (LIN *et al.*, 1999). A narigenina, uma substância fenólica presente em frutos cítricos, e o extrato de *Vigna angularis* foram capazes de aumentar a expressão da tirosinase e de estimular a melanogênese em células B16 (OHGUCHI *et al.*, 2006).

O ácido rosmarínico, encontrado em espécies aromáticas como o alecrim e a sálvia, foi relatado como estimulante da síntese de tirosinase e indutor da melanogênese, podendo ser um potente agente preventivo de fotocarcinogêneses (LEE, KIM *et al.*, 2007).

Dentre esses e outros produtos naturais ou sintéticos, vários são indicados por dermatologistas para melhorar a aparência estética e para tratamento terapêutico de pacientes que possuem problemas pigmentares. Neste contexto, a busca por substâncias naturais que interferem na pigmentação da pele está cada vez mais em destaque, devido a possível aplicação dermatológica dessas substâncias e capacidade de atuarem como agentes terapêuticos causando pouco ou nenhum efeito adverso na maioria dos casos. Além disso, estudos nesta área são necessários, visto que várias patologias pigmentares, como o vitiligo, continuam sem tratamento específico, e ainda, vários agentes utilizados para tratamento de doenças e problemas de pele provocam eventos adversos. A hidroquinona, por exemplo, um agente despigmentante comumente utilizado em formulações tópicas, é capaz de induzir dermatites e irritação cutânea (MAEDA e FUKUDA, 1995).

3.4 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A validação de um método analítico pode ser definida como a verificação de que os requerimentos para atingir o objetivo específico estão adequados. Essa definição implica que a investigação detalhada do método foi realizada e evidencia que o método analítico, quando corretamente aplicado, produz resultados que são apropriados ao objetivo assim como confirma a efetividade do método com alto grau de exatidão (ARAUJO, 2009). A validação de um método analítico garante que o mesmo é exato, específico, reprodutível e robusto na faixa de concentração em que o analito será analisado (SHABIR, 2003).

Existe vasta literatura na área de medições químicas e recomendações publicadas por organizações nacionais e internacionais. No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) são os órgãos credenciados para avaliar a competência destes ensaios. O FDA (US Food and Drug Administration), a USP (US Pharmacopoeia) e o ICH (International Conference of Harmonization) são órgãos reguladores internacionais da validação de métodos (SHABIR, 2003).

A ANVISA, por meio da RE nº 899, de 29/05/03, determina os testes a serem realizados para a validação de um método analítico segundo a categoria da análise (Tabelas 2 e 3).

TABELA 2- CLASSIFICAÇÃO DOS MÉTODOS A SEREM VALIDADOS SEGUNDO A ANVISA

CATEGORIA	FINALIDADE DO TESTE
I	Determinação de princípios ativos em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
II	Testes quantitativos ou ensaios limite para determinar impurezas de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas
III	Testes de performance (ex. dissolução, liberação de ativo)
IV	Testes de identificação

FONTE: BRASIL (2003)

TABELA 3- ENSAIOS DE VALIDAÇÃO A SEREM REALIZADOS PARA CADA CATEGORIA DE MÉTODO ANALÍTICO SEGUNDO A ANVISA

PARÂMETRO	CATEGORIA I	CATEGORIA II		CATEGORIA III	CATEGORIA IV
		QUANTITATIVO	ENSAIO LIMITE		
Especificidade	<i>Sim</i>	Sim	Sim	1	Sim
Linearidade	<i>Sim</i>	Sim	Não	1	Não
Intervalo	<i>Sim</i>	Sim	1	1	Não
Repetibilidade	<i>Sim</i>	Sim	Não	Sim	Não
Precisão Intermediária	2	2	Não	2	Não
Limite de detecção	<i>Não</i>	Não	Sim	1	Não
Limite de quantificação	<i>Não</i>	Sim	Não	1	Não
Exatidão	<i>Sim</i>	Sim	1	1	Não
Robustez	<i>Sim</i>	Sim	Sim	Não	Não

FONTE: BRASIL (2003)

NOTA: Destaque em itálico à categoria em que se enquadram as amostras avaliadas neste trabalho. ¹Pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico; ²se houver comprovação de reprodutibilidade não é necessária a comprovação de precisão intermediária

Um método específico é aquele que produz resposta para uma única substância de interesse e um método seletivo é aquele capaz de quantificar exatamente um ou mais analitos em presença de interferentes. A avaliação destes parâmetros é de fundamental importância uma vez que componentes da matriz ou produtos de degradação podem sobrepor à resposta do analito de interesse (FDA, 1994; ICH, 2005).

A linearidade é a habilidade de um método em produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito dentro de um intervalo específico. O intervalo de aplicação compõe a faixa de concentração do analito que apresenta precisão, exatidão e linearidade aceitáveis (SHABIR, 2003). O ICH, assim como a ANVISA, estabelece um mínimo de 5 concentrações, dentro de uma faixa específica, que para ensaios de quantificação do analito em matéria-prima ou produto acabado vai de 80 a 120% da concentração usual (BRASIL, 2003; ICH, 1996).

O limite de detecção consiste na menor concentração detectável do analito na amostra, mas não necessariamente quantificável. O limite de quantificação representa a menor concentração determinada na amostra com precisão e exatidão aceitáveis condições experimentais (BRASIL, 2003).

A precisão consiste na avaliação da dispersão dos resultados entre ensaios múltiplos e independentes de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. Esse parâmetro é considerado em três níveis (BRASIL, 2003):

- repetibilidade: concordância entre os resultados de medições sucessivas mantendo procedimento, analista, instrumento e local;
- precisão intermediária: concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas em diferentes dias, equipamentos e/ou analistas;
- reprodutibilidade: concordância entre resultados obtidos por laboratórios diferentes, geralmente para padronização de métodos analíticos, por exemplo, para inclusão de metodologias em farmacopéias.

A ANVISA preconiza que o desvio padrão relativo (DPR%), entre um mínimo de 6 medidas para cada nível de avaliação de precisão, não deve ser superior a 5% (BRASIL, 2003).

A concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como verdadeiro é chamado de exatidão (ARAUJO, 2009; FDA, 1994). Geralmente são usados materiais de referência certificados para avaliar a exatidão de um método, comparando os resultados obtidos com este material e com as amostras em teste. Nos casos em que a obtenção da matriz sem o analito é difícil ou impossível, aplica-se o método de adição de padrão, a partir do qual quantidades crescentes conhecidas do analito são adicionadas na amostra no início da execução da metodologia. Após o desenvolvimento da metodologia, constroem-se duas curvas analíticas, uma de padrão e outra de padrão mais amostra, e a partir da extrapolação do ponto onde a reta padrão mais amostra cruza o eixo das ordenadas na curva de padrão, é possível conhecer a concentração verdadeira do analito na amostra. A partir do valor verdadeiro, é possível determinar a recuperação do método, pela comparação das concentrações de analito determinadas experimentalmente com as calculadas teoricamente a partir do valor verdadeiro para a faixa de 80 a 120% da concentração usual (BRASIL, 2003).

A robustez de um método analítico representa sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros e indica sua confiabilidade durante o uso normal. Há um consenso na literatura de que esse teste seja realizado durante o desenvolvimento do método. As possíveis alterações de um método

analítico por CLAE podem ser, por exemplo, com relação a concentração do solvente orgânico, fluxo da fase móvel, colunas de diferentes fabricantes, bem como variações nas etapas de preparação da amostra, como tempo de extração e agitação (BRASIL, 2003; ICH, 1996).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento experimental deste trabalho, utilizou-se material vegetal de duas procedências. Para o isolamento e caracterização do ácido rosmarínico usou-se um extrato seco comercial das partes aéreas de *S. officinalis* L., contendo aproximadamente 6% (m/m) de ácido rosmarínico, conforme laudo emitido pela empresa Apsen Farmacêutica Ltda., fornecedora do produto. A droga vegetal usada nos experimentos de determinação de ácido rosmarínico em sálvia, e a usada para o preparo do extrato fluido e da infusão para avaliação de atividades biológicas, foram adquiridas no comércio local de Curitiba.

4.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO

4.1.1 Preparação do extrato de sálvia para isolamento de ácido rosmarínico

O extrato seco de partes aéreas de *S. officinalis* foi preparado para o isolamento de ácido rosmarínico baseado em Christ e Kesselring (1982), com algumas modificações (Figura 9).

4.1.2 Isolamento do ácido rosmarínico

A amostra seca (AS) obtida do extrato de sálvia foi submetida à cromatografia circular centrífuga em Chromatotron[®]. Foi utilizada uma placa de 2 mm de espessura de Sílica Gel (Merck[®], TLC grade 7749), e a eluição foi feita com acetato de etila/hexano/ácido acético nas proporções 30:60:10 (v/v/v) (300 mL) (FM1) e 55:35:10 (v/v/v) (250 mL) (FM2). A corrida cromatográfica foi acompanhada por luz UV, nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm, e frações foram coletadas em tubos de ensaio. Estas foram analisadas por CCD, usando a FM2 como fase móvel e luz UV e revelador universal (etanol:ácido sulfúrico 80/20 (v/v)) como reveladores. As frações contendo o ácido rosmarínico foram secas em rotaevaporador à vácuo, com temperatura máxima de 70 °C. O ácido rosmarínico isolado foi armazenado em atmosfera de nitrogênio, em frasco vedado, envolto em papel alumínio e mantido em geladeira.

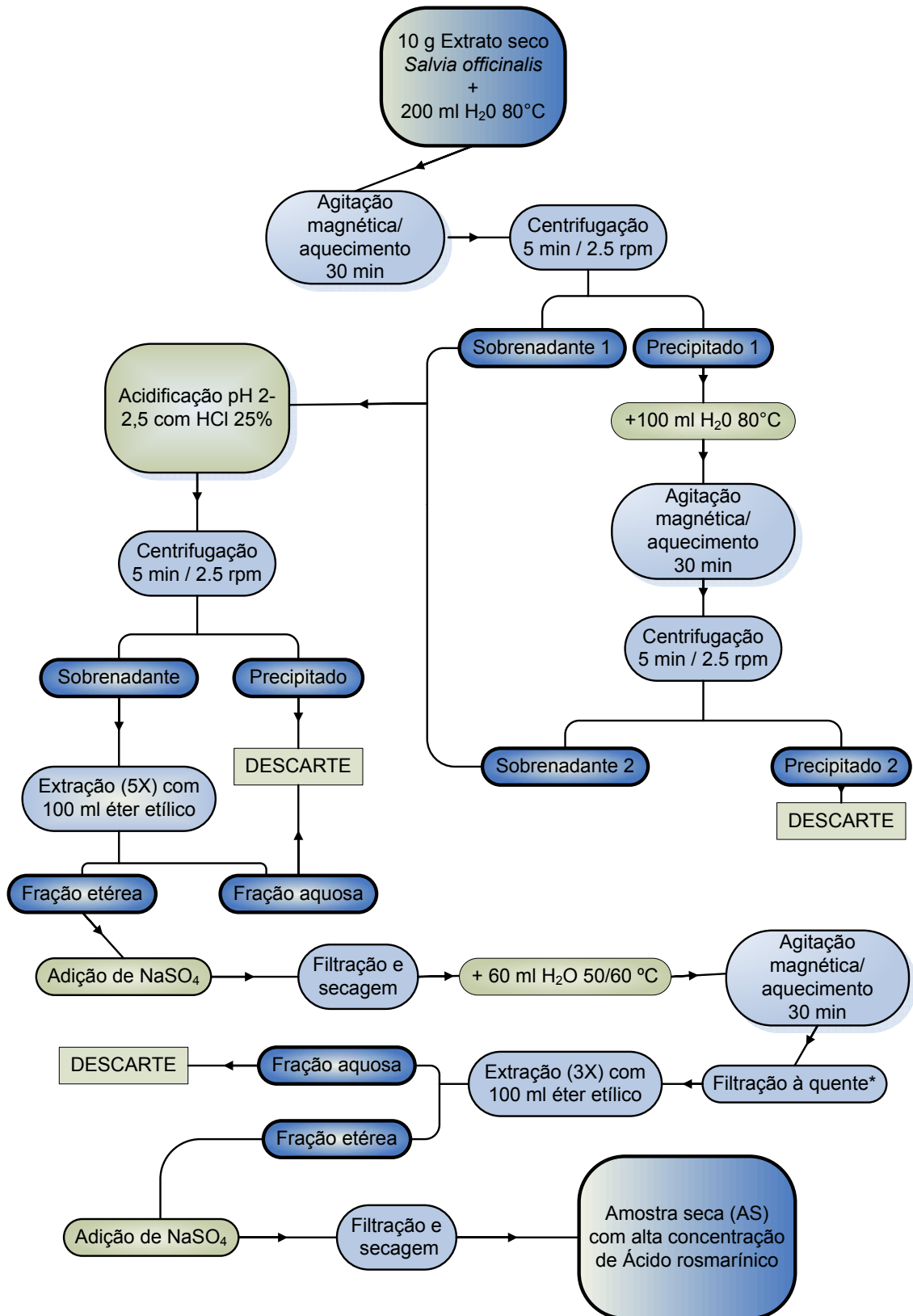


FIGURA 9– PREPARO DO EXTRATO DE PARTES AÉREAS DE SÁLVA PARA ISOLAMENTO DE ÁCIDO ROSMARÍNICO

NOTA: *Até este etapa reproduziu-se a metodologia proposta por Christ e Kesselring (1982)

4.1.3 Identificação do ácido rosmarínico isolado

O ácido rosmarínico isolado foi analisado por CLAE, espectrometria UV-VIS e RMN. Para a análise por CLAE, preparou-se uma solução de ácido rosmarínico na concentração de 50 µg/mL em metanol/água (50:50 v/v). O sistema usado foi da marca Varian®, modelo compacto 920-LC, composto por bomba quaternária, detector de arranjo de diodos e injetor automático, nas mesmas condições estabelecidas no item 4.3.3 a seguir. A análise por RMN foi realizada em equipamento da marca Bruker PX-200, usando metanol deuterado (CD₃OD) como solvente e TMS como padrão interno.

4.2 IDENTIFICAÇÃO DA SÁLVIA OBTIDA COMERCIALMENTE

Para a otimização da extração do ácido rosmarínico e para a determinação de atividades biológicas da sálvia, foram utilizadas drogas vegetais obtidas comercialmente, compostas por caules e, principalmente, por folhas de *S. officinalis*, identificadas morfoanatomicamente conforme Wichtl (2004). Após inspeção do material com lupa e observação de suas características organolépticas, em particular seu odor, cortes manuais foram depositados sobre lâminas de microscopia e diafanizados com cloral hidratado. Os aspectos morfoanatômicos foram observados em microscópio óptico. Após identificação, as drogas vegetais tiveram seu teor de umidade determinado segundo a metodologia “Determinação de perda por dessecação” (BRASIL, 1988). Para tanto, 3 g de droga vegetal fragmentada foram depositados sobre vidro de relógio previamente seco e tarado, e submetidas a aquecimento a 100-105 °C por, aproximadamente, 5 h, quando se obteve peso constante. O experimento foi realizado em triplicata.

4.3 DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ROSMARÍNICO NA *Salvia officinalis*

4.3.1 Condições cromatográficas

O desenvolvimento do método em CLAE baseou-se inicialmente no método para determinação dos ácidos rosmarínico e caféico em espécies vegetais aromáticas (WANG *et al.*, 2004). As modificações no método incluíram alteração da

coluna cromatográfica e da fase móvel. O método final foi escolhido em função da resolução e simetria do pico do ácido rosmarínico e do tempo de análise.

4.3.2 Otimização da extração do ácido rosmarínico por planejamento fatorial

A extração do ácido rosmarínico de *S. officinalis* foi otimizada por planejamento fatorial de experimentos, utilizando o módulo “Design of Experiments” do programa MINITAB 15 (Minitab Inc.). Na etapa de triagem foram avaliados os parâmetros: solvente, tempo, temperatura, e presença de antioxidantes na extração (Tabela 4). Aqueles que apresentaram maior significância foram selecionados para a etapa de otimização (Tabelas 5 e 6), utilizando o método de *Central Composite Design*. Os resultados obtidos foram utilizados para obtenção dos gráficos de mapas de contorno. A análise dos resultados permitiu estabelecer o método com as melhores condições de extração do ácido rosmarínico da sálvia, o qual foi testado em duas amostras comerciais de sálvia, sendo uma na forma de fragmentos da droga seca, e outra na forma de droga seca em pó.

TABELA 4- FATORES AVALIADOS PARA TRIAGEM DA EXTRAÇÃO DE ÁCIDO ROSMARÍNICO DE SÁLVIA

FATOR		A	B
A	Solvente (% metanol)	35	70
B	Tempo (min)	10	25
C	Temperatura (°C)	25	45
D	Antioxidante	Com	Sem

TABELA 5- FATORES AVALIADOS NA OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE ÁCIDO ROSMARÍNICO DE SÁLVIA.

FATOR		- α	-1	0	+1	+ α
A	Solvente (% metanol)	39,8	50	65	80	90,2
B	Tempo (min)	16,6	20	25	30	33,4
C	Temperatura (°C)	29,9	35	42,5	50	55,1

TABELA 6- FATORES AVALIADOS PARA A SEGUNDA OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE ÁCIDO ROSMARÍNICO DE SÁLVIA

FATOR		- α	-1	0	+1	+ α
A	Solvente (% metanol)	15,9	20	30	40	44,1
B	Tempo (min)	17,9	20	25	30	32,1

4.3.3 Método otimizado para determinação do ácido rosmarínico

As condições cromatográficas estabelecidas e aplicadas na otimização da extração do ácido rosmarínico e na validação da metodologia foram: coluna Agilent Eclipse C₁₈ (150 mm x 4,6 mm x 5 µm); temperatura do compartimento da coluna de 25 °C; fase móvel composta por metanol:água (acidificada com ácido fosfórico 1%), na proporção 45:55 (v/v) (0-5 minutos), e na proporção 80:20 (v/v) (5-10 minutos); fluxo de 1 mL/min.; detecção em 330 nm. Com o ácido rosmarínico isolado, preparou-se uma curva de calibração com cinco pontos (entre 6,25 e 100 µg/mL) nas condições cromatográficas acima estabelecidas, a qual foi usada para doseamento do ácido rosmarínico na etapa de otimização da metodologia de extração. As condições otimizadas por planejamento fatorial para a extração do ácido rosmarínico da sálvia foram: 100 mg de material vegetal, triturado e tamisado entre 310 e 740 µm (48 e 24 *mesh*), diluídos em 10 mL de metanol 40% (v/v) em água destilada, contendo 1 mg/mL de ácido ascórbico e 10 mM de EDTA; sonicação a 45 °C por 20 min.; filtração em papel filtro; diluição 1:10 em metanol 50% para injeção no cromatógrafo. O sistema CLAE utilizado foi o mesmo descrito no item 4.1.3.

4.3.4 Avaliação da adequação do sistema (*System suitability test*)

A avaliação da adequação do sistema foi realizada a partir da análise dos seguintes parâmetros: fator capacidade, número de pratos teóricos, fator de encaudamento, resolução e simetria do pico.

4.3.5 Avaliação da estabilidade das soluções de padrão e das soluções amostras

A estabilidade das soluções padrão de ácido rosmarínico foi avaliada em diversos tempos após seu preparo, com armazenamento em geladeira a 4 °C. Para tanto, cinco soluções com concentrações crescentes de ácido rosmarínico (6,25 a 100 µg/mL) foram injetadas em CLAE nos dias inicial (tempo 0) e após 7, 15 e 30 dias. As áreas dos picos obtidas foram comparadas e analisadas pela análise de Variância, seguido pelo teste de Tukey. Amostras de extratos de sálvia, preparadas a partir do método otimizado e armazenadas em geladeira a 4 °C., foram analisadas

quanto a sua estabilidade nos tempos 0, 3 e 7 dias. As áreas dos picos do ácido rosmarínico nas amostras foram analisadas e comparadas estatisticamente.

4.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

4.4.1 Especificidade e seletividade

Realizou-se a comparação dos perfis espectrais do ácido rosmarínico do extrato de sálvia e do padrão. Para tal, o perfil espectral do ácido rosmarínico isolado foi comparado àquele observado no pico relativo ao tempo de retenção deste analito nas amostras de extratos, com auxílio do detector de arranjo de diodos. Ainda, fez-se comparação de curvas analíticas de padrão e de padrão adicionado à amostra. O preparo das amostras está descrito no item relativo à exatidão (item 4.4.5). O resultado avalia o paralelismo entre as curvas, o que é observado por meio da comparação do coeficiente angular da equação da reta gerada pelas duas curvas.

4.4.2 Linearidade e intervalo de aplicação

A linearidade para o padrão de ácido rosmarínico foi avaliada em uma curva com cinco pontos, nas concentrações de 6,25 a 100 µg/mL. Para a matéria-prima vegetal, foram realizadas tomadas de amostras de 80, 90, 100, 110 e 120 mg de sálvia triturada e tamisada, que correspondem a faixa de 80 a 120 % da quantidade usualmente utilizada no método otimizado (100 mg). A droga vegetal foi tratada e analisada em CLAE da maneira usual. Os resultados puderam mostrar a linearidade do método para o analito no extrato de sálvia. O intervalo de aplicação foi determinado pela faixa avaliada nos testes de linearidade, exatidão e precisão, ou seja, de 80 a 120% da concentração esperada para cada amostra.

4.4.3 Repetibilidade

Foram realizadas seis análises de determinação a 100% da tomada de amostra de material vegetal usualmente praticada (100 mg), pelo mesmo analista, no mesmo equipamento, em um curto espaço de tempo. As áreas dos picos do

analito obtidas foram comparadas, e o resultado foi fornecido como coeficiente de variação ou desvio padrão relativo (DPR).

4.4.4 Precisão intermediária

Foram realizadas seis análises de determinação a 100% da tomada de amostra de material vegetal usualmente praticada (100 mg), por um segundo analista, mantendo o mesmo equipamento, em um curto espaço de tempo. As áreas dos picos do analito obtidas foram analisadas juntamente às obtidas no teste de repetibilidade, e o resultado foi fornecido como desvio padrão e desvio padrão relativo (DPR) entre as 12 análises.

4.4.5 Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo método de adição de padrão à amostra. Para tal, foram tomadas cinco amostras de material vegetal na quantidade usualmente praticada e, em quatro delas foram adicionadas quantidades crescentes de ácido rosmarínico. As amostras foram extraídas e tratadas da maneira usual e injetadas no cromatógrafo. Traçou-se uma curva área obtida (mAU.s) *versus* concentração de padrão de ácido rosmarínico presente ($\mu\text{g/mL}$). O coeficiente linear (b) da equação da reta foi extrapolado na curva de calibração do padrão de ácido rosmarínico, sendo possível a determinação da concentração real de ácido rosmarínico presente na amostra de extrato analisada. A partir do valor verdadeiro encontrado para a concentração de ácido rosmarínico no extrato, foram analisadas as concentrações de 80, 100 e 120% em triplicata, preparadas nas mesmas condições descritas para o teste de linearidade (item 4.4.2). Conhecendo-se o valor verdadeiro a 100% da tomada de amostra, foi possível calcular o valor teórico esperado para 80 e 120% da tomada de amostra. A partir da concentração teórica esperada, pode-se calcular a recuperação do método pela equação: $\text{Recuperação} = \text{Concentração média experimental} \times 100 / \text{Concentração teórica}$.

4.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÁCIDO ROSMARÍNICO E DA SÁLVIA

4.5.1 Preparo do extrato fluido e da infusão de sálvia

Com a finalidade de se estudar as propriedades biológicas da *S. officinalis*, uma das drogas vegetais comerciais foi utilizada para produção de dois diferentes extratos a serem testados: extrato fluido 1:1 (EF) (BRASIL, 1988) e extrato 1:10. Para a obtenção do EF segundo a Farmacopéia Brasileira 4ª edição (1988), 20 g de droga vegetal, triturada e tamisada em tamis de 710 µm, foram colocados em funil de separação e adicionados de solução etanólica 56% em quantidade suficiente para cobrir toda a droga. Após 72 h de maceração, os primeiros 17 mL de extrato foram eluídos e armazenados em geladeira. Em seguida, foram feitas extrações sucessivas da droga com solução etanólica 56% até o esgotamento. O extrato final obtido foi concentrado em banho-maria, a temperatura máxima de 60 °C, até o volume de 3 mL, o qual foi adicionado aos primeiros 17 mL extraídos, obtendo-se um volume final de extrato de 20 mL. O extrato foi considerado 1:1 porque 20 g de droga vegetal foram utilizadas para produzir 20 mL de extrato concentrado. Para o extrato 1:10 de sálvia, 10 g de droga vegetal, previamente triturada e tamisada em tamis de 710 µm, foram colocados em 100 mL de água destilada aquecida à 80 °C e a infusão foi mantida por 15 minutos. Em seguida, a solução foi filtrada em papel filtro (Whatmann nº1) e, após lavagem do papel filtro com água a 80 °C, o volume do extrato foi ajustado para 100 mL com água destilada. Essa infusão foi considerada representativa do chá caseiro de sálvia e doravante será denominada infusão (INF).

4.5.2 Determinação do peso seco e de ácido rosmarínico nos extratos de sálvia

Para determinação do peso seco, 1 mL de cada um dos extratos preparados no item 4.5.1 foi colocado em um vidro de relógio previamente seco e tarado. Os extratos foram aquecidos em estufa a 100 °C pelo tempo necessário para o peso manter-se constante (aproximadamente 5 h). Os vidros foram, então, retirados da estufa, colocados em dessecador até atingir a temperatura ambiente e pesados em balança analítica. O peso seco do extrato foi obtido através da diferença entre o peso do vidro de relógio contendo a amostra seca e o peso inicial do vidro de relógio. O experimento foi realizado em triplicata para cada extrato. Ambos os

extratos tiveram também a concentração de ácido rosmarínico determinada por CLAE. Para tanto, 0,2 mL do EF e da INF foram diluídos em balão volumétrico, respectivamente, para 50 e para 5 mL em metanol 50%. As soluções foram centrifugadas e 20 μ L do sobrenadante foram injetados em sistema CLAE, usando as mesmas condições cromatográficas descritas no item 4.3.3, porém com fase móvel gradiente composta por metanol/água na proporção inicial de 45:55 (v/v) até a proporção final de 80:20 (v/v) em 15 minutos de análise. Para o doseamento de ácido rosmarínico nos extratos, foi construída uma curva de calibração com padrão de ácido rosmarínico, nas concentrações de 6,12, 24, 48 e 96 μ g/mL.

4.5.3 Teste de letalidade para náuplios de *Artemia salina*

A determinação da toxicidade do ácido rosmarínico e dos extratos EF e INF para náuplios de *Artemia salina* foi baseada na metodologia descrita por Fontana e colaboradores (1998) e por Meyer e colaboradores (1982), com pequenas modificações. Para tanto, 100 mg de material comercial (Miramar®) contendo cistos de *Artemia salina* foram transferidos para solução de água do mar sintética (NaCl 26,3 g/l; KCl 0,75 g/l; CaCl₂.2H₂O 1,47 g/l; MgCl₂.6H₂O 5,10 g/l; NaBr 0,21 g/l; NaHCO₃ 0,21 g/l; MgSO₄.7H₂O 6,20 g/l; pH 8,0), mantidos em temperatura ambiente, sob aeração contínua, com iluminação lateral constante, durante o período de eclosão (48 e 72 h). Nessas condições, cistos viáveis liberaram náuplios que possuem fototropismo positivo e intensa atividade natatória, acumulando-se nas margens mais iluminadas do recipiente. Os ensaios foram realizados em placas de 24 poços, nos quais foram adicionados 10 náuplios vivos e ativos de artemia, quantidade suficiente de solução de ácido rosmarínico ou dos extratos para obter a concentração desejada, e quantidade de água do mar sintética para um volume total de 2 mL por poço. O ácido rosmarínico foi testado nas concentrações de 10^{-2} à 10^{-6} M (correspondendo a 3600 e 0,36 μ g/mL) em um primeiro momento e, posteriormente, nas concentrações de 3×10^{-3} M (1080 μ g/mL), $2,5 \times 10^{-3}$ (900 μ g/mL), 2×10^{-3} (720 μ g/mL), $1,5 \times 10^{-3}$ (540 μ g/mL) e 10^{-3} M (360 μ g/mL). Os EF e INF de sálvia foram testados com relação ao seu peso seco nas concentrações de 10, 100 e 1000 μ g/mL. As placas foram mantidas em presença de luz durante 24 horas. Em seguida, verificou-se a quantidade de náuplios vivos e mortos com auxílio de lupa. Os ensaios foram realizados três vezes e, cada um em quadruplicata. O controle

negativo foi composto somente por náuplios em água do mar sintética. O timol, nas concentrações de 10, 100 e 1000 µg/mL, foi utilizado como controle positivo dos experimentos.

4.5.4 Toxicidade celular e influência na melanogênese

Para determinação da toxicidade celular do ácido rosmarínico e dos extratos de sálvia, assim como seus efeitos sobre a melanogênese, foram utilizados fibroblastos de camundongo da linhagem McCoy, adquiridos do Instituto Adolfo Lutz, e células de melanoma murino B16F10, gentilmente cedidas pela Professora Dra. Gláucia R. Martinez, Dep. de Bioquímica, da Universidade Federal do Paraná.

A análise microscópica das células foi realizada em microscópio óptico invertido da marca BIOVAL modelo XDS-1B.

4.5.4.1 Soluções

Solução salina tamponada com fosfatos (PBS) de Dulbecco

PBS foi preparado dissolvendo-se NaCl 8 g/l, KCl 0,2 g/l, MgCl₂.6H₂O 0,1 g/l, NaH₂PO₄ 0,92 g/l, CaCl₂.2H₂O 0,1 g/l, KH₂PO₄ 0,2 g/l, em água ultra pura. Após ajuste do pH para 7,2–7,4 com solução de NaOH 1 N, procedeu-se a esterilização em autoclave e armazenamento a 4 – 8 °C.

Meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute)

Meio de cultivo RPMI 1640 (Himedia, Japão) foi dissolvido em água ultra pura, conforme instruções do fabricante para o preparo de um litro, e suplementado com 200 mM de bicarbonato de sódio, 0,3 g de penicilina G e 100 mg/mL de sulfato de estreptomicina. O pH 7,2 foi ajustado com solução de NaOH 1N. O meio foi esterilizado em autoclave e armazenado a –10 °C. Quando em uso, foi armazenado a 4 – 8 °C por, no máximo 14 dias. Para a manutenção dos cultivos, RPMI 1640 foi suplementado com 10 % (v/v) de soro bovino fetal estéril (Gibco, São Paulo).

Solução de tripsina-EDTA a 0,05%

Tripsina (Worthington Biochemical Corporation), 195 U/mg de proteína, foi dissolvida na proporção 1:400 em PBS. A solução foi diluída na proporção 1:5 com

PBS contendo 0,02 g de EDTA dissódico, obtendo-se uma solução de tripsina a 0,05%, a qual foi esterilizada através de filtração por membrana de acetato de celulose de 0,22 µm de diâmetro de poro, e mantida a -25 °C até o uso.

Solução de trabalho de Vermelho Neutro

Solução estoque do corante vermelho neutro (3-amino-*m*-dimethylamino-2-methyl-phenazine hydrochloride) a 4 mg/mL em PBS foi armazenada à temperatura ambiente. Para uso nos experimentos, esta solução estoque foi diluída 1:100 em PBS (solução de trabalho), mantida a 37 °C por 12-18 h e, imediatamente antes do uso, foi centrifugada a 3500 rpm por 10 minutos para remoção de possíveis cristais não solubilizados.

Solução de ácido rosmarínico

Solução estoque de ácido rosmarínico isolado da sálvia a 0,01 M em meio RPMI 1640 pH 7,0 foi esterilizada através de filtração por membrana de acetato de celulose de 0,22 µm de diâmetro de poro, alíquotada e armazenada a -25 °C até seu uso.

Extratos de sálvia

O extrato fluido 1:1 (EF) e a infusão 1:10 (INF) de *S. officinalis* foram centrifugados em 1300 g por 5 minutos, esterilizados através de filtração por membrana de acetato de celulose de 0,22 µm de diâmetro de poro, alíquotados e armazenados a -25 °C até uso.

Solução de ácido kójico

Ácido kójico 0,2 M foi preparado em DMSO e esta solução foi diluída em RPMI 1640, para solução estoque de 2 mM. A solução foi esterilizada através de filtração por membrana de acetato de celulose de 0,22 µm de diâmetro de poro, alíquotada em eppendorfs e mantida a -25 °C até uso.

Solução tampão de lise celular

Preparou-se tampão 0,1 M Tris-HCl, pH 7,2 em água ultra pura, o qual foi adicionado de 1% de Nonidet P-40, 0,01% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 100 µM de PMSF (fluoreto de fenil metil sulfonil) e 1 µg/mL de aprotinina. A solução foi

esterilizada através de filtração por membrana de acetato de celulose de 0,22 µm de diâmetro de poro, alíquotada e mantida a -25 °C.

Solução de azul de Coomassie

Solução do corante Azul Brilhante de Coomassie (reagente de Bradford) foi preparada na concentração de 100 mg/l. Para tanto, 100 mg do corante foram dissolvidos em 50 mL de etanol; e a solução foi adicionada de 100 mL de ácido fosfórico 85% e de q.s. de água destilada para volume final de um litro. A solução foi armazenada em frasco âmbar e mantida em geladeira. Imediatamente antes do uso, a solução foi filtrada em papel filtro Whatmann n°1.

4.5.4.2 Manutenção das linhagens McCoy e B16F10

Ambas as linhagens foram mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com 500 U/mL de penicilina G, 300 µg/mL de sulfato de estreptomicina e 10% de soro bovino fetal, a 37 °C em garrafas de 25 cm² (TPP, Suíça) em um volume de 10 mL/frasco. A cada 2-3 dias, as linhagens foram sub-cultivadas na concentração de 10⁵ células/mL após tripsinização com solução de tripsina-EDTA 0,05%.

4.5.4.3 Viabilidade celular

A viabilidade das linhagens celulares utilizadas neste estudo foi avaliada em todas as etapas dos procedimentos metodológicos usando-se o teste de exclusão com azul de tripan, segundo Merchant e colaboradores (1964), onde as células foram diluídas apropriadamente em solução a 0,4% de Azul de Trypan em PBS e sua viabilidade observada ao microscópio de luz (Olympus CH30). As células discriminadas como viáveis apresentaram-se íntegras, brilhantes, incolores e redondas, enquanto que as não viáveis mostraram-se coradas em azul, muitas com perda da definição de contorno. Em todos os experimentos, as células utilizadas apresentaram viabilidade > 90%.

4.5.4.4 Toxicidade celular

Para os experimentos de toxicidade celular, ambas as linhagens McCoy e B16F10, 10^5 células/mL em meio RPMI 1640 suplementado, foram semeadas em placas de 24 poços (1 mL/poço) e mantidas a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após confluência de aproximadamente 80%, solução de ácido rosmarínico, EF e INF, em concentrações correspondendo entre 0,001 µM e 1000 µM em ácido rosmarínico, foi adicionada. Em seguida, as placas foram re-incubadas por 24 h. A toxicidade foi determinada pela técnica de incorporação de Vermelho Neutro (BABICH *et al.*, 2005; BORENFREUND *et al.*, 1990) como a seguir. Após remoção do sobrenadante, as células foram tratadas por 1 h com 500 µL de solução de trabalho de vermelho neutro a 37 °C. Em seguida, foram rapidamente lavadas com PBS e tratadas por 10 minutos com 500 µL de solução 0,5 % (v/v) de formalina e 1 % (m/v) de CaCl₂. Após isso, 500 µL de solução etanólica 50 % (v/v) contendo 1 % (v/v) de ácido acético foram adicionados, e as placas foram gentilmente agitadas em temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, a absorbância do sobrenadante foi obtida em 540 nm, usando-se, como branco, 500 µL da solução formalina/ CaCl₂ e 500 µL da solução etanol/ácido acético. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos em % de células vivas em relação ao controle (cultura de células que não recebeu nenhum tratamento), para o qual se atribuiu 100 %.

4.5.4.5 Influência do ácido rosmarínico e dos extratos de sálvia na melanogênese

Células de melanoma murino B16F10 cultivadas em garrafas de 25 cm² (TPP, Suíça) e apresentando confluência de ~80% foram tratadas, por 24 h a 37 °C, com ácido rosmarínico (10, 100 e 1000 µM), EF (correspondente a 1 e 10 µM de ácido rosmarínico), ou com INF (correspondente a 1, 10 e 100 µM de ácido rosmarínico), na presença ou não de L-tirosina 500 µM. Em paralelo, usou-se a L-tirosina (500 µM) e o ácido kójico (400 µM) como controle e controle positivo, respectivamente. Cloreto de amônio (NH₄Cl) 10 mM foi adicionado em todos os ensaios (SAEKI e OIKAWA, 1983). Após 24 h de incubação, o sobrenadante das culturas foi removido e as células tratadas com 500 µL de solução de EDTA 2 mM, por 5 minutos à 37 °C.

Após desprendimento do fundo do frasco, as células foram transferidas para frascos cônicos e centrifugadas a 800 g, por 5 minutos, a 4 °C. Os “pellets” celulares foram, então, adicionados de 200 µL de tampão de lise celular, brevemente agitados em vórtex e sonicados por 1 h em banho de gelo. Uma fração (100 µL) deste lisado celular (LC) foi utilizada para o doseamento de melanina, enquanto que o restante foi centrifugado a 10.000 rpm, por 10 minutos a 4 °C, e o sobrenadante utilizado para o doseamento de proteínas totais e para a determinação da atividade de tirosinase.

4.5.4.5.1 Doseamento de proteínas no lisado celular

Para o doseamento das proteínas totais no LC, usou-se o método de Bradford (BRADFORD, 1976). Para tanto, 10 µL de LC foram adicionados de 40 µL de água ultra pura, e a 10 µL desta solução, foram adicionados 90 µL de água ultra pura e 1 mL da solução de Azul Brilhante de Coomassie. Após homogeneização em vórtex e repouso por 2 minutos em temperatura ambiente, obteve-se a leitura em 595 nm. Usou-se soroalbumina bovina como padrão (5 a 15 µg/mL), tratada da mesma forma que os LC, para construção das curvas de calibração absorvância *versus* concentração (µg/mL) para cada experimento. Os resultados foram expressos em µg de proteínas totais por mililitro de LC (µg/mL).

4.5.4.5.2 Doseamento de melanina

O doseamento de melanina baseou-se na metodologia proposta por Heo e colaboradores (2009) com algumas modificações. Alíquotas de 100 µL do LC foram adicionadas de 900 µL de NaOH 1N, homogeneizadas em vórtex e incubadas a 37 °C por 24 h. Em seguida, obteve-se a leitura em 470 nm, usando NaOH 1N como branco. A concentração de melanina foi calculada com auxílio de uma curva padrão de melanina de sépia (*Seppia officinalis*) (10 a 100 µg/mL) obtida nas mesmas condições experimentais. Para cada repetição do experimento uma nova curva foi desenvolvida. Os resultados obtidos em µg de melanina por mililitro de LC (µg/mL) foram convertidos em µg de melanina para 100 µg de proteína do LC (% de

melanina com relação à proteína). Os valores calculados foram expressos em % do controle.

4.5.4.5.3 Determinação de tirosinase no lisado celular

A determinação da tirosinase celular após tratamento das células com os testes foi baseada em Sarkar e colaboradores (2006). Volume de LC correspondente a 100 µg de proteínas totais foi adicionado de 1 mL de tampão fosfato pH 7,4 contendo 0,1 % (m/v) de L-DOPA. A solução foi mantida por 1 h em estufa a 37 °C e, em seguida, obteve-se a absorbância em 470 nm, usando tampão fosfato pH 7,4 como branco. Os valores de absorbâncias obtidos foram expressos em relação (%) ao controle, para o qual o valor de 100% foi atribuído.

4.5.4.5.4 Determinação da atividade de tirosinase *in vitro*

A determinação da atividade de tirosinase *in vitro* baseou-se na metodologia proposta por An (2008) e por Nagata (2004) e colaboradores. Para tal, células B16F10 (10^7) lavadas e “peletizadas” foram lisadas da maneira descrita no item 4.5.4.5. Volume de lisado celular correspondente a 100 µg de proteína foi adicionado de diferentes concentrações de ácido rosmarínico (1 a 1000 µM), EF (correspondente a 1 e 10 µM de ácido rosmarínico) ou INF (correspondente a 1, 10 e 100 µM de ácido rosmarínico) e o volume foi completado para 1 mL com solução 0.1 M de NaH_2PO_4 pH 7.4 contendo 5 mM de L-DOPA como substrato para ação da tirosinase. A L-tirosina (500 µM) e o ácido kójico (400 µM) foram usados como controle e controle positivo da atividade de tirosinase, respectivamente. Após incubar as soluções em estufa a 37 °C por 1 h, a formação de DOPA-cromo foi estimada em 470 nm. Contra brancos da L-DOPA e de todos os testes, na ausência de lisado celular, foram realizados a fim de corrigir qualquer interferência. Os resultados estão apresentados como % de atividade de tirosinase (AT) em relação ao controle (L-DOPA), segundo a fórmula:

$$AT = \frac{(A - A_B) \times 100}{(C - C_B)}$$

onde: A = absorvância do teste; A_B = absorvância do teste sem lisado celular; C = absorvância do controle L-DOPA (sem testes); C_B = absorvância do controle L-DOPA sem lisado celular.

4.5.4.5.5 Identificação de tirosinase por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida

O fracionamento de proteínas por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida para identificação da tirosinase baseou-se na metodologia descrita por Sato e Toriyama (SATO e TORIYAMA, 2009), com pequenas modificações. Lisados de células B16F10, previamente tratadas com ácido rosmarínico, EF e INF por 24 h a 37 °C, contendo 50 (EF, AR) ou 100 µg (INF) de proteínas totais foram misturados a volumes apropriados do tampão de aplicação Blue/Orange 6X Loading Dye (Promega, Madison, WI, USA) e analisados por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida a 8%, a 200 mV, por 50 minutos. Após a corrida, o gel foi transferido para uma cuba contendo tampão NaH_2PO_4 0.1 M pH 6.8, no qual permaneceu em temperatura ambiente por 30 minutos sob suave agitação. Este procedimento de lavagem foi repetido por duas vezes. Na sequência, o gel foi mergulhado neste mesmo tampão acrescido de 5 mM L-DOPA e incubado a 37 °C, por 3-5 h, no escuro. As bandas escurecidas correspondentes à tirosinase foram visualizadas e fotografadas.

4.5.5 Análises estatísticas

Os resultados de atividades biológicas estão apresentados como a média \pm desvio padrão (DP) das várias repetições dos experimentos. Para análise estatística dos resultados, usou-se o teste “t” de Student e a Análise de Variância (ANOVA), com execução do teste de Tukey. Os cálculos foram realizados usando os programas *JMP*, versão 7.0, *R*, versão 2.7.2 e *GraphPad-Prism 5*, versão 2007. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO

O isolamento de grande quantidade de ácido rosmarínico (na ordem de gramas), para a realização dos objetivos do trabalho, apresentou algumas dificuldades devido à fácil oxidação e difícil cristalização do mesmo em sua forma pura. Vários artigos científicos descrevem o isolamento de ácido rosmarínico em extratos vegetais, mas a maior parte deles obtém rendimentos baixos e apresentam metodologia de difícil reprodução, com alto custo e tempo de análise para serem realizadas várias vezes.

Com o objetivo, então, de superar os problemas de instabilidade do ácido rosmarínico e da falta de métodos adequados para seu isolamento em grande quantidade, estabeleceu-se um método para o isolamento desta substância em duas etapas. A primeira etapa é a preparação do extrato de sálvia, baseada na patente de autoria de Christ e Kesselring (1982). A segunda etapa é a de isolamento do ácido rosmarínico propriamente dito, utilizando Chromatotron®. Todo o processo foi otimizado de modo que fosse passível de reprodução fácil e rápida, com obtenção de alto rendimento de ácido rosmarínico.

5.1.1 Preparação do extrato de sálvia para isolamento de ácido rosmarínico

Na preparação do extrato de partes aéreas de sálvia para isolamento do ácido rosmarínico (Figura 9, pág. 48), a primeira etapa consistiu em realizar duas diluições sucessivas do extrato em pó de sálvia com água a 80° C, a fim de ser obtido um extrato aquoso, eliminando por centrifugação as substâncias insolúveis em água nesta temperatura. A próxima etapa correspondeu à acidificação desta solução aquosa com o objetivo de precipitar substâncias insolúveis em meio aquoso ácido, como o ácido carnósico presente na sálvia. Após isso, a solução aquosa foi submetida à partição com éter dietílico, o qual tem a capacidade de extrair o ácido rosmarínico da fração aquosa. Outras substâncias interferentes também são extraídas pelo éter. Foi possível eliminar alguns destes interferentes mais polares

com ressolubilização da fração etérea seca em água a 50-60°C, a partir da qual ocorreu a formação de precipitado que foi eliminado por filtração.

Até esta etapa do processo, usou-se o método descrito por Christ e Kesselring (1982), que propõe que, a partir daí, o ácido rosmarínico seja cristalizado nessa solução aquosa após adição de cristais da própria substância. Esta cristalização não foi passível de reprodução. Como continuação do processo, estabeleceu-se uma nova partição da solução aquosa com éter dietílico, obtendo-se a fração etérea, e a fração aquosa remanescente. A Figura 10 mostra duas placas de CCD em sílica, realizadas com a fase móvel acetato de etila/hexano/ácido acético 55:35:10 (v/v/v) e reveladas com revelador universal, nas quais foram aplicadas: (1) fração aquosa (obtida com água 50/60 °C); (2) padrão de ácido rosmarínico; (3) padrão de ácido caféico; (4) fração etérea; (5) fração aquosa remanescente da partição com éter etílico.

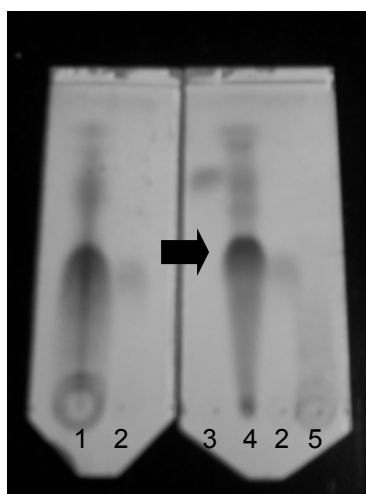


FIGURA 10– CCD DO EXTRATO DE SÁLVIA.

NOTA: (1) fração aquosa (obtida com água 50/60 °C) antes da extração com éter etílico; (2) padrão de ácido rosmarínico; (3) padrão de ácido caféico; (4) fração etérea; (5) fração aquosa após partição com éter etílico. A seta vermelha indica o ácido rosmarínico. Fase móvel: acetato de etila:hexano:ácido acético 55:35:10 (v/v/v)

Na Figura 10 é possível observar que nesta última partição da solução aquosa (Figura 10 – 1) com éter dietílico são eliminados interferentes mais polares da solução que ficam na fração aquosa remanescente (retidos no ponto de partida) (Figura 10 – 5). O ácido rosmarínico fica na fração etérea (Figura 10 – 4). Este processo facilita a próxima etapa do isolamento do ácido rosmarínico (item 4.1.2,

pág. 47), porque estes interferentes mais polares, se não forem removidos, ficam retidos na cromatoplaça, dificultando a separação e diminuindo a vida útil da placa.

No fim de todo o processo de preparação de amostra, obteve-se, então, a fração etérea, a qual foi seca e denominada amostra seca (AS). A AS teve seu peso mensurado em aproximadamente 1 g, o que corresponde a 10 % (m/m) da massa inicial do extrato em pó de sálvia. Isto significa que no fim desta etapa foi possível eliminar aproximadamente 90% das impurezas do extrato de sálvia.

5.1.2 Isolamento de ácido rosmarínico

Com a AS, realizou-se a técnica de cromatografia circular centrífuga em Chromatotron. A Figura 11 mostra o equipamento e a cromatoplaça durante o processo de separação. A Figura 12 mostra a CCD das diversas frações obtidas do Chromatotron e como ocorre a separação do ácido rosmarínico das outras substâncias presentes na amostra.

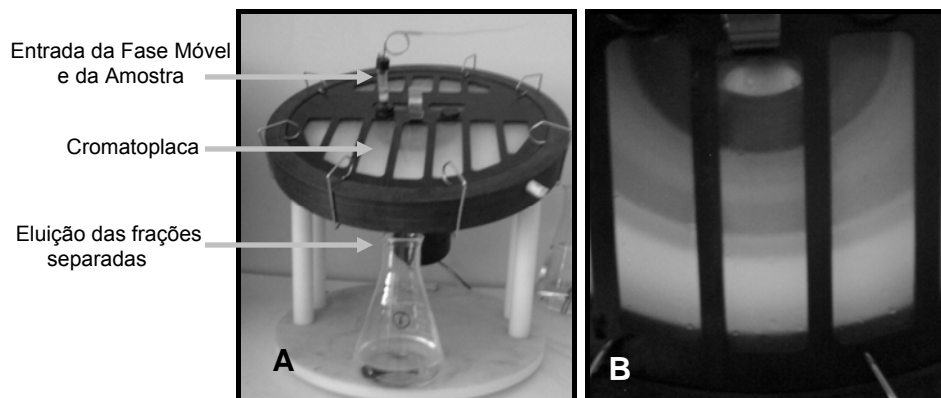


FIGURA 11—CHROMATOTRON (A); SEPARAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS NA CROMATOPLACA, COM VISUALIZAÇÃO SOB LUZ UV EM 254 NM (B)

O rendimento de ácido rosmarínico purificado, obtido nas várias repetições do procedimento a partir de 10 g de extrato em pó de partes aéreas de *Salvia officinalis*, variou entre 430 e 550 mg. Este rendimento está entre 4,3 e 5,5% (m/m) da massa inicial de extrato, e representa de 71,7 a 91,7% do rendimento teórico.

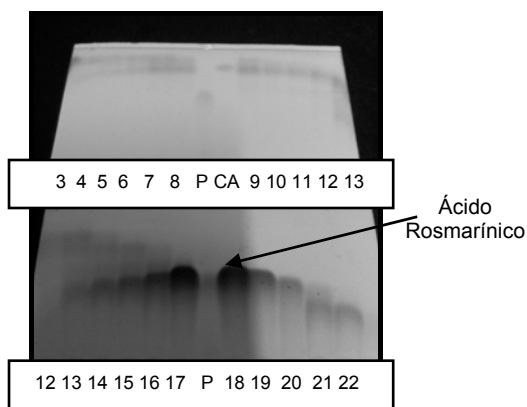


FIGURA 12– CCD DAS FRAÇÕES OBTIDAS NO ISOLAMENTO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO DO EXTRATO DE SÁLVIA POR CHROMATOTRON

NOTA: P: padrão de ácido rosmarínico; CA: padrão de ácido caféico; Fase móvel: acetato de etila:hexano:ácido acético 55:35:10 (v/v/v).

5.1.3 Identificação do ácido rosmarínico

O ácido rosmarínico isolado foi analisado por CLAE e por RMN. A Figura 13 mostra o cromatograma obtido, com o pico do ácido rosmarínico num tempo de retenção de 5,1 minutos, e pureza de 97,25%. A Figura 14 mostra o espectro UV-VIS do ácido rosmarínico.

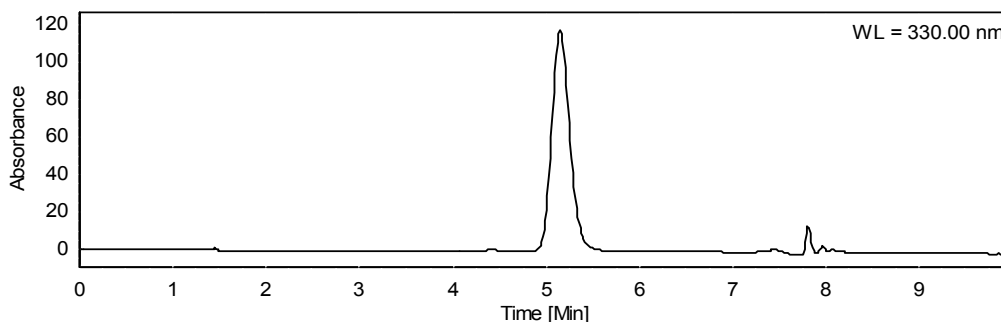


FIGURA 13– CROMATOGRAMA DO ÁCIDO ROSMARÍNICO ISOLADO DO EXTRATO DE PARTES AÉREAS DE SÁLVIA

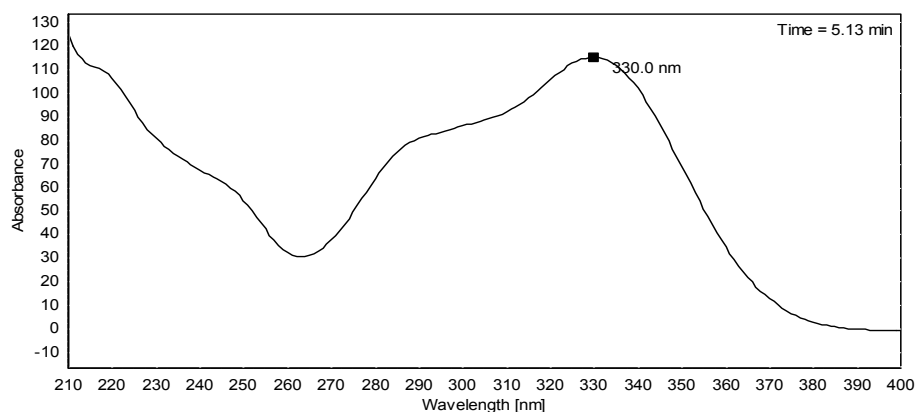
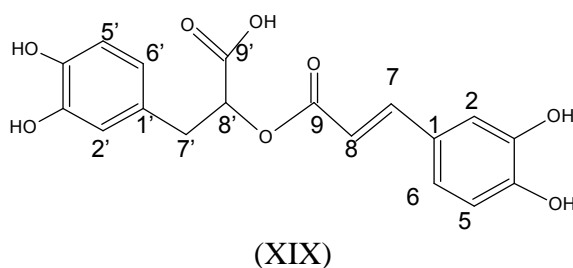


FIGURA 14– PERFIL ESPECTRAL DO ÁCIDO ROSMARÍNICO ISOLADO

O perfil espectral e o comprimento de onda máximo de 330 nm foram condizentes com os dados encontrados em literatura para o ácido rosmarínico (WANG *et al.*, 2004; XU *et al.*, 2008).

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H , ^{13}C e ^{13}C -DEPT obtidos para o ácido rosmarínico (XIX) isolado estão representados nas Figuras 15, 16 e 17.



O espectro de RMN ^1H (Figura 15) do ácido rosmarínico (XIX) apresenta dois dupletos em δ 7,55 e 6,27 ppm com constante de acoplamento (J) de 16,0 Hz, que caracterizam o par de prótons da ligação *trans* entre os carbonos 7 e 8. Os sinais entre δ 6,58 e 7,06 ppm, com integração para um total de 6 hidrogênios, representam os hidrogênios ligados aos carbonos aromáticos 2, 5, 6, 2', 5' e 6'. Em δ 5,18 ppm aparece um duplo duplete que caracteriza o hidrogênio ligado ao carbono 8'. Os sinais em δ 3,04 ppm (2 quartetos) representam os hidrogênios ligados ao carbono 7'. Os sinais do solvente metanol aparecem como um singleto em δ 4,90 ppm, intensificado pela presença de água na amostra, e como um quinteto em δ 3,30 ppm.

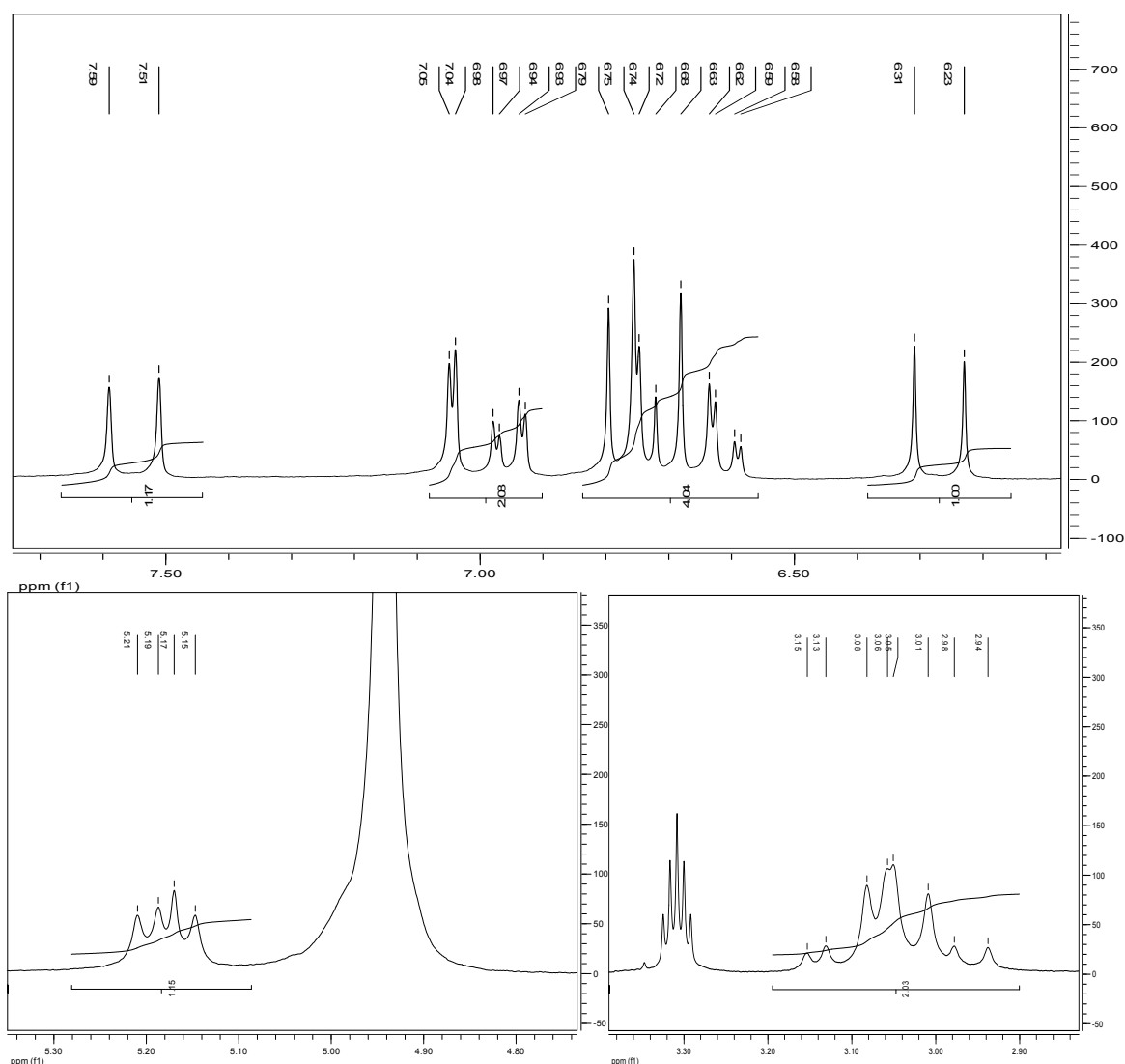
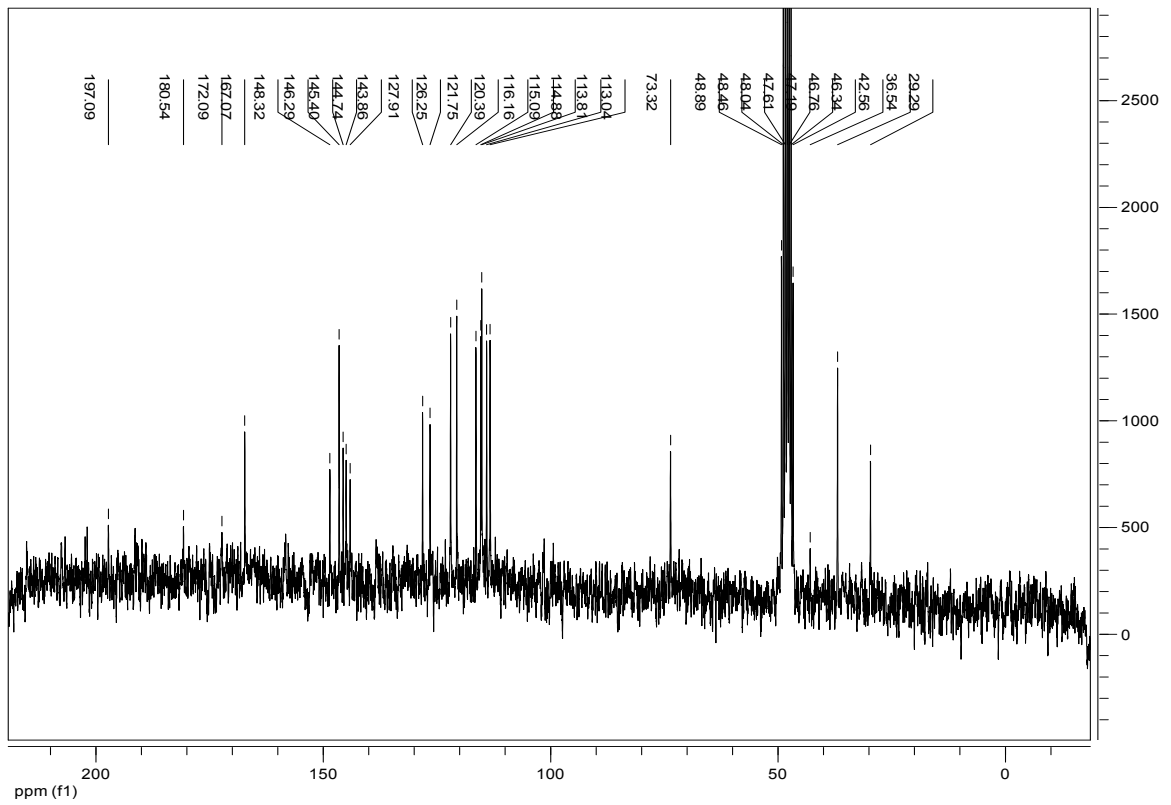
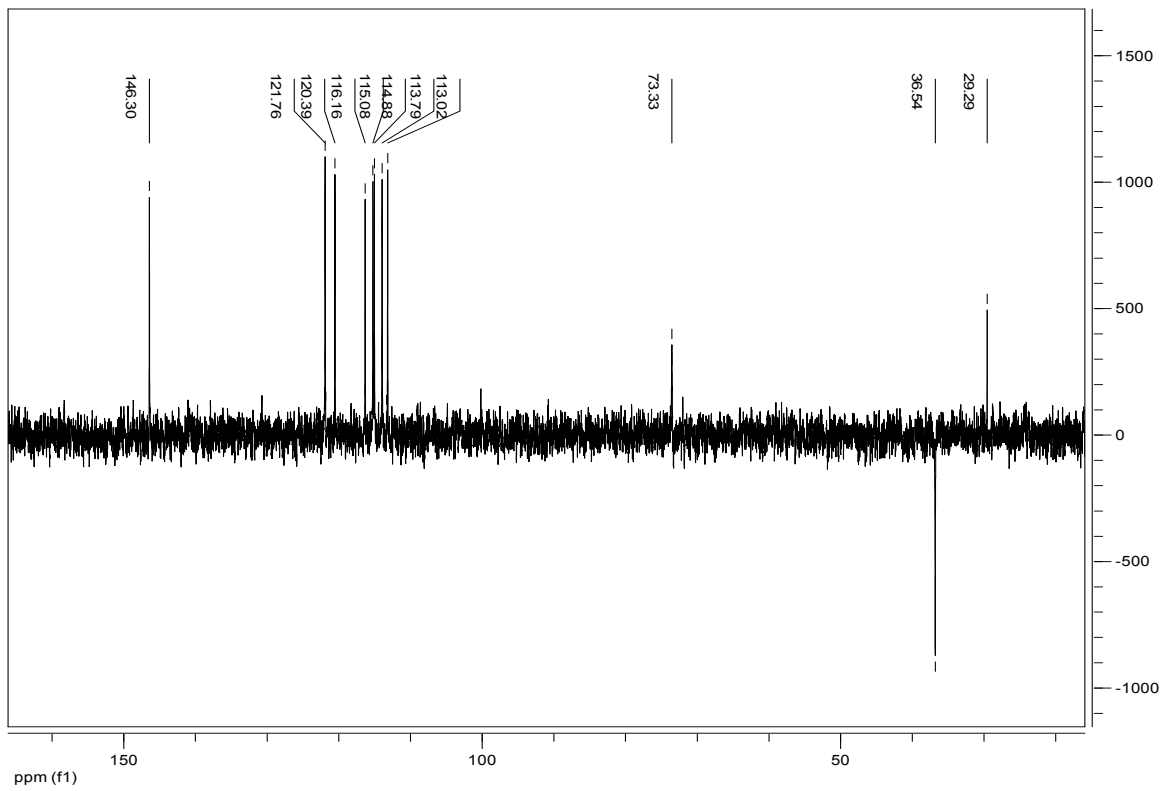


FIGURA 15 – RMN DE ^1H DO ÁCIDO ROSMARÍNICO

O espectro de RMN ^{13}C do ácido rosmarínico (Figura 16) apresenta um sinal em $\delta 180,54$ ppm correspondente ao carbono 9' da carboxila e um sinal em $\delta 167,07$ ppm do carbono 9 do grupamento éster. Os sinais em $\delta 148,32$, $145,40$, $144,74$ e $143,86$ ppm correspondem, respectivamente, aos carbonos aromáticos 4, 3, 3' e 4' ligados às hidroxilas fenólicas. Os carbonos 1 e 1' estão representados pelos sinais em $\delta 127,91$ e $126,25$ ppm. Os sinais em $\delta 121,75$, $120,39$, $116,16$, $115,09$, $114,88$ e $113,04$ ppm correspondem aos carbonos aromáticos não-substituídos 6, 6', 2', 5, 5' e 2, respectivamente. Os carbonos 7 e 8 da dupla ligação apresentam sinais em $\delta 146,29$ e $113,81$ ppm. Em $\delta 73,32$ ppm aparece o sinal do carbono 8' e em $\delta 36,54$ ppm o sinal do carbono 7'. O sinal do solvente metanol aparece na região de $\delta 48$ ppm.

FIGURA 16 – RMN ^{13}C DO ÁCIDO ROSMARÍNICOFIGURA 17 – RMN ^{13}C -DEPT-135 DO ÁCIDO ROSMARÍNICO

A Figura 17 apresenta o espectro RMN ^{13}C -DEPT-135 do ácido rosmarínico isolado. O sinal para baixo em $\delta 36,54$ ppm corresponde ao carbono 7', sendo o único grupamento $-\text{CH}_2$ presente na molécula. Os outros sinais correspondem a carbonos de grupamentos $-\text{CH}$ da molécula: em $\delta 146,30$ e $\delta 113,79$ ppm os sinais correspondem aos carbonos 7 e 8 da dupla ligação; os sinais entre $\delta 121,76$ e $113,02$ ppm correspondem aos carbonos aromáticos não-substituídos 6, 6', 2', 5, 5' e 2; e em $\delta 73,33$ ppm aparece o sinal do carbono 8'.

A análise dos espectros confirmou a identidade da substância isolada como o ácido rosmarínico, em conformidade com os dados encontrados em literatura (Tabela 7) (KELLEY *et al.*, 1976; KELLEY *et al.*, 1975).

TABELA 7- DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE ^1H E ^{13}C DO ÁCIDO ROSMARÍNICO

H / C	RMN ^1H δ ppm (multiplicidade / J, Hz)	RMN ^{13}C
1	-	126,5
1'	-	129,9
2	7,09 (d / 2)	113,6
2'	6,79 (d / 2)	117,1
3	-	143,7
3'	-	143,7
4	-	146,7
4'	-	142,4
5	6,79 (d / 8)	115,9
5'	6,69 (d / 8)	115,9
6	6,96 (dd / 2; 8)	122,4
6'	6,60 (dd / 2; 8)	121,8
7	7,50 (d / 16)	145,8
7' (2 H)	3,03 (2 q / 5; 8; 14)	36,8
8	6,23 (d / 16)	115,0
8'	5,17 (dd / 5; 8)	76,2
9	-	168,6
9'	-	177,2

FONTE: KELLEY *et al.* (1976); KELLEY *et al.* (1975)

NOTA: δ : deslocamento químico; J: constante de acoplamento; d: duplete; dd: duplo duplete; q: quarteto

5.2 IDENTIFICAÇÃO DA SÁLVIA OBTIDA COMERCIALMENTE

As drogas vegetais usadas para a otimização da extração do ácido rosmarínico e para análise de atividades biológicas da sálvia foram primeiramente identificadas. O material vegetal tinha um odor agradável, lembrando tempero, e coloração verde-acinzentada, o que é característico da *S. officinalis* (BISSET e WICHTL, 2001; PDR,

2000; TEUSCHER, 2006; WICHTL, 2004). Através da visualização de uma folha por lupa (microscópio estereoscópico), foi possível visualizar gotículas de óleo e uma grande quantidade de tricomas (“pêlos”) nas duas superfícies (Figura 18).

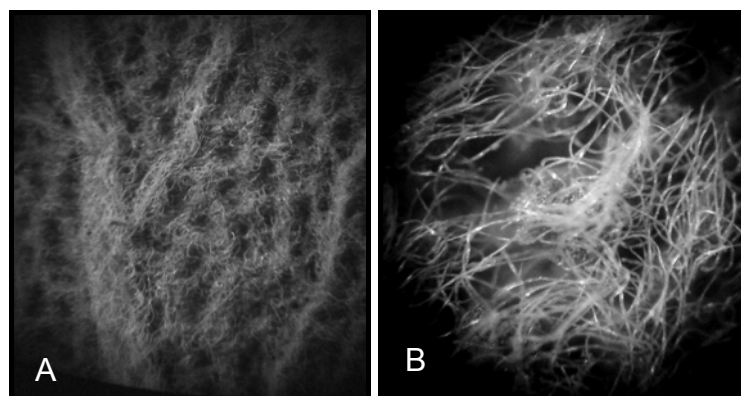


FIGURA 18– FOLHA DE SÁLVIA OBSERVADA ATRAVÉS DE LUPA

NOTA: A) aumento de 6,7x; B) aumento de 40x

A Figura 18-A representa a porção abaxial da folha de sálvia, sendo possível observar as nervuras e a grande quantidade de tricomas na superfície. A Figura 18-B representa um maior aumento da porção adaxial da folha, podendo-se observar algumas gotículas de óleo e os tricomas na superfície. O aspecto da folha corresponde à encontrada na literatura para a espécie (WICHTL, 2004).

A Figura 19 representa dois cortes transversais de folha seca da sálvia comercial.

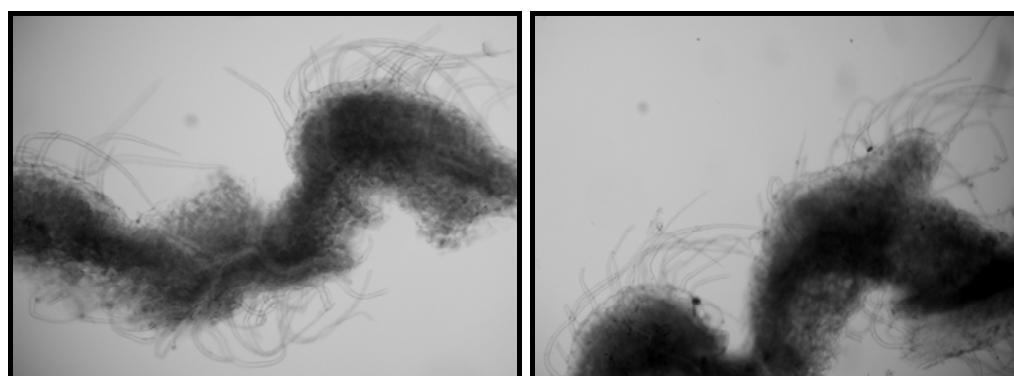


FIGURA 19– CORTES TRANSVERSAIS DA FOLHA DE SÁLVIA

Nos cortes da folha do material vegetal observa-se grande número de tricomas longos e multicelulares, característicos da espécie *S. officinalis*. Através de Wichtl (2004), foi possível identificar o material vegetal como sendo a espécie *S. officinalis*, e descartar a possibilidade de ser a *S. trilobae* (apresenta tricomas mais enrijecidos e bem eretos) pela diferença entre os tricomas das duas espécies.

As drogas vegetais comerciais apresentaram teor de umidade médio de 9,24 e 9,56% (m/m), valores que se encontram dentro do especificado pela literatura (entre 8 e 12%) (BRASIL, 1988). Os teores de umidade foram considerados em todos os experimentos que utilizaram o material vegetal.

5.3 DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ROSMARÍNICO NA *Salvia officinalis*

5.3.1 Condições cromatográficas

O desenvolvimento do método cromatográfico em CLAE para determinação de ácido rosmarínico em sálvia baseou-se naquele descrito por Wang e colaboradores (2004) (coluna Kingsorb C₁₈ (150 mm x 4,6 mm), mantida a 30 °C; fase móvel composta por água acidificada com 0,1% de ácido ortofosfórico (A) e metanol acidificado com 0,1% do mesmo ácido (B), com gradiente de 40 a 50% de B de 0-10 minutos, 50 a 60% de B de 10-15 minutos, e fluxo isocrático de 60% de B até 25 minutos de análise; fluxo de 1 mL/min.; e detecção em 330 nm).

As modificações no método foram com relação à coluna cromatográfica e à fase móvel. As colunas testadas foram: Varian Reselut e Agilent Eclipse, ambas C₁₈ (150 mm x 4,6 mm x 5µm), mantidas à temperatura de 25 °C durante a corrida cromatográfica. As fases móveis testadas foram compostas pelos solventes metanol (A) e água acidificada com ácido fosfórico 1% (B), nas proporções:

- Fase móvel 1 – A/B 45:55 (v/v) até 5 min., A/B 80:20 (v/v) de 5 a 10 min.;
- Fase móvel 2 – A/B 40:60 (v/v) até 6 min., A/B 80:20 (v/v) de 6 a 10 min.

O cromatograma obtido quando a coluna Varian Reselut foi testada com a fase móvel 1 na análise de um extrato de sálvia produzido nas condições estabelecidas no item 4.3.3 (pág. 51), é mostrado na Figura 20.

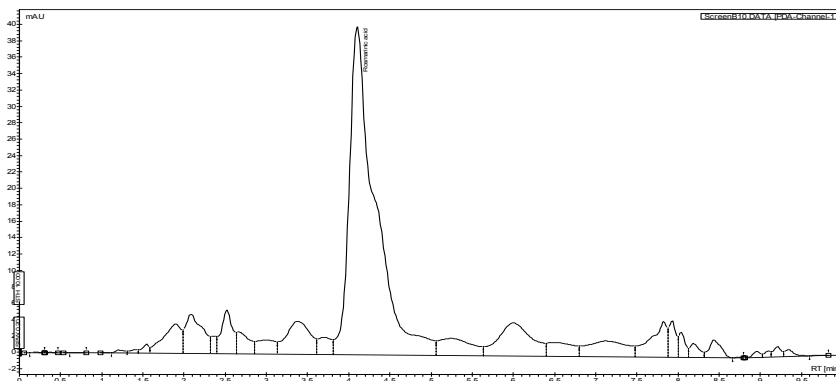


FIGURA 20- CROMATOGRAMA, OBTIDO ATRAVÉS DE COLUNA VARIAN RESELUT C₁₈, DE UM EXTRATO DE SÁLVIA PRODUZIDO ATRAVÉS DAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS DESCRITAS NO ITEM 4.3.3

Observa-se no cromatograma (Figura 20) um pico intenso em 4,1 min., o qual teve toda sua extensão analisada usando o detector de arranjo de diodos (DAD). Diferentes perfis espectrais foram encontrados na análise do pico cromatográfico, caracterizando uma mistura de substâncias, dentre as quais está o ácido rosmarínico. Então, a coluna Varian Reselut não conseguiu separar e resolver o pico do ácido rosmarínico de outras substâncias presentes no extrato de sálvia.

Testou-se, então, a coluna Agilent Eclipse, usando a fase móvel 1 e um extrato de sálvia preparado da mesma forma (item 4.3.3, pág. 51). O cromatograma obtido (Figura 21) apresenta dois picos intensos em 3,8 e 4,9 min., e outro pico menos intenso em 5,4 min. Os perfis espectrais destes três picos estão representados na Figura 22.

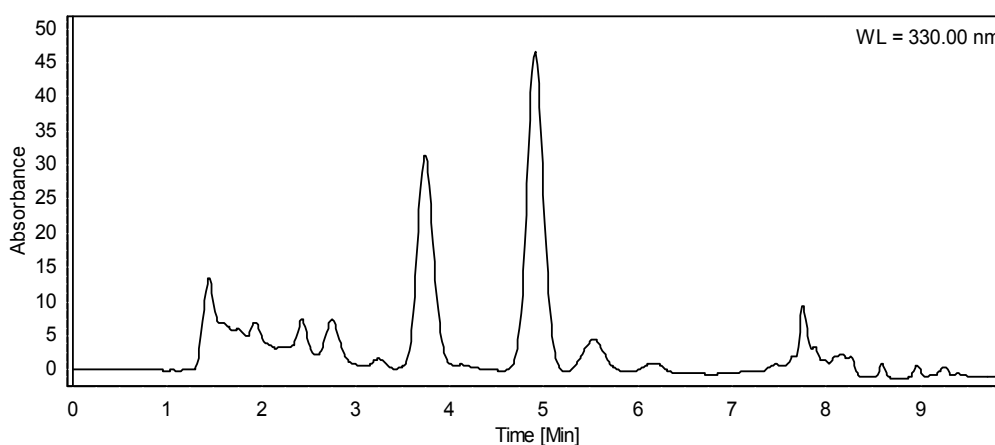


FIGURA 21- CROMATOGRAMA, OBTIDO ATRAVÉS DE COLUNA AGILENT ECLIPSE C₁₈, DE UM EXTRATO DE SÁLVIA PRODUZIDO ATRAVÉS DAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS DESCRITAS NO ITEM 4.3.3

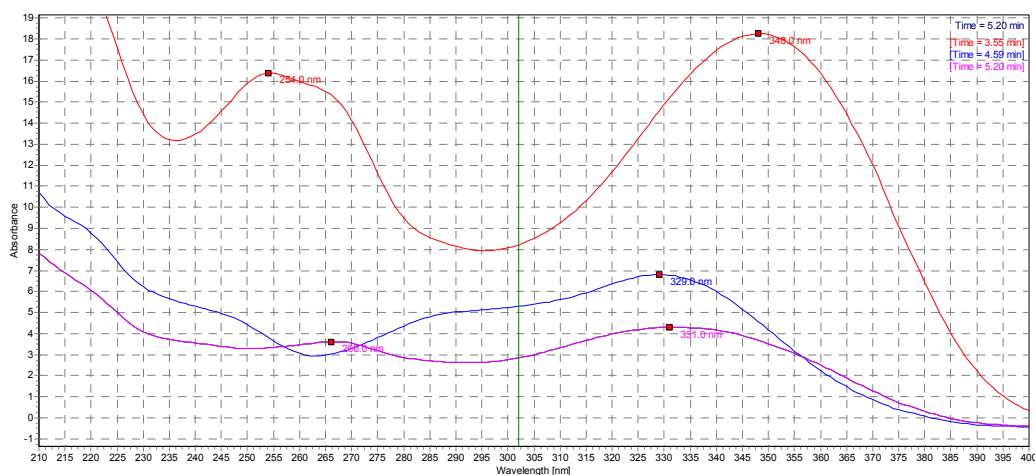


FIGURA 22- PERFIS ESPECTRAIS DOS PICOS ENTRE 3,8 E 5,4 MIN DO CROMATOGRAMA OBTIDO COM COLUNA AGILENT ECLIPSE C₁₈ (FIGURA 21)

NOTA: Curva em vermelho– pico em 3,8 min.; curva em azul– pico em 4,9 min.; curva em rosa– pico em 5,4 min.

A partir dos espectros apresentados na Figura 22 é possível afirmar que o pico cromatográfico em 4,9 min. é do ácido rosmarínico, já que o espectro em azul é compatível com o perfil espectral desta substância.

Os espectros em vermelho e rosa são os mesmos que apareciam junto ao do ácido rosmarínico na análise espectral do pico cromatográfico em 4,1 min. da Figura 20. Então, estas duas substâncias coeluíram com o ácido rosmarínico quando a separação cromatográfica foi realizada com a coluna Varian Reselut. Já quando a coluna Agilent Eclipse foi usada, a separação das três substâncias foi possível, e o pico do ácido rosmarínico se apresentou simétrico e bem resolvido em relação aos outros picos no cromatograma.

Os perfis espectrais em vermelho e rosa da Figura 22 são bastante similares aos relatados na literatura para a luteolina e para a apigenina, respectivamente (QUIRANTES-PINE *et al.*, 2009). Esses dois flavonóides já foram caracterizados na *S. officinalis*, sendo a luteolina o composto fenólico em maior abundância na espécie depois do ácido rosmarínico (FECKA e TUREK, 2007).

Após definição da Agilent Eclipse como a melhor coluna cromatográfica, trocou-se a fase móvel 1 para a 2. Nestas condições (Figura 23) o ácido rosmarínico, caracterizado a partir de seu espectro UV, teve seu tempo de retenção aumentado para 8,4 min., e não se apresentou bem resolvido do pico em 8,9 min. no cromatograma. Com isso, manteve-se a fase móvel 1 como melhor opção para a separação do ácido rosmarínico de extratos de sálvia.

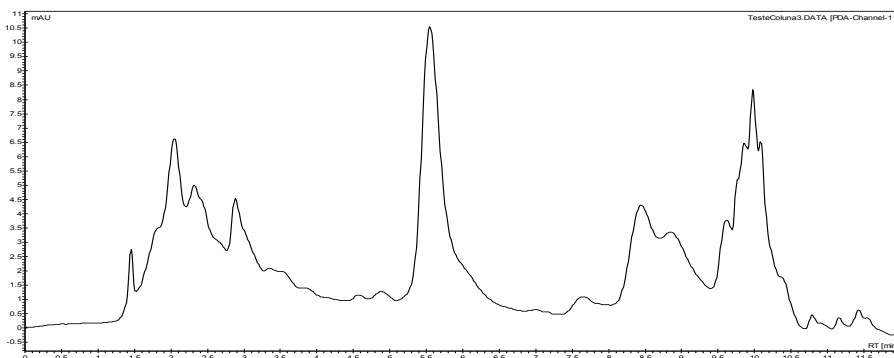


FIGURA 23- CROMATOGRAMA OBTIDO ATRAVÉS DE COLUNA AGILENT ECLIPSE C₁₈E COM FASE MÓVEL METANOL 40% ATÉ 6 MIN E METANOL 80% DE 6 A 10 MIN, DE UM EXTRATO DE SÁLVIA PRODUZIDO ATRAVÉS DAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS DESCRITAS NO ITEM 4.3.3

As vantagens das modificações sobre o método apresentado por Wang e colaboradores (2004) foram principalmente a diminuição do tempo de retenção do ácido rosmarínico de 8 para 5 min., e a redução do tempo de corrida cromatográfica de 25 para 10 min..

As condições cromatográficas estabelecidas foram testadas para a análise de extrato seco de sálvia. O extrato foi diluído em metanol 40%, na proporção 10:1 (m/v), filtrado em papel filtro, e diluído na proporção 1:20 em metanol 50% previamente à injeção. O cromatograma obtido foi bastante similar ao representado na Figura 21. O pico do ácido rosmarínico apresentou-se bem resolvido, sendo possível a quantificação da substância em $5,108 \pm 0,038\%$ (m/m).

5.3.2 Otimização da extração do ácido rosmarínico

A otimização da extração do ácido rosmarínico da *S. officinalis* foi feita por planejamento fatorial de experimentos. Neste procedimento, as variáveis (fatores) suspeitas de provocar influência no rendimento são examinadas simultaneamente ao invés de forma univariada. Dessa maneira, é possível reduzir o tempo de desenvolvimento e otimização, e ainda detectar interações entre os fatores (ZIVANOVIC *et al.*, 2008). O procedimento é realizado em duas etapas. Na primeira etapa de triagem, utiliza-se um planejamento fatorial de 2 níveis que pode ser representado por 2^n , onde n é o número de fatores que se deseja estudar. Os resultados desta etapa indicam quais fatores interferem de maneira significativa no método. Estes fatores serão utilizados para a fase seguinte de otimização, que pode

ser realizada por dois modelos diferentes, dos quais, os mais usados em cromatografia e preparação de amostras são planejamento composto central (*central composite design*) e *Box-Behnken* (FERREIRA *et al.*, 2007).

Para a etapa de triagem, foram avaliados 4 fatores (Tabela 4, item 4.3.2, pág. 50), contemplando um experimento de 2^4 em duplicata, em um total de 32 experimentos. Para os experimentos, a droga vegetal foi triturada e tamisada entre 310 e 740 μm (48 e 24 *mesh*) de tamanho de partícula. A proporção de massa de droga/solvente usada foi de 10:1 (m/v), ou 100 mg de droga para 10 mL de solvente. Alguns testes iniciais usando as granulometrias entre 740 e 1700 μm (24 e 10 *mesh*), assim como a proporção 20:1 (m/v) de droga/solvente deram rendimentos de extração menores do que as condições escolhidas.

Os antioxidantes testados foram o ácido ascórbico 1 mg/mL e o EDTA 10 mM (NARDINI *et al.*, 2002). Em todos os experimentos, a extração foi realizada em banho de ultrassom, na temperatura e tempo determinados. Os extratos foram filtrados em papel filtro e diluídos 1:10 em metanol 50% antes da injeção em cromatógrafo. As Figuras 24, 25 e 26 mostram os gráficos obtidos a partir dos resultados da etapa de triagem.

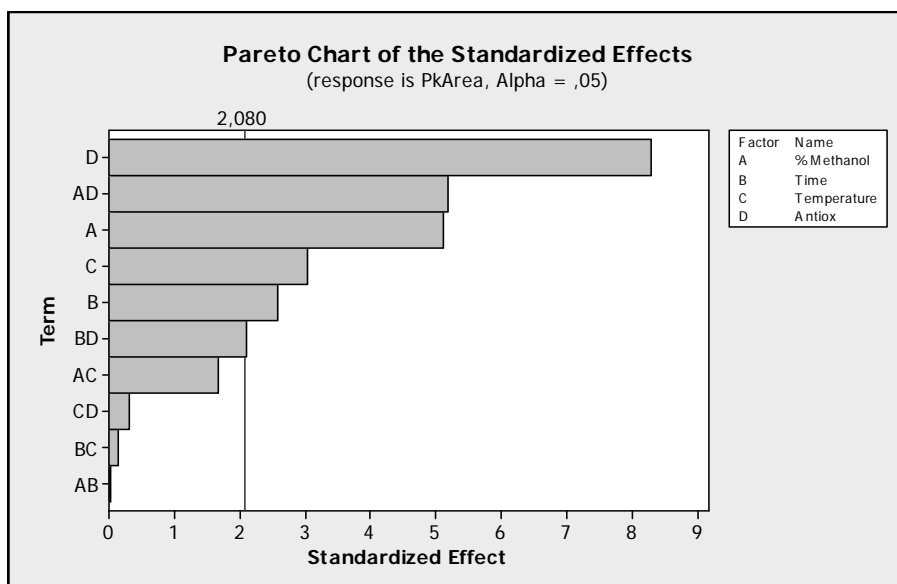


FIGURA 24- GRÁFICO DE PARETO PARA EFEITOS PADRONIZADOS-FATORES E INTERAÇÕES SIGNIFICATIVAS PARA A EXTRAÇÃO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO DA SÁLVIA

NOTA: A) Solvente; B) Tempo; C) Temperatura; D) Presença de antioxidante

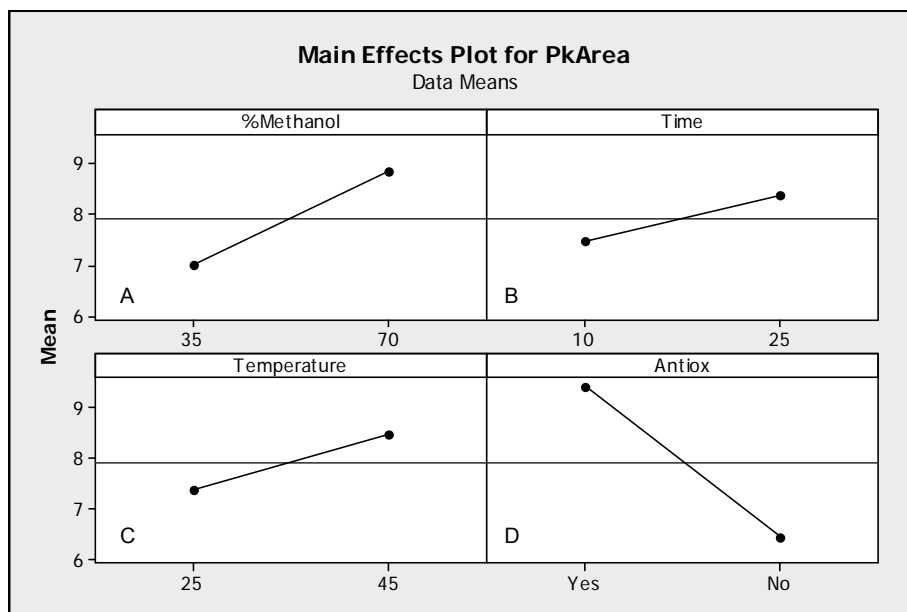


FIGURA 25- INFLUÊNCIA DOS FATORES INDIVIDUAIS NA EXTRAÇÃO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO DA SÁLVIA

NOTA: A) Solvente; B) Tempo; C) Temperatura; D) Presença de antioxidante

A Figura 24 mostra o gráfico de pareto que indica quais fatores ou interações entre eles interferem significativamente o rendimento da extração do ácido rosmarínico da sálvia. A Figura 25 mostra o gráfico de efeitos principais, traçado a partir da média das áreas de pico do ácido rosmarínico obtidas na condição especificada, sendo que quanto maior a inclinação da reta, mais significativa é a influência do fator na extração. Através dos gráficos das Figuras 24 e 25 pode-se dizer que o fator mais relevante foi a presença de antioxidantes, seguido da interação entre solvente e presença de antioxidantes, e da ação independente do solvente. Os fatores temperatura e tempo também alteraram significativamente o rendimento da extração.

Pelo gráfico da Figura 26, que mostra se ocorre ou não interação entre os fatores, é possível verificar que o aumento da porcentagem de metanol de 35 para 70%, melhorou o rendimento, independente do tempo ou da temperatura utilizada. Mas na presença de antioxidantes este efeito foi praticamente anulado, pois o rendimento foi praticamente igual para qualquer porcentagem de metanol utilizada.

Questionou-se se o efeito do antioxidante não seria em função da diminuição do pH (de 6 para 4). Para verificar este fato, foram selecionados dois experimentos da triagem realizados nas mesmas condições, porém um com e outro sem antioxidante. Os experimentos foram realizados em triplicata substituindo-se a

ausência ou presença de antioxidantes pelo ajuste do pH em 6 ou 4, respectivamente. A média dos picos do ácido rosmarínico encontradas para a extração em pH 6 e para a extração em pH 4, foram, respectivamente, 9,65 e 9,60. Este resultado comprovou que não há diferença significativa entre as extrações realizadas em pH 6 e 4, e que o efeito do antioxidante no aumento do rendimento não está ligado a alteração de pH. A ação provável dos antioxidantes na extração do ácido rosmarínico é a prevenção à oxidação ou degradação em meio aquoso, facilitada em determinadas condições. O EDTA pode realizar a quelação de metais oxidantes possivelmente presentes no meio, e o ácido ascórbico age como antioxidante.

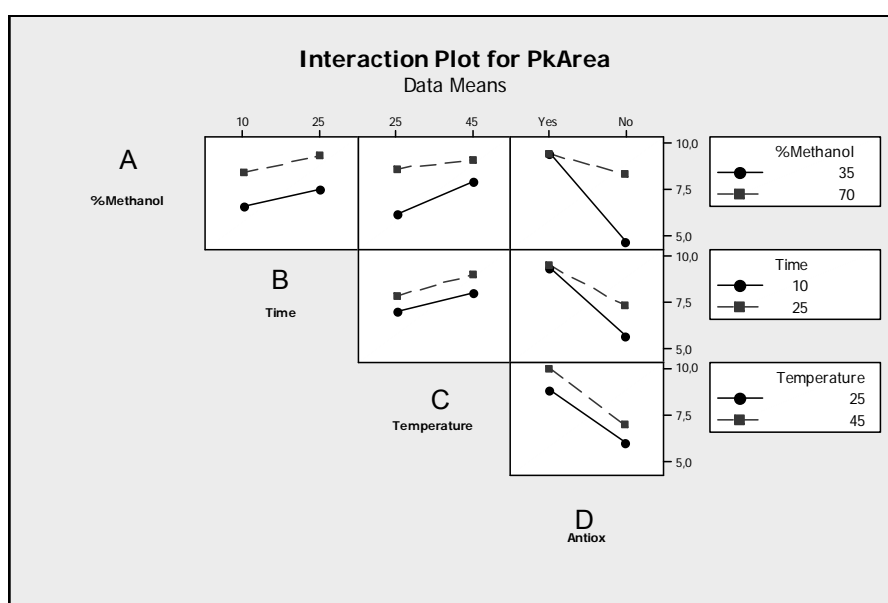


FIGURA 26– INTERAÇÃO ENTRE OS FATORES AVALIADOS NA EXTRAÇÃO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO DA SÁLVIA
NOTA: A) Solvente; B) Tempo; C) Temperatura; D) Presença de antioxidante

Através dos gráficos ainda foi possível concluir que o aumento no tempo e na temperatura melhorou o rendimento da extração. O fator tempo sofreu interação com a presença de antioxidantes, o que significa que na presença de antioxidantes precisa-se de um tempo de extração menor para atingir o mesmo rendimento que na ausência de antioxidantes.

A partir destes resultados, realizou-se a etapa de otimização com o método de *Central Composite Design*. Os 3 parâmetros selecionados foram avaliados em 5 níveis (Tabela 5, item 4.3.2, pág. 50) e as condições de extração foram as mesmas

da etapa de triagem, porém foi considerada a presença de antioxidantes em todas as extrações.

As áreas dos picos obtidas foram usadas para gerar os mapas de contorno (Figuras 27, 28 e 29).

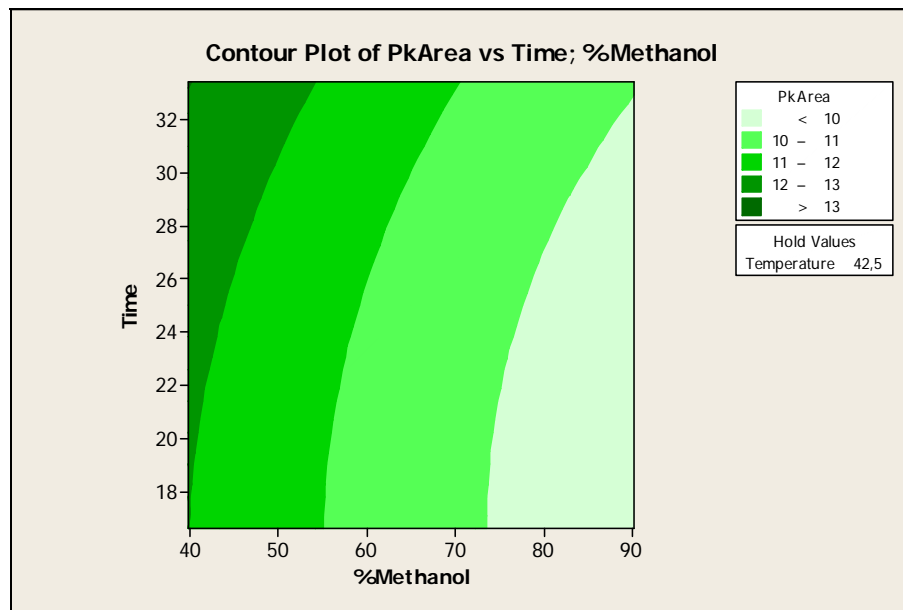


FIGURA 27- MAPA DE CONTORNO TEMPO VERSUS SOLVENTE DA OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE ÁCIDO ROSMARÍNICO DA SÁLVEA

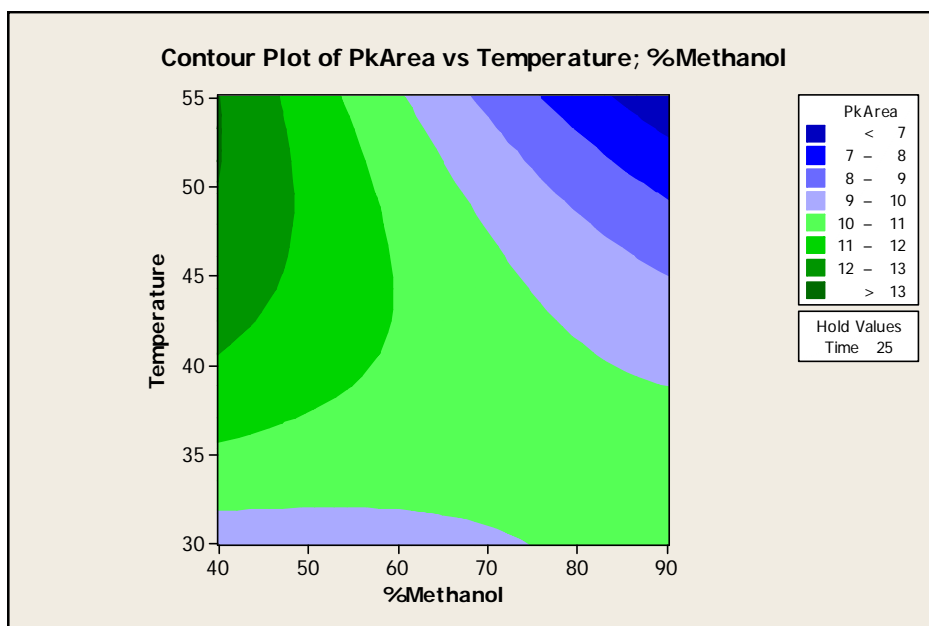


FIGURA 28- MAPA DE CONTORNO TEMPERATURA VERSUS SOLVENTE DA OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE ÁCIDO ROSMARÍNICO DE SÁLVEA

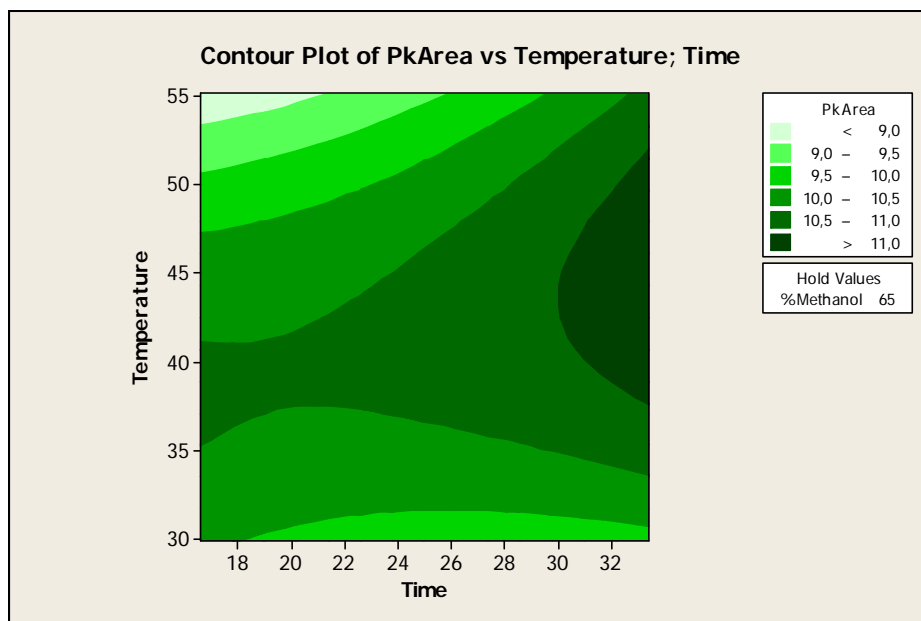


FIGURA 29- MAPA DE CONTOURNO TEMPERATURA *VERSUS* TEMPO DA OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE ÁCIDO ROSMARÍNICO DA SÁLVIA

A Figura 28 mostra que os melhores rendimentos foram obtidos com temperaturas de extração na faixa de 40-55 °C. Já no gráfico da Figura 29, a temperatura ideal esteve na faixa de 40 a 50 °C, pois temperaturas maiores reduziram o rendimento. Com isso, considerou-se a faixa entre 40 a 50 °C como a ideal para a extração do ácido rosmarínico, sendo selecionado o valor médio de 45.°C.

A partir de 30 minutos de extração foram obtidos os melhores rendimentos na extração do ácido rosmarínico (Figura 29). Porém, quando porcentagens de metanol mais baixas (p.e. 40%, Figura 27), ou temperaturas na faixa de 35 a 45 °C (Figura 29) foram usadas, rendimentos bons já foram obtidos a partir de 18 minutos de extração.

A proporção de metanol com maior rendimento na extração encontrou-se na faixa de 40 a 50% (Figuras 27 e 28), dependendo das condições de temperatura e tempo usadas. Porém não foi possível concluir através deste experimento a melhor proporção de metanol como solvente para extração, já que esta pode ser ainda menor que 40%.

Com isso, realizou-se mais uma etapa de otimização da extração (Tabela 6, item 4.3.2, pág. 50), mantendo-se a temperatura de extração em 45 °C e a presença de antioxidantes.

Com os resultados obteve-se o mapa de contorno mostrado na Figura 30.

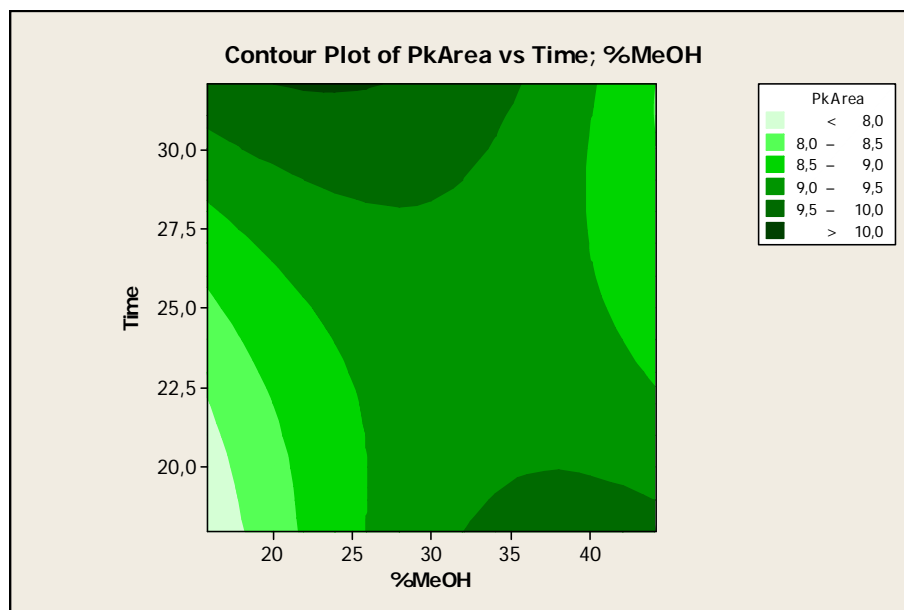


FIGURA 30- MAPA DE CONTORNO % DE METANOL *VERSUS* TEMPO DA OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE ÁCIDO ROSMARÍNICO DA SÁLVIA

Pelo gráfico da Figura 30 pode-se observar que a extração do ácido rosmarínico teve bons rendimentos em todas as concentrações testadas de metanol, porém o rendimento dependeu do tempo de extração. Para porcentagens de metanol entre < 20 e 32%, o tempo de extração ótimo foi > 28 minutos. Para porcentagens de metanol entre 32 e > 40%, o melhor tempo de extração foi \leq 20 minutos. Como maiores tempos de extração não são vantajosos experimentalmente, escolheu-se o tempo de extração de 20 min e o solvente de extração contendo 40% de metanol.

Assim, as condições estabelecidas por planejamento fatorial para a extração do ácido rosmarínico da sálvia foram: 100 mg de droga vegetal triturada e tamisada entre 310 e 740 μ m de partícula, diluição em 10 mL de metanol/água 40:60 (v/v) contendo 1 mg/mL de ácido ascórbico e 10 mM de EDTA, extração por 20 min. em banho de ultra-som a 45 °C, filtração do extrato em papel filtro, e diluição do mesmo na proporção 1:10 com metanol 50% para injeção em cromatógrafo.

5.3.2.1 Número de extrações necessárias pelo método otimizado

Para verificar o número de extrações necessárias para extrair todo o ácido rosmarínico pelo método otimizado, foram realizadas 3 extrações sucessivas do mesmo material vegetal, e os extratos foram analisados nas condições

estabelecidas. As concentrações de ácido rosmarínico nos extratos, considerando a diluição realizada, estão resumidas na Tabela 8. O experimento foi realizado em triplicata.

TABELA 8- EXTRAÇÕES SUCESSIVAS DO ÁCIDO ROSMARÍNICO PELO MÉTODO OTIMIZADO

AMOSTRAS	Concentração de ácido rosmarínico extraído ($\mu\text{g/mL}$ de extrato)			
	Extração 1	Extração 2	Extração 3	Total
1	188,8	20,0	2,1	210,9
2	197,0	18,3	1,9	217,2
3	192,1	18,3	1,9	212,3
Média \pm DP	192,63 \pm 4,13	18,87 \pm 0,98	1,97 \pm 0,12	213,47
% de ácido rosmarínico	90,24	8,84	0,92	100

Os resultados mostram que com apenas uma extração nas condições estabelecidas obtém-se aproximadamente 90% do ácido rosmarínico estimado na amostra de sálvia seca. A segunda extração ainda é relativamente importante, já que extrai quase 9% do total de ácido rosmarínico. As extrações a partir da segunda não são de reprodução vantajosa, já que as quantidades de ácido rosmarínico extraídas são bem menores.

Através dos dados da Tabela 8 observa-se que o método foi reprodutível, com desvios padrão (DP) baixos, já que os teores de ácido rosmarínico encontrados para as extrações das três amostras foram bem próximos.

A concentração média de ácido rosmarínico encontrado no extrato foi de 213,47 $\mu\text{g/mL}$ (2,13% m/m).

5.3.2.2 Aplicação do método em amostras de sálvia comerciais

O método de extração otimizado foi testado em duas amostras comerciais, uma droga seca fragmentada (DF) e uma droga seca vegetal em pó (DV). A amostra fragmentada foi triturada e tamisada para o tamanho de partícula entre 310 e 740 μm , e ambas as amostras foram tratadas e extraídas conforme a metodologia estabelecida (item 4.3.3, pág 51). Após análises, em triplicata, os resultados foram calculados e resumidos na Tabela 9.

TABELA 9– TEOR DE ÁCIDO ROSMARÍNICO EM AMOSTRAS COMERCIAIS DE SÁLVIA

Amostras	Média da concentração de AR na amostra injetada ($\mu\text{g/mL}$)	Média da concentração de AR na amostra comercial (% ou $\text{mg}/100\text{mg}$) \pm DP
DF	5,07	0,507 \pm 0,071
DV	20,69	2,069 \pm 0,029

NOTA: AR: Ácido rosmarínico; DF: droga vegetal fragmentada; DV: droga vegetal em pó; DP: desvio padrão.

O teor encontrado para a droga vegetal fragmentada foi bem inferior ao encontrado na droga vegetal em pó. Essas diferenças podem ser explicadas pela origem e pelo tratamento dado ao material vegetal desde sua colheita. Segundo a literatura (item 3.1.2), o teor de ácido rosmarínico na sálvia pode variar entre 0,1 a 3,3% (m/m). Esses resultados exemplificam a importância do controle de qualidade de matérias primas vegetais. A variação de teores de substâncias ativas pode ter influência na eficácia e segurança de produtos contendo drogas vegetais.

5.3.3 Avaliação da adequação do sistema

A avaliação da adequação do sistema analítico é um conjunto de testes para verificar se ele encontra-se adequado para as análises que serão realizadas. Parâmetros como número de pratos teóricos, fator de encaudamento, resolução e fator capacidade devem ser analisados para garantir o desempenho do sistema antes e durante as análises (SHABIR, 2003). Os limites recomendados pelo FDA (1994) e pela USP (2007) para alguns parâmetros, e os valores obtidos para o método desenvolvido estão na Tabela 10.

TABELA 10- RECOMENDAÇÕES PARA AVALIAÇÃO DA ADEQUAÇÃO DO SISTEMA ANALÍTICO

PARÂMETRO	RECOMENDAÇÃO	OBTIDO
Fator capacidade (k')	$>2,0$. O pico deve ser bem resolvido dos outros picos e do volume morto	2,5
Resolução (R_s)	> 2 entre os picos de interesse e do interferente mais próximo	2,72
Fator de encaudamento (T)	≤ 2	1,1
Número de pratos teóricos (N)	> 2000	3449,31

FONTE: SHABIR (2003)

O método de determinação de ácido rosmarínico apresentou os parâmetros em conformidade com o exigido pela legislação. O tempo de retenção do analito foi de 4,91 min. e a simetria de pico foi igual a 1,05. O k' e a R_s de acordo com o exigido garantem a separação satisfatória do pico de interesse dos outros que aparecem no cromatograma e do volume morto. Valores ótimos de T e de simetria de pico (próximo a 1) garantem que o pico não se apresente muito largo, e que o nível de retenção da substância na coluna seja aceitável.

5.3.4 Avaliação da estabilidade das soluções de padrão e das soluções amostras

A estabilidade das soluções de padrão de ácido rosmarínico (6,25 a 100 $\mu\text{g/mL}$) foi acompanhada nos tempos 0, 7, 15 e 30 dias após seu preparo, com armazenamento em geladeira a 4 °C. As áreas dos picos obtidas foram usadas para traçar uma curva para cada tempo de análise (Figura 31).

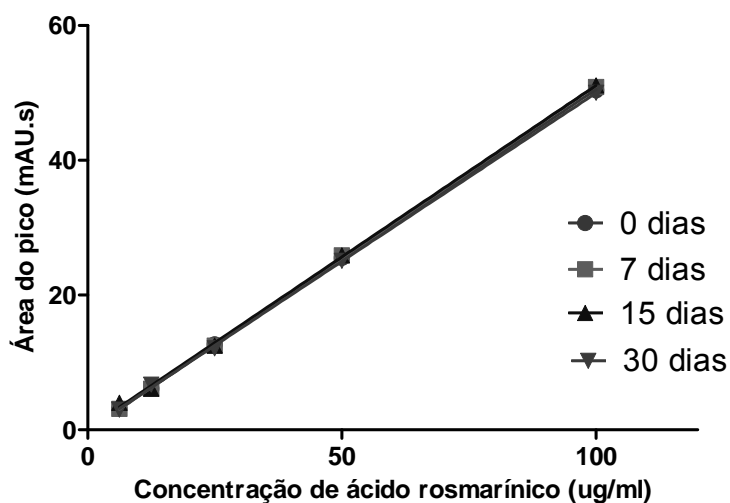


FIGURA 31– CURVAS DAS SOLUÇÕES PADRÕES DE ÁCIDO ROSMARÍNICO ANALISADAS EM 0, 7, 15 E 30 DIAS

Os coeficientes de correlação (r) das curvas foram superiores a 0,9997. A análise de variância das áreas dos picos do ácido rosmarínico obtidas para cada concentração mostrou que não houve diferença significativa entre elas nos períodos de tempo analisados. Estes resultados mostraram que as soluções padrão, armazenadas a 4 °C apresentam estabilidade de, pelo menos, 30 dias.

As amostras de extratos também foram avaliadas quanto a estabilidade nos tempos 0, 3 e 7 dias, armazenadas em geladeira a 4 °C após seu preparo. A análise das áreas pelo teste de variância (ANOVA) com execução do teste de Tukey, mostrou não haver diferença significativa entre as médias das áreas nos tempos 0 e 3 dias, mas considerou diferença significativa de aproximadamente 6,5% entre as médias nos tempos 0 e 7 dias (Tabela 11). Com isso, pode-se considerar que as amostras são estáveis num período de 3 dias armazenadas em geladeira a 4 °C, mas que em 7 dias, ou entre 4 e 7 dias, perdem a estabilidade, não podendo ser aproveitadas para análise.

TABELA 11- ESTABILIDADE DAS AMOSTRAS DE SÁLVIA NOS TEMPOS 0,3 E 7 DIAS

TEMPO (dias)	MÉDIA DAS ÁREAS ± DP	%
0	9,58 ± 0,20	100
3	9,44 ± 0,13	98,54
7	8,96 ± 0,24	93,53

5.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

Segundo a Resolução RE 899 da ANVISA (2003), o método analítico desenvolvido para determinação de ácido rosmarínico em *S. officinalis*, tanto na droga vegetal como em extratos, pode ser classificado na categoria 1, sendo caracterizado como um teste quantitativo para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas. Para esta categoria é exigida a avaliação dos parâmetros especificidade, linearidade, intervalo de confiança, precisão repetibilidade e intermediária, exatidão, e robustez (BRASIL, 2003). O ICH (*International Conference on Harmonization*) também estabelece estes mesmos parâmetros para métodos de doseamento (ICH, 1995)

Todas as etapas da validação do método analítico foram realizadas usando as condições cromatográficas e de preparação de amostra estabelecidas no item 4.3.3 (pág. 51).

5.4.1 Especificidade e seletividade

A análise do perfil espectral do pico com tempo de retenção igual ao do padrão de ácido rosmarínico nas amostras foi feita pelo detector de arranjo de diodos (DAD). Toda a extensão do pico apresentou somente um perfil espectral, tratando-se de uma só substância. Além disso, o espectro UV apresentou-se bastante similar ao do padrão (Figura 32), sendo possível afirmar que o pico analisado nas amostras é, de fato, o ácido rosmarínico.

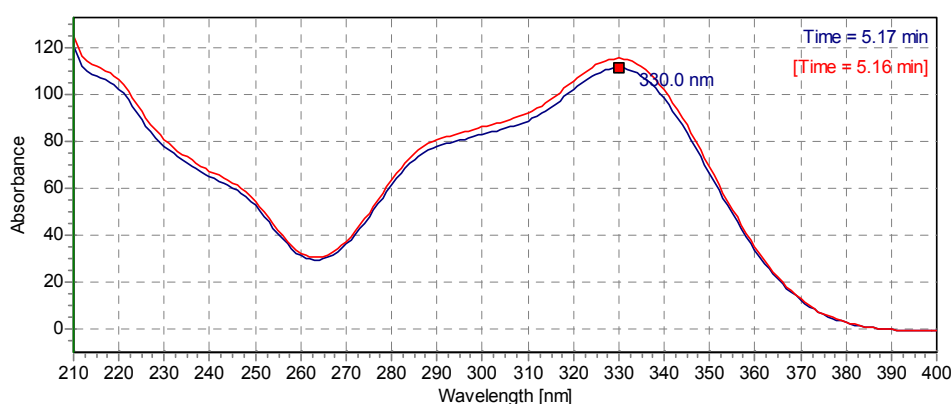


FIGURA 32- COMPARAÇÃO DO PERFIL ESPECTRAL DO PADRÃO E DO ÁCIDO ROSMARÍNICO NAS AMOSTRAS
NOTA: Curva em azul – padrão; curva em vermelho – analito da amostra

A seletividade pelo método de adição de padrão foi realizada como descrito para a exatidão (item 4.4.5). Neste caso, observa-se o paralelismo entre as curvas de padrão e padrão adicionado de amostra. A verificação desta característica foi obtida pela comparação do coeficiente angular (a) das duas retas (Figura 36), que foi de 0,5055 para a reta de padrão e 0,4858 para a reta de padrão adicionado de amostra. A diferença entre esses valores (3,9%) não foi estatisticamente significativa, e as duas retas foram consideradas equivalentes. Se considerarmos que a reta que contém o extrato foi submetida a todas as etapas do procedimento, atribui-se o resultado à variabilidade inerente ao método. Desta maneira, comprovou-se a seletividade do método analítico.

5.4.2 Linearidade e intervalo de aplicação

Para verificar a linearidade do método para o padrão, preparou-se uma curva padrão de ácido rosmarínico com 5 pontos em triplicata, nas concentrações de 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL (Figura 33). A curva apresentou uma correlação linear ($r=0,9999$), superior ao exigido pela ANVISA (0,99) e pelo FDA (0,999) (BRASIL, 2003; FDA, 1994).

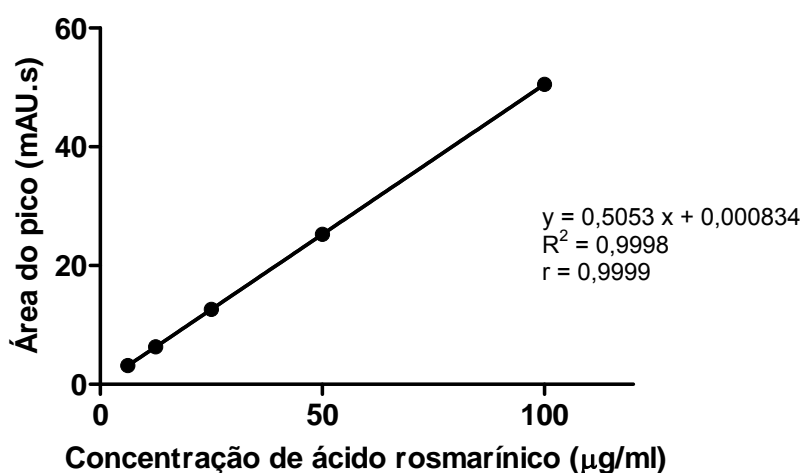


FIGURA 33- LINEARIDADE DO MÉTODO PARA O PADRÃO DE ÁCIDO ROSMARÍNICO

A linearidade do método para a matéria-prima vegetal foi avaliada através de cinco tomadas de amostras em triplicata entre 80 e 120% da usualmente praticada. As amostras foram submetidas ao procedimento usual, e os extratos foram injetados no cromatógrafo. Considerando o valor verdadeiro 18,85 mg de ácido rosmarínico/g droga, calculado na exatidão (item 5.4.5), os valores esperados da quantidade de ácido rosmarínico presente nas diferentes tomadas de amostra de sálvia e da concentração do mesmo na solução injetada estão apresentados na Tabela 12. Com os valores desta tabela, traçou-se um gráfico área do pico obtido (mAU.s) *versus* concentração teórica de analito injetado (µg/mL) (Figura 34).

TABELA 12- CONCENTRAÇÃO TEÓRICA DE ÁCIDO ROSMARÍNICO NAS DIFERENTES TOMADAS DE AMOSTRA DO MATERIAL VEGETAL

% TOMADA DE AMOSTRA	TOMADA DE AMOSTRA (mg)	QUANTIDADE (mg de ácido rosmarínico)	CONCENTRAÇÃO INJETADA ($\mu\text{g/mL}$)
80	80	1,508	15,08
90	90	1,697	16,97
100	100	1,885	18,85
110	110	2,074	20,74
120	120	2,262	22,62

NOTA: Considerando o material vegetal com 18,85 mg de ácido rosmarínico/g, e o extrato na proporção 100 mg droga/ 10 mL solvente, diluído 1:10 antes da injeção.

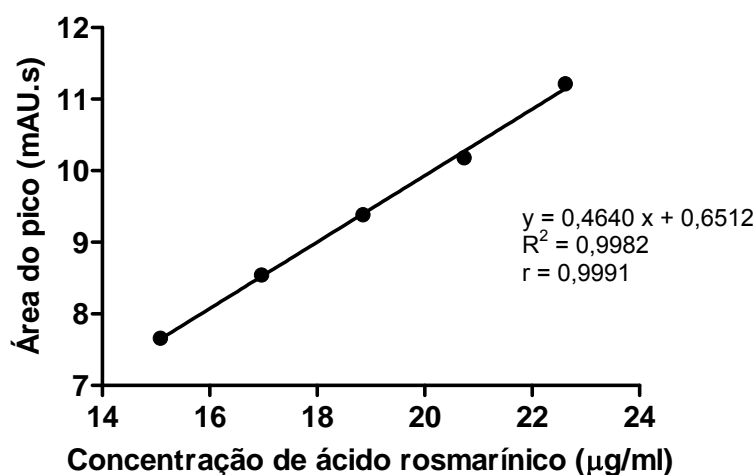


FIGURA 34- LINEARIDADE DO MÉTODO PARA O MATERIAL VEGETAL

O gráfico apresentado na Figura 34 expõe o valor de coeficiente de correlação de 0,9991, superior ao exigido pela ANVISA (0,99) e pelo FDA (0,999).

A ANVISA ainda recomenda a avaliação dos resíduos. Resíduos são as diferenças entre os valores experimentais e aqueles calculados pela equação da reta. Um gráfico é construído plotando os resíduos *versus* as concentrações das amostras. Uma distribuição aleatória destes pontos indica adequação do modelo (equação de regressão). A Figura 35 apresenta o gráfico dos resíduos apresentados pelas médias dos dados de linearidade da metodologia de análise da droga seca. A distribuição aleatória dos resíduos permite concluir que a equação da curva analítica é adequada.

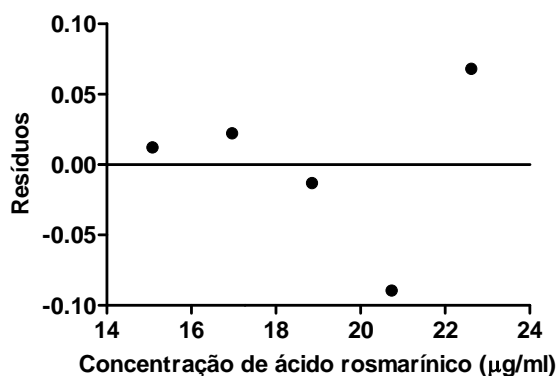


FIGURA 35- RESÍDUOS OBTIDOS PELOS DADOS DE LINEARIDADE PARA A DROGA VEGETAL

O intervalo de aplicação foi determinado como a faixa avaliada nos testes de linearidade e exatidão, ou seja, de 80 a 120% da concentração esperada para cada amostra.

5.4.3 Repetibilidade

A repetibilidade do método foi avaliada através de seis análises de determinação a 100% da tomada de amostra (100 mg), realizadas pelo mesmo analista (A) (Tabela 13) O coeficiente de variação (desvio padrão relativo) entre as análises foi de 3,25%, inferior ao máximo exigido pela ANVISA (5%) (BRASIL, 2003).

5.4.4 Precisão intermediária

A precisão intermediária foi avaliada pela análise do desvio padrão relativo (DPR) entre 12 análises executadas por dois analistas diferentes (A e B) em dias diferentes.(Tabela 13) O DPR encontrado foi de 4,05%, inferior ao exigido pela ANVISA (5%) (BRASIL, 2003).

TABELA 13- PRECISÃO REPETIBILIDADE E INTERMEDIÁRIA PARA O MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO

ANALISTA	MÉDIA DAS ÁREAS \pm DP	MÉDIA DA CONCENTRAÇÃO DE AR INJETADA ($\mu\text{g}/\text{mL}$) \pm DP	MÉDIA DO TEOR DE AR NA DROGA VEGETAL (mg/g) \pm DP	DPR (%)
A	9,435 \pm 0,31	18,73 \pm 0,61	18,73 \pm 0,61	3,28
B	9,060 \pm 0,36	17,98 \pm 0,72	17,98 \pm 0,72	4,00
A+B	9,247 \pm 0,38	18,36 \pm 0,74-	18,36 \pm 0,74	4,05

NOTA: AR: Ácido rosmarínico; DP: desvio padrão; DPR: desvio padrão relativo; resultado final gerado em função da tomada de amostra e das diluições realizadas.

5.4.5 Exatidão

A exatidão de um método se dá pela concordância entre o resultado prático de uma análise e o valor aceito como verdadeiro. Esse parâmetro pode ser avaliado através de vários tipos de ensaio, o qual deve ser escolhido em função da natureza da amostra a ser analisada. No caso de matéria-prima vegetal, que constitui um exemplo cuja obtenção da matriz sem o analito é impossível, sugere-se o teste de adição de padrão à amostra. Dessa forma, para determinar a exatidão do método para análise de ácido rosmarínico em sálvia foram construídas duas curvas, uma de padrão e outra de padrão adicionado de quantidades fixas de amostra, nas concentrações descritas na Tabela 14.

TABELA 14- CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO ROSMARÍNICO NA CURVA PADRÃO E NA CURVA PADRÃO + AMOSTRA

PONTO	CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO ROSMARÍNICO ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
	SOLUÇÃO PADRÃO	PADRÃO + AMOSTRA
1	6,25	0
2	12,5	10
3	25	20
4	50	30
5	100	40

NOTA: * A concentração descrita para padrão + amostra não contempla a quantidade de ácido rosmarínico da amostra

O gráfico da Figura 36 apresenta as duas retas obtidas. O ponto onde a reta do padrão adicionado de amostra encontra o eixo das ordenadas corresponde à área de ácido rosmarínico (9,5) presente na amostra, quando não foi adicionado

padrão. A extrapolação deste ponto na reta do padrão define, no eixo das abscissas, a concentração real de ácido rosmarínico no extrato analisado.

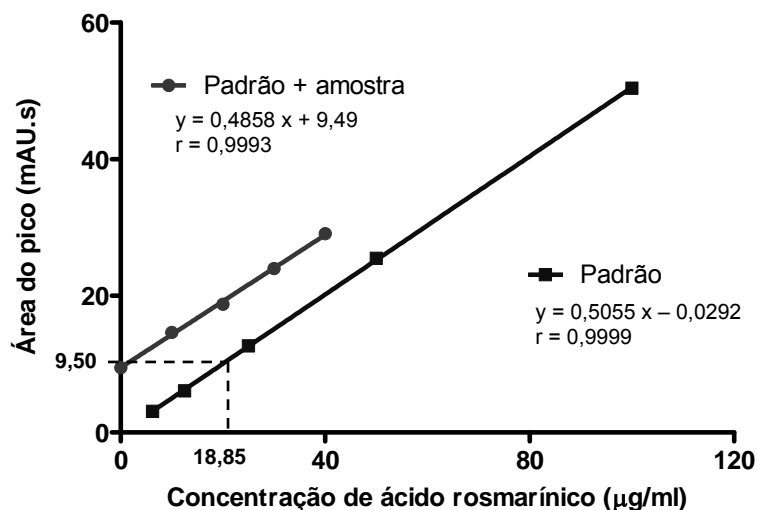


FIGURA 36- CURVA DE PADRÃO E DE PADRÃO ADICIONADO À AMOSTRA

NOTA: Apresentação da extrapolação da área equivalente ao coeficiente linear (b) da curva de padrão + amostra na curva do padrão (linha pontilhada)

A concentração real de analito na amostra foi de 18,85 µg/mL. Considerando a diluição 1:10 realizada com o extrato para originar a amostra, pode-se afirmar que a concentração de ácido rosmarínico no extrato era de 188,5 µg/mL. Como 100 mg de material vegetal foram usados para produção dos 10 mL de extrato, é correto afirmar que nessa massa de droga havia 1,885 mg de ácido rosmarínico, ou 18,85 mg/g de droga vegetal seca.

A partir deste valor verdadeiro encontrado, foram analisadas as amostras preparadas a partir de tomadas de amostra de 80, 100 e 120% da usual, em triplicata. Os valores teóricos para a concentração de ácido rosmarínico nas amostras a 80 e 120% foram calculados a partir do valor verdadeiro, e estes valores teóricos foram comparados com os obtidos experimentalmente, sendo possível o cálculo da recuperação do método (Tabela 15).

TABELA 15– RECUPERAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE DE ÁCIDO ROSMARÍNICO NA SÁLVIA SECA

% DE TOMADA DE AMOSTRA	RESULTADO ESPERADO (mg/g)	RESULTADO FINAL (mg/g)	RECUPERAÇÃO MÉDIA ± DPR (%)
80	15,08	15,29	101,39 ± 1,31
		15,49	
		15,09	
100	18,85	18,65	98,94 ± 1,07
		18,45	
		18,85	
120	22,62	22,41	98,50 ± 1,84
		21,82	
		22,61	

NOTA: DPR: desvio padrão relativo

A recuperação esteve no intervalo 98,50-101,39%, dentro do estabelecido pelo FDA ($100 \pm 2\%$) (FDA, 1994), podendo-se considerar o método exato.

5.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÁCIDO ROSMARÍNICO E DA SÁLVIA

A *S. officinalis* é uma planta amplamente usada como tempero caseiro e na indústria de alimentos, e é empregada popularmente para tratamento de problemas de saúde. Por possuir vários constituintes químicos funcionais, muitos trabalhos vêm sendo publicados com relação aos benefícios do consumo desta espécie à saúde. Algumas atividades biológicas da sálvia já foram comprovadas cientificamente, e muitas delas estão associadas com o alto teor de antioxidantes que apresenta (AHERNE *et al.*, 2007; BEN FARHAT *et al.*, 2009; KULISIC-BILUSIC *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 1999; ZUPKO *et al.*, 2001). Dentre esses antioxidantes está o ácido rosmarínico, para o qual atividades farmacológicas foram atribuídas principalmente com relação ao sistema nervoso central (IUVONE *et al.*, 2006; TAKEDA *et al.*, 2002), além de suas potentes atividades antioxidante, antiinflamatória e imunomodulatória (KANG *et al.*, 2003; VAN KESSEL *et al.*, 1986; ZHENG e WANG, 2001). Recentemente, comprovou-se a natureza foto-protetora do ácido rosmarínico (SANCHEZ-CAMPILLO *et al.*, 2009), o qual atua como sequestrante de radicais livres e indutor da melanogênese (LEE, KIM *et al.*, 2007). Apesar disso, não existem relatos na literatura da influencia da sálvia na melanogênese e se o ácido

rosmarínico contribui de alguma forma para esta ação. Então, no presente trabalho foi estudado o potencial melanogênico de um extrato fluido e de uma infusão (chá) de sálvia, e a contribuição do ácido rosmarínico para esta ação. O potencial tóxico tanto da sálvia como do ácido rosmarínico também foi avaliado com relação aos náuplios de artemia e duas diferentes linhagens celulares, com a finalidade de colaborar na previsão de possíveis atividades biológicas e de aspectos de segurança de ambos para aplicação na área terapêutica e no uso popular.

5.5.1 Determinação do peso seco e de ácido rosmarínico nos extratos de sálvia

O extrato fluido (EF) e a infusão (INF) de sálvia tiveram seu peso seco e o seu teor de ácido rosmarínico determinado antes de serem usados para os experimentos de atividades biológicas. Os valores encontrados foram:

- EXTRATO FLUIDO – peso seco: 156,1 mg/mL; concentração de ácido rosmarínico: 5,88 mg/mL ou 3,77% (m/m);

- INFUSÃO – peso seco: 14,3 mg/mL; concentração de ácido rosmarínico: 0,51 mg/mL ou 3,57% (m/m).

Tanto os resultados de peso seco como de doseamento de ácido rosmarínico dos extratos de sálvia foram coerentes, já que ambos mostraram-se aproximadamente 10 vezes maior para o EF, que se encontra 10 vezes mais concentrado que a INF. A pequena diferença que se observa nos resultados é devido à eficiência e ao solvente da extração, já que a extração aquosa 1:10 para a infusão não foi realizada de forma exaustiva e ocorreu por um intervalo de tempo bem menor do que a extração hidroalcoólica 1:1. Os cromatogramas do EF e da INF de sálvia (Figuras 37 e 38) mostram significativas diferenças na composição química desse dois extratos. O EF apresenta maior quantidade de substâncias mais apolares e maior proporção de ácido rosmarínico do que a INF, devido a diferentes solventes terem sido utilizados na extração de ambos.

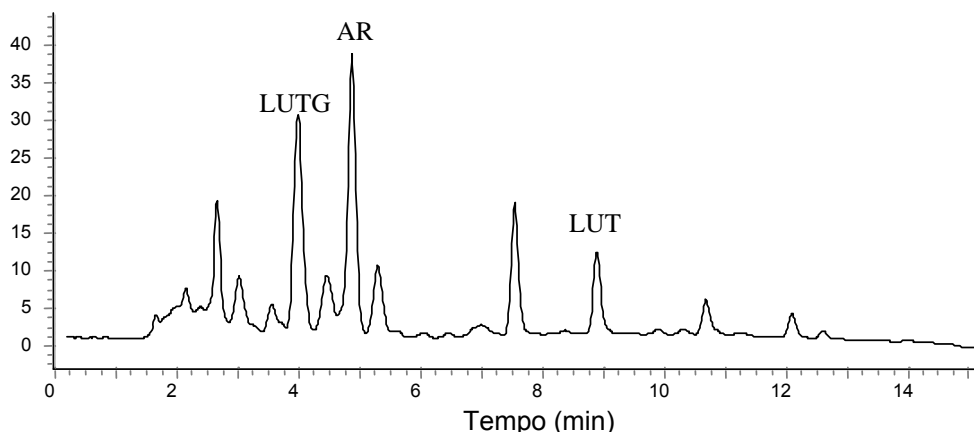


FIGURA 37- PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO FLUIDO (EF) DE SÁLVIA
 NOTA: LUTG: luteolina-7-O-glucuronídeo; AR: ácido rosmarínico; LUT: luteolina

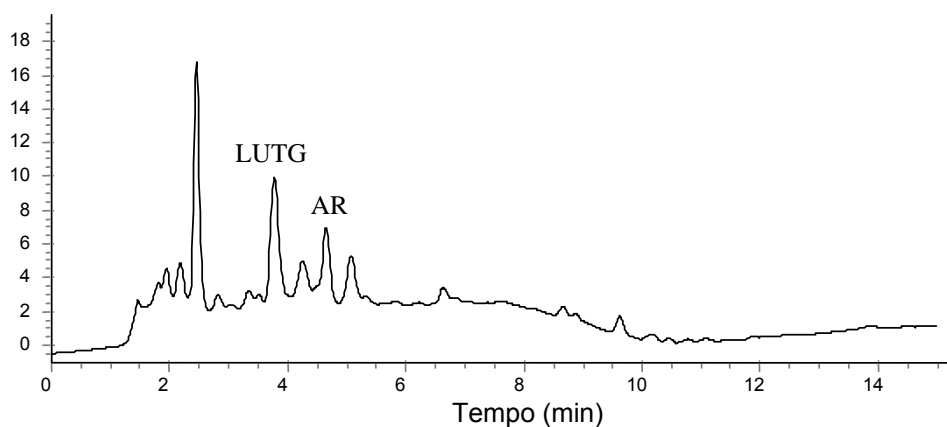


FIGURA 38- PERFIL CROMATOGRÁFICO DA INFUSÃO AQUOSA (INF) DE SÁLVIA
 NOTA: LUTG: luteolina-7-O-glucuronídeo; AR: ácido rosmarínico

Através da comparação do perfil cromatográfico e espectral das substâncias presentes no EF e na INF de sálvia com o padrão de luteolina, e com base no descrito em literatura, pode-se identificar a luteolina e/ou a luteolina-7-O-glucuronídeo nos extratos.

As doses de EF e de INF utilizadas nos ensaios biológicos de toxicidade celular e de influência na melanogênese foram estabelecidas com relação à concentração de ácido rosmarínico presente nessas preparações.

5.5.2 Teste de letalidade para náuplios de *Artemia salina*

A análise de toxicidade de substâncias e extratos aos náuplios de *Artemia salina* Leach é um método simples, rápido e de baixo custo para determinação da

toxicidade e para sugestão de compostos bioativos, que se baseia na viabilidade remanescente desses microcrustáceos após exposição ao tratamento em estudo. O método pode ser considerado um teste inicial para prever atividades farmacológicas de substâncias puras e extratos, os quais podem ser submetidos posteriormente a ensaios mais elaborados para determinar atividades biológicas específicas. São consideradas tóxicas aos náuplios de artemia todas as substâncias ou extratos que apresentam $CL_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ (MEYER *et al.*, 1982).

Nas primeiras concentrações em que o ácido rosmarínico foi testado (10^{-2} a 10^{-6} M), quanto a toxicidade aos náuplios de *A. salina*, somente a concentração mais alta de 10^{-2} M (3600 $\mu\text{g/mL}$) foi tóxica após 24 horas de exposição, causando a morte de 100% dos náuplios (Figura 39).

Decidiu-se, então, testar concentrações de ácido rosmarínico na faixa de 10^{-3} (360 $\mu\text{g/mL}$) a $3,0 \times 10^{-3}$ M (1080 $\mu\text{g/mL}$), já que a CL_{50} de interesse estaria dentro destes limites. A Figura 40 mostra os resultados obtidos, sendo possível concluir que nenhuma das concentrações de ácido rosmarínico testada foi significativamente tóxica aos náuplios de artemia. Este resultado pode ser explicado pelo fato do ácido rosmarínico ser metabolizado e/ou degradado principalmente a derivados fenólicos, como os ácidos coumárico e caféico, os quais não apresentam toxicidade elevada, já que são facilmente eliminados do organismo por sua alta polaridade. Essas substâncias ainda estão associadas à proteção contra situações deletérias ao organismo, principalmente por suas capacidades antioxidantes (BABA *et al.*, 2004; NAKAZAWA e OHSAWA, 1998).

O EF e a INF de sálvia também foram testados quanto à toxicidade aos náuplios, nas concentrações de 10, 100 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ com relação ao peso seco (Figura 41).

Foi possível observar através dos resultados expostos na Figura 41 que tanto o EF como a INF não foram tóxicos aos náuplios nas concentrações testadas, com exceção do EF na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$, que apresentou toxicidade a 12,5% dos náuplios. As pequenas diferenças encontradas para a toxicidade do EF e da INF de sálvia estão relacionadas aos diferentes modos de extração de ambos. O EF, além de ter demorado um tempo maior para ser produzido, teve sua extração a partir de solvente hidroalcoólico, o qual extraiu substâncias menos polares do que as encontradas na INF, com propriedades tóxicas mais pronunciadas.

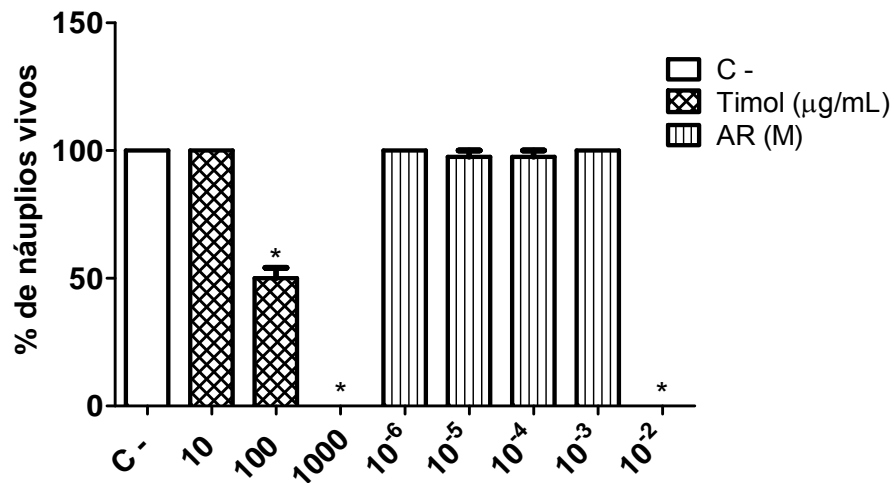


FIGURA 39- TOXICIDADE DO ÁCIDO ROSMARÍNICO COM
RELAÇÃO AOS NÁUPLIOS DE ARTEMIA

NOTA: C-: controle negativo; Timol: controle positivo; AR: ácido rosmarínico. Cada barra representa a porcentagem média \pm DP em relação ao controle (C-), normalizado em 100%. * $p < 0,0001$ em relação ao controle (n=4).

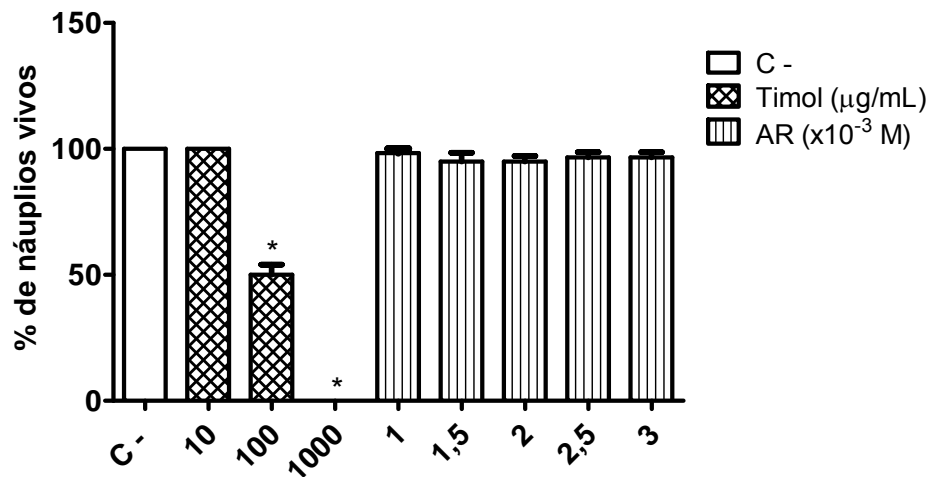


FIGURA 40- TOXICIDADE DO ÁCIDO ROSMARÍNICO COM
RELAÇÃO AOS NÁUPLIOS DE ARTEMIA

NOTA: C-: controle negativo; Timol: controle positivo; AR: ácido rosmarínico. Cada barra representa a porcentagem média \pm DP em relação ao controle (C-), normalizado em 100%. * $p < 0,0001$ em relação ao controle (n=4).

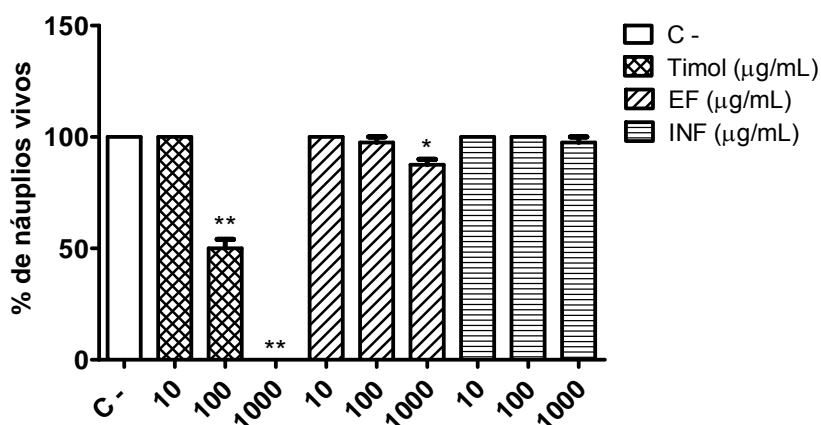


FIGURA 41- TOXICIDADE DO EXTRATO FLUIDO 1:1 E DA INFUSÃO 1:10 DE SÁLVIA COM RELAÇÃO AOS NÁUPLIOS DE ARTEMIA

NOTA: C-: controle negativo; Timol: controle positivo; EF: extrato fluido 1:1; INF: infusão 1:10. Cada barra representa a porcentagem média \pm DP em relação ao controle (C-), normalizada em 100%. ** $p < 0,0001$; * $p < 0,05$ em relação ao controle (n=4).

Nenhuma das concentrações menores que 1000 $\mu\text{g/mL}$ de ácido rosmarínico, de EF e de INF foram tóxicas a pelo menos 50% dos náuplios, ou seja, todos apresentam CL_{50} maior que 1000 $\mu\text{g/mL}$. Este resultado sugere que tanto a sálvia como o ácido rosmarínico podem ser considerados em experimentos futuros e que apresentam atividades biológicas provavelmente associadas a mecanismos que não envolvam danos aos sistemas biológicos.

5.5.3 Toxicidade celular

Após conhecer a baixa toxicidade do ácido rosmarínico e dos extratos de sálvia aos náuplios de *A. salina*, ambos puderam ser considerados para determinação de sua toxicidade a culturas celulares, que são sistemas mais sensíveis. As linhagens McCoy e B16F10 foram escolhidas para a determinação da citotoxicidade por se tratarem de células normais e tumorais, respectivamente, as quais apresentam diferentes reações frente a tratamentos (RUMJANEK *et al.*, 2001). A avaliação da toxicidade a células tumorais revela o potencial antitumoral da substância ou extrato, e o teste com células normais prevê possíveis danos celulares causados por toxicidade pelos tratamentos.

As células da linhagem McCoy são fibroblastos de camundongos não tumorais que proliferam de forma rápida e uniforme quando adequadamente

cultivadas (GORDON e QUAN, 1965). Essa linhagem serve de modelo experimental para o estudo de várias ações biológicas de substâncias e extratos vegetais, com destaque para a avaliação da toxicidade celular dos mesmos (DRAGANOVA-FILIPOVA *et al.*, 2008; KITAGAWA *et al.*, 2008). A linhagem de melanoma murino B16F10 constitui-se por células com formato fibroblastóide que se desenvolvem facilmente *in vitro*. Ela é altamente tumorigênica *in vivo*, crescendo espontaneamente em camundongos, com grande habilidade de formar metástases (NAKAMURA *et al.*, 2002; ZHAO *et al.*, 2001). Células B16F10 são usadas para estudo das várias etapas envolvidas na progressão tumoral e da melanogênese (NGUYEN *et al.*, 2007; OHIRA *et al.*, 1994; YOKOZAWA e KIM, 2007).

Após tratamento das células das linhagens McCoy e B16F10 por 24 h com diferentes concentrações de ácido rosmarínico e de extratos de sálvia, as células foram observadas em microscópio óptico invertido (Figura 42).

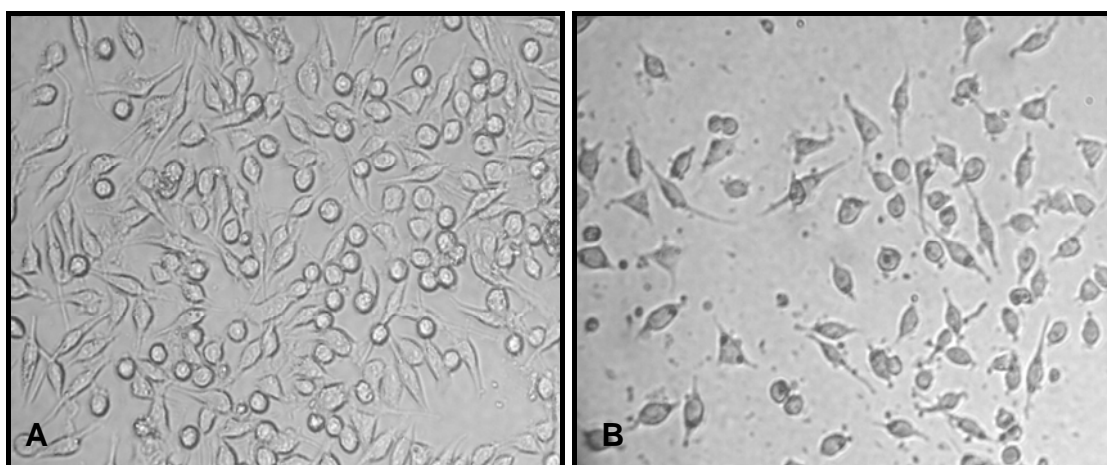


FIGURA 42– CÉLULAS McCoy OBSERVADAS EM MICROSCÓPIO INVERTIDO
NOTA: A) Cultura de células controle; B) Cultura de células tratada por 24 h com extrato fluido 1:1 de sálvia na concentração de 1000 µM de ácido rosmarínico.

As células do controle apresentam-se arredondadas ou com prolongamentos fibroblastóides, refringentes, envoltas em citoplasma abundante e bem definido, e íntegras, caracterizando uma cultura de células saudável. Já a cultura de células que recebeu tratamento com EF 1000 µM de ácido rosmarínico (Figura 42 – B) apresenta um número reduzido de células, com morfologia alterada, e perda de refringência que essas células detêm quando mantidas em condições saudáveis, sugerindo efeito citotóxico.

Após tratamento das células com vermelho neutro, foi possível melhor visualização das células viáveis e inviáveis na cultura (Figura 43).

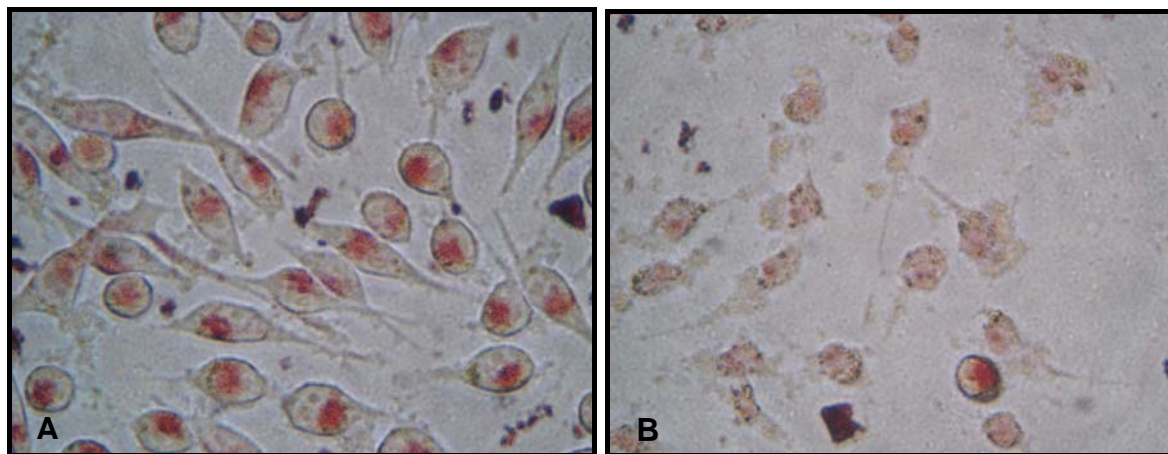


FIGURA 43– CÉLULAS McCoy OBSERVADAS EM MICROSCÓPIO INVERTIDO APÓS TRATAMENTO COM VERMELHO NEUTRO

NOTA: A) Cultura de células controle; B) Cultura de células tratada por 24 h com extrato fluido 1:1 de sálvia na concentração de 1000 µM de ácido rosmarínico.

O vermelho neutro é um corante que é incorporado por células viáveis com membrana plasmática intacta, sendo armazenado na porção lisossomal das células (SCHROTEROVA *et al.*, 2009). Na Figura 43-A é possível observar a porção corada no interior das células viáveis. Vê-se que a porção que incorporou o corante é bem delimitada, e não ocorre coração de outras estruturas celulares. Já na Figura 43-B, na qual a maioria das células está inviável, não ocorre incorporação do corante da mesma maneira. As células já não apresentam membrana plasmática intacta, a porção lisossomal encontra-se dispersa, e, por isso, não ocorre a incorporação correta do corante.

Para a determinação quantitativa do número de células viáveis tratadas com vermelho neutro, faz-se uso da leitura em espectrofotômetro UV. Quando a cultura celular incorporada com vermelho neutro tem sua absorbância lida em 540 nm, esta será proporcional ao número de células viáveis. O resultado é comparado com a absorbância de uma cultura de células controle, corada da mesma maneira.

Os resultados obtidos de viabilidade das culturas celulares McCoy e B16F10 pela técnica de vermelho neutro, após tratamento com o ácido rosmarínico e com os extratos de *S. officinalis*, estão representados nas Figuras 44, 45 e 46.

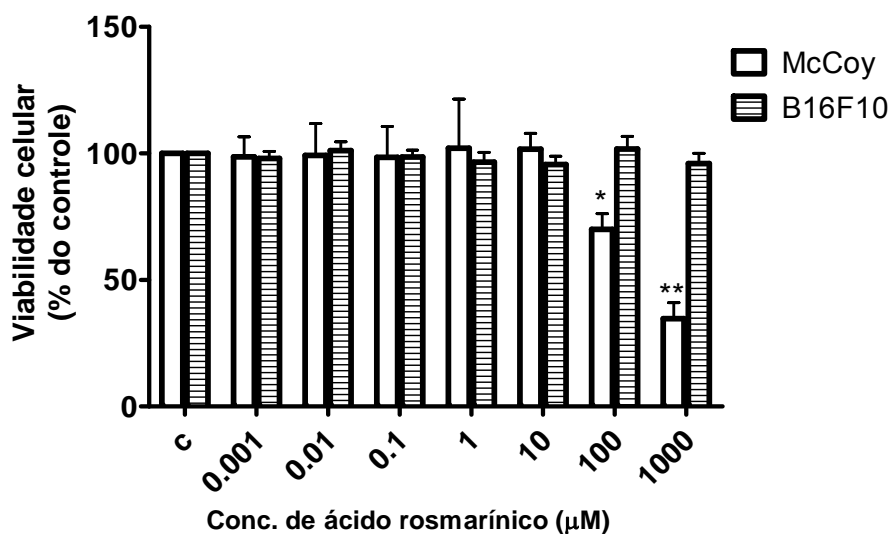


FIGURA 44- TOXICIDADE DO ÁCIDO ROSMARÍNICO COM RELAÇÃO ÀS CÉLULAS DAS LINHAGENS McCoy E B16F10

NOTA: C: controle. Culturas McCoy e B16F10 foram tratadas com as diferentes concentrações de ácido rosmarínico por 24 h, e tiveram a viabilidade celular determinada pela técnica de incorporação de vermelho neutro. Cada barra representa a porcentagem média \pm DP em relação ao controle (C), normalizado em 100%. ** $p < 0,0001$; * $p < 0,05$ em relação ao controle ($n=4$).

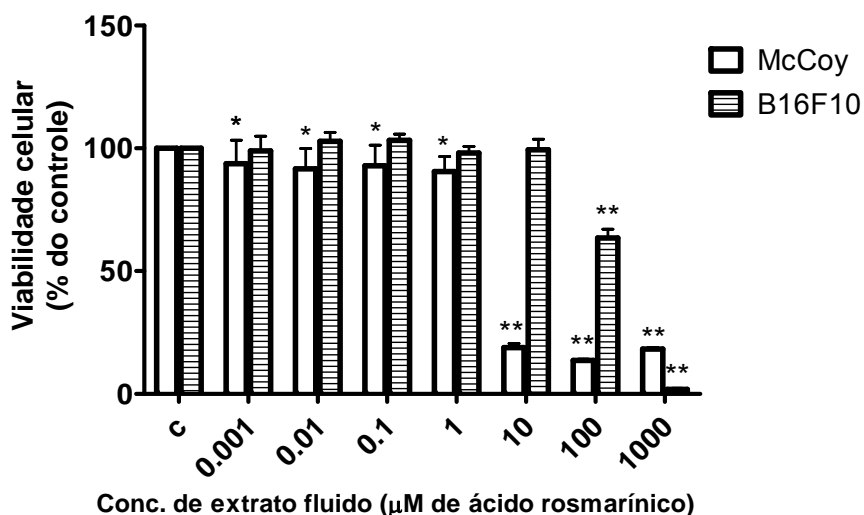


FIGURA 45- TOXICIDADE DO EXTRATO FLUIDO DE SÁLVIA COM RELAÇÃO ÀS CÉLULAS DAS LINHAGENS McCoy E B16F10

NOTA: C: controle. Culturas McCoy e B16F10 foram tratadas com as diferentes concentrações de extrato fluido de sálvia por 24 h, e tiveram a viabilidade celular determinada pela técnica de incorporação de vermelho neutro. Cada barra representa a porcentagem média \pm DP em relação ao controle (C), normalizado em 100%. ** $p < 0,0001$; * $p < 0,05$ em relação ao controle ($n=4$).

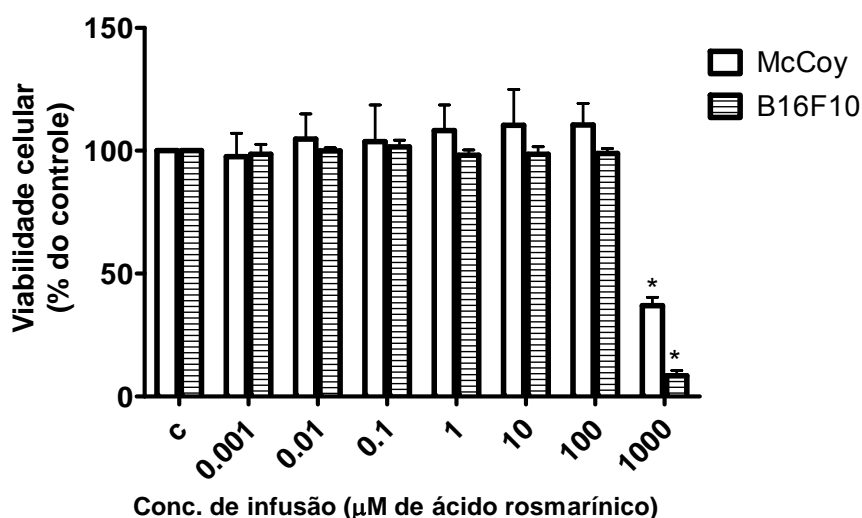


FIGURA 46- TOXICIDADE DA INFUSÃO DE SÁLVIA COM RELAÇÃO ÀS CÉLULAS DAS LINHAGENS McCoy E B16F10

NOTA: C: controle. Culturas McCoy e B16F10 foram tratadas com as diferentes concentrações de infusão de sálvia por 24 h, e tiveram a viabilidade celular determinada pela técnica de incorporação de vermelho neutro. Cada barra representa a porcentagem média \pm DP em relação ao controle (C), normalizado em 100%. * $p < 0,0001$ em relação ao controle (n=4).

Os resultados expressos na Figura 44 mostram que o ácido rosmarínico nas concentrações de 100 e 1000 μM reduziu significativamente a viabilidade das células McCoy, para 70 e 35 % em relação ao controle, respectivamente. Porém não foi tóxico em nenhuma das concentrações para a linhagem celular B16F10.

Pelos resultados apresentados na Figura 45 observa-se que o EF reduziu a viabilidade celular da linhagem McCoy em todas as concentrações testadas, principalmente nas concentrações de 10, 100 e 1000 μM de ácido rosmarínico, com redução para menos de 20 % em relação ao controle. A viabilidade celular da linhagem B16F10 foi reduzida pelas concentrações de EF de 100 e 1000 μM de ácido rosmarínico, para aproximadamente 65 e 5%, respectivamente.

Pelo gráfico da Figura 46 vê-se que somente a concentração de INF de 1000 μM de ácido rosmarínico reduziu significativamente a viabilidade das linhagens celulares McCoy e B16F10, para aproximadamente 40 e 10 % em relação ao controle, respectivamente.

A linhagem celular de melanoma murino B16F10 foi mais resistente a todos os tratamentos realizados comparada à linhagem McCoy. A maior resistência a tratamentos é uma característica de células tumorais (RUMJANEK *et al.*, 2001). Através dos resultados, é possível observar que o ácido rosmarínico não apresentou

citotoxicidade significativa à linhagem tumoral B16F10, concluindo-se que esta substância não apresenta propriedades antitumorais *in vitro* com relação a este tipo de célula nas concentrações testadas. O EF foi o que se mostrou mais tóxico a ambas as linhagens celulares. A diferença de toxicidade apresentada pelo EF e pela INF se dá pela diferente forma de extração de ambos, o que acarreta em diferentes composições químicas. O EF foi produzido através de extração mais demorada e com solvente hidroalcoólico. Já a extração da INF foi rápida e realizada somente com água a 80 °C. Dessa forma, como já citado anteriormente, substâncias menos polares e com maior potencial tóxico estão presentes em maior quantidade no EF, e este pode ser considerado para estudos com relação à sua atividade antitumoral. Ainda é possível afirmar que o ácido rosmarínico não é responsável pela toxicidade celular do EF, visto que este foi mais tóxico a ambas as linhagens celulares do que a substância isolada.

Outras substâncias e espécies demonstraram potencial citotóxico à linhagem B16F10. A pentadactilina, isolada da espécie *Leptodactylus labyrinthicus*, foi tóxica a essa linhagem celular, sendo considerada um possível agente para tratamento de câncer (LIBERIO *et al.*, 2009). O óleo essencial da espécie aromática *Melissa officinalis* apresentou citotoxicidade *in vitro* a linhagem B16F10, com potencial para agente antitumoral (DE SOUSA *et al.*, 2004). Estudo da atividade citotóxica de várias espécies de *Salvia* a outras linhagens tumorais evidenciou que este gênero pode ser considerado como uma fonte natural de agentes antitumorais (FIORE *et al.*, 2006).

5.5.4 Influência do ácido rosmarínico e dos extratos de sálvia na melanogênese

Os ensaios de toxicidade realizados permitiram estabelecer limites extremos de doses para serem usadas nos ensaios de influência na atividade melanogênica da linhagem B16F10. O ácido rosmarínico, o EF e a INF de sálvia, em concentrações que não alteraram a viabilidade celular, foram avaliados com relação às suas ações na síntese de melanina e na atividade de tirosinase. Para tanto, culturas de células de melanoma murino B16F10 foram tratadas com NH₄Cl e com as diferentes concentrações de ácido rosmarínico, EF e INF, na presença ou não de L-tirosina (500 µM). Após 24 horas, tiveram os conteúdos de proteína e melanina

determinados, bem como foram avaliadas quanto à atividade de tirosinase por diferentes metodologias.

O NH_4Cl (10 mM) adicionado às culturas celulares tem a função de neutralizar o meio intracelular ácido dos melanossomos, tendo como resultado o aumento da atividade da tirosinase, o aumento da captação de tirosina pelos melanossomos, e o conseqüente aumento na produção de melanina (ANCANS *et al.*, 2001; HOOGDUIJN *et al.*, 2004; KONGSHOJ *et al.*, 2007).

A L-tirosina (500 μM) foi o controle da produção de melanina e da atividade de tirosinase, já que tem a capacidade de aumentar a atividade da enzima (KONGSHOJ *et al.*, 2007). Além disso, foi adicionada às culturas juntamente aos testes com o objetivo de servir como substrato e estimulador enzimático.

O controle positivo de inibição da melanogênese foi o ácido kójico (400 μM). Esta substância é um metabólito encontrado em fungos, considerado um inibidor de tirosinase padrão, e geralmente usado como agente de clareamento de pele em cosméticos, ou como aditivo em alimentos para prevenir o escurecimento enzimático (CHANG, 2009). O ácido kójico pode ser tanto inibidor competitivo como não-competitiva da tirosinase, dependendo do substrato fenólico envolvido, se ligando tanto à enzima livre quanto à enzima ligada ao substrato (CHEN *et al.*, 1991). Para os experimentos o ácido kójico foi primeiramente diluído em DMSO, como descrito no item 4.5.4.1.

Além dos controles de ácido kójico e de L-tirosina, controles experimentais também foram realizados com o NH_4Cl e com o DMSO, nas concentrações usualmente aplicadas nas culturas celulares.

Todos os controles foram testados com relação à toxicidade celular pela técnica de viabilidade por incorporação do vermelho neutro (item 4.5.4.3). Nenhum deles alterou significativamente a viabilidade celular da linhagem celular B16F10, podendo ser aplicados nos ensaios de influência na melanogênese.

Após 24 horas de tratamento, as células foram observadas em microscópio óptico invertido. As Figuras 47 e 48 são fotos de culturas celulares controle e tratada com ácido rosmarínico 10 μM na presença ou não de L-tirosina.

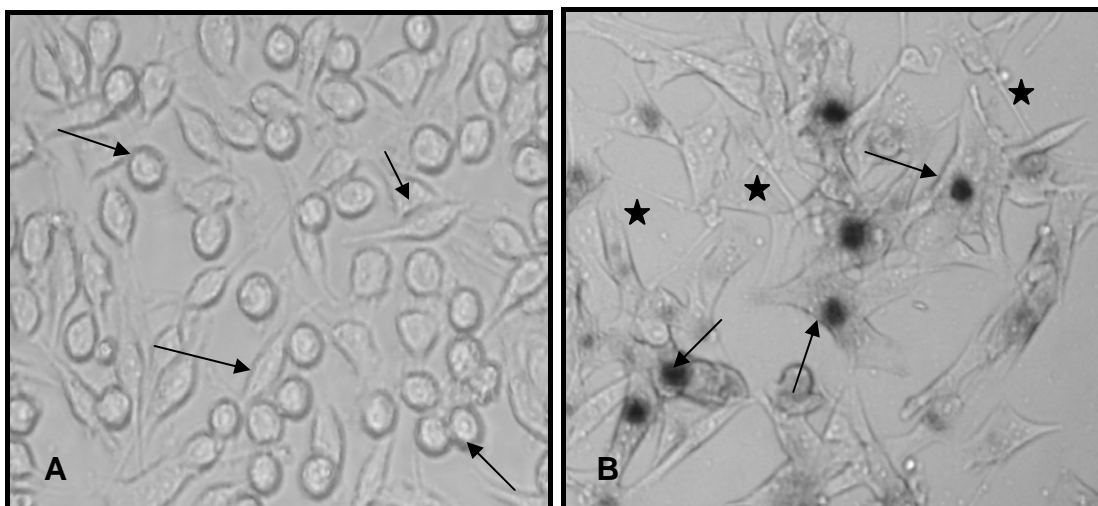


FIGURA 47- ALTERAÇÕES EM CULTURAS DE CÉLULAS B16F10 INDUZIDAS PELO ÁCIDO ROSMARÍNICO 10 μ M NA PRESENÇA DE L-TIROSINA

NOTA: Cultura de células B16F10 controle (A), onde as setas indicam as células com formato esférico ou fibroblástico característico; Cultura de células B16F10 que recebeu tratamento com ácido rosmarínico 10 μ M na presença de L-tirosina 500 μ M (B), sendo que as setas indicam as células com aparência achatada/plana, apresentando citoplasma disperso e escurecido e as estrelas indicam as protusões.

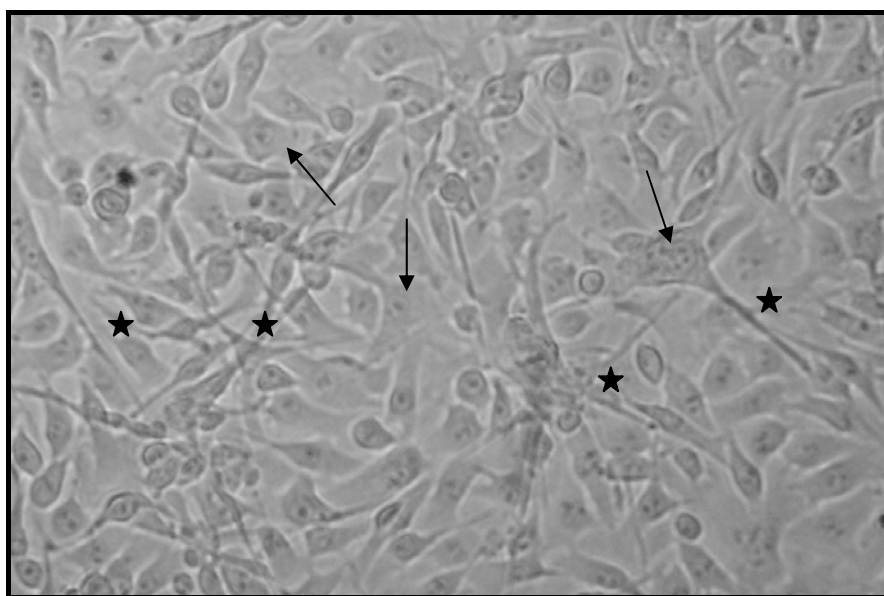


FIGURA 48- CULTURA DE CÉLULAS B16F10 TRATADA COM ÁCIDO ROSMARÍNICO 10 μ M

NOTA: Células com formato achatado ou plano (setas), com citoplasma disperso e escurecido, apresentando longas protusões (estrelas).

Na Figura 47-A é possível observar uma cultura de células controle apresentando células num formato esférico ou fibroblástico característico da linhagem B16F10. Na cultura celular apresentada na Figura 47-B, que foi tratada com ácido rosmarínico 10 μ M na presença de L-tirosina 500 μ M, observam-se

células com aspecto achatado, com formatos irregulares, apresentando regiões escuras características de melanócitos maduros com produção de melanina. Além disso, nota-se a formação de longas protusões celulares, as quais caracterizam a indução da melanogênese. Na cultura celular da Figura 48, tratada com ácido rosmarínico 10 μM , vê-se também um grande número de protusões escurecidas, em consequência do aumento do número de melanossomos periféricos, e a maior parte das células apresenta-se com morfologia achatada/plana e irregular, com citoplasma disperso e escurecido.

Fernandes e colaboradores (2004) realizaram um estudo sobre o estímulo do ácido retinóico na melanogênese em células de melanoma murino B16F10, envolvendo análise das alterações morfológicas e estruturais celulares. O ácido retinóico induziu a produção de melanina e provocou alterações morfológicas nos melanócitos. As principais alterações celulares que caracterizaram a indução da melanogênese foram o aumento do número de protusões, causadas pela indução da síntese ou da exposição de glicolípídeos e/ou glicoproteínas na superfície celular, e o maior número de melanócitos maduros escurecidos, com aspecto achatado/plano. Além disso, a quantidade de melanossomos no interior e na porção periférica celular foi aumentada.

Com isso, pode-se concluir previamente às análises quantitativas, que o ácido rosmarínico 10 μM , tanto na ausência quanto na presença de L-tirosina, provoca alterações celulares características da indução da melanogênese.

5.5.4.1 Doseamento de proteína

Após avaliação microscópica das células tratadas, estas foram retiradas das garrafas de cultivo, centrifugadas e lisadas. Os lisados celulares (LC) tiveram a concentração de proteína determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). As absorbâncias das amostras foram usadas para obter a concentração de proteína nos LC ($\mu\text{g/mL}$) a partir da curva analítica de soroalbumina bovina (Figura 49).

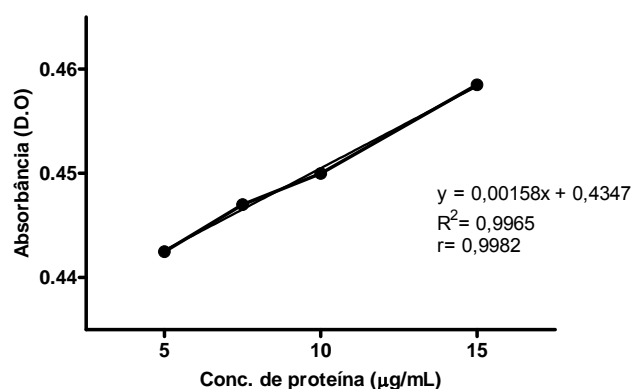


FIGURA 49- CURVA ANALÍTICA DE PROTEÍNA

5.5.4.2 Doseamento de melanina

Conhecendo-se a concentração de proteína do LC, fração de 100 µL do mesmo teve o teor de melanina determinado. As absorvâncias das amostras foram usadas para calcular a concentração de melanina no LC, a partir da curva padrão de melanina de sépia (Figura 50) e considerando a diluição realizada.

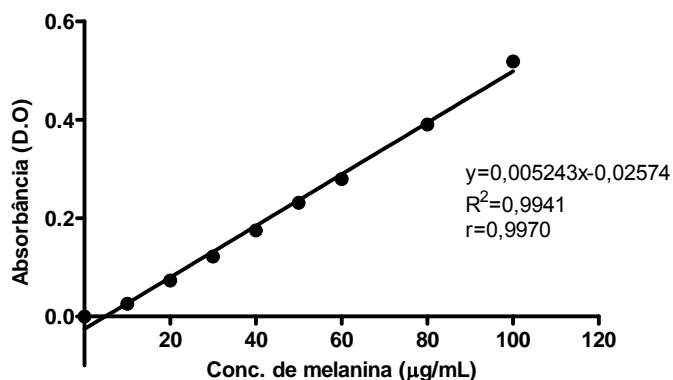


FIGURA 50- CURVA ANALÍTICA DE MELANINA

Os valores de concentração de melanina no LC (µg/mL) foram corrigidos para o teor de proteína da amostra, sendo convertidos para µg de melanina em 100 µg de proteína de LC, ou % melanina/proteína (m/m). Os valores de µg melanina/100 µg proteína foram expressos como % em relação ao controle, considerado como 100%.

Com a finalidade de avaliar a influência do NH₄Cl na produção de melanina, comparou-se a concentração de melanina dos lisados das células tratadas com

NH₄Cl 10 mM e das que não receberam nenhum tipo de tratamento (controle). O resultado (Figura 51) demonstrou não haver diferença significativa entre a concentração de melanina nas duas culturas, certificando que o NH₄Cl não induz por si só a síntese de melanina.

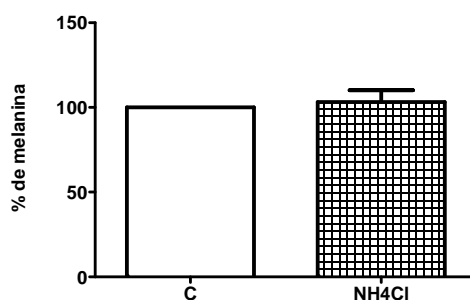


FIGURA 51- INFLUÊNCIA DO NH₄CL NA SÍNTESE DE MELANINA CELULAR.

NOTA: C: controle, concentração de melanina no lisado de células não tratadas; NH₄Cl: concentração de melanina no lisado de células tratadas com NH₄Cl 10 mM. Cada barra representa a porcentagem média \pm DP em relação ao controle (C), normalizado em 100%. * $p < 0,05$ em relação ao controle (n=8).

A partir disso, o NH₄Cl foi aplicado em todas as culturas para manter o pH ótimo para a melanogênese, e foi considerado controle experimental. A Figura 52 apresenta os resultados de doseamento de melanina para as culturas de células tratadas com ácido rosmarínico, EF e INF, na ausência de L-tirosina.

O controle L-tirosina foi capaz de aumentar significativamente a quantidade de melanina produzida pelas células, na ordem de 3,5 vezes em relação ao controle NH₄Cl. Isto se deve à capacidade dessa substância de estimular a atividade da tirosinase, servindo como substrato da enzima.

Porém, o ácido kójico e os outros testes não alteraram significativamente a concentração de melanina nas células. Pequenas diferenças podem ser observadas no gráfico da Figura 52, mas são estatisticamente irrelevantes. Este resultado pode ser decorrente da baixa disponibilidade de substrato para a produção celular de melanina, ou da baixa atividade enzimática da tirosinase, o que dificultou a interpretação dos resultados dos testes sobre a melanogênese. As células, então, foram tratadas com os extratos e com o ácido rosmarínico na presença de L-tirosina

500 μM , a qual é substrato da tirosinase e eleva a atividade enzimática. Neste caso, a L-tirosina 500 μM foi o controle experimental. Os resultados estão na Figura 53.

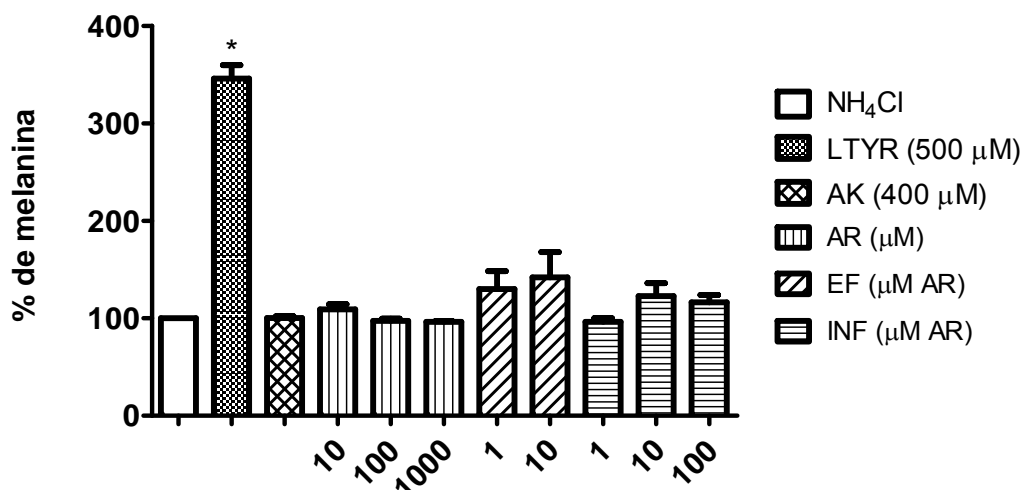


FIGURA 52- INFLUÊNCIA DO ÁCIDO ROSMARÍNICO E DOS EXTRATOS DE SÁLVA NA SÍNTESE DE MELANINA CELULAR

NOTA: LTYR: controle L-tirosina ; AK: controle positivo ácido kójico; AR: ácido rosmarínico; EF: extrato fluido de sálvia; INF: infusão de sálvia. Cada barra representa a porcentagem média \pm DP de melanina no lisado celular em relação ao controle (NH₄Cl), normalizado em 100%. * $p < 0,0001$ em relação ao controle (n=5 a 8).

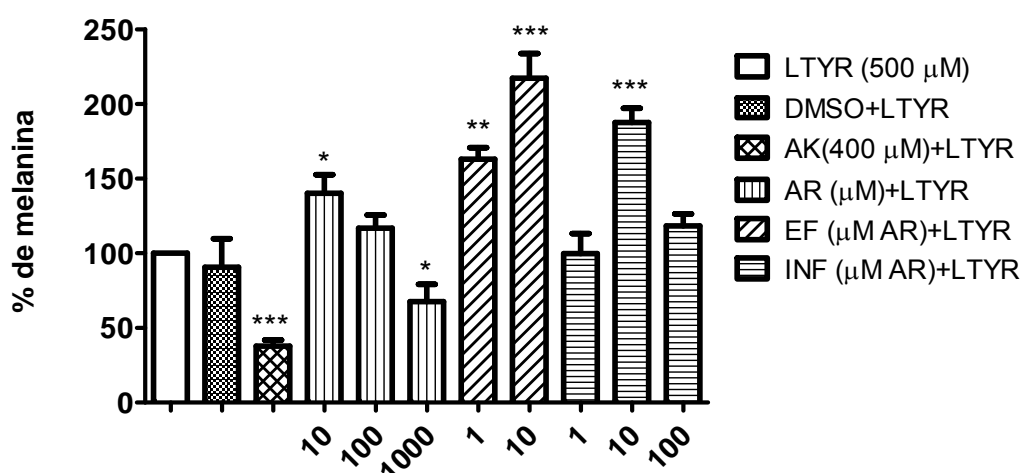


FIGURA 53- INFLUÊNCIA DO ÁCIDO ROSMARÍNICO E DOS EXTRATOS DE SÁLVA NA SÍNTESE DE MELANINA, NA PRESENÇA DE L-TIROSINA 500 μM

NOTA: LTYR: L-tirosina; DMSO: dimetilsulfóxido; AK: controle positivo ácido kójico; AR: ácido rosmarínico; EF: extrato fluido de sálvia; INF: infusão de sálvia. Cada barra representa a porcentagem média \pm DP de melanina no lisado celular em relação ao controle (LTYR), normalizado em 100%. *** $p < 0,0001$; ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ em relação ao controle (n=5 a 8).

Observa-se uma grande similaridade entre os perfis dos gráficos das Figuras 52 e 53, porém, com a presença de L-tirosina os resultados foram mais pronunciados, evidenciando melhor a interferência dos tratamentos na síntese de melanina. O ácido rosmarínico 10 μM (3,6 $\mu\text{g/mL}$) aumentou a concentração de melanina em aproximadamente 40% comparada ao controle L-tirosina. Já na concentração de 100 μM (36 $\mu\text{g/mL}$) não alterou significativamente a quantidade de melanina, e em 1000 μM (360 $\mu\text{g/mL}$) reduziu a síntese de melanina em ~35%. O EF estimulou a síntese de melanina nas duas concentrações testadas, 1 μM (~0,01 mg de EF/mL ou 0,061 μL de EF/mL) e 10 μM de ácido rosmarínico (~0,1 mg de EF/mL ou 0,61 μL de EF/mL). O aumento na concentração de melanina com relação ao controle foi de 63 e 117%, respectivamente. A INF somente estimulou a produção de melanina em ~90% na concentração de 10 μM de ácido rosmarínico (~0,1 mg de INF/mL ou ~7 μL de INF/mL). Nas outras concentrações testadas não alterou significativamente o conteúdo de melanina em relação ao controle. O teor de melanina foi reduzido em ~53% pelo ácido kójico 400 μM em relação ao seu controle DMSO+LTYR, corroborando à classificação desta substância como inibidora da síntese de melanina na concentração testada (ITOH *et al.*, 2009).

Pela quantificação de melanina, foi possível confirmar a conclusão prévia, obtida pela visualização microscópica das alterações celulares, de que o ácido rosmarínico 10 μM é capaz de estimular a melanogênese. Nesta mesma concentração correspondente de ácido rosmarínico, tanto o EF como a INF também aumentaram significativamente a produção de melanina, mostrando que a substância isolada pode ser responsável por parte da ação melanogênica de ambos os extratos de sálvia.

Os testes na concentração de 100 μM de ácido rosmarínico não aumentaram a concentração de melanina com relação ao controle, e o ácido rosmarínico 1000 μM reduziu a produção do pigmento. Isto significa que a atuação na melanogênese depende da concentração de ácido rosmarínico no meio, e que, em concentrações maiores, mecanismos de ação inibidores da melanogênese podem estar envolvidos.

5.5.4.3 Determinação da atividade de tirosinase celular e *in vitro*

A tirosinase é uma enzima amplamente distribuída na natureza, sendo responsável pela melanização em animais e pelo escurecimento de espécies

vegetais (JIMENEZ-ATIENZAR *et al.*, 2005). É considerada a enzima chave da melanogênese, pois catalisa a hidroxilação da L-tirosina à 3,4-dihidroxifenil-L-alanina (L-DOPA), e também a oxidação da L-DOPA à *o*-dopaquinona. A última sofre uma série de reações de polimerização e oxidação não-enzimáticas, dando origem ao dopacromo, e posteriormente, a melanina (ITOH *et al.*, 2009; KIM e UYAMA, 2005). A tirosinase também é fundamental para a síntese de catecolaminas, como a dopamina, que tem início com a oxidação enzimática da L-tirosina a L-DOPA pela tirosinase. Estudos comprovaram que a produção de neuromelanina na substância negra no cérebro humano está associada à expressão da tirosinase, apesar deste fato apresentar controvérsias (TRIBL *et al.*, 2007; XU *et al.*, 1997). Além disso, a tirosinase também se mostrou capaz de acelerar a oxidação da dopamina a derivados quinonas neurotóxicos, que estão associados com o processo de neurodegeneração envolvido na doença de Parkinson. Isso sugere que alterações na atividade e expressão da tirosinase no cérebro podem contribuir para o aumento ou diminuição do risco a doença de Parkinson, mas ainda não se conseguiu comprovar a expressão da tirosinase no neurônio dopaminérgico (XU *et al.*, 1997). Por outro lado, a tirosinase possui capacidade de oxidar aminas fenólicas em intermediários tóxicos com potencial antitumoral em melanomas específicos. Dois compostos amino fenólicos, N-acetil-4-S-cisteaminilfenol e 4-S-cisteaminilfenol, demonstraram ação inibitória a uma variedade de linhagens celulares de melanoma, sem causar prejuízos a células não tumorais. A teofilina aumentou a atividade da tirosinase *in vitro* e conseqüentemente, elevou o potencial antimelanoma desses derivados amino fenólicos. Já a feniltiouréia, um tio derivado, apresentou atividade inibitória da atividade da tirosinase e bloqueou parcialmente a ação antimelanona dos derivados amino fenólicos (PREZIOSO *et al.*, 1992). Com isso, observa-se que as atividades biológicas da tirosinase são bastante amplas, e que as mesmas podem depender de certas condições ou de outras substâncias específicas, indo além da indução da síntese de melanina. Substâncias que inibem ou estimulam a atividade e a expressão desta enzima são de grande interesse, visto que ambas as ações podem estar relacionadas a benefícios ou prejuízos à saúde humana.

Após determinação da influência do ácido rosmarínico e dos extratos de sálvia (EF e INF) na síntese de melanina em células de melanoma murino B16F10, ambos foram testados com relação à alteração da atividade e expressão da

tirosinase. Alíquotas de LC provenientes de células tratadas ou não com os testes foram usadas para determinação da influência do ácido rosmarínico e dos extratos de sálvia na atividade da tirosinase celular e *in vitro*.

A atividade da tirosinase presente nos LC foi determinada com relação à formação de dopacromo a partir da L-DOPA. Essa conversão enzimática pode ser mensurada por espectrometria UV-VIS, pois o dopacromo absorve luz UV em 470 nm. Quanto maior a atividade da tirosinase no LC, mais dopacromo será formado e maior será a absorção no UV em comparação ao controle. Além disso, se as proteínas do LC forem resolvidas por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida, as bandas de tirosinase podem ser identificadas no gel quando este é imerso em solução contendo L-DOPA. Esta sofre oxidação enzimática, e a banda característica da tirosinase fica escura e pode ser visualizada. Quanto maior a atividade da tirosinase, mais intensa é a coloração da banda.

A influência de substâncias e de extratos nas etapas oxidativas catalisadas pela tirosinase pode estar relacionada a mecanismos de ação relativos à síntese ou atividade enzimática. A interferência na síntese de tirosinase é avaliada quando as células são tratadas com as substâncias ou extratos por um período de tempo prolongado e depois são lisadas, tendo o conteúdo de tirosinase avaliado no LC pela formação de dopacromo na presença de um substrato para a melanogênese. Nesse caso, substâncias-testes poderão atuar nas diversas etapas da síntese da tirosinase, como na indução da síntese de AMPc, no estímulo ao PKA, entre outros. (LEE, JUNG *et al.*, 2007).

Para avaliar esta ação, o lisado das células tratadas com ácido rosmarínico ou com os extratos de sálvia por 24 horas foi submetido a uma hora de incubação à 37 °C na presença de L-DOPA, e a formação de dopacromo foi posteriormente mensurada em 470 nm. Os resultados foram expressos em % do controle NH₄Cl, considerado 100% (Figura 54). Os LC das células tratadas também foram submetidos à separação protéica por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida, com o objetivo de identificar a tirosinase e, ainda, avaliar sua atividade pela intensidade da coloração das bandas, na presença de L-DOPA (Figura 55).

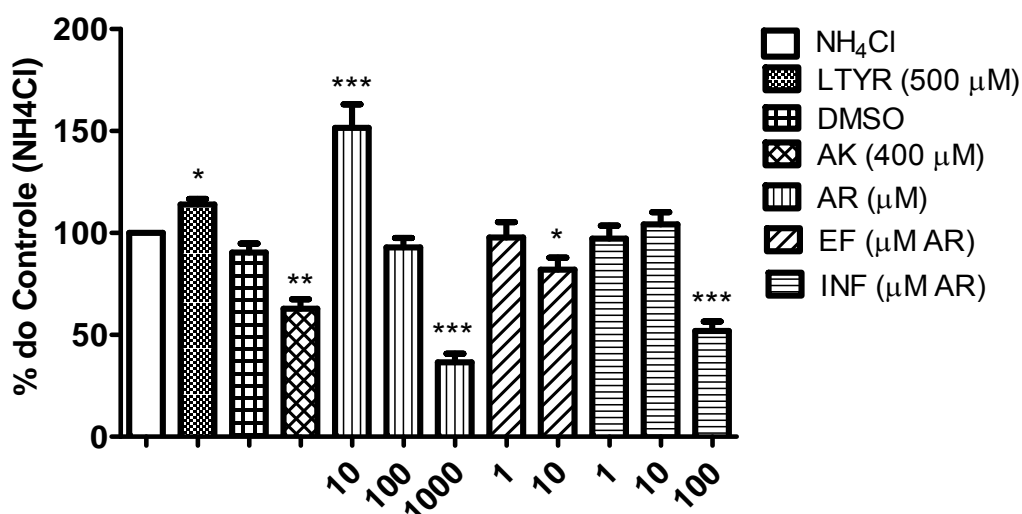


FIGURA 54- INFLUÊNCIA DO ÁCIDO ROSMARÍNICO E DOS EXTRATOS DE SÁLVA NA ATIVIDADE DA TIROSINASE CELULAR

NOTA: LTYR: L-tirosina; DMSO: dimetilsulfóxido; AK: controle positivo ácido kójico; AR: ácido rosmarínico; EF: extrato fluido de sálvia; INF: infusão de sálvia. Cada barra representa a porcentagem média \pm DP de tirosinase mensurada em dopacromo no lisado celular em relação ao controle (NH₄Cl), normalizado em 100%. *** p <0,0001; ** p <0,01, * p <0,05 em relação ao controle (n=5 a 8).

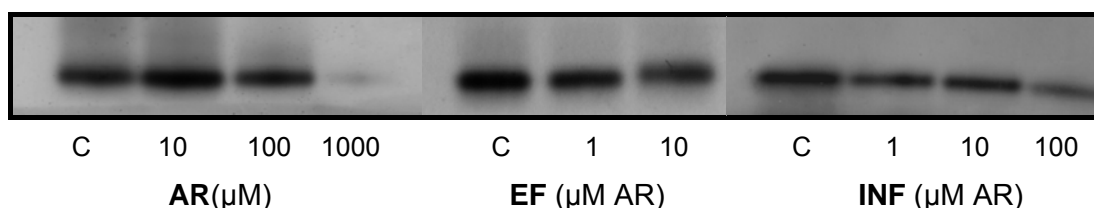


FIGURA 55- BANDAS DE TIROSINASE OBTIDAS POR ELETROFORESE EM GEL DOS LISADOS CELULARES TRATADOS COM ÁCIDO ROSMARÍNICO E EXTRATOS DE SÁLVA: INFLUÊNCIA NA ATIVIDADE DA TIROSINASE CELULAR

NOTA: C: controle NH₄Cl; AR: ácido rosmarínico; EF: extrato fluido de sálvia; INF: infusão de sálvia. Os lisados das células tratadas foram separados por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida e o gel foi imerso em solução 5 mM de L-DOPA.

Para avaliar se as substâncias ou extratos atuam na atividade enzimática, podem ser usadas tirosinases purificadas, como a de cogumelo (*Agaricus bisporum*) (YOON *et al.*, 2009), ou pode-se fazer uso do próprio conteúdo de tirosinase presente no lisado de uma cultura de células melanogênicas (AN *et al.*, 2008). Quantidades conhecidas de tirosinase purificada, ou de lisado celular contendo a enzima, são tratadas com as substâncias e/ou extratos de interesse na presença de um substrato da melanogênese. Em seguida avalia-se a formação de dopacromo e compara-se com o controle.

Para a análise da atividade de tirosinase *in vitro*, o lisado de células não tratadas foi usado como fonte de tirosinase, e incubado durante 1 hora com ácido rosmarínico ou com os extratos de sálvia a 37 °C, na presença de L-DOPA. O teor de dopacromo foi mensurado e, através dos resultados expressos como % do controle L-DOPA (100%), foi possível verificar a ação dos tratamentos na atividade enzimática (Figura 56).

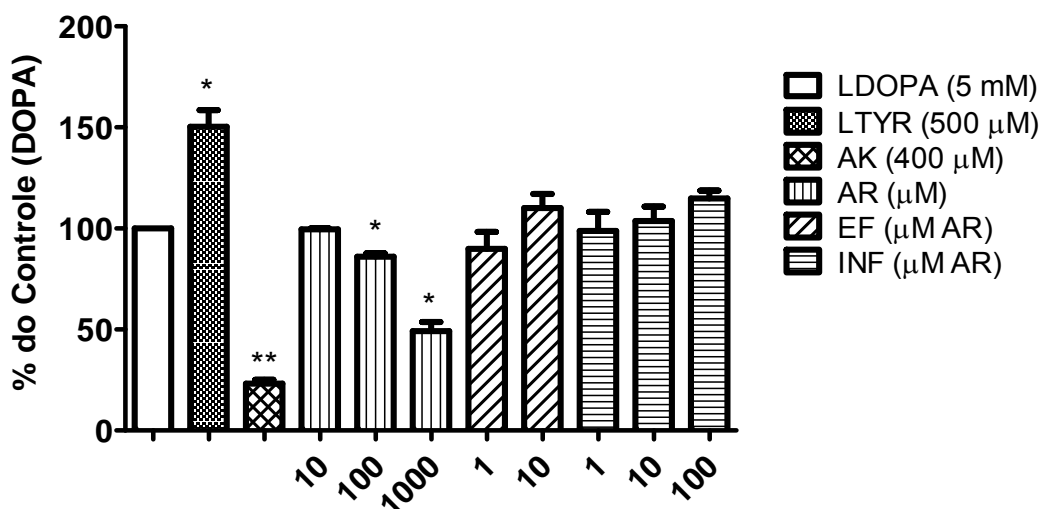


FIGURA 56- INFLUÊNCIA DO ÁCIDO ROSMARÍNICO E DOS EXTRATOS DE SÁLVIA NA ATIVIDADE DA TIROSINASE *IN VITRO*

NOTA: LDOPA: L-DOPA; LTYR: L-tirosina; AK: controle positivo ácido kójico; AR: ácido rosmarínico; EF: extrato fluido de sálvia; INF: infusão de sálvia. Cada barra representa a porcentagem média \pm DP de tirosinase mensurada em dopacromo no lisado celular em relação ao controle (L-DOPA), normalizado em 100%. ** $p < 0,0001$, * $p < 0,05$ em relação ao controle (n=5 a 8).

A L-tirosina 500 μ M aumentou a ação da tirosinase celular. Os gráficos das Figuras 54 e 56 mostram que essa substância elevou em 50% a atividade da tirosinase *in vitro* e em menor proporção a tirosinase celular, atuando como substrato enzimático e induzindo o aumento da produção de melanina (Figura 53). Já o controle positivo de inibição enzimática, ácido kójico 400 μ M, reduziu a atividade da tirosinase celular e *in vitro*, em 40 (Figura 54) e 75% (Figura 56) respectivamente, com conseqüente redução da síntese de melanina (Figura 53). Esta ação relaciona-se à capacidade da substância de inibir a ação da tirosinase, por ligar-se à enzima e inibir a ligação dos substratos para a síntese de melanina.

Observa-se no gráfico da Figura 54 que o ácido rosmarínico 10 μM estimulou a ação da tirosinase celular em 50% com relação ao controle. Este estímulo também pode ser visualizado pela maior intensidade da banda da tirosinase (Figura 55) para o ácido rosmarínico 10 μM em comparação a banda controle. Porém, na mesma concentração, não foi capaz de alterar a atividade enzimática *in vitro* (Figura 56). Isso significa que o ácido rosmarínico 10 μM não tem como ação principal a influência na atividade enzimática, mas sim em sua síntese. Um estudo realizado mostrou que o ácido rosmarínico aumenta a expressão da tirosinase, sem alterar o conteúdo de AMPc, através da ativação da proteína quinase A (PKA), a qual induz a fosforilação do CREB (proteína de ligação ao CRE; CRE: elemento responsivo ao AMPc), promovendo o aumento da expressão do fator de transcrição do MITF (fator de transcrição de microftalmia), crucial para o desenvolvimento e diferenciação dos melanócitos e para a transcrição da tirosinase (LEE, KIM *et al.*, 2007). Através desta ação do ácido rosmarínico poderiam ser explicados os resultados obtidos experimentalmente (Figuras 53, 54 e 55), que foram o aumento do conteúdo de tirosinase celular com conseqüente aumento na produção de melanina.

Na concentração de 100 μM , o ácido rosmarínico não alterou significativamente a tirosinase celular (Figuras 54 e 55), porém reduziu a atividade da tirosinase *in vitro* em ~20% (Figura 56). Por mais que o ácido rosmarínico possa ter ação estimuladora à síntese de tirosinase no meio celular, também pode atuar servindo de substrato à tirosinase, sendo convertido a derivados *o*-quinonas, já que se trata de um composto fenólico, mais precisamente um *o*-dihidroxifenol. Dessa forma o ácido rosmarínico causaria um bloqueio a oxidação enzimática da L-DOPA a *o*-dopaquinona através de sua própria oxidação catalisada pela tirosinase, inibindo, assim, a formação de dopacromo e de melanina (CHANG, 2009). Dupla ação como essa foi descrita para o flavonóide quercetina, que também é capaz de induzir a expressão da tirosinase celular (NAGATA *et al.*, 2004), e, por outro lado, inibir fortemente a atividade enzimática *in vitro* (XIE *et al.*, 2003). A formação de derivados quinóicos leva a conseqüente formação de radicais livres e peróxidos, contribuindo ainda mais para a inibição da tirosinase, inclusive em nível de síntese enzimática pelo stress oxidativo protéico (EBANKS *et al.*, 2009). Além disso, segundo Chang (2009) agentes antioxidantes podem atuar reduzindo novamente a *o*-dopaquinona à L-DOPA, evitando, conseqüentemente, a formação de dopacromo e de melanina.

Como a ação antioxidante do ácido rosmarínico é bem conhecida, esta também pode contribuir para a inibição da síntese de dopacromo e de melanina. Com isso, qualquer estímulo do ácido rosmarínico 100 μM à síntese da tirosinase pode ter sido em parte “anulado” pelas ações inibitórias à enzima, não ocorrendo aumento significativo da síntese de melanina (~15%) (Figura 53). Na concentração de 1000 μM , as ações inibitórias do ácido rosmarínico podem ter sido intensificadas, ocorrendo redução tanto da tirosinase celular como da *in vitro*, em 65 e 50%, respectivamente (Figuras 54, 55 e 56), com consequente redução da síntese de melanina (Figura 53).

Os resultados obtidos para o ácido rosmarínico mostram que ele possui dupla ação na melanogênese, dependendo de sua concentração. Em concentrações mais baixas (10 μM) o ácido rosmarínico é capaz de estimular a síntese de tirosinase e de melanina, induzindo a melanogênese. Já em concentrações mais altas a ação inibitória fica mais evidente. Essa substância fenólica poderia ser estudada quanto a sua aplicação em formulações para tratamento de patologias pigmentares, sugerindo-se aplicação tópica, visto que estudos já relataram a boa absorção do ácido rosmarínico por esta via, sendo distribuído facilmente à pele e podendo atuar como indutor melanogênico com função estética ou terapêutica.

A interpretação dos resultados obtidos para o EF e para a INF é mais complexa, devido à grande variedade de substâncias presente nos extratos, as quais podem apresentar diferentes formas de atuação na melanogênese, podendo interferir nas várias etapas da síntese da tirosinase e/ou direta ou indiretamente na atividade da mesma.

O EF na concentração de 1 μM de ácido rosmarínico não alterou significativamente nem a atividade de tirosinase celular nem a *in vitro* (Figuras 54, 55 e 56), mas aumentou em 63% a síntese de melanina (Figura 53). Já o EF 10 μM reduziu a atividade de tirosinase celular em ~20% com relação ao controle (Figura 54), o que também pode ser observado pela diminuição da intensidade da banda da tirosinase (Figura 55), e não alterou a atividade enzimática *in vitro* (Figura 56). Porém, a síntese de melanina sofreu um forte estímulo por essa concentração de EF de ~117% (Figura 53). A INF não alterou significativamente a atividade da tirosinase *in vitro* em nenhuma das concentrações testadas (Figura 56), e só interferiu na atividade enzimática celular, reduzindo em ~60%, na concentração de 100 μM de ácido rosmarínico (Figuras 54 e 55). No entanto, a INF 10 μM aumentou a síntese de

melanina em ~100% (Figura 53). A partir desses resultados, é possível afirmar primeiramente que a ação do EF e da INF de sálvia na melanogênese está mais relacionada à interferência na síntese da tirosinase e não em sua atividade.

Considerando que na concentração de 10 μM de ácido rosmarínico, tanto o EF como a INF aumentaram a produção de melanina celular, é possível considerar a colaboração do ácido rosmarínico para esta ação, em nível de síntese enzimática. Porém, ao contrário do esperado, não ocorreu aumento da atividade de tirosinase celular nessa concentração dos extratos, e o EF 10 μM ainda foi capaz de reduzi-la em 20%. Este fato deve-se à provável presença de outras substâncias na sálvia, que possuem outras ações na melanogênese. O extrato aquoso ou hidroalcoólico de *S. officinalis* tem os polifenóis como principais constituintes em sua composição química. Dentre eles, destacam-se os flavonóides (38,5%), em sua maior parte (90%) representados pela luteolina e pelo seu derivado 7-O-glucuronídeo, e os derivados do ácido caféico (61,5%), dentre os quais se destaca o ácido rosmarínico (76%) (FECKA e TUREK, 2007). A luteolina, em concentrações abaixo de 200 μM não interferiu na produção de melanina em células de melanoma murino B16, apesar de aumentar a atividade de tirosinase celular (AN *et al.*, 2008). No entanto, em concentrações maiores que 1 μM , apresentou capacidade de reduzir a síntese de AMPc através da inibição da adenilato ciclase de forma concentração-dependente, inibindo diretamente a transcrição da tirosinase (CHOI *et al.*, 2008). Somente em concentrações acima de 200 μM foi capaz de reduzir a atividade da tirosinase *in vitro*, de maneira reversível e não-competitiva, ou seja, ligando-se ao complexo enzima-substrato e não à enzima isolada (AN *et al.*, 2008; CHOI *et al.*, 2008; XIE *et al.*, 2003). A luteolina ainda mostrou atuar como seqüestrante de radicais livres gerados na melanogênese, reduzindo a inibição enzimática por stress oxidativo (CHOI *et al.*, 2008; EBANKS *et al.*, 2009).

A presença da luteolina-7-O-glucuronídeo no EF e na INF de sálvia, e de luteolina no EF de sálvia foi determinada pela análise em CLAE desses dois extratos (Figuras 37 e 38, pág. 95). Com isso, considerando a possível junção das ações do ácido rosmarínico e da luteolina, e seu respectivo derivado glucuronídeo, no EF 1 e 10 μM e na INF 10 μM de ácido rosmarínico, podem-se explicar os resultados obtidos experimentalmente. Em um primeiro momento, ocorreu um aumento intenso da síntese de melanina, provavelmente associado à elevação da síntese de

tirosinase pela ativação da PKA pelo ácido rosmarínico. Já num segundo momento, o estímulo do ácido rosmarínico à síntese da tirosinase pode ter sido inibido pela depleção de AMPc, em consequência ao bloqueio da síntese de AMPc pela luteolina.

Os níveis reduzidos de atividade de tirosinase celular estão relacionados a outras prováveis ações melanogênicas dos extratos de sálvia. É conhecida a inibição da síntese e da atividade da tirosinase celular na presença de altas concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e de outras espécies reativas de oxigênio (ERO), produzidos como subprodutos da síntese de melanina, e da auto-oxidação ou da oxidação enzimática de outras substâncias, como derivados caféico, à o-quinonas (EBANKS *et al.*, 2009; JIMENEZ-CERVANTES *et al.*, 2001; WOOD *et al.*, 2004). Com isso, prevê-se que a alta produção de melanina induzida pelo EF 1 e 10 μM e pela INF 10 μM , juntamente à ocorrência de oxidações, catalisadas ou não pela própria tirosinase, podem ter aumentado a concentração celular de H_2O_2 e de ERO, causando inibição da tirosinase celular, até níveis de atividade iguais (EF 1 e INF 10 μM) ou inferiores (EF 10 μM) aos encontrados para uma cultura de células controle (Figura 54). A capacidade da luteolina e de outros flavonóides em seqüestrar esses agentes oxidativos pode prevenir a inibição da tirosinase celular, mas essa ação é limitada, visto que não é capaz de neutralizar toda a quantidade de peróxidos e ERO produzida nas células (CHANG, 2009).

Na concentração de 100 μM de ácido rosmarínico, a INF de sálvia não aumentou a concentração de melanina, assim como a substância isolada na mesma concentração. Isto pode estar associado à capacidade do ácido rosmarínico, nessas condições, de inibir a atividade da tirosinase além de estimular a síntese enzimática. Além disso, a luteolina nessa concentração de INF encontra-se em maior quantidade no meio, podendo atuar inibindo ainda mais a produção de AMPc, com redução mais intensa da síntese da tirosinase. Com isso, poderiam ser justificados os resultados práticos, que salientaram atividade de tirosinase celular reduzida.

Outras substâncias presentes nos extratos de sálvia, ou outros mecanismos de ação, podem estar envolvidos no estímulo a melanogênese, já que a indução da síntese de melanina pelo EF e pela INF na concentração de 10 μM de AR foi maior que a observada para o ácido rosmarínico por si só. Além disso, nas concentrações de 1 e 10 μM de ácido rosmarínico, o EF aumentou a produção de melanina,

enquanto a INF não alterou ou estimulou em menor intensidade a melanogênese. Isso significa que outras substâncias da sálvia, estimulantes da melanogênese, estão em maior concentração no EF. Como os extratos foram produzidos por métodos diferentes, diferenças em suas composições químicas são possíveis, principalmente porque o EF foi extraído por uma mistura hidroalcoólica, a qual é capaz de carrear maior quantidade de substâncias menos polares do que as encontradas na INF, que foi extraída somente com água.

A atividade de tirosinase *in vitro* não foi alterada pelos extratos de sálvia em nenhuma das concentrações testadas. Por um lado, a atividade *in vitro* pode ter sido inibida por substâncias fenólicas, como os derivados caféicos, que, através de sua própria oxidação e da formação de radicais livres, inibem a oxidação da L-DOPA à dopacromo pela tirosinase, ou ainda reverterem essa reação, reduzindo novamente o dopacromo. Por outro lado, flavonóides e outras classes de substâncias fenólicas podem atuar prevenindo a inibição da tirosinase pela inibição da oxidação não enzimática ou ainda através da captação dos radicais livres gerados pela formação de derivados *o*-quinonas. O provável equilíbrio entre as ações justifica a inalteração da atividade da tirosinase *in vitro*.

Com isso, conclui-se que os extratos de sálvia influenciam a melanogênese, aumentando os níveis de melanina celular dependendo da concentração no meio, mas não alterando necessariamente a atividade de tirosinase celular. Pode-se dizer que o ácido rosmarínico e outras substâncias fenólicas, como a luteolina, colaboram com as ações dos extratos de sálvia tanto em nível de síntese da tirosinase como de melanina. Estudos de outras substâncias presentes nessa espécie ou de outros mecanismos de ação envolvidos na atuação da mesma na melanogênese devem ser considerados.

Considerando o peso seco e o teor de ácido rosmarínico dos extratos foi possível determinar a concentração de EF e de INF de sálvia, equivalente a 10 μ M de ácido rosmarínico, necessária para a indução da síntese de melanina *in vitro*, que foi de 610 μ L/L ou 95,6 mg/L para o EF, e de 7,06 mL/L ou 100 mg/L para a INF. Sabendo-se que 10 g de sálvia foram usadas para preparar 100 mL de INF a 14,3 mg/mL de peso seco, a massa total extraída dessa quantidade de droga foi de 1,430 g. Para uma infusão estimulante da melanogênese (100 mg INF/L) *in vitro* seriam necessários aproximadamente 700 mg de sálvia seca e triturada para 1 litro de infusão em água a 80 °C por 15 minutos. A partir da mesma linha de raciocínio para

o EF, seriam necessários aproximadamente 612 mg de droga vegetal para o preparo de 1 litro de extrato fluido nas mesmas condições usadas neste trabalho, para a indução da melanogênese *in vitro*. Observa-se que a quantidade de material vegetal necessária para produzir os extratos em concentrações estimulantes da síntese de melanina *in vitro* é bastante pequena, e não tende a grandes variações desde que a concentração de ácido rosmarínico apresente-se dentro de uma faixa específica para materiais vegetais de boa procedência e qualidade. A elucidação da influência dos extratos de sálvia na melanogênese *in vivo* deve ser considerada previamente à determinação de uma possível formulação para a indução da síntese de melanina *in vivo*, considerando a metabolização e todos os outros aspectos farmacocinéticos e farmacodinâmicos da droga.

Os resultados deste estudo demonstraram que a infusão aquosa 1:10 e o extrato fluido 1:1 de *S. officinalis*, assim como o ácido rosmarínico, são indutores da síntese de melanina em células B16F10 em concentrações menores e/ou iguais a 10 μM . O ácido rosmarínico apresenta dupla ação na melanogênese, podendo atuar tanto estimulando a síntese de tirosinase, como inibindo sua atividade, sendo que esses mecanismos de ação dependem da concentração desta substância no meio. Os extratos evidenciaram possível atuação em nível de síntese enzimática, não interferindo na atividade da tirosinase *in vitro*. A ação melanogênica do ácido rosmarínico é possivelmente uma das responsáveis pela influência dos extratos de sálvia na síntese de melanina, o que faz dessa substância e da sálvia agentes terapêuticos com potencial para tratamento de doenças relacionadas à hipopigmentação da pele, como o vitiligo. Além disso, a provável ação indutora da síntese de tirosinase, apresentada pelo ácido rosmarínico em concentrações mais baixas, pode ser explorada para o tratamento de melanomas em associação com outras substâncias, como, por exemplo, certos derivados amino fenólicos, já que a tirosinase os converte em agentes com potencial antitumoral.

6 CONCLUSÃO

A otimização do isolamento de ácido rosmarínico foi possível através do desenvolvimento de um método com alto rendimento e de fácil reprodução. A identificação da substância isolada por RMN e por espectrometria UV-VIS permitiu a utilização do analito na validação do método de extração e quantificação do ácido rosmarínico na sálvia, e na avaliação de atividades biológicas.

Através de planejamento fatorial de experimentos as condições ótimas para a extração do ácido rosmarínico da sálvia foram estabelecidas. Além disso, o método para determinação do analito na sálvia por CLAE foi validado com relação aos aspectos exigidos na legislação, apresentando resultados apropriados e dentro do estabelecido por normas nacionais e internacionais. O método de extração e determinação de ácido rosmarínico por CLAE pode ser empregado em estudos analíticos, biológicos, ou para controle de qualidade da espécie.

Tanto o ácido rosmarínico isolado como os extratos de sálvia foram testados com relação à toxicidade aos náuplios de *A. salina* e às linhagens celulares McCoy e B16F10. Nenhum deles apresentou toxicidade significativa aos náuplios, porém em concentrações maiores foram tóxicos às células, principalmente à linhagem celular McCoy. O conhecimento da citotoxicidade de uma substância ou extrato é importante, visto que é um dos testes de toxicidade exigidos pela legislação para registro de medicamentos.

A linhagem B16F10 foi utilizada para determinação da influência do ácido rosmarínico e da sálvia na melanogênese, e os resultados mostraram que todos os testes em concentrações mais baixas são capazes de estimular significativamente a síntese de melanina celular, podendo ser caracterizados como indutores da melanogênese dependendo da concentração no meio celular. A ação principal foi na síntese enzimática, e o ácido rosmarínico apresentou dupla ação, atuando tanto na síntese como na atividade da tirosinase. Esta substância foi responsável por grande parte da influência dos extratos de sálvia na melanogênese, mas outras substâncias presentes na planta podem estar colaborando com esta atividade.

7 REFERÊNCIAS

ABERDAM, E; ROMÉRO, C.; ORTONNE, J. Repeated UVB irradiations do not have the same potential to promote stimulation of melanogenesis in cultured normal human melanocytes. **Journal of Cell Science**, v. 106, n.4, p.1015-1022. 1993.

AHERNE, S. A., KERRY, J. P., O'BRIEN, N. M. Effects of plant extracts on antioxidant status and oxidant-induced stress in Caco-2 cells. **Br J Nutr**, v.97, n.2, p.321-328. 2007.

AKHONDZADEH, S., NOROOZIAN, M., MOHAMMADI, M., OHADINIA, S., JAMSHIDI, A. H., KHANI, M. Salvia officinalis extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomized and placebo-controlled trial. **J Clin Pharm Ther**, v.28, n.1, p.53-59. 2003.

ALKAM, T., NITTA, A., MIZOGUCHI, H., ITOH, A., NABESHIMA, T. A natural scavenger of peroxynitrites, rosmarinic acid, protects against impairment of memory induced by A beta(25-35). **Behavioural Brain Research**, v.180, n.2, p.139-145. 2007.

AN, S. M., KIM, H. J., KIM, J. E., BOO, Y. C. Flavonoids, taxifolin and luteolin attenuate cellular melanogenesis despite increasing tyrosinase protein levels. **Phytother Res**, v.22, n.9, p.1200-1207. 2008.

ANCANS, J., HOOGDUIJN, M. J., THODY, A. J. Melanosomal pH, pink locus protein and their roles in melanogenesis. **J Invest Dermatol**, v.117, n.1, p.158-159. 2001.

ARAUJO, P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v.877, n.23, p.2224-2234. 2009.

AREIAS, F., VALENTAO, P., ANDRADE, P. B., FERRERES, F., SEABRA, R. M. Flavonoids and phenolic acids of sage: Influence of some agricultural factors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, n.12, p.6081-6084. 2000.

BABA, S., OSAKABE, N., NATSUME, M., TERAOKA, J. Orally administered rosmarinic acid is present as the conjugated and/or methylated forms in plasma, and is degraded and metabolized to conjugated forms of caffeic acid, ferulic acid and m-coumaric acid. **Life Sciences**, v.75, n.2, May 28, p.165-178. 2004.

BABICH, H., KRUPKA, M. E., NISSIM, H. A., ZUCKERBRAUN, H. L. Differential in vitro cytotoxicity of (-)-epicatechin gallate (ECG) to cancer and normal cells from the human oral cavity. **Toxicol In Vitro**, v.19, n.2, p.231-242. 2005.

BARA, M. T. F., RIBEIRO, P. A. M., ARANTES, M. D. C. B., AMORIM, L. L. S. S., PAULA, J. R. D. Determinação do teor de princípios ativos em matérias-primas vegetais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16, n.2, p.211-215. 2006.

BARICEVIC, D., SOSA, S., DELLA LOGGIA, R., TUBARO, A., SIMONOVSKA, B., KRASNA, A., ZUPANCIC, A. Topical anti-inflammatory activity of Salvia officinalis L.

leaves: the relevance of ursolic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v.75, n.2-3, p.125-132. 2001.

BEN FARHAT, M., JORDAN, M. J., CHAOUECH-HAMADA, R., LANDOULSI, A., SOTOMAYOR, J. A. Variations in essential oil, phenolic compounds, and antioxidant activity of tunisian cultivated *Salvia officinalis* L. **J Agric Food Chem**, v.57, n.21, p.10349-10356. 2009.

BISSET, N. G., WICHTL, M. **Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals - A handbook for practice on a scientific basis with reference to German Comision E Monographs**. 2: Medpharm 2001. p. 440-443

BORENFREUND, E., BABICH, H., MARTIN-ALGUACIL, N. Rapid chemosensitivity assay with human normal and tumor cells in vitro. **In Vitro Cell Dev Biol**, v.26, n.11, p.1030-1034. 1990.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v.72, p.248-254. 1976.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed. Atheneu. v. 1, 1988.

BRASIL. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**. 2003. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word>. Acesso em: 18/09/2009.

CHANG, T. S. An updated review of tyrosinase inhibitors. **Int J Mol Sci**, v.10, n.6, p.2440-2475. 2009.

CHEN, J. S., WEI, C.-I., MARSHALL, M. R. Inhibition Mechanism of Kojic Acid on Polyphenol Oxidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.39, n.11, p.1897-1901. 1991.

CHOI, M. Y., SONG, H. S., HUR, H. S., SIM, S. S. Whitening activity of luteolin related to the inhibition of cAMP pathway in alpha-MSH-stimulated B16 melanoma cells. **Arch Pharm Res**, v.31, n.9, p.1166-1171. 2008.

CHRIST, B., KESSELRING, K. Process for isolating rosmarinic acid from plants. Germany: A. Nattermann & Cie GmbH. 4354035 1982.

CUNHA, A. P., SILVA, A. P., ROQUE, O. R. **Plantas e Produtos vegetais em Fitoterapia**. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 2003. p. 578-581 (Toxicon).

DE SOUSA, A. C., ALVIANO, D. S., BLANK, A. F., ALVES, P. B., ALVIANO, C. S., GATTASS, C. R. *Melissa officinalis* L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities. **J Pharm Pharmacol**, v.56, n.5, p.677-681. 2004.

DEBERSAC, P., VERNEVAUT, M. F., AMIOT, M. J., SUSCHETET, M., SIESS, M. H. Effects of a water-soluble extract of rosemary and its purified component rosmarinic acid on xenobiotic-metabolizing enzymes in rat liver. **Food and Chemical Toxicology**, v.39, n.2, p.109-117. 2001.

DRAGANOVA-FILIPOVA, M. N., GEORGIEVA, M. G., PEYCHEVA, E. N., MILOSHEV, G. A., SARAFIAN, V. S., PEYCHEV, L. P. Effects of propolis and CAPE on proliferation and apoptosis of McCoy-Plovdiv cell line. **Folia Med (Plovdiv)**, v.50, n.1, p.53-59. 2008.

DUBOIS, M., BAILLY, F., MBEMBA, G., MOUSCADET, J. F., DEBYSER, Z., WITVROUW, M., COTELLE, P. Reaction of rosmarinic acid with nitrite ions in acidic conditions: Discovery of nitro- and dinitrorosmarinic acids as new anti-HIV-1 agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.51, n.8, p.2575-2579. 2008.

DUNN, J. F., JR. Vitiligo. **Am Fam Physician**, v.33, n.5, p.137-143. 1986.

EBANKS, J. P., WICKETT, R. R., BOISSY, R. E. Mechanisms regulating skin pigmentation: the rise and fall of complexion coloration. **Int J Mol Sci**, v.10, n.9, p.4066-4087. 2009.

EIDI, M., EIDI, A., BAHAR, M. Effects of *Salvia officinalis* L. (sage) leaves on memory retention and its interaction with the cholinergic system in rats. **Nutrition**, v.22, n.3, p.321-326. 2006.

EIDI, M., EIDI, A., ZAMANIZADEH, H. Effect of *Salvia officinalis* L. leaves on serum glucose and insulin in healthy and streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, n.3, p.310-313. 2005.

FALE, P. L., BORGES, C., MADEIRA, P. J. A., ASCENSAO, L., ARAUJO, M. E. M., FLORENCIO, M. H., SERRALHEIRO, M. L. M. Rosmarinic acid, scutellarein 4'-methyl ether 7-O-glucuronide and (16S)-oleon E are the main compounds responsible for the antiacetylcholinesterase and antioxidant activity in herbal tea of *Plectranthus barbatus* ("falso boldo"). **Food Chemistry**, v.114, n.3, p.798-805. 2009.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Reviewer Guidance: Validation of Chromatography Methods, Center for Drug Evaluation and Research. 1994. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM134409.pdf>. Acesso em: 18/09/2009.

FECKA, I., TUREK, S. Determination of water-soluble polyphenolic compounds in commercial herbal teas from Lamiaceae: Peppermint, melissa, and sage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, n.26, p.10908-10917. 2007.

FERNANDES, S. S., ARCURI, R., MORGADO-DIAZ, J. A., BENCHIMOL, M. Increase of melanogenesis by retinoic acid: an ultrastructural and morphometric study. **Tissue Cell**, v.36, n.2, p.95-105. 2004.

FERNANDES, T. M. **Plantas Medicinais: memória da ciência no Brasil**. ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 2004. p. 260

FERREIRA, S. L., BRUNS, R. E., DA SILVA, E. G., DOS SANTOS, W. N., QUINTELLA, C. M., DAVID, J. M., DE ANDRADE, J. B., BREITKREITZ, M. C., JARDIM, I. C., NETO, B. B. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. **J Chromatogr A**, v.1158, n.1-2, p.2-14. 2007.

FIGLIORE, G., NENCINI, C., CAVALLO, F., CAPASSO, A., BADER, A., GIORGI, G., MICHELI, L. In vitro antiproliferative effect of six *Salvia* species on human tumor cell lines. **Phytother Res**, v.20, n.8, p.701-703. 2006.

Salvia officinalis. **FLICKR**. 2008. 1 fotografia, color. Disponível em: www.flickr.com. Acesso em 12/9/2008.

FONTANA, J. D., LANCAS, F. M., PASSOS, M., CAPPELARO, E., VILEGAS, J. Selective polarity and absorption-guided extraction/ purification of polar acetogenins and biological assay against agricultural pests. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.70-72, p.67-76. 1998.

GAO, L. P., WEI, H. L., ZHAO, H. S., XIAO, S. Y., ZHENG, R. L. Antiapoptotic and antioxidant effects of rosmarinic acid in astrocytes. **Pharmazie**, v.60, n.1, p.62-65. 2005.

GEUENICH, S., GOFFINET, C., VENZKE, S., NOLKEMPER, S., BAUMANN, I., PLINKERT, P., REICHLING, J., KEPLER, O. T. Aqueous extracts from peppermint, sage and lemon balm leaves display potent anti-HIV-1 activity by increasing the virion density. **Retrovirology**, v.5. 2008.

GLASBY, J. S. **Dictionary of Plants containing secondary metabolites**. London: Taylor e Francis. 1991. p. 283

GOMES, P. C. S., FERREIRA, M. F. Organ- and season-dependent variation in the essential oil composition of *Salvia officinalis* L. cultivated at two different sites. **J Agric Food Chem**, v.49, n.6, p.2908-2916. 2001.

GORDON, F. B., QUAN, A. L. Isolation of the Trachoma Agent in Cell Culture. **Proc Soc Exp Biol Med**, v.118, p.354-359. 1965.

GRIEVE, M. **A Modern Herbal**. ed. London: Tiger Books International. 1998. p. 700-701

GRZEGORCZYK, I., MATKOWSKI, A., WYSOKINSKA, H. Antioxidant activity of extracts from in vitro cultures of *Salvia officinalis* L. **Food Chemistry**, v.104, n.2, p.536-541. 2007.

GU, L., WU, T., WANG, Z. TLC bioautography-guided isolation of antioxidants from fruit of *Perilla frutescens* var. *acuta*. **LWT-Food Science and Technology**, v.XXX, p.1-6. 2008.

HADLEY, M. E. **Endocrinology**. 4 ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall. 1996. p. 549

HEO, S. J., KO, S. C., CHA, S. H., KANG, D. H., PARK, H. S., CHOI, Y. U., KIM, D., JUNG, W. K., JEON, Y. J. Effect of phlorotannins isolated from *Ecklonia cava* on melanogenesis and their protective effect against photo-oxidative stress induced by UV-B radiation. **Toxicol In Vitro**, v.23, n.6, p.1123-1130. 2009.

HOOGDUIJN, M. J., CEMELI, E., ROSS, K., ANDERSON, D., THODY, A. J., WOOD, J. M. Melanin protects melanocytes and keratinocytes against H₂O₂-induced DNA strand breaks through its ability to bind Ca²⁺. **Exp Cell Res**, v.294, n.1, p.60-67. 2004.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE HARMONIZATION (ICH). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. **Q2(R1)**. 2005. Disponível em: www.bioforum.org.il/Uploads/Editor/karen/q2_r1_step4.pdf. Acesso em: 18/09/2009.

ICH. Text on Validation of Analytical Procedures. vol. 60, maio de 1995, 4 ed. US FDA Federal Register. 1995.

ICH. Validation of Analytical Procedures: Methodology. novembro de 1996. US FDA Federal Register. 1996.

ITOH, K., HIRATA, N., MASUDA, M., NARUTO, S., MURATA, K., WAKABAYASHI, K., MATSUDA, H. Inhibitory effects of Citrus hassaku extract and its flavanone glycosides on melanogenesis. **Biol Pharm Bull**, v.32, n.3, p.410-415. 2009.

IUVONE, T., DE FILIPPIS, D., ESPOSITO, G., D'AMICO, A., IZZO, A. A. The spice sage and its active ingredient rosmarinic acid protect PC12 cells from amyloid-beta peptide-induced neurotoxicity. **J Pharmacol Exp Ther**, v.317, n.3, p.1143-1149. 2006.

IZZO, A. A., CAPASSO, F. Herbal medicines to treat Alzheimer's disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.28, n.2, p.47-48. 2007.

JI, H. F., ZHANG, H. Y. Multipotent natural agents to combat Alzheimer's disease. Functional spectrum and structural features. **Acta Pharmacologica Sinica**, v.29, n.2, p.143-151. 2008.

JIMENEZ-ATIENZAR, M., ESCRIBANO, J., CABANES, J., GANDIA-HERRERO, F., GARCIA-CARMONA, F. Oxidation of the flavonoid eriodictyol by tyrosinase. **Plant Physiol Biochem**, v.43, n.9, p.866-873. 2005.

JIMENEZ-CERVANTES, C., MARTINEZ-ESPARZA, M., PEREZ, C., DAUM, N., SOLANO, F., GARCIA-BORRÓN, J. C. Inhibition of melanogenesis in response to oxidative stress: transient downregulation of melanocyte differentiation markers and possible involvement of microphthalmia transcription factor. **J Cell Sci**, v.114, n.12, p.2335-2344. 2001.

JIROVSKY, D., KOSINA, P., MYSLINOVA, M., STYSKALA, J., ULRICHOVA, J., SIMANEK, V. HPLC analysis of rosmarinic acid in feed enriched with aerial parts of *Prunella vulgaris* and its metabolites in pig plasma using dual-channel coulometric detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, n.19, p.7631-7637. 2007.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. 7 ed. São Paulo: Ed. Nacional. 1985. p. 582-586

KANG, M. A., YUN, S. Y., WON, J. Rosmarinic acid inhibits Ca²⁺-dependent pathways of T-cell antigen receptor-mediated signaling by inhibiting the PLC-gamma 1 and I κ B activity. **Blood**, v.101, n.9, p.3534-3542. 2003.

KELLEY, C. J., HARRUFF, R. C., CARMACK, M. The Polyphenolic Acids of *Lithospermum ruderale*. II. Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance of Lithospermic and Rosmarinic Acids. **J. Org. Chem.**, v.41, n.3, p.449-455. 1976.

KELLEY, C. J., MAHAJAN, J. R., BROOKS, L. C., NEUBERT, L. A., BRENNEMAN, W. R., CARMACK, M. Polyphenolic Acids of *Lithospermum ruderale* Dougl. ex Lehm. (Boraginaceae). 1. Isolation and Structure Determination of Lithospermic Acid. **Journal of Organic Chemistry**, v.40, n.12, p.1804-1815. 1975.

KENNEDY, D. O., PACE, S., HASKELL, C., OKELLO, E. J., MILNE, A., SCHOLEY, A. B. Effects of cholinesterase inhibiting sage (*Salvia officinalis*) on mood, anxiety and performance on a psychological stressor battery. **Neuropsychopharmacology**, v.31, n.4, p.845-852. 2006.

KIM, Y. J., UYAMA, H. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. **Cell Mol Life Sci**, v.62, n.15, p.1707-1723. 2005.

KITAGAWA, R. R., DA FONSECA, L. M., XIMENES, V. F., KHALIL, N. M., VILEGAS, W., RADDI, M. S. Ascorbic acid potentiates the cytotoxicity of the naphthoquinone 5-methoxy-3,4-dehydroxanthone. **Phytochemistry**, v.69, n.11, p.2205-2208. 2008.

KONGSHOJ, B., MIKKELSEN, N. D., KOBAYASHI, T., LERCHE, C. M., WULF, H. C. Ammonium chloride and L-tyrosine enhance melanogenesis in vitro but not in vivo even in combination with ultraviolet radiation. **Photodermatol Photoimmunol Photomed**, v.23, n.5, p.197-202. 2007.

KULISIC-BILUSIC, T., KATALINIC, V., DRAGOVIC-UZELAC, V., LJUBENKOV, I., KRISKO, A., DEJANOVIC, B., JUKIC, M., POLITEO, O., PIFAT, G., MILOS, M. Antioxidant and acetylcholinesterase inhibiting activity of several aqueous tea infusions in vitro. **Food Technology and Biotechnology**, v.46, n.4, p.368-375. 2008.

LAN, W. J., WANG, H. Y., LAN, W., WANG, K. Y. Geniposide enhances melanogenesis by stem cell factor/c-Kit signalling in norepinephrine-exposed normal

human epidermal melanocyte. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v.103, n.1, p.88-93. 2008.

LEE, J., JUNG, E., KIM, Y., LEE, J., PARK, J., HONG, S., HYUN, C. G., PARK, D., KIM, Y. S. Rosmarinic acid as a downstream inhibitor of IKK-beta in TNF-alpha-induced upregulation of CCL11 and CCR3. **British Journal of Pharmacology**, v.148, n.3, p.366-375. 2006.

LEE, J., JUNG, E., LEE, J., HUH, S., BOO, Y. C., HYUN, C. G., KIM, Y. S., PARK, D. Mechanisms of melanogenesis inhibition by 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone. **Br J Dermatol**, v.157, n.2, p.242-248. 2007.

LEE, J., KIM, Y. S., PARK, D. Rosmarinic acid induces melanogenesis through protein kinase A activation signaling. **Biochemical Pharmacology**, v.74, n.7, p.960-968. 2007.

LI, L., TIAN, J. W., LIANG, X. G. Regression of atherosclerosis by Rosmarinic acid via regulating lipid metabolism and anti-inflammatory actions. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v.44, n.4, p.719-719. 2008.

LIBERIO, M. S., JOANITTI, G. A., AZEVEDO, R. B., CILLI, E. M., ZANOTTA, L. C., NASCIMENTO, A. C., SOUSA, M. V., PIRES JUNIOR, O. R., FONTES, W., CASTRO, M. S. Anti-proliferative and cytotoxic activity of pentadactylin isolated from *Leptodactylus labyrinthicus* on melanoma cells. **Amino Acids**. 2009.

LIMA, C. F., ANDRADE, P. B., SEABRA, R. M., FERNANDES-FERREIRA, M., PEREIRA-WILSON, C. The drinking of a *Salvia officinalis* infusion improves liver antioxidant status in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, n.2, p.383-389. 2005.

LIMA, C. F., AZEVEDO, M. F., ARAUJO, R., FERNANDES-FERREIRA, M., PEREIRA-WILSON, C. Metformin-like effect of *Salvia officinalis* (common sage): is it useful in diabetes prevention? **Br J Nutr**, v.96, n.2, p.326-333. 2006.

LIMA, C. F., FERNANDES-FERREIRA, M., PEREIRA-WILSON, C. Drinking of *Salvia officinalis* tea increases CCl₄-induced hepatotoxicity in mice. **Food Chem Toxicol**, v.45, n.3, p.456-464. 2007.

LIMA, C. F., VALENTAO, P. C. R., ANDRADE, P. B., SEABRA, R. M., FERNANDES-FERREIRA, M., PEREIRA-WILSON, C. Water and methanolic extracts of *Salvia officinalis* protect HepG2 cells from t-BHP induced oxidative damage. **Chemico-Biological Interactions**, v.167, n.2, p.107-115. 2007.

LIN, Z., HOULT, J. R., BENNETT, D. C., RAMAN, A. Stimulation of mouse melanocyte proliferation by *Piper nigrum* fruit extract and its main alkaloid, piperine. **Planta Med**, v.65, n.7, p.600-603. 1999.

LORENZI, H., MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda. 2002. p. 263

LU, Y. R., FOO, L. Y. Rosmarinic acid derivatives from *Salvia officinalis*. **Phytochemistry**, v.51, n.1, p.91-94. 1999.

_____. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). **Food Chemistry**, v.75, n.2, p.197-202. 2001.

MACHADO FILHO, C. D., ALMEIDA, F. A., PROTO, R. S., LANDMAN, G. Vitiligo: analysis of grafting versus curettage alone, using melanocyte morphology and reverse transcriptase polymerase chain reaction for tyrosinase mRNA. **Sao Paulo Med J**, v.123, n.4, p.187-191. 2005.

MAEDA, K.; FUKUDA, M. Arbutin: Mechanism of Its Depigmenting Action in Human Melanocyte Culture. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.276, n.2, p.765-769. 1996.

MATHE, I., HOHMANN, J., JANICSAK, G., NAGY, G., DORA, R. [Chemical diversity of the biological active ingredients of *salvia officinalis* and some closely related species]. **Acta Pharm Hung**, v.77, n.1, p.37-45. 2007.

MAYER, B., BAGGIO, C. H., FREITAS, C. S., DOS SANTOS, A. C., TWARDOWSCHY, A., HORST, H., PIZZOLATTI, M. G., MICKE, G. A., HELLER, M., DOS SANTOS, E. P., OTUKI, M. F., MARQUES, M. C. Gastroprotective constituents of *Salvia officinalis* L. **Fitoterapia**, v.80, n.7, p.421-426. 2009.

Melanina. 2010. Disponível em: <http://saude.hsw.uol.com.br/albinismo1.htm>. Acesso em: 10/02/2010.

MERCHANT, D., KAHN, R., MURPHY, W. **Handbook of cell and organ culture**. Burgess Publishing, Broken Arrow. 1964.

MEYER, B. N., FERRIGNI, N. R., PUTNAM, J. E., JACOBSEN, L. B., NICHOLS, D. E., J. L. MCLAUGHLIN. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. **Planta Medica**, v.45, n.1, p.31-34. 1982.

MOMTAZ, S., MAPUNYA, B. M., HOUGHTON, P. J., EDGERLY, C., HUSSEIN, A., NAIDOO, S., LALL, N. Tyrosinase inhibition by extracts and constituents of *Sideroxylon inerme* L. stem bark, used in South Africa for skin lightening. **J Ethnopharmacol**, v.119, n.3, p.507-512. 2008.

NAGATA, H., TAKEKOSHI, S., TAKEYAMA, R., HOMMA, T., YOSHIYUKI OSAMURA, R. Quercetin enhances melanogenesis by increasing the activity and synthesis of tyrosinase in human melanoma cells and in normal human melanocytes. **Pigment Cell Res**, v.17, n.1, p.66-73. 2004.

NAKAMURA, K., YOSHIKAWA, N., YAMAGUCHI, Y., KAGOTA, S., SHINOZUKA, K., KUNITOMO, M. Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. **Life Sci**, v.70, n.7, p.791-798. 2002.

NAKAZAWA, T., OHSAWA, K. Metabolism of rosmarinic acid in rats. **Journal of Natural Products**, v.61, n.8, p.993-996. 1998.

_____. Metabolites of orally administered *Perilla frutescens* extract in rats and humans. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.23, n.1, p.122-127. 2000.

NARDINI, M., CIRILLO, E., NATELLA, F., MENCARELLI, D., COMISSO, A., SCACCINI, C. Detection of bound phenolic acids: prevention by ascorbic acid and ethylenediaminetetraacetic acid of degradation of phenolic acids during alkaline hydrolysis. **Food Chemistry**, v.79, n.1, p.119-124. 2002.

NEWTON, R. A., COOK, A. L., ROBERTS, D. W., LEONARD, J. H., STURM, R. A. Post-transcriptional regulation of melanin biosynthetic enzymes by cAMP and resveratrol in human melanocytes. **J Invest Dermatol**, v.127, n.9, p.2216-2227. 2007.

NGUYEN, D. T., NGUYEN, D. H., LYUN, H. L., LEE, H. B., SHIN, J. H., KIM, E. K. Inhibition of melanogenesis by dioctyl phthalate isolated from *Nigella glandulifera* Freyn. **J Microbiol Biotechnol**, v.17, n.10, p.1585-1590. 2007.

OHGUCHI, K., AKAO, Y., NOZAWA, Y. Stimulation of melanogenesis by the citrus flavonoid naringenin in mouse B16 melanoma cells. **Biosci Biotechnol Biochem**, v.70, n.6, p.1499-1501. 2006.

OHIRA, T., OHE, Y., HEIKE, Y., PODACK, E. R., OLSEN, K. J., NISHIO, K., NISHIO, M., MIYAHARA, Y., FUNAYAMA, Y., OGASAWARA, H., ET AL. In vitro and in vivo growth of B16F10 melanoma cells transfected with interleukin-4 cDNA and gene therapy with the transfectant. **J Cancer Res Clin Oncol**, v.120, n.11, p.631-635. 1994.

OLLANKETO, M., PELTOKETO, A., HARTONEN, K., HILTUNEN, R., RIEKKOLA, M. L. Extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by pressurized hot water and conventional methods: antioxidant activity of the extracts. **European Food Research and Technology**, v.215, n.2, p.158-163. 2002.

PDR. **PDR for Herbal Medicines**. 2 ed. Montvale: Medical Economics Company. 2000. p. 655-656

Pele. 2010. Disponível em:
<http://www.saudetotal.com.br/prevencao/topicos/histologia.asp>. Acesso em:
 10/02/10.

PEREIRA, P., TYSCA, D., OLIVEIRA, P., DA SILVA BRUM, L. F., PICADA, J. N., ARDENGHI, P. Neurobehavioral and genotoxic aspects of rosmarinic acid. **Pharmacol Res**, v.52, n.3, p.199-203. 2005.

PETERSEN, M. Cytochrome P450-dependent hydroxylation in the biosynthesis of rosmarinic acid in *Coleus*. **Phytochemistry**, v.45, n.6, p.1165-1172. 1997.

PETERSEN, M., HAUSLER, E., KARWATZKI, B., MEINHARD, J. Proposed Biosynthetic-Pathway for Rosmarinic Acid in Cell-Cultures of *Coleus-Blumei* Benth. **Planta**, v.189, n.1, p.10-14. 1993.

PETERSEN, M., HAUSLER, E., MEINHARD, J., KARWATZKI, B., GERTLOWSKI, C. The Biosynthesis of Rosmarinic Acid in Suspension-Cultures of *Coleus-Blumei*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.38, n.2-3, p.171-179. 1994.

PETERSEN, M., SIMMONDS, M. S. J. Molecules of interest - Rosmarinic acid. **Phytochemistry**, v.62, n.2, p.121-125. 2003.

PREZIOSO, J. A., EPPERLY, M. W., WANG, N., BLOOMER, W. D. Effects of tyrosinase activity on the cytotoxicity of 4-S-cysteaminylphenol and N-acetyl-4-S-cysteaminylphenol in melanoma cells. **Cancer Lett**, v.63, n.1, p.73-79. 1992.

QUIRANTES-PINE, R., FUNES, L., MICOL, V., SEGURA-CARRETERO, A., FERNANDEZ-GUTIERREZ, A. High-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight and ion-trap tandem mass spectrometry to identify phenolic compounds from a lemon verbena extract. **J Chromatogr A**, v.1216, n.28, p.5391-5397. 2009.

RAAL, A., ORAV, A., ARAK, E. Composition of the essential oil of *Salvia officinalis* L. from various European countries. **Nat Prod Res**, v.21, n.5, p.406-411. 2007.

REUTER, J., JOCHER, A., HORNSTEIN, S., MONTING, J. S., SCHEMPP, C. M. Sage extract rich in phenolic diterpenes inhibits ultraviolet-induced erythema in vivo. **Planta Med**, v.73, n.11, p.1190-1191. 2007.

Rosmarinic acid. SciFinder Scholar. 2009.

Ácido rosmarínico. 2008. Disponível em: www.liberherbarum.com. Acesso em: 06/8/2008.

RUMJANEK, V. M., TRINDADE, G. S., WAGNER-SOUZA, K., DE-OLIVEIRA, M. C., MARQUES-SANTOS, L. F., MAIA, R. C., CAPELLA, M. A. Multidrug resistance in tumour cells: characterization of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1. **An Acad Bras Cienc**, v.73, n.1, p.57-69. 2001.

SA, C. M., RAMOS, A. A., AZEVEDO, M. F., LIMA, C. F., FERNANDES-FERREIRA, M., PEREIRA-WILSON, C. Sage tea drinking improves lipid profile and antioxidant defences in humans. **Int J Mol Sci**, v.10, n.9, p.3937-3950. 2009.

SAEKI, H., OIKAWA, A. Stimulation of tyrosinase activity of cultured melanoma cells by lysosomotropic agents. **J Cell Physiol**, v.116, n.1, p.93-97. 1983.

SANCHEZ-CAMPILLO, M., GABALDON, J. A., CASTILLO, J., BENAVENTE-GARCIA, O., DEL BANO, M. J., ALCARAZ, M., VICENTE, V., ALVAREZ, N., LOZANO, J. A. Rosmarinic acid, a photo-protective agent against UV and other ionizing radiations. **Food Chem Toxicol**, v.47, n.2, p.386-392. 2009.

SARKAR, C., SINGH, S. K., MANDAL, S. K., SAHA, B., BERA, R., RATHA, J., DATTA, P. K., BHADRA, R. Human placental protein/peptides stimulate melanin synthesis by enhancing tyrosinase gene expression. **Mol Cell Biochem**, v.285, n.1-2, p.133-142. 2006.

SATO, K., TORIYAMA, M. Effect of pyrroloquinoline quinone (PQQ) on melanogenic protein expression in murine B16 melanoma. **J Dermatol Sci**, v.53, n.2, p.140-145. 2009.

SCHNITZLER, P., NOLKEMPER, S., STINTZING, F. C., REICHLING, J. Comparative in vitro study on the anti-herpetic effect of phytochemically characterized aqueous and ethanolic extracts of *Salvia officinalis* grown at two different locations. **Phytomedicine**, v.15, n.1-2, p.62-70. 2008.

SCHOLEY, A. B., TILDESLEY, N. T. J., BALLARD, C. G., WESNES, K. A., TASKER, A., PERRY, E. K., KENNEDY, D. O. An extract of *Salvia* (sage) with anticholinesterase properties improves memory and attention in healthy older volunteers. **Psychopharmacology**, v.198, n.1, p.127-139. 2008.

SCHROTEROVA, L., KRALOVA, V., VORACOVA, A., HASKOVA, P., RUDOLF, E., CERVINKA, M. Antiproliferative effects of selenium compounds in colon cancer cells: Comparison of different cytotoxicity assays. **Toxicol In Vitro**, 2009.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **J Chromatogr A**, v.987, n.1-2, p.57-66. 2003.

TAKEDA, H., TSUJI, M., INAZU, M., EGASHIRA, T., MATSUMIYA, T. Rosmarinic acid and caffeic acid produce antidepressive-like effect in the forced swimming test in mice. **Eur J Pharmacol**, v.449, n.3, p.261-267. 2002.

TEPE, B. Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia virgata* (Jacq), *Salvia staminea* (Montbret & Aucher ex Benth) and *Salvia verbenaca* (L.) from Turkey. **Bioresour Technol**, v.99, n.6, p.1584-1588. 2008.

TEUSCHER, E. **Medicinal Spices: A handbook of culinary herbs, spices, spice mixtures and their essential oils**. Triebes: Medpharm. 2006. p. 324-327

TRIBL, F., ARZBERGER, T., RIEDERER, P., GERLACH, M. Tyrosinase is not detected in human catecholaminergic neurons by immunohistochemistry and Western blot analysis. **J Neural Transm Suppl**, n.72, p.51-55. 2007.

TRUTE, A., NAHRSTEDT, A. Separation of rosmarinic acid enantiomers by three different chromatographic methods (HPLC, CE, GC) and the determination of rosmarinic acid in *Hedera helix* L. **Phytochemical Analysis**, v.7, n.4, p.204-208. 1996.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP). 30 ed. Rockville: US Pharmacopeial Convention. 3, 2007.

VALENTOVA, K., TRUONG, N., MONCION, A., DE WAZIERS, I., ULRICHOVA, J. Induction of glucokinase mRNA by dietary phenolic compounds in rat liver cells in vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, n.19, p.7726-7731. 2007.

VAN KESSEL, K. P., KALTER, E. S., VERHOEF, J. Rosmarinic acid inhibits external oxidative effects of human polymorphonuclear granulocytes. **Agents Actions**, v.17, n.3-4, p.375-376. 1986.

VIRADOR, V. M., KOBAYASHI, N., MATSUNAGA, J., HEARING, V. J. A standardized protocol for assessing regulators of pigmentation. **Anal Biochem**, v.270, n.2, p.207-219. 1999.

WANG, H. F., PROVAN, G. J., HELLIWELL, K. Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC. **Food Chemistry**, v.87, n.2, p.307-311. 2004.

WANG, M., SHAO, Y., LI, J., ZHU, N., RANGARAJAN, M., LAVOIE, E. J., HO, C. T. Antioxidative phenolic glycosides from sage (*Salvia officinalis*). **J Nat Prod**, v.62, n.3, p.454-456. 1999.

WANG, M. F., KIKUZAKI, H., ZHU, N. Q., SANG, S. M., NAKATANI, N., HO, C. T. Isolation and structural elucidation of two new glycosides from sage (*Salvia officinalis* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, n.2, p.235-238. 2000.

WICHTL, M. **Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals**. 3 ed. Stuttgart, Germany: Medpharm: Scientific Publishers. 2004. p. 538-545

WOOD, J. M., CHAVAN, B., HAFEEZ, I., SCHALLREUTER, K. U. Regulation of tyrosinase by tetrahydropteridines and H₂O₂. **Biochem Biophys Res Commun**, v.325, n.4, p.1412-1417. 2004.

WU, L. C., CHANG, L. H., CHEN, S. H., FAN, N. C., HO, J. A. A. Antioxidant activity and melanogenesis inhibitory effect of the acetonic extract of *Osmanthus fragrans*: A potential natural and functional food flavor additive. **LWT-Food Science and Technology**, v.42, n.9, p.1513-1519. 2009.

XIE, L. P., CHEN, Q. Y., HUANG, H., WANG, H. Z., ZHANG, R. Q. Inhibitory effects of some flavonoids on the activity of mushroom tyrosinase. **Biochemistry-Moscow**, v.68, n.4, p.487-491. 2003.

XU, J.-Z., SHEN, J., CHENG, Y.-Y., QU, H.-B. Simultaneous detection of seven phenolic acids in Danshen injection using HPLC with ultraviolet detector. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v.9, n.9, p.728-733. 2008.

XU, Y., STOKES, A. H., FREEMAN, W. M., KUMER, S. C., VOGT, B. A., VRANA, K. E. Tyrosinase mRNA is expressed in human substantia nigra. **Brain Res Mol Brain Res**, v.45, n.1, p.159-162. 1997.

YIN, G., LI, Y. M., WEI, W., JIANG, S. H., ZHU, D. Y., DU, W. H. Interactions of acetylcholinesterase with salvianolic acid B and rosmarinic acid from *Salvia miltiorhiza* water extract investigated by NMR relaxation rate. **Chinese Chemical Letters**, v.19, p.747-751. 2008.

YOKOZAWA, T., KIM, Y. J. Piceatannol inhibits melanogenesis by its antioxidative actions. **Biol Pharm Bull**, v.30, n.11, p.2007-2011. 2007.

YOON, N. Y., EOM, T. K., KIM, M. M., KIM, S. K. Inhibitory Effect of Phlorotannins Isolated from *Ecklonia cava* on Mushroom Tyrosinase Activity and Melanin Formation in Mouse B16F10 Melanoma Cells. **J Agric Food Chem**, 2009.

ZHANG, X., HU, X., HOU, A., WANG, H. Inhibitory effect of 2,4,2',4'-tetrahydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-chalcone on tyrosinase activity and melanin biosynthesis. **Biol Pharm Bull**, v.32, n.1, p.86-90. 2009.

ZHAO, W., LIU, H., XU, S., ENTSCHLADEN, F., NIGGEMANN, B., ZANKER, K. S., HAN, R. Migration and metalloproteinases determine the invasive potential of mouse melanoma cells, but not melanin and telomerase. **Cancer Lett**, v.162, p.S49-S55. 2001.

ZHENG, W., WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **J Agric Food Chem**, v.49, n.11, p.5165-5170. 2001.

ZIVANOVIC, L., LICANSKI, A., ZECEVIC, M., JOCIC, B., KOSTIC, M. Application of experimental design in optimization of solid phase extraction of mycophenolic acid and mycophenolic acid glucuronide from human urine and plasma and SPE-RP-HPLC method validation. **J Pharm Biomed Anal**, v.47, n.3, p.575-585. 2008.

ZUPKO, I., HOHMANN, J., REDEI, D., FALKAY, G., JANICSAK, G., MATHE, I. Antioxidant activity of leaves of *Salvia* species in enzyme-dependent and enzyme-independent systems of lipid peroxidation and their phenolic constituents. **Planta Med**, v.67, n.4, p.366-368. 2001.