

Potencial antioxidante dos diferentes extratos de *Morinda citrifolia* por TLC-DPPH•

Antioxidant potential of different extracts of Morinda citrifolia by TLC-DPPH•

Elison de Souza Sevalho¹, Wadireny Caldas Rocha¹

¹Instituto de Saúde e Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Coari, Amazonas, Brasil.

Resumo

Introdução: As substâncias antioxidantes ocupam um lugar de destaque dentro das diferentes áreas da indústria, é importante a realização de pesquisa sistematizada desses compostos e de suas capacidades de neutralizar agentes nocivos, como por exemplo, os radicais livres. A espécie *Morinda citrifolia*, conhecida por noni, possui uma longa história de uso na medicina. **Objetivo:** rastrear a presença de substâncias com capacidade antioxidante em diferentes extratos de *M. citrifolia*. **Metodologia:** As sementes, raízes, caule e folhas foram secas em estufa de ar circulante e trituradas em moinho de facas do tipo Willy, com exceção da polpa. Os extratos foram obtidos através de extração sequencial com solventes de polaridade crescente (hexano, acetato de etila e metanol) por maceração em marlotte. As análises da capacidade antioxidante foram realizadas pela técnica TLC-DPPH• em duas etapas. Na primeira etapa, realizou-se varredura para determinar quais dos extratos obtidos possuem capacidade antioxidante por TLC-DPPH•. Na segunda etapa, avaliaram-se os extratos ativos, e através do perfil cromatográfico identificou o *R_f* com atividade antioxidante. **Resultados:** Pela avaliação antioxidante por TLC-DPPH• na primeira etapa, observou-se que somente o *spot* do extrato em acetato de etila da semente demonstrou melhor atividade antioxidante quando comparando aos padrões utilizados. Na segunda etapa, somente o *R_f*=0,7 do extrato em acetato de etila apresentou a atividade antioxidante, comparado com os padrões. **Conclusão:** O método TLC-DPPH• demonstrou ser um procedimento rápido e preciso na separação do extrato em acetato de etila da semente, o qual apresentou resultado positivo para a atividade antioxidante, quando comparado com os demais extratos e o controle. - A abordagem mostrou perspectivas de isolamento de substâncias com propriedades antioxidantes.

Palavras-chave: Substâncias antioxidantes; *Screening*; Noni.

Autor correspondente:

Elison de Souza Sevalho

Endereço: Estrada Coari-Mamiá, 305, Espírito Santo - Coari

Amazonas, Brasil

Telefone: +55 92 993260145

E-mail: elisonsevalho@hotmail.com

Recebido em: 29/09/2016

Revisado em: 16/03/2017

Aceito em: 06/04/2017

Publicado em: 28/04/2017

Abstract

Introduction: The antioxidant substances occupy a place of distinction inside the different areas of the industry, when there is important the realization of systematized inquiry of these compounds and of his capacities of neutralizing harmful agents, as for example, the free radicals. The sort *Morinda citrifolia*, known for noni, has a long history of use as popular medicine. **Objective:** to look for substances with antioxidant capacity in different extracts of *M. citrifolia*. **Methodology:** The seed, root, stem and leaf were dry in stove of air circulating and ground in mill of knives of the type Willy, with the exception of the pulp. The extracts were obtained through sequential extraction with solvents of growing polarity (hexano, acetate of etila and metanol) by maceration in mariotte. The analyses of the antioxidant capacity were carried out by the technician TLC-DPPH• in two stages. The first stage happened sweep to determine which of the obtained extracts have antioxidant capacity for TLC-DPPH•. The second stage valued the active extracts, and through the profile chromatogram it identified the Rf with antioxidant activity. **Results:** The antioxidant evaluation for TLC-DPPH• in the first stage pointed out to itself that only the spotlight of the extract in acetate of etila of the seed demonstrate better antioxidant activity when comparing to the used standards. In the second stage only the Rf=0,7 of the extract in acetate of etila they presented the antioxidant activity, compared with the standards. **Conclusions:** The method TLC-DPPH• it demonstrated to be a fast and necessary procedure in the separation of the extract in having accepted of etila of the seed, which presented positive result for the antioxidant activity, when compared with the other extracts and the control, and the approach showed perspectives of isolation of substances with antioxidant properties.

Keywords: Substances antioxidants; Screening; Noni.

Introdução

Os produtos naturais têm um papel importante em todo o mundo, seja na forma de alimentos, cosméticos, inseticidas, defensivos agrícolas e principalmente como medicamentos¹. A natureza é uma fonte na descoberta de novas substâncias de características terapêutica, com uma enorme diversidade química que é encontrada em milhões de espécies de plantas, animais, organismos marinhos e microrganismos².

Uma planta é uma verdadeira usina química que pode produzir milhares de substâncias, que são responsáveis pela atividade terapêutica³. A procura de produtos naturais pode ser rapidamente submetida a métodos de varredura, os quais são constituídos de diversas misturas de compostos, assim separando o composto ativo dos demais⁴.

Recentemente, a presença de radicais livres tem sido relacionada com um grande número de doenças, mas não como agentes etiológicos, e sim, como fatores que participam diretamente dos mecanismos fisiopatológicos⁵. Diante disso, os antioxidantes são substâncias que, em uma concentração consideravelmente menor que a do substrato oxidável retardam o estresse oxidativo, diminuindo a velocidade da reação ou prolongando o seu período de indução⁶. Dentre as principais substâncias com atividade antioxidante derivadas de plantas destacam-se o ácido ascórbico (Vitamina C) e a quercetina que é amplamente

utilizado como antioxidante, nutracêutico e cosmecêutico⁷.

Dentre os métodos cromatográficos propostos, destaca-se Thin-Layer Chromatography (TLC), uma técnica analítica de adsorção líquido-sólido que separa pela diferença de afinidade do solvente utilizado (fase móvel), os componentes de um extrato pela fase estacionária de sílica gel⁸. É simples e de execução relativamente rápida, utilizada em química de produtos naturais como uma ferramenta eficaz de análise qualitativa e quantitativa para avaliação da pureza de uma amostra simples⁹, avaliação do número de componentes de uma mistura, identificação de uma ou mais substâncias presentes em uma mistura por comparação com padrões e monitoramento do progresso de uma reação química¹⁰.

Nos ensaios in vitro, destaca-se o método DPPH• que indica a atividade antioxidante de extratos ou substâncias isoladas¹¹. A molécula de DPPH• é caracterizada como um radical livre estável em virtude da deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula, conferindo a esta molécula uma coloração violeta¹². A realização do método ocorre na medida em que a capacidade antioxidante de uma determinada substância em sequestrar o radical DPPH• reduz a hidrazina obtendo dessa forma a mudança simultânea na coloração de violeta para amarelado¹³.

Os atributos relacionados a uma determinada planta são divulgados periodicamente, e nesse contexto, a espécie originária do sudoeste da Ásia, *Morinda citrifolia* Linn (Rubiaceae), popularmente conhecido por noni, tem ganhado espaço devido às atividades biológicas encontradas: antioxidante, anti-inflamatória, analgésica, antibacteriana e antitumoral, etc.^{14, 15}.

Estudos detalhados acerca do isolamento de compostos fixos da planta já estão bastante avançados, cerca de 200 substâncias já foram isoladas¹⁶. Dentre as diferentes atividades biológicas encontradas na espécie, a fruta possui estudo, e nela foi encontrada a atividade antioxidante^{17, 18}. O cultivo e o consumo têm se expandido rapidamente em todas as regiões brasileiras, não apenas por ser uma rica fonte de nutrientes, mas principalmente, devido às diversas propriedades a ela atribuída e à sua facilidade de adaptação^{19, 20}.

Dessa forma, este trabalho teve por objetivo buscar substâncias com o potencial antioxidante em diferentes tipos de extratos do *M. citrifolia* através do método TLC-DPPH•

Metodologia

Obtenção dos extratos orgânicos

As sementes, raízes, caules, folhas e frutos *M. citrifolia* foram coletados no mês de julho de 2015, na cidade de Coari, Amazonas. A identificação científica foi realizada por botânicos do Instituto de Saúde e Biotecnologia. Os materiais coletados foram desidratados em estufa de ar circulante a 40°C, por 48h, e, em seguida, triturados em moinho de facas até a obtenção de um pó.

A extração ocorreu por maceração em marionete, submetendo 250g do pó de cada parte da planta a 700 mL de solventes de diferentes polaridades. Inicialmente macerou-se a amostra com hexano fazendo agitações manuais durante quatro dias. Utilizou-se novamente o resíduo resultante e cobriu-o com o solvente acetato de etila, repetindo o processo por mais quatro dias. Ressuspendeu novamente o resíduo com álcool metílico por mais quatro dias. Cada filtrado foi levado ao rotaevaporador para a eliminação total do solvente utilizado, obtendo-se extratos em hexano, extratos em acetato de etila e extratos metanólicos da semente, raiz, caule folha e fruto, ambos foram mantidos em dessecador.

Ensaio da atividade antioxidante por TLC-DPPH•

A avaliação da atividade antioxidante dos extratos foi realizada em duas etapas, a primeira consistiu no screening dos extratos com capacidade antioxidante, os que apresentaram resultados positivos foram selecionados para a segunda etapa, que consistiu na identificação do fator de retenção (Rf) com atividade antioxidante, através do perfil cromatográfico.

Na primeira etapa do ensaio antioxidante, as soluções dos extratos foram preparadas na concentração 0,5 mg/mL, 2,5 mg/mL e 10 mg/mL. A solução padrão, usada como controle positivo, foi a solução de quercetina e ácido ascórbico, ambos solubilizados com 0,4 mg/mL de metanol. Para o controle negativo, foram utilizados os solventes de solubilização. O revelador de substâncias antioxidante foi adquirido através da solução de DPPH• (Sigma-Aldrich), na concentração 0,5 mg/mL (0,05%).

Na placa cromatográfica de sílica gel 60 foram aplicados, em formato de spots no centro de cada quadrado esquematizado na cromatoplaça, 10 µL dos diferentes extratos e controles. Após a total evaporação do solvente, a mesma foi revelada com solução metanólica de DPPH•. Esperou-se a visualização dos spots que apresentasse o aparecimento de manchas amarelas sobre o fundo roxo, indicativo da atividade antioxidante²¹.

Preparou-se na segunda etapa, a determinação do perfil cromatográfico dos extratos ativos. Para tanto, foram aplicados 5 µL do extrato com o auxílio de um capilar de vidro em formato de banda na placa cromatográfica recortável (10x5 cm)¹³⁻²². Foram usadas placas cromatográficas de fase normal de sílica gel 60 (0,20 mm) e placas cromatográficas de fase reversa de sílica gel C18 (0,15 mm) ambas com indicador de fluorescência UV254 e em alumínio DC-Fertigfolien ALUGRAM® da MACHEREY-NAGEL (20X20 cm)

Determinou-se a série eluotrópica dos solventes, estabelecendo-se a seguinte ordem da polaridade: clorofórmio, diclorometano, acetato de etila, metanol, ácido fórmico e ácido acético. Todos os sistemas de solventes preparados foram adicionados à cuba cromatográfica e saturados por 5 minutos à temperatura ambiente⁹⁻²².

Após a eluição, as placas foram secas à capela e para a visualização da separação das substâncias, utilizou-se o revelador físico com exposição na câmera UV (luz 365 nm) e reveladores químicos: solução NP/PEG sobre luz UV (365 nm) como revelador específico de flavonoides e a solução de cloreto férrico (FeCl₃) como revelador específico para substâncias fenólicas. A solução de DPPH foi usada para revelar as bandas com substâncias antioxidantes e posteriormente, foi calculado o fator de retenção (Rf) através do equipamento de HPTLC (CAMAG).

Resultados

A atividade antioxidante pelo método TLC-DPPH• é observada pela presença de manchas amarelo-esbranquiçadas resultantes da redução do radical DPPH•, sobre fundo roxo, da mesma forma que os apresentados pelos padrões. O screening por TLC-DPPH• dos extratos de diferentes polaridades mostrara-se ativo na concentração de 0,5 mg/mL 21.

Não foi possível investigar a existência de atividade nos extratos em hexano e acetato de etila da raiz, extrato acetato de etila do caule e extratos hexânico e acetato de etila da folha, devido à coloração apresentada, a partir dessa problemática não foi possível encontrar trabalhos científicos na literatura sobre a técnica TLC-DPPH• para embasar-se nas características encontradas, os quais podem justificar a atividade antioxidante ou não. Porém, o resultado negativo dos extratos pode estar vinculado com o uso da concentração testada e/ou com a forte intensidade de pigmentação nos extratos¹².

Foi verificada atividade antioxidante nos três tipos de extratos da semente. Nos extratos das raízes, somente o extrato metanólico aparentou ser ativo²³. Nos extratos do caule, somente os extratos em hexano e metanol apresentaram atividade²³. Nos extratos das folhas, apenas o extrato em metanol mostrou-se ter atividade²⁴.

Em relação aos extratos da polpa, todos obtiveram resultados positivos²⁵, porém, cabe ressaltar que os extratos citados se mostraram ativos, porém com baixa atividade. Entretanto, criou-se o critério de seleção dos extratos ativos por meio dos resultados obtidos e também pela comparação com os padrões, e a partir disso, selecionou-se para a segunda etapa somente o extrato em acetato de etila da semente (EAS), devido à atividade antioxidante expressiva e interessante quando comparada com os padrões, conforme mostrado na figura 1.

	Semente	Raiz	Caule	Folha	Polpa	Controles
Extratos Hexânicos	EHS	EHR	EHC	EHF	EHP	Branco
Extratos em Acetato de etila	EAS	EAR	EAC	EAF	EAP	Padrão 1 Ácido Ascórbico
Extratos Metanólicos	EMS	EMR	EMC	EMF	EMP	Padrão 2 Quercetina

FIGURA 1 - Cromatograma com os extratos e controles revelado com solução de DPPH•

A placa cromatográfica de sílica gel 60 de fase normal apresentou melhor separação das substâncias do extrato em acetato de etila da semente. No total foram testados dez sistemas cromatográficos diferentes. Como o extrato é de média polaridade, foi iniciado com solventes que também apresentam a polaridade citada. Não foram testados sistemas menos polares porque todas as substâncias permaneciam retidas à parte inferior da placa. Observou-se que o sistema utilizado na separação dos componentes do

extrato foi clorofórmio: metanol (8:2) mais uma gota de ácido fórmico.

O cromatograma em acetato de etila da semente revelada com FeCl₃ não indicou o aparecimento de substâncias fenólicas, devido a este revelar o aparecimento de manchas marrons sob fundo de coloração laranja, demonstrando que essas características não foram observadas na placa.

O cromatograma do acetato de etila da semente não revelou substâncias fluorescentes alaranjados

quando reveladas com NP-PEG no UV (365 nm), como observadas no padrão (quercetina). Esse comportamento é próprio dos flavonoides, e comprova que o extrato não apresentou resultado positivo para flavonoides.

As substâncias fenólicas são responsáveis, na maioria das vezes, pela atividade antioxidante, e assim, a atividade antioxidante frente ao radical DPPH• do extrato em acetato de etila da semente, deve-se aos compostos de natureza não fenólica, o que pode estar relacionado com a presença de outra classe de metabólito secundário²⁸. A atividade antioxidante da semente de *M. citrifolia* está relacionada à substância isolada Americanina A, pertencente à classe de lignanas.

Discussões

Há vários métodos e técnicas analíticas para identificação de substâncias, os quais são escolhidos avaliando desde os fatores referentes à substância (propriedades químicas, físicas e biológicas) como também do método (disponibilidade, simplicidade, viabilidade financeira)²².

Em relação à capacidade antioxidante encontrada nos extratos metanólicos das raízes e das folhas e todos os extratos da polpa apresentaram atividade, corroborando com a literatura citada^{23, 24, 25}.

Em ensaio quantitativo da avaliação antioxidante foi possível verificar através do sequestro do radical livre DPPH• por leitura de absorbância produzida pelo espectrofotômetro, que a fração acetato de etila do extrato etanólico da semente de *M. citrifolia*, apresentou maior atividade antioxidante (IC₅₀ de 48,15 mg/L) ao contrário das demais partes como folha e polpa, que apresentaram baixa atividade quando comparadas com o controle⁶.

O método TLC-DPPH permitiu verificar que as substâncias presentes no extrato em aceto de etila da semente apresentaram atividade antioxidante, já que

Declaração de conflitos de interesses

Os autores do artigo afirmam que não houve nenhuma situação de conflito de interesse, tais como propostas de financiamento, emissão de pareceres, promoções ou participação em comitês consultivos ou diretivos, entre outras, que pudessem influenciar no desenvolvimento do trabalho.

uma mancha amarela, indicativa de inibição oxidativa formou-se na região do cromatograma no qual se encontra a substância responsável pela mesma²², enquanto que nas demais partes do cromatograma, demonstrou-se a não existência de substâncias antioxidantes, devido à coloração permanecerem roxo²⁸.

A atividade antioxidante do extrato etanólico das sementes de *M. citrifolia* destacou essa parte da planta com maior atividade de sequestrar os radicais livres, com o valor de IC₅₀ 12 mg/L²⁹.

Conclusão

O presente trabalho demonstrou que todos os órgãos da espécie *M. citrifolia* estudados apresentaram potencial quanto à atividade antioxidante porém, a semente destacou-se como a parte que melhor apresentou atividade.

O perfil cromatográfico por TLC-DPPH• do extrato em acetato de etila da semente demonstrou que a substância com R_f 0,7 foi a única que apresentou atividade antioxidante, evidenciando que, futuros trabalhos possam utilizar o procedimento na purificação e isolamento da substância identificada e assim testá-la quantitativamente em comparação com os antioxidantes sintéticos existentes. A técnica TLC-DPPH• mostrou-se ser o procedimento analítico rápido, simples, de baixo custo, com boa reprodutibilidade dos resultados e auxiliou preliminarmente na separação de diferentes extratos e na identificação de substâncias bioativas.

Por meio da pesquisa deste trabalho foi possível enriquecer a literatura na descoberta de dados sobre a atividade antioxidante dos órgãos, uma vez que esta é carente de informações relevantes sobre demais órgãos (semente, raiz, caule e folha), exceto o fruto.

Referências

- 1-PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Química Nova*, v. 25, supl. 1, p. 45-61, 2009.
- 2-BRANDÃO, H. N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. *Química Nova*, v. 33, n. 6, p. 1-13, 2010.
- 3-SASLIS-LAGOUDAKIS H. C. et al. The use of phylogeny to interpret cross-cultural patterns in plant use and guide medicinal plant discovery: An Example from *Pterocarpus* (Leguminosae). *Plos One*, v. 6, n. 7, p. 1359-1369, 2011.
- 4-PROENÇA DA CUNHA, A. *Farmacognosia e fitoquímica*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2005, p. 670.

- 5-AHMED, H. H. et al. Updates in the pathophysiological mechanisms of Parkinson's disease: Emerging role of bone marrow mesenchymal stem cells. **World Journal of Stem Cells**, v. 8, n. 3, p. 106-117, 2016.
- 6-BABA, S. A. et al. Phytochemical analysis and antioxidant activity of different tissue types of *Crocus sativus* and oxidative stress alleviating potential of saffron extract in plants, bacteria, and yeast. **Food Science and Technology**, v. 90, p. 80-87, 2015.
- 7-TAGHVAEI, M. et al. The effect of natural antioxidants extracted from plant and animal resources on the oxidative stability of soybean oil. **Food Science and Technology**, v. 56, p. 124-130, 2014.
- 8-CIMPOIU, C.; HOSUET, A. Thin layer chromatography for the analysis of vitamins and their derivatives. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 30, n.5-7, p. 701-728, 2007.
- 9-HAWRYŁ, M. A. et al. Thin-layer chromatography and chemometric analysis in the fingerprinting of selected *Scutellaria* species. **Journal of Planar Chromatography**, v. 29, n.4, p. 256-263, 2016.
- 10-STEGALL, S. L. et al. Separation of transition and heavy metals using stationary phase gradients and thin layer chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1446, p. 141-148, 2016.
- 11-HARIPRASATH, L. et al. In vitro propagation of *Senecio candicans* DC and comparative antioxidant properties of aqueous extracts of the in vivo plant and in vitro-derived callus. **Rev. Brasileira de plantas medicinais**, v. 17, n. 1, p. 134-141, 2015.
- 12- HARIPRASATH, L. et al. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH: estudo de revisão. **South African Journal of Botany**, v. 98, p. 36-44, 2015.
- 13-MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 127-130, 2001.
- 14-WANG, J. et al. Two new anthraquinones with antiviral activities from the barks of *Morinda citrifolia* (Noni). **Phytochemistry Letters**, v. 15, p. 13-15, 2016.
- 15-RIBEIRO, I. A. T. A. et al. **Biodiversity and antimicrobial activity from endophytic fungi isolate from *Morinda citrifolia***. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Orgs.). *Microbes in the spotlight: recent progress in the understanding of beneficial and harmful microorganisms*, USA: Brown Walker Press, 2016, p. 255-259.
- 16- SRINIVASAHAN, V.; DURAIRAJ, B. In vitro cytotoxic and apoptotic activity of polysaccharide rich *Morinda citrifolia* fruit on MCF-7 cells. **Asian Journal of Pharmaceutical Clinical Research**, v. 8, n. 2, p. 190-193, 2015.
- 17- DUSSOSSOY, E. et al. Pulmonary anti-inflammatory effects and spasmolytic properties of Costa Rican noni juice (*Morinda citrifolia* L.). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 192, p. 264-272, 2016.
- 18-SILVA, C. L. R. et al. Caracterização do fruto de *Morinda citrifolia* L. (noni). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 17, n. 1, p. 93-100, 2012.
- 19-ALMEIDA-SOUZA, F. et al. Leishmanicidal, imunomodulatory and reparative skin activity from *Morinda citrifolia* (Noni). **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 8, p. 1-17, 2016.
- 20-CORREIA, A. A. S. et al. Caracterização química e físico-química da polpa do noni (*Morinda citrifolia*) cultivado no estado do Ceará. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 22, n. 4, p. 609-615, 2011.
- 21-AGATONOVIC-KUSTRIN, S.; MORTON, D. W. YUSOF, A. P. Thin-layer chromatography - bioassay as powerful tool for rapid identification of bioactive components in botanical extracts. **Modern Chemistry & Applications**, v. 3, n. 1, p. 1-2, 2015.
- 22-PATNIBUL, S. et al. Screening for antioxidant activity in eighteen local northeastern vegetables using silica gel thin-layer chromatography followed by spraying with DPPH. **NU Science Journal**, v.5 n.1, p.1 - 6, 2008.
- 23-KRISHNAIAH, D. et al. Antioxidant activity and total phenolic content of an isolated *Morinda citrifolia* L. methanolic extract from poly-ethersulphone (PES) membrane separator. **Journal of King Saud University - Engineering Sciences**, v.27 n.1, p.63 - 67, 2015.
- 24-SERAFINI, M. R. et al. Anti-inflammatory property and redox profile of the leaves extract from *Morinda citrifolia* L. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.9 n.24, p. 693-701, 2015.
- 25-KISHORE-KUMAR, S. N. et al. Bioactive compounds, radical scavenging, antioxidant properties and FTIR spectroscopy study of *Morinda citrifolia* fruit extracts. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v.3, n.2, p. 28-42, 2014.
- 26-SAMPAIO, C.G. **Estudo químico bioguiado das sementes de *Morinda citrifolia* Linn. (NONI) e suas aplicações**. Dissertação de Mestrado em Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.
- 27-TUKUN, A. V. et al. Antioxidant capacity and total phenolic contents in hydrophilic extracts of selected Bangladeshi medicinal plants. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, Supl. 1, p. 568-S573, 2014.
- 28- NICKAVARA, B., ADELIA, A., NICKAVARB, A. TLC-Bioautography and GC-MS analyses for detection and identification of antioxidant constituents of *Trachyspermum coticum* essential oil. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n.1, p. 127-133, 2014.
- 29- MASUDA, M. et al. Inhibitory effects of constituents of *Morinda citrifolia* seeds on elastase and tyrosinase. **Journal Natural of Medicine**, v. 63, n.3, p. 267-273, 2009.