

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Philippe Dias de Ávila Lima

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS
ETANÓLICOS DE PLANTAS DO CERRADO: *Ageratum fastigiatum* (GARDN.) R. M.
KING et H. ROB., *Croton antisiphiliticus* MART., *Kielmeyera rubriflora* CAMB.,
Miconia ferruginata DC., E *Norantea adamantium* CAMB.**

Diamantina

2016

Philippe Dias de Ávila Lima

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS
ETANÓLICOS DE PLANTAS DO CERRADO: *Ageratum fastigiatum* (GARDN.) R. M.
KING et H. ROB., *Croton antisiphiliticus* MART., *Kielmeyera rubriflora* CAMB.,
Miconia ferruginata DC., E *Norantea adamantium* CAMB.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas *Stricto Sensu* da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM, como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Rodrigues

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Rubia Regina Gonçalves Sivieri

Diamantina

2016

Ficha Catalográfica - Sistema de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecária: Jullyele Hubner Costa CRB-6/2972

L732a
2016 Lima, Philipe Dias de Ávila.
Avaliação da capacidade antioxidante dos extratos etanólicos de plantas do cerrado: *Ageratum fastigiatum* (gardn.) R. M. KING et H. ROB., *Croton antisiphiliticus* MART., *Kielmeyera rubriflora* CAMB., *Miconia ferruginata* DC., E *Norantea adamantium* CAMB / Philipe Dias de Ávila Lima. – Diamantina, 2016.
111 p. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Rodrigues
Coorientadora: Profa. Dra. Rubia Regina Gonçalves Sivieri

Dissertação (mestrado) –Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2016.

1. Fenólicos totais. 2. Poder redutor. 3. Atividade antioxidante. I. Rodrigues, Ana Paula. II. Sivieri, Rubia Regina Gonçalves. III. Título.

CDD 615.321

Elaborada com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

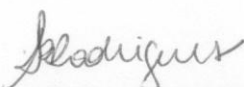
PHILIFE DIAS DE AVILA LIMA

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS
ETANÓLICOS DE PLANTAS DO CERRADO: *Ageratum fastigiatum*
(GARDN.) R. M. KING et H. ROB., *Croton antisiphiliticus* MART.,
Kielmeyera rubriflora CAMB., *Miconia ferruginata* DC., E
Norantea adamantium CAMB.**

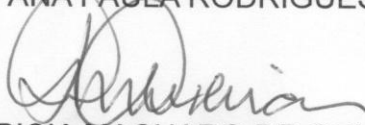
Dissertação apresentada ao
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS,
nível de MESTRADO como parte dos
requisitos para obtenção do título de
MESTRE

Data da aprovação : 20/07/2016

Orientador : Prof.^a Dr.^a Ana Paula
Rodrigues



Prof.^a Dr.^a ANA PAULA RODRIGUES – UFVJM



Prof.^a Dr.^a PATRICIA MACHADO DE OLIVEIRA – UFVJM



Prof.^a Dr.^a CRISTIANE FERNANDA FUZER GRAEL - UFVJM

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todas as pessoas que me incentivaram, me motivaram e colaboraram direta ou indiretamente para o meu sucesso.

AGRADECIMENTOS

Grandes sonhos demandam grandes batalhas, e este não foi diferente. Cheguei ao final dessa longa jornada graças a um exército de pessoas que me ajudaram e me proporcionaram as melhores condições emocionais, sociais e intelectuais para que o objetivo fosse alcançado com êxito. Declaro os meus sinceros agradecimentos:

Primeiramente a Deus por prover toda a base espiritual e a fé que me impulsionaram para seguir sempre em busca dos objetivos.

Aos meus pais Gilberto Lima e Raquel Lima que nunca mediram esforços para que meu objetivo fosse alcançado. A todas àquelas horas aguentando o meu estresse dentro de casa, a todas as vezes que precisei de auxílio familiar e maternal.

Aos meus irmãos Pablo Lima e Andrey Lima pelos diversos momentos de descontração, sem eles não haveria o equilíbrio emocional necessário para seguir minha caminhada.

A minha namorada Mayara pelo amor, carinho e companheirismo. Por sempre acreditar que eu seria capaz de realizar os meus objetivos e pelos incentivos nos momentos de cansaço.

Ao meu Tio Cláudio, por todos os momentos de apoio e colaborações, pelas inúmeras vezes que pude contar com a sua ajuda na realização dos experimentos.

Aos amigos do Laboratório de Hematologia e Imunologia Clínica, em especial o Ricardo e a Patrícia pelas devidas colaborações.

À minha Orientadora Prof^ª. Dr^ª. Ana Paula Rodrigues pela amizade, pelas conversas, conselhos e ensinamentos que foram fundamentais para concretizar a minha formação.

À minha Co-orientadora Prof^ª. Dr^ª. Rubia Regina Gonçalves Sivieri pela ajuda intensa, discussões de artigos e metodologias, pelo empenho e atenção para que o trabalho fosse concretizado com êxito.

Aos amigos do CIPQ-Saúde e dos laboratórios de Parasitologia e Imunologia, em especial aos amigos Lucas, Josué, Vinícius e Letícia pelas devidas colaborações.

À toda turma de Pós-graduação 2014-2 do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Ao Prof. Dr Luiz Elídio Gregório pela colaboração e doação de todo material vegetal necessário aos experimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e a todo o Departamento de Farmácia - UFVJM

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, que foram fundamentais para o crescimento e aprendizado durante toda a jornada.

Aos técnicos e demais funcionários da UFVJM que frequentaram a Farmácia Análises Clínicas, pelas conversas, ensinamentos e pela amizade conquistada.

Aos programas CAPES e FAPEMIG pelas devidas colaborações e apoio financeiro necessário para a realização deste trabalho

“Sabemos como é a vida: num dia dá tudo certo e no outro as coisas já não são tão perfeitas assim. Altos e baixos fazem parte da construção do nosso caráter. Afinal, cada momento, cada situação, que enfrentamos em nossas trajetórias é um desafio, uma oportunidade única de aprender, de se tornar uma pessoa melhor. Só depende de nós, das nossas escolhas... Não sei se estou perto ou longe demais, se peguei o rumo certo ou errado. Sei apenas que sigo em frente, vivendo dias iguais de forma diferente. Já não caminho mais sozinho, levo comigo cada recordação, cada vivência, cada lição. E, mesmo que tudo não ande da forma que eu gostaria, saber que já não sou o mesmo de ontem me faz perceber que valeu a pena. Procure ser uma pessoa de valor, em vez de procurar ser uma pessoa de sucesso. O sucesso é só consequência”

Albert Einstein

RESUMO

Nos últimos anos, um número crescente de pesquisas tem demonstrado o papel chave das espécies reativas (ERs) na aceleração do processo de envelhecimento e agravamento de doenças inflamatórias e crônico-degenerativas. Tais espécies, altamente reativas, podem oxidar várias biomoléculas e provocar graves lesões no organismo. O efeito das ERs é equilibrado no organismo por ação de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, sendo estes últimos, representados em sua maioria pelos compostos fenólicos, sendo os flavonóides os principais representantes. Os flavonóides podem ser consumidos na dieta diária através de vários alimentos como frutas, legumes, vinhos etc., porém, o principal alvo para busca de tais compostos são as plantas medicinais que são constantemente utilizadas pela população. Tendo em vista a importância de desenvolvimento e busca de novos compostos antioxidantes naturais, o presente estudo teve como principal objetivo avaliar a atividade antioxidante dos extratos etanólicos de algumas espécies vegetais que vêm sendo utilizadas na medicina popular, dentre outras finalidades, como antiinflamatórias, cicatrizantes e outros usos relacionados a atividade antioxidante. As espécies vegetais utilizadas foram: *Ageratum fastigiatum* (GARDN.) R. M. KING et H. ROB., *Croton antisiphiliticus* MART., *Kielmeyera rubriflora* CAMB., *Miconia ferruginata* DC., e *Norantea adamantium* CAMB., coletadas no município de Diamantina – MG e regiões subjacentes, áreas de predominância do bioma Cerrado. Avaliando a atividade antioxidante e teor de fenólicos totais (FT) nos extratos, pode-se observar que todos os extratos, exceto da *A. fastigiatum* (partes aéreas) apresentaram altos teores de compostos fenólicos, determinado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (FC) e eficiente poder redutor (PR), com destaque para a *N. adamantium* (partes aéreas), que apresentou o maior teor de FT (684,59 mg EAG/g extrato) e o menor valor para o PR ($EC_{50} = 66,77 \mu\text{g/mL}$). Quanto à captura das espécies radicalares DPPH[•] e ABTS^{•+}, os extratos seguiram uma correlação positiva, determinada pelo coeficiente de Pearson, ou seja, os extratos com maiores teores de FT também apresentaram as melhores atividades de captura das espécies radicalares com destaque para a *N. adamantium* (partes aéreas) e *C. antisiphiliticus* (caule) que apresentaram resultados de EC_{50} estatisticamente semelhantes ao padrão ácido gálico (AG) para a captura de ambas as espécies radicalares utilizadas. Para a captura dos reagentes HOCl e H₂O₂ todos os extratos foram eficientes, porém apresentaram melhores resultados apenas em altas concentrações (>100µg/mL), sendo necessário um estudo de citotoxicidade para avaliar se tais concentrações não são tóxicas às células humanas. Por fim, foi realizada uma avaliação de interferência dos extratos no *burst*

oxidativo produzidos por neutrófilos humanos isolados ativados com PMA e todos os extratos apresentaram atividade protetora frente às espécies produzidas pelo *burst* oxidativo com destaque para *C. antisiphiliticus* (caule) e *A. fastigiatum* (partes aéreas) que apresentaram menores valores de EC₅₀, igual a 8,51 e 5,74 µg/mL respectivamente.

Palavras-chave: DPPH; ABTS; Fenólicos Totais; Poder Redutor; Atividade antioxidante

ABSTRACT

An increasing number of studies have been lately demonstrating the key role of the reactive species (RS) in accelerating aging and worsening inflammatory and chronic-degenerative diseases. These species, highly reactive, are able to oxidize several biomolecules and cause severe injuries to the organism. The effect of the RS is balanced by the enzymatic and non-enzymatic antioxidants, the latter being represented mostly by phenolic compounds and flavonoids key players which can be daily consumed in fruits, vegetables, wine etc. However, the main samples to search for these compounds are the medicinal plants extensively used by the population. Considering the importance of the development and screening of new natural antioxidant compounds, the present study aimed to evaluate the antioxidant activity of the ethanolic extracts of some species of plants that have been used in the popular medicine for its anti-inflammatory, healing and other uses related to antioxidant activity, among other features. The plants were: *Ageratum fastigiatum* (GARDN.); R. M. KING and H. ROB., *Croton antisyphiliticus* MART., *Kielmeyera rubriflora* CAMB., *Miconia ferruginata* DC., and *Norantea adamantium* CAMB., collected at the municipality of Diamantina - MG and surroundings, where the biome Cerrado is predominant. The analysis of the antioxidant activity and the total phenolic content (TP) of the extracts showed that, except for the *A. fastigiatum* (aerial parts), all of the others presented high contents of phenolic compounds through the colorimetric assay of Folin-Ciocalteu (FC) and the effectiveness of the reductive power (RP). Highlights here to *N. adamantium* (aerial parts) extract which demonstrated the highest content of TP (684,59 mg EAG/g extract) and the lowest value of RP ($EC_{50} = 66,77 \mu\text{g/mL}$). Regarding the capture of the following free radicals, DPPH[•] and ABTS^{•+}, the extracts demonstrated a positive correlation, determined by the Pearson factor, which means that the extracts with the highest contents of TP also displayed better capture activities of those free radicals. It is important to emphasize *N. adamantium* (aerial parts) and *C. antisyphiliticus* (stem), once they presented statistically similar EC_{50} to the garlic acid (GA) for the capture of both of the free radicals used. For the capture of HOCl and H₂O₂, all the extracts showed to be efficient, nevertheless they presented better results only in high concentrations (>100 $\mu\text{g/mL}$). Therefore it is relevant to perform a cytotoxicity assay on human cells. At last, the interference of the extracts was evaluated on the oxidative burst produced by human neutrophils isolated and activated with PMA and all of them showed to be protective against the free radicals produced in the assay, in which *C. antisyphiliticus* (stem) and *A. fastigiatum* (aerial parts) stand out for the lowest EC_{50} , 8,51 and 5,74 $\mu\text{g/mL}$ respectively.

Key-words: DPPH; ABTS; Total Phenolics; Reductive Power; Antioxidant Activity

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – <i>Ageratum fastigiatum</i> (GARDN.) R. M. KING et H. ROB..... | 21 |
| Figura 2 – <i>Croton antisiphiliticus</i> MART..... | 21 |
| Figura 3 – <i>Kielmeyera rubriflora</i> CAMB..... | 22 |
| Figura 4 – <i>Miconia ferruginata</i> DC..... | 22 |
| Figura 5 – <i>Norantea adamantium</i> CAMB..... | 22 |
| Figura 6 – Estrutura química de alguns compostos fenólicos e a estrutura básica dos flavonoides (representada com os Anéis aromáticos A,B e C)..... | 27 |
| Figura 7 – Mecanismo de atividade antioxidante dos flavonoides..... | 29 |
| Figura 8 – Redução tetravalente do O ₂ na mitocôndria até a formação de H ₂ O. Várias EROs são formadas durante o processo..... | 29 |
| Figura 9 – Fagocitose e produção de EROs em neutrófilos..... | 31 |
| Figura 10 – Representação esquemática da produção de HOCL durante o <i>burst</i> oxidativo...33 | |
| Figura 11 - Reação do DPPH com um composto antioxidante..... | 35 |
| Figura 12 – Estabilização do radical ABTS ^{•+} por um antioxidante e sua formação pelo Persulfato de Potássio..... | 36 |
| Figura 13 - Armazenamento dos extratos secos..... | 44 |
| Figura 14 - Extratos diluídos, armazenamento em geladeira..... | 45 |
| Figura 15 - Estruturas moleculares do DTNB e do TNB (Velloso, 2005)..... | 50 |
| Figura 16 - Ensaio de citotoxicidade com o Azul de Trypan..... | 52 |

LISTA DE TABELA

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Resumo das principais características das espécies vegetais utilizadas no presente estudo..... | 26 |
| Tabela 2 – Patologias relacionadas ao estresse oxidativo..... | 34 |
| Tabela 3 – Comparação dos resultados de todos os experimentos realizados para análise da atividade antioxidante..... | 74 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|--|-----|
| Gráfico 1 – Curva de calibração do padrão AG..... | 55 |
| Gráfico 2 – Teor de Fenólicos Totais (FT) expresso em mg EAG/g de Extrato (n=3)..... | 56 |
| Gráfico 3 – Poder Redutor, expresso em EC ₅₀ (µg/mL)..... | 58 |
| Gráfico 4 – Atividade antioxidante - Captura do radical DPPH [•] | 59 |
| Gráfico 5 – Atividade antioxidante - Captura do radical catiônico ABTS ^{•+} | 61 |
| Gráfico 6 – Atividade antioxidante - Captura do H ₂ O ₂ analisando apenas a concentração de 1000 µg/mL..... | 62 |
| Gráfico 7 (A – F) – Atividade antioxidante - Captura do HOCl, método de oxidação do TNB..... | 64 |
| Gráfico 8 – Atividade antioxidante - Captura de HOCl nas concentrações de 250, 500 e 1000 µg/mL..... | 65 |
| Gráfico 9 - Inibição do <i>burst</i> oxidativo em neutrófilos humanos isolados estimulados (PMA)..... | 67 |
| Gráfico 10 (A,B) – Correlação entre os teores de FT e os valores de atividade de captura do radical DPPH [•] (EC ₅₀)..... | 70 |
| Gráfico 11 (A,B) – Correlação entre os teores de FT e os valores de atividade de captura do radical ABTS ^{•+} (EC ₅₀)..... | 72 |
| Gráfico 12 – Poder redutor dos extratos e do padrão AG. Absorbância obtida em 700 nm versus a concentração em µg/mL..... | 94 |
| Gráfico 13 (A-C) – Poder redutor dos extratos apresentados como porcentagem de redução em relação ao padrão AG versus concentração (µg/mL)..... | 95 |
| Gráfico 14 (A-F) – Atividade antioxidante - captura do radical DPPH [•] | 96 |
| Gráfico 15 – Atividade de captura do radical DPPH [•] - resultado do padrão e de todos os extratos agrupados; Porcentagem de inibição versus concentração (µg/mL)..... | 97 |
| Gráfico 16 (A-F) – Atividade antioxidante - captura do radical ABTS ^{•+} | 98 |
| Gráfico 17 – Captura do radical ABTS ^{•+} - resultado do padrão AG e de todos os extratos agrupados. Porcentagem de inibição versus concentração (µg/mL)..... | 99 |
| Gráfico 18 (A-F) – Captura do H ₂ O ₂ . Porcentagem de Inibição x Concentração (µg/mL)..... | 100 |

Gráfico 19 (A-F) – Interferência dos extratos no *burst* oxidativo de neutrófilos estimulados (PMA).....101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--|--|
| ABTS ^{•+} | radical 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico |
| AG | Ácido gálico |
| AUC | Área sobre a curva |
| BHA | butil-hidroxi-anisol |
| BHT | butil-hidroxi-tolueno |
| BM | Banho Maria |
| C ₆ FeN ₆ K ₃ | Ferricianeto de Potássio |
| CEP | Comitê de Ética em Pesquisa |
| Cl ₃ COOH | Ácido Tricloroacético |
| CNPq | Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DPPH [•] | radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila |
| DPPH-H | 2,2-difenilpicril-hidrazina |
| DTNB | ácido 5-5'- ditio(2-nitrobenzóico) |
| EAG | Equivalentes de ácido gálico |
| EC ₅₀ | Concentração eficiente para captura de 50% da espécie reagente |
| ERs | Espécies reativas |
| ERNs | Espécies Reativas de Nitrogênio |
| EROs | Espécies Reativas de Oxigênio |
| FC | Folin-Ciocalteu |
| FeCl ₃ | Cloreto Férrico |
| FT | Fenólicos Totais |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de Hidrogênio |
| H ₂ SO ₄ | Ácido sulfúrico |
| HO [•] | Radical hidroxil |
| HO ₂ [•] | Radical hidroperoxila |
| HOCl | Ácido Hipocloroso |
| IC ₅₀ | Concentração Inibitória a 50% |
| K ₂ HPO ₄ | Fosfato de Potássio dibásico |

| | |
|-------------------|--|
| $K_2S_2O_8$ | Persulfato de Potássio |
| KH_2PO_4 | Fosfato de Potássio monobásico |
| LPMN | Leucócitos Polimorfonucleares Neutrófilos |
| M | Molaridade = mol/L |
| mM | mmol/L |
| MPO | Mieloperoxidase |
| Na_2CO_3 | Carbonato de Sódio |
| $NaBH_4$ | Borohidreto de Sódio |
| $NaCl$ | Cloreto de Sódio |
| $NaOCl$ | Hipoclorito de Sódio |
| NH_4Cl | Cloreto de amônio |
| O_2 | Oxigênio molecular |
| $O_2^{\bullet -}$ | Radical ânion superóxido |
| $ONOO^-$ | Peroxinitrito |
| PBS | Solução Tampão Salina Fosfato |
| PMA | Acetato de forbol miristato |
| PS | Poliestireno |
| Qlum | Quimioluminescência |
| SISBIO | Sistema de Autorização e Informação em Sistema de Biodiversidade |
| SOD | Superóxido dismutase |
| TNB | ácido 5-tio-2-nitrobenzóico |
| TROLOX | 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2- ácido carboxílico |
| UFVJM | Universidade Federal dos Vales Jequitinhonha e Mucuri |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 18 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA | 20 |
| 2.1 O Cerrado Brasileiro..... | 20 |
| 2.2 Espécies vegetais empregadas neste estudo..... | 21 |
| 2.3 Os compostos fenólicos e os flavonoides..... | 27 |
| 2.4 As Espécies Reativas (ERs) e sua formação no organismo..... | 29 |
| 2.4.1 Principais EROs geradas no organismo..... | 31 |
| 2.4.1.1 Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂)..... | 31 |
| 2.4.1.2 Ácido Hipocloroso (HOCl)..... | 32 |
| 2.5 Patologias relacionadas com Espécies Reativas (ERs)..... | 33 |
| 2.6 Metodologias aplicadas na avaliação antioxidante..... | 35 |
| 2.6.1 Ensaio de captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH [*])..... | 35 |
| 2.6.2 Ensaio de captura do radical 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS ^{*+})..... | 36 |
| 2.6.3 Outros ensaios de avaliação de capacidade antioxidante..... | 36 |
| 3 OBJETIVOS | 38 |
| 3.1 Objetivo geral..... | 38 |
| 3.2 Objetivos específicos..... | 38 |
| 4 METODOLOGIA | 39 |
| 4.1 Equipamentos e reagentes..... | 39 |
| 4.2 Preparo de reagentes e soluções..... | 40 |
| 4.3 Protocolo experimental..... | 42 |
| 4.3.1 Obtenção do material vegetal | 42 |
| 4.3.1.1 <i>Ageratum fastigiatum</i> | 42 |
| 4.3.1.2 <i>Croton antispyhiliticus</i> | 42 |
| 4.3.1.3 <i>Kielmeyera rubriflora</i> | 43 |
| 4.3.1.4 <i>Miconia ferruginata</i> | 43 |
| 4.3.1.5 <i>Norantea adamantium</i> | 43 |
| 4.3.2 Preparo dos extratos vegetais..... | 44 |

| | |
|---|-----------|
| 4.3.3 Ensaio para de terminação de Fenólicos Totais (FT)..... | 45 |
| 4.3.4 Ensaio para de terminação do Poder Redutor (PR)..... | 47 |
| 4.3.5 Ensaio de captura do radical DPPH [•] | 47 |
| 4.3.6 Ensaio de captura do radical ABTS ^{•+} | 48 |
| 4.3.7 Ensaio de captura do HOCl..... | 48 |
| 4.3.8 Ensaio de captura do H ₂ O ₂ | 49 |
| 4.3.9 Obtenção de neutrófilos..... | 50 |
| 4.3.9.1 Coleta do sangue venoso..... | 50 |
| 4.3.9.2 Isolamento dos neutrófilos..... | 51 |
| 4.3.9.3 Contagem em câmara de Neubauer..... | 52 |
| 4.3.9.4 Determinação da viabilidade celular através do método do Azul de Trypan..... | 52 |
| 4.3.10 Avaliação do <i>burst</i> oxidativo em neutrófilos estimulados..... | 53 |
| 4.3.11 Análise estatística..... | 54 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 55 |
| 5.1 Ensaio para determinação de Fenólicos Totais..... | 55 |
| 5.2 Ensaio para determinação do Poder Redutor..... | 57 |
| 5.3 Ensaio de captura do radical DPPH [•] | 59 |
| 5.4 Ensaio de captura do radical ABTS ^{•+} | 60 |
| 5.5 Ensaio de captura do H ₂ O ₂ | 62 |
| 5.6 Ensaio de captura do HOCl..... | 63 |
| 5.7 Avaliação do <i>burst</i> oxidativo em neutrófilos humanos estimulados..... | 66 |
| 5.8 Correlações entre os teores de FT e as atividades de captura dos radicais ABTS ^{•+} e DPPH [•] | 69 |
| 5.8.1 Correlação entre FT (mg EAG/g extrato) e a atividade de captura do radical DPPH [•] (EC ₅₀ µg/mL)..... | 69 |
| 5.8.2 Correlação entre FT (mg EAG/g extrato) e a atividade de captura do radical ABTS ^{•+} (EC ₅₀ µg/mL)..... | 71 |
| 6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS..... | 74 |
| REFERÊNCIAS..... | 77 |

| | |
|---|------------|
| APÊNDICE A – PREPARO DE REAGENTES E SOLUÇÕES..... | 91 |
| APÊNDICE B – PODER REDUTOR DOS EXTRATOS E DO PADRÃO AG..... | 94 |
| APÊNDICE C – PODER REDUTOR DOS EXTRATOS..... | 95 |
| APÊNDICE D – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE – CAPTURA DO RADICAL DPPH’..... | 96 |
| APÊNDICE E – ATIVIDADE CAPTURA RADICAL DPPH’ - RESULTADO DOS EXTRATOS E PADRÃO..... | 97 |
| APÊNDICE F – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE – CAPTURA DO RADICAL ABTS^{•+}..... | 98 |
| APÊNDICE G – CAPTURA DO RADICAL ABTS^{•+} – RESULTADO DO PADRÃO E DOS EXTRATOS..... | 99 |
| APÊNDICE H – CAPTURA DO H₂O₂..... | 100 |
| APÊNDICE I – INTERFERÊNCIA DOS EXTRATOS NO <i>BURST</i> OXIDATIVO DOS NEUTRÓFILOS ESTIMULADOS..... | 101 |
| ANEXO A – DECLARAÇÃO DE DEPÓSITOS DE EXSICATAS NO HERBÁRIO DIAM..... | 103 |
| ANEXO B – AUTORIZAÇÃO DO CNPQ PARA COLETA DE PLANTAS..... | 105 |
| ANEXO C – COMPROVANTE DE REGISTRO PARA COLETA DE MATERIAL VEGETAL..... | 107 |
| ANEXO D – AUTORIZAÇÃO PARA COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO (CEP)..... | 108 |

1. INTRODUÇÃO

Inúmeros estudos e evidências têm demonstrado o papel chave das espécies radicalares e outros compostos oxidantes, como as espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), no processo de aceleração do envelhecimento e no desenvolvimento e agravamento de doenças crônico-degenerativas relacionadas ao envelhecimento, como por exemplo, câncer, aterosclerose, doenças inflamatórias, mal de Parkinson, mal de Alzheimer e catarata (GONÇALVES, 2008).

Compostos oxidantes são extremamente reativos e podem reagir com as membranas lipídicas das estruturas celulares, levando à oxidação lipídica e gerar intermediários extremamente tóxicos que podem interagir com o DNA, proteínas, enzimas ou outros órgãos alvos levando aos processos de degeneração celular e conseqüentemente ao desenvolvimento das doenças crônico-degenerativas (BARREIROS et al., 2006).

No organismo a produção destes compostos é controlada por agentes antioxidantes endógenos ou exógenos provenientes da alimentação. Os antioxidantes agem como compostos neutralizantes, que inibem a potencialidade das espécies reativas e impedem que os órgãos alvos sejam atingidos. De forma geral, denominam-se antioxidantes as substâncias que presentes em concentrações baixas, comparadas ao substrato oxidável, retardam significativamente ou inibem a oxidação do substrato. Os radicais formados a partir de antioxidantes não são reativos para propagar a reação em cadeia, sendo neutralizados por reação com outro radical, formando produtos estáveis ou podem ser reciclados por outro antioxidante (SOUZA et al., 2007). Compostos fenólicos radicalares podem se auto estabilizarem devidos às suas características estruturais.

A atividade farmacológica de uma planta medicinal pode estar associada ao seu poder antioxidante, pois na inflamação são produzidas várias ERs (reações mediadas pelas enzimas Cicloxigenase (COX), Lipoxigenase (LPX)), o acúmulo de tais espécies pode agravar o processo inflamatório e potencializar os danos teciduais.

Diversos compostos antioxidantes de origem sintética já foram desenvolvidos, entretanto a toxicidade de tais produtos tem limitado o seu uso. Na indústria alimentícia, por exemplo, alguns compostos antioxidantes sintéticos, como butil-hidroxi-anisol (BHA) e butil-hidroxi-tolueno (BHT) são constantemente utilizados, porém alguns estudos *in vivo* demonstraram potenciais efeitos carcinogênicos destas substâncias (RAMALHO e JORGE, 2006).

Tendo em vista a importância de desenvolvimento e busca de novos compostos antioxidantes, que sejam menos tóxicos ao organismo, inúmeras pesquisas têm direcionado o foco para a busca de compostos naturais bioativos. Um importante alvo para a busca de tais compostos são as plantas medicinais que são constantemente utilizadas pela população (RATES, 2001).

Diante da grande biodiversidade brasileira, o bioma Cerrado é uma das principais fontes de obtenção de plantas para a pesquisa de novos compostos bioativos com potencial antioxidante.

Analisando os relatos de uso popular e a carência de estudos científicos relacionados a grande parte de espécies de plantas endêmicas do Cerrado, o presente estudo teve por objetivo avaliar o potencial antioxidante das seguintes espécies vegetais: *Ageratum fastigiatum* (GARDN). (Asteraceae), *Croton antisyphiliticus* MART. (Euphorbiaceae), *Kielmeyera rubriflora* CAMB. (Clusiaceae), *Miconia ferruginata* DC. (Melastomataceae) e *Norantea adamantium* CAMB. (Marcgraviaceae).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O CERRADO BRASILEIRO

O bioma Cerrado merece destaque quanto à sua dimensão e biodiversidade. O Cerrado é o segundo maior bioma da América do Sul, ocupando uma área de 2.036.448 km², cerca de 22% do território nacional. O termo Cerrado é geralmente utilizado para designar um conjunto de ecossistemas (savanas, matas, campos e matas de galeria) que ocorrem no Brasil Central. Essa região apresenta clima estacional, com período de chuvas de outubro a março e período de seca de abril a setembro, a temperatura média ao longo do ano é de 22-27°C, com precipitação média anual de 1.500 mm. Do ponto de vista da diversidade biológica, o Cerrado brasileiro é reconhecido como a savana mais rica do mundo, abrigando 11.627 espécies de plantas nativas já catalogadas, porém, essa alta biodiversidade é muitas vezes menosprezada. (KLINK e MACHADO, 2005; Ministério do Meio Ambiente (MMA), 2014).

O Brasil possui a maior diversidade genética vegetal do mundo e conta com ampla tradição do uso das plantas medicinais, vinculada ao conhecimento popular transmitido entre gerações (FONSECA, 2012). O uso de plantas do Cerrado na medicina popular brasileira é muito difundido, porém, existem poucos estudos que relacionam as plantas medicinais da região do Cerrado brasileiro com suas utilidades terapêuticas. Muitas destas espécies são utilizadas como anti-inflamatórios, entretanto, a maioria ainda não foi objeto de pesquisas científicas. Apesar da riqueza da flora brasileira, nos últimos 20 anos, o número de informações sobre plantas medicinais tem crescido apenas 8% anualmente (FONSECA, 2012).

Dentre as Famílias com maior relevância e abrangência no cerrado as que merecem destaque são: *Asteraceae*, *Euphorbiaceae*, *Clusiaceae*, *Melastomataceae* e *Marcgraviaceae* (VIERA e MARTINS, 2000).

O Cerrado é uma grande fonte na busca de novos fármacos e produtos biologicamente ativos. Frente à grande variedade de espécies e à elevada utilização de plantas na medicina popular, faz-se necessário o estudo mais aprofundado para elucidar e comprovar determinadas potencialidades farmacêuticas de algumas espécies. As plantas objetos do presente estudo apresentam relatos na literatura de usos medicinais relacionados à presença de metabólitos secundários produzidos pelas mesmas como mecanismo de proteção e defesa. A grande maioria destes metabólitos se enquadra na classe de compostos fenólicos (ELITA SCIO, 2004; DEL-VECHIO-VIEIRA et al., 2009 REIS et al., 2013;; LIMA et al., 2013).

2.2 ESPÉCIES VEGETAIS EMPREGADAS NESTE ESTUDO

Todas as plantas utilizadas no presente estudo foram coletadas no município de Diamantina (MG) e região, onde se observa a predominância do bioma Cerrado. Foram coletadas cinco espécies vegetais representantes das seguintes famílias: Asteraceae, Euphorbiaceae, Clusiaceae, Melastomataceae e Marcgraviaceae.

As espécies vegetais coletadas e empregadas no presente estudo foram: *Ageratum fastigiatum* (GARDN.) R. M. KING et H. ROB (Asteraceae) (FIGURA 1); *Croton antisiphiliticus* MART. (Euphorbiaceae) (FIGURA 2); *Kielmeyera rubriflora* CAMB. (Clusiaceae) (FIGURA 3); *Miconia ferruginata* DC (Melastomataceae) (FIGURA 4) e *Norantea adamantium* CAMB. (Marcgraviaceae) (FIGURA 5).

Figura 1. *Ageratum fastigiatum* (GARDN.); R. M. KING et H. ROB.



Fonte: Voucher: Zappi, D.C. 2708 – Brazil MG, disponível em www.kew.org

Figura 2. *Croton antisiphiliticus* MART.



Fonte: www.flickr.com

Figura 3. *Kielmeyera rubriflora* CAMB.



Fonte: www.pirenopolis.tur.br

Figura 4. *Miconia ferruginata* DC.



Fonte: Voucher: Zappi, D.C. 2039 – Brazil, MG disponível em www.kew.org

Figura 5. *Norantea adamantium* CAMB.



Fonte: www.pirenopolis.tur.br

2.2.1 *Ageratum fastigiatum* (GARDN.) R. M. KING et H. ROB. (Asteraceae)

A família Asteraceae possui cerca de 1.000 gêneros e 25.000 espécies cosmopolitas, encontradas em diferentes localidades do planeta. No Brasil, essa família é representada por 300 gêneros e 2.000 espécies sendo que, muitas delas, são usadas popularmente no tratamento de diversas patologias.

Entre os gêneros, destaca-se *Ageratum* que consiste de aproximadamente 30 espécies, entretanto, poucas foram investigadas cientificamente. A *Ageratum fastigiatum* (GARDN., R. M. KING et H. ROB), conhecida popularmente como “matapasto” ou “enxota” é uma das principais espécies da família Asteraceae que possui ampla utilização na medicina popular como cicatrizante, antimicrobiana, analgésica e antiinflamatória (SOUZA e LORENZI, 2005; DEL-VECHIO-VIEIRA, 2009). Na medicina popular são preparados extratos utilizando folhas e ramos (com ou sem inflorescências) frescos esmagados ou rasgados e submetidos a maceração com água por algumas horas. O extrato aquoso, após a filtração, é aplicado topicamente para tratar a dor e inflamações (Gonçalves et al., 2007).

Na família Asteraceae, os principais produtos do metabolismo secundário isolados e identificados são poliacetilenos, sesquiterpenóides, diterpenóides, triterpenóides, flavonóides, cumarinas, benzofuranos e benzopiranos (SOUZA et al.; 2013).

2.2.2 *Croton antisyphiliticus* (MART.) (Euphorbiaceae)

Outra família muito importante e abrangente no cerrado brasileiro é a *Euphorbiaceae*, sendo que o gênero *Croton* é o mais amplo, compreendendo cerca de 1.300 espécies, distribuídas principalmente nas áreas tropicais e subtropicais do planeta.

A espécie utilizada no presente estudo foi a *Croton antisyphiliticus* (MART.) que possui diversos relatos de uso na medicina popular em forma de chás e garrafadas das folhas (extrato hidroalcoólico) e raízes para tratamento de algumas doenças sexualmente transmissíveis e de infecções do sistema reprodutor feminino e masculino. É uma planta arbustiva, encontrada principalmente nos estados brasileiros que contêm vegetações típicas do Cerrado, principalmente no estado de Minas Gerais, onde é conhecida popularmente como: canela– de – perdiz, curraleira, pé – de – perdiz ou alcanforeira (SAINT-HILARIE, 2009).

Estudos abordando a farmacologia de *C. antisyphiliticus* são escassos e limitados às atividades antimicrobiana, citotóxica e anti-inflamatória. Estudo realizado por Reis (2013) mostrou, em camundongos, que extratos de *C. antisyphiliticus* reduziu a inflamação e a

concentração dos mediadores pró- inflamatórios Óxido nítrico (NOx), Teor de Necrose tumoral alfa (TNF- α) e Interleucina-17 (IL-17).

Dentre os principais metabólitos isolados e identificados das espécies do gênero *Croton*, encontram-se os diterpenóides, alcaloides, terpenóides e proantocianidina (Reis et al., 2013).

Diante dos promissores metabolitos encontrados em outras espécies do gênero e devido à intensa utilização na medidina popular, bem como a escassez de estudos relacionados à atividades da *C. antisiphiliticus* essa espécie se tornou excelente alvo de estudo para a pesquisa.

2.2.3 *Kielmeyera rubriflora* (CAMB.) (Clusiaceae)

A família *Clusiaceae* é frequente e abrangente no Cerrado brasileiro, engloba aproximadamente 1000 espécies em trinta gêneros distribuídos na zona pantropical. No Brasil existem dezoito gêneros e aproximadamente 150 espécies, sendo o gênero *Kielmeyera* endêmico da América do Sul. Plantas deste gênero têm sido usadas pela população para o tratamento de diversas doenças como esquistossomose, leishmaniose, malária, infecção por bactérias e fungos, entre outras. (SOBRAL, 2009).

Dentre os principais constituintes químicos presentes nas espécies da família *Clusiaceae*, os compostos fenólicos são um dos mais importantes, garantindo às plantas desta família um potencial uso como anti-inflamatório. De suas partes aéreas foram encontrados taninos, triterpenos, e xantonas (ELITA SCIO, 2004).

Neste trabalho a espécie utilizada foi a *Kielmeyera rubriflora* Camb., conhecida popularmente por Rosa do Campo, Pau Santo, Flor de Santa Rita ou Rosa do Cerrado, que é bastante abrangente, encontrada nos estados de Goiás, Mato Grosso do Sul, São Paulo e é nativa da região do Vale do Jequitinhonha em Minas (MONTEIRO et al., 2006; PIMENTA et al., 2016)

As plantas do gênero *Kielmeyera* têm demonstrado várias utilidades terapêuticas como: antioxidante e antiviral (*K. variabilis*), antiviral (*K. lathrophyton*) anticancerígena e antidepressiva (*K. coriácea* e *K. rubriflora*) (PINHEIRO et al., 2003; COQUEIRO et al., 2013; PIMENTA et al., 2016).

2.2.4 *Miconia ferruginata* (DC.) (Melastomataceae)

A família Melastomataceae possui cerca de 200 gêneros e 5.000 espécies, sendo que um dos maiores gêneros da família é o gênero *Miconia* que conta com aproximadamente 1000 espécies, distribuídas ao longo da América Tropical (OLIVEIRA et al., 2014).

O gênero *Miconia* possui extratos com extraordinária atividade biológica e muitas dessas espécies são utilizadas como plantas medicinais na região do Cerrado brasileiro (Hiraiwa et al. 2007). Segundo Souza et al. (2013), o gênero possui atividades biológicas tripanocida, antimicrobiana, antioxidante, analgésica e anti-inflamatória e em relação às classes de metabólitos destacam-se os flavonóides, triterpenos e taninos.

No Brasil é representada por cerca de 250 espécies. Neste estudo utilizamos a espécie *Miconia ferruginata* (DC.), popularmente conhecida como pixirica-do-campo e babatenão. É uma espécie de porte arbustivo a arbóreo, e pode atingir até 4 metros de altura. É utilizada popularmente em infusão e banhos para tratamento de doenças de pele (SILVA, HIGUCHI e PIFANO, 2007; LIMA et al., 2013).

2.2.5 *Norantea adamantium* (CAMB.) (Marcgraviaceae)

A família Marcgraviaceae possui oito gêneros e cerca de 130 espécies, de distribuição exclusivamente neotropical. Dentre as espécies que são conhecidas, 56-60 estão na Colômbia, o que o torna o país o mais rico em espécies Marcgraviaceae, seguido por Brasil e Venezuela, com 38 e 25 espécies, respectivamente (GIRALDO-CAÑAS, 2011; SOUZA, 2012).

A espécie utilizada no estudo foi a *Norantea adamantium* (CAMB.), uma planta de caráter arbóreo e ocorrência predominantemente em campos e cerrados rupestres de altitude acima de 900 metros. Possui uma copa com ramos longos, seu tronco é de até 30 cm de diâmetro. As folhas são simples, alternadas e espiraladas, com uma coloração verde-acinzentada. As flores são dispostas em inflorescência de até 1,5cm de diâmetro com brácteas pêndulas, transformadas em nectários de cor avermelhada (JUNIOR et al., 2005).

É uma árvore típica de terrenos rochosos. Ganhou seu nome pela crendice popular de que sua ocorrência indica a presença de diamantes. Conhecida popularmente por copinho ou mel-de-arara, devido a um pequeno órgão armazenador de néctar, em forma de copo, na base do pecíolo da flor, que serve para atrair beija-flores para a polinização (JUNIOR et al., 2005).

Alguns estudos na literatura relataram a presença de compostos triterpenos pentacíclicos como os principais constituintes de espécies da família Marcgraviaceae (ARCE et al., 2013).

Devido à carência de estudos e dados da literatura, a espécie *N. adamantium* é um excelente alvo de pesquisa.

Tabela 1. Resumo das principais características das espécies vegetais utilizadas no presente estudo.

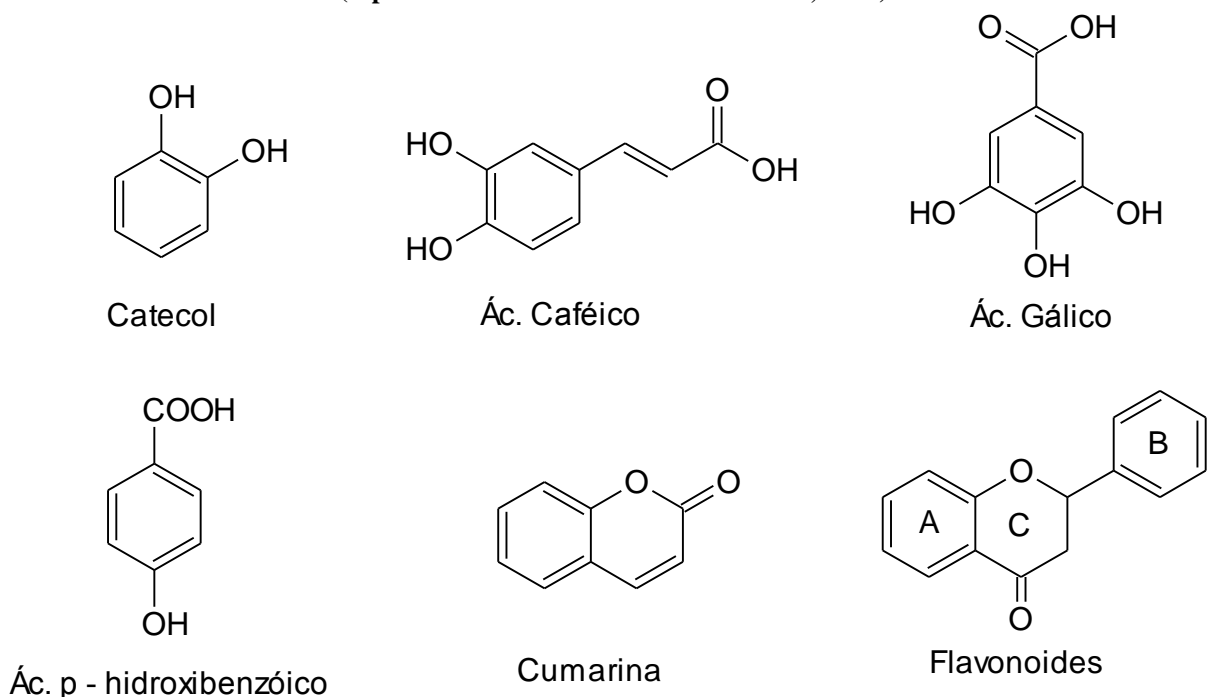
| ESPÉCIES | NOME POPULAR | USO MEDICINA POPULAR | FITOQUÍMICA (LITERATURA) |
|--------------------------------------|--|--|---|
| <i>Ageratum fastigiatum</i> (Gardn.) | Matapasto ou Enxota | Cicatrizante; antimicrobiana, analgésica e anti-inflamatória. | Poliacetilenos, sesquiterpenóides, diterpenóides, triterpenóides, cumarinas, benzofuranos e benzopiranos ^{1,2,3} |
| <i>Croton antisyphiliticus</i> Mart. | Canela-de-perdiz; Curraleira; Pé-de-perdiz ou Alcanforeira | Tratamento de doenças sexualmente transmissíveis; tratamento de infecções do sistema reprodutor feminino e masculino | Alcaloides, terpenóides, diterpenóides, proantocianidinas ^{4,5,6} (*) |
| <i>Kielmeyera rubriflora</i> Camb. | Rosa-do-campo ou Rosa-do-cerrado | Antiinflamatório. Tratamento de esquistossomose, leishmaniose, malária, infecção por bactérias e fungos. | Taninos, triterpenos, e xantonas ⁷ (*) |
| <i>Miconia ferruginata</i> DC | Pixirica-do-campo; Babatenão | Infusão e banhos para tratamento de doenças de pele | Flavonóides, triterpenos e taninos ⁸ |
| <i>Norantea adamantium</i> C.A.M.B. | Copinho ou mel de arara | Chá para tratamento de doenças cardíacas | Triterpenos pentacíclicos ⁹ (*) |

OBS: (*) Substâncias encontradas em outras espécies pertencentes à família e ou gênero da espécie em estudo ¹DEL-VECHIO-VIEIRA et al., 2009; ²BOHLMANN et al., 1981; ³BOHLMANN et al., 1983; ⁴PIZZOLATTI et al., 2013; ⁵SUAREZ et al., 2013; ⁶ADEROGBA et al., 2011; ⁷ELITA SCIO, 2004; ⁸LIMA et al., 2013; ⁹ ARCE et al., 2013.

2.3 OS COMPOSTOS FENÓLICOS E OS FLAVONOIDES

Os compostos fenólicos são definidos como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Estão amplamente distribuídos no reino vegetal, englobando desde moléculas simples, como os ácidos fenólicos e os flavonoides (FIGURA 6) até moléculas complexas de alto peso molecular como os taninos (SOARES et al.,2008).

Figura 6. Estrutura química de alguns compostos fenólicos e a estrutura básica dos flavonoides (representada com os Anéis aromáticos A,B e C)



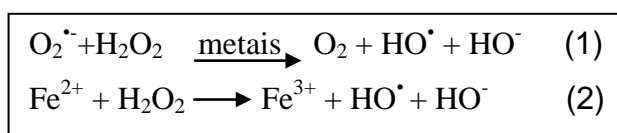
Diversas funções são atribuídas aos flavonoides nas plantas. Entre elas, pode-se citar a proteção contra a incidência de raios ultravioleta, proteção contra microrganismos patogênicos, ação antioxidante, ação alelopática e inibição enzimática. Na maioria dos vegetais, os compostos fenólicos constituem os antioxidantes mais abundantes (MACHADO et al., 2008; EVERETTE et al., 2010).

Em função da elevada atividade antioxidante que possuem, uma variedade de compostos fenólicos desempenha um papel importante nos processos de inibição do risco das doenças cardiovasculares e podem atuar sobre o estresse oxidativo, relacionado com diversas patologias crônico-degenerativas, como o diabetes, o câncer e processos inflamatórios (W. S. ROCHA et al., 2011)

Os flavonoides fazem parte de um grupo de compostos fenólicos naturais do reino vegetal que são consumidos na dieta diária através de vários alimentos como frutas, legumes, vinho tinto, chá preto e chá verde. Representam um dos grupos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem vegetal e são amplamente distribuídas no reino vegetal. Cerca de 6000 diferentes flavonoides já foram descritos sendo que o número de novas estruturas aumenta a cada ano. (KANASHIRO et al., 2004; MACHADO et al., 2008).

Os flavonoides são membros de uma classe de compostos naturais que recentemente tem sido objeto de considerável interesse científico e terapêutico, uma vez que têm sido relatadas importantes atividades biológicas, tais como, ações antialérgicas, antivirais, anti-inflamatórias, vasodilatadoras e antitumorais. Entretanto, o maior interesse tem sido na atividade antioxidante dos flavonoides. Os polifenóis, e em particular os flavonoides, possuem estrutura ideal para o sequestro de radicais, sendo antioxidantes mais efetivos que as vitaminas C e E (ALVES et al., 2007; DUQUE, 2013)

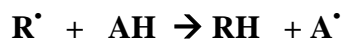
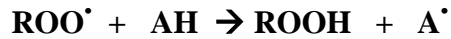
A atividade antioxidante dos flavonoides depende da sua estrutura e pode ser determinada por cinco fatores: (1) reatividade como agente doador de hidrogênio radicalar H^\bullet e de elétrons, representada esquematicamente através da Figura 7, onde o flavonoide (AH) reage com espécies radicalares (ROO^\bullet e R^\bullet) doando H^\bullet aos mesmos e levando a produção de espécies reduzidas ($ROOH$ e RH). O radical é estabilizado a partir da estrutura do flavonoide (A^\bullet). Quanto maior o número de hidroxilas, maior a atividade como agente doador de H^\bullet e de elétrons, flavonoides monoidroxilados apresentam atividade muito baixa; (2) estabilidade do radical flavanoil formado, depende da habilidade do flavonoide em deslocalizar o elétron desemparelhado. A presença de hidroxilas em *orto* é o principal fator que auxilia nessa deslocalização; (3) reatividade frente a outros antioxidantes; (4) capacidade de quelar metais de transição: a remoção de metais de transição livres no meio biológico é fundamental para a proteção antioxidante do organismo, visto que esses catalisam as reações de Haber-Weiss (reação 1) e de Fenton (reação 2); (5) solubilidade e interação com as membranas.



A lipofilicidade do flavonoide indica a incorporação desse pela membrana, que é alvo da maioria das espécies reativas. Os flavonoides que são assimilados pelas membranas

exercem a função de moduladores de fluidez. Restringindo essa fluidez, os flavonoides geram um impedimento físico para a difusão das ER, de modo que decresce a cinética das reações responsáveis pelo estresse oxidativo (CAO et al., 1997; DAVID et al., 2006; CAO et al., 2007; LIMA e BEZERRA, 2012).

Figura 7. Mecanismo de atividade antioxidante dos flavonoides.



Nota: ROO[•] e R[•] representam os radicais livres; AH = antioxidante com um átomo de hidrogênio; A[•] = radical estabilizado;

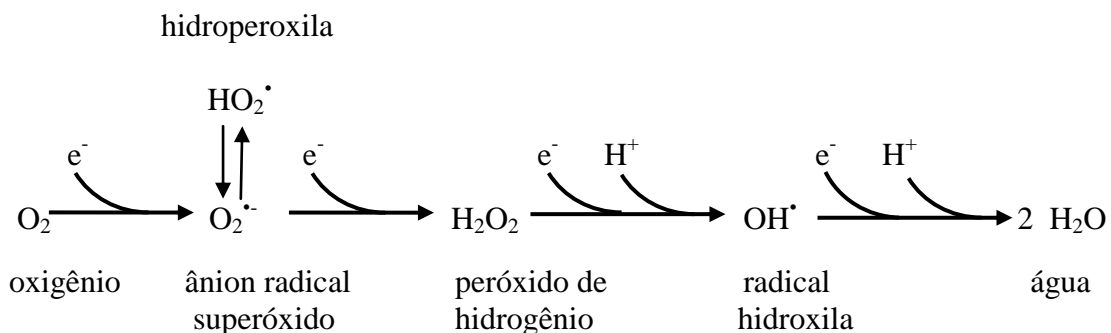
Fonte: Adaptado de: Dossiê Antioxidante, Food Ingredients Brasil; revista-fi.com pg 17, N° 6, 2009.

2.4 AS ESPÉCIES REATIVAS (ERs) E SUA FORMAÇÃO NO ORGANISMO

A formação de ERs no organismo acontece predominantemente de duas maneiras, através da cadeia transportadora de elétrons ou *burst* oxidativo após a fagocitose.

Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbico, o oxigênio molecular (O₂) sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons (e⁻), resultando na formação de água (H₂O). Durante esse processo são formados vários intermediários reativos, como os radicais ânion superóxido (O₂^{•-}), hidroperoxila (HO₂[•]), hidroxila (HO[•]) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (FIGURA 8).

Figura 8. Redução tetravalente do O₂ na mitocôndria até a formação de H₂O. Várias ERs são formadas durante o processo.



Fonte: Adaptado de FERREIRA e MATSUBARA, 1997

Essas ERs desempenham papéis importantes na biologia celular, já que em baixos níveis são indispensáveis em muitos processos bioquímicos, incluindo mensagens intracelulares, diferenciação celular, apoptose, imunidade e defesa contra microorganismos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; VALKO et al., 2007; ROBERTS; SINDHU, 2009; KUANG-REN, 2012).

EROs é um termo usado no meio científico, que inclui todos os radicais e não radicais derivados do oxigênio (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990; NORDBERG e ARNÉR, 2001).

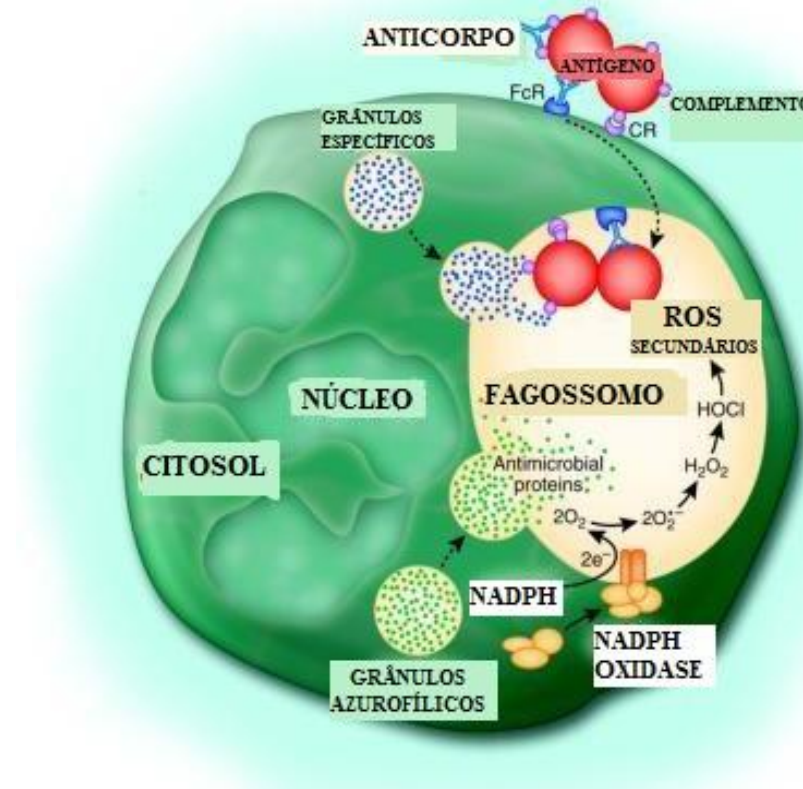
As EROs formadas *in vivo* apresentam diferenças principalmente quanto à reatividade e tempo de meia vida. Nesse cenário, o $O_2^{\bullet-}$ é o mais comum e abundante na célula. É um produto da cadeia transportadora de elétrons ou da ação de fagócitos para defesa bactericida. Algumas biomoléculas, como por exemplo, hemoglobina, mioglobina e catecolaminas, autoxidam-se gerando $O_2^{\bullet-}$ e podem atuar como propagadores de cadeias radicalares (DIAZ et al., 1998; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000).

Os neutrófilos são células fagocíticas essenciais na imunidade inata que determinam a resistência do hospedeiro contra infecções por microorganismos invasores e partículas estranhas (MAY; MACHESKY, 2001; KUMAR e SHARMA, 2010).

Nos mamíferos, a fagocitose de partículas estranhas é favorecida pela ligação das imunoglobulinas aos receptores para a porção Fc (FcR) nos fagócitos profissionais, tais como os neutrófilos e macrófagos, e a partícula opsonizada é, então, rapidamente internalizada (MAY; MACHESKY, 2001)

A fagocitose inicia a execução de diversos mecanismos microbicidas do neutrófilo, entre eles a produção de EROs e seus derivados, mecanismo conhecido como *burst* oxidativo ou respiratório, e a degranulação quando há a liberação de peptídeos, proteínas e enzimas antimicrobiais. Esses mecanismos são classificados em oxidativos e não oxidativos. O mecanismo oxidativo consiste no sistema NADPH oxidase que gera as EROs, as quais são liberadas no fagolisossomo. A secreção de grânulos, tais como azurofílicos e grânulos específicos, constitui o mecanismo microbicida não oxidativo (KOBAYASHI e DELEO, 2009) (FIGURA 9).

Figura 9. Fagocitose e produção de EROs em neutrófilos.



Fonte: adaptado de Kobayashi e Deleo, 2009

Como mostrado na Figura 8, o antígeno é fagocitado e internalizado no fagolisossomo. A NADPH oxidase reduz O_2 em $O_2^{\bullet-}$, a partir do qual outros derivados são formados, incluindo o H_2O_2 e o $HOCl$ (KOBAYASHI E DELEO, 2009).

2.4.1 PRINCIPAIS EROs GERADAS NO ORGANISMO

2.4.1.1 PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H_2O_2)

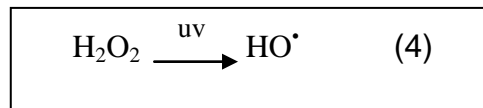
O H_2O_2 não é um radical livre por definição, porém, é importante devido ao poder de permear membranas e possibilitar reações com alvos biológicos em compartimentos distantes de seu local de formação (HANCOCK et al., 2001).

A maior parte do oxigênio consumido no processo de respiração celular é convertida em H_2O_2 por dismutação do $O_2^{\bullet-}$, seja espontânea ou pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD), (reação 3).



O H_2O_2 é altamente tóxico para as células, pois tem vida longa se comparado a outras espécies oxidantes e é capaz de atravessar camadas lipídicas, podendo reagir com membranas biológicas (Peroxidação Lipídica ou Lipoperoxidação) ou com proteínas ligadas ao íon Fe^{++} (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; BABIOR, 2000; KVIECINSKI, 2007; ALVES et al., 2010).

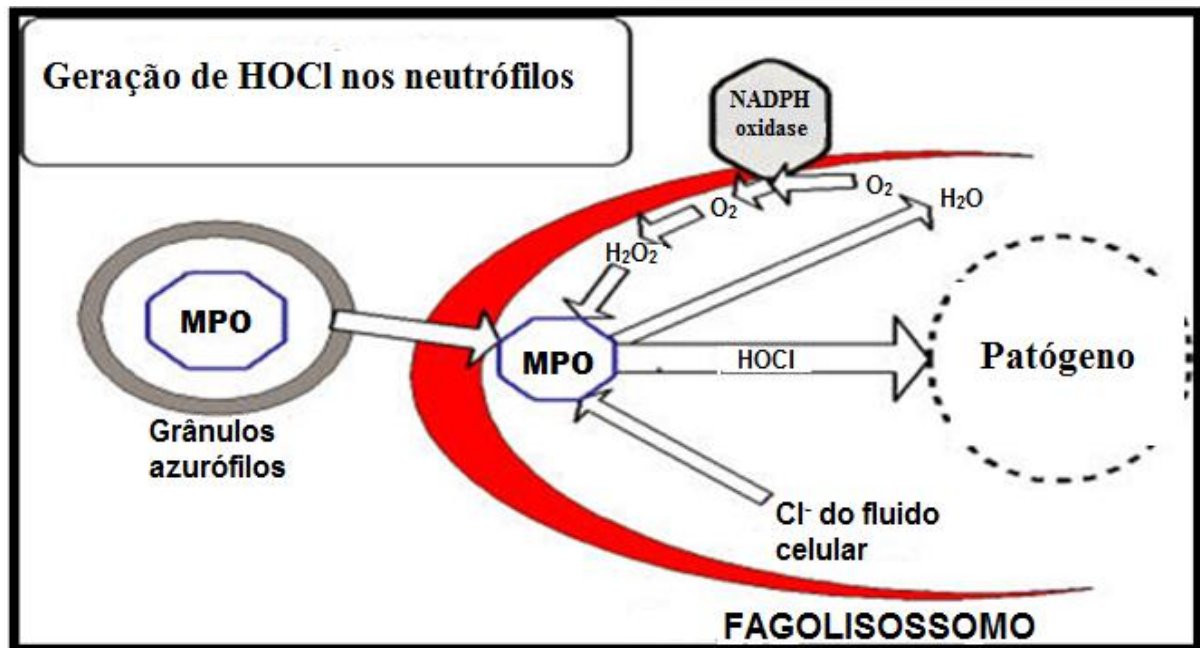
Em termos químicos, H_2O_2 é fracamente reativo, no entanto exerce papel importante no estresse oxidativo por ser capaz de transpor as membranas celulares facilmente e gerar o radical HO^\bullet através de sua fácil conversão por exposição à luz ultravioleta (reação 4) ou via reação de Haber-Weiss (reação 1) ou de Fenton (reação 2), além de gerar outras espécies oxidantes altamente microbicidas, como por exemplo o ácido hipocloroso (HOCl) e peroxinitrito (ONOO^-) (BABIOR, 2000; BARREIROS et al., 2006; KVIECINSKI, 2007; ALVES et al., 2010).



2.4.1.2 ÁCIDO HIPOCLOROSO (HOCl)

O HOCl é produzido por fagócitos ativados e pode gerar outras EROs, tais como, oxigênio singlete e HO^\bullet via sua reação com H_2O_2 e $\text{O}_2^{\cdot-}$ respectivamente. Nos neutrófilos, a maior parte do H_2O_2 formado é consumido pela mieloperoxidase (MPO) que o utiliza para gerar o HOCl . Durante o processo de explosão respiratória (*burst* oxidativo) as células consomem O_2 convertendo-o em H_2O_2 sob ação do complexo enzimático $\text{NADPH}_{\text{oxidase}}$. O H_2O_2 formado promove a oxidação de íons cloreto, levando a formação de HOCl , catalisada pela MPO (FIGURA 10) (WANG et al; 2007, SAKARYA et al; 2014).

Figura 10. Representação esquemática da produção de HOCl durante o *burst* oxidativo



Fonte: Wang et al., 2007

O HOCl é uma espécie não radicalar, membrana permeável, conhecido por ser o principal oxidante produzido por leucócitos do sangue e também é um potente agente microbicida no interior dessas células. Em altas concentrações o HOCl pode oxidar várias biomoléculas de importância fisiológica, tais como, tióis e tioésteres, aminas, aminoácidos, nucleotídeos, fenóis e ascorbato e também gerar outras EROs mais deletérias, contribuindo para o processo de envelhecimento e desenvolvimento de várias patologias relacionadas a processos oxidantes (VASCONCELOS et al., 2007).

O HOCl é essencial para proteção do organismo, visto que participa do processo de destruição de microorganismos, porém, também possui uma ação invasiva, um tanto quanto agressiva aos tecidos quando produzidos em altas concentrações, pois o organismo não consegue eliminar este excesso (LAPENNA & CUCCURULLO, 1996).

2.5 PATOLOGIAS RELACIONADAS COM ESPÉCIES REATIVAS (ERs)

Nas últimas décadas, pesquisas apontam as espécies reativas (EROs e ERNs) como principais responsáveis pelo envelhecimento e por desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; BIANCHI; ANTUNES, 1999; RE et al., 1999; HAVSTEEN, 2002; VALKO et al., 2007; VELLOSA, BARBOSA; OLIVEIRA, 2007).

O efeito das ERs é equilibrado pela ação de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Quando há um desequilíbrio entre a produção e a remoção de EROs por

moléculas antioxidantes parece haver uma relação positiva no aparecimento de desordens celulares que podem evoluir para certas patologias, processo conhecido como estresse oxidativo (BABIOR, 2000).

O radical pode ceder o elétron desemparelhado oxidando-se ou receber um elétron reduzindo-se. Nesta tentativa de se estabilizar quimicamente, os radicais livres propiciam reações em cadeia que terminam alterando a conformação, a estrutura ou as funções de diversos componentes celulares (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; VALKO et al., 2007).

Em sistemas biológicos, a membrana celular constitui um dos principais focos de atuação das ERs. Além da membrana que envolve a célula, as membranas das organelas intracelulares, tais como mitocôndria, retículo endoplasmático, nucléolo, dentre outras, também são alvos de atuação. O dano celular resulta basicamente do ataque das ER sobre as macromoléculas, tais como açúcares, DNA, proteínas e lipídios (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; VASCONCELOS et al., 2007; OKUSAGA, 2013; BARADARAN et al., 2014; FUJIMOTO & YAMASOBA, 2014; KIM & CHANG, 2014; YANG et al., 2014).

Existem evidências de que as ERs possam estar envolvidas em mais de 50 doenças ou eventos nosológicos tais como envelhecimento, câncer, aterosclerose, inflamação, enfisema, doença respiratória aguda, injúria por reperfusão e artrite reumatóide (TABELA 2) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; BABIOR, 2000).

Tabela 2. Patologias relacionadas ao estresse oxidativo

| Doenças relacionadas ao estresse oxidativo | Natureza do envolvimento com ERs |
|--|---|
| Doença de Alzheimer, Asma, Artrite Reumatóide, asbestose, Síndrome de Insuficiência Respiratória do adulto | Produção de $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e HOCl por células fagocíticas ativadas |
| Doença Granulomatosa Crônica | Defeito genético no sistema antioxidante |
| Aterosclerose, Síndrome de Bloom, Síndrome de Down, Kwashiorkor, Doença de Keshan | Falha ou consumo excessivo de defesas antioxidantes |
| Hipertensão arterial sistêmica | Produção de $O_2^{\cdot-}$ por NADPH/NADP oxidase |
| Diabetes mellitus, anoxia, injúria da reperfusão, pré-eclampsia | Oxidação anormal de substratos ou mudanças na concentração de oxigênio |

Vasconcellos et al., 2007

Atualmente, o conhecimento dos mecanismos de formação e regulação das EROs é de grande importância para a compreensão dos eventos celulares relacionados ao controle da

sobrevivência, morte e proliferação celular (VALKO et al., 2006; GLASAUER & CHANDEL, 2014).

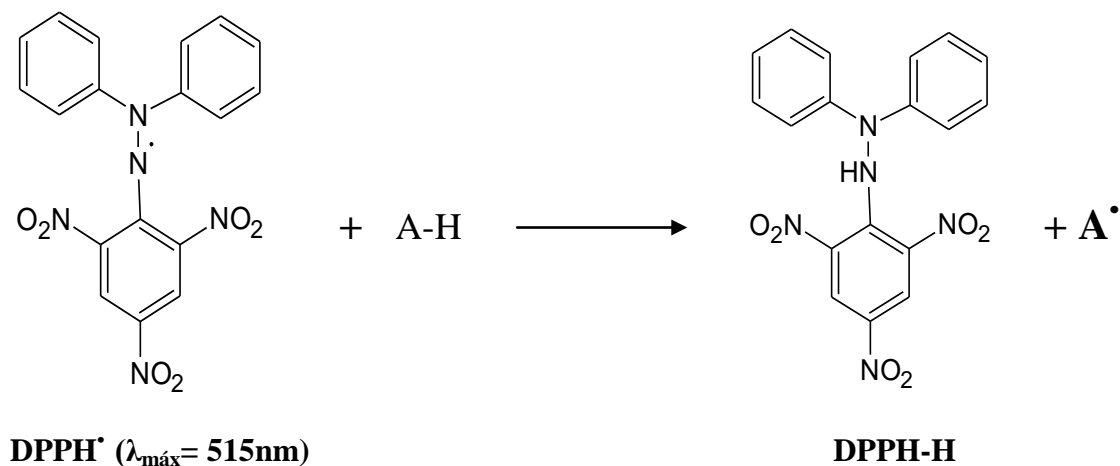
2.6 METODOLOGIAS APLICADAS NA AVALIAÇÃO ANTIOXIDANTE

2.6.1 ENSAIO DE CAPTURA DO RADICAL 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH[•])

O método de captura do radical DPPH[•] é aplicado para determinar a capacidade antioxidante de compostos específicos ou a capacidade de extratos vegetais brutos em sequestrar radicais livres, sendo um dos mais utilizados, pois ele é considerado um método rápido, prático e com boa estabilidade (SUCUPIRA et al., 2012).

O ensaio consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical DPPH[•], de coloração violeta intensa, por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar (R[•]), o DPPH[•] é reduzido formando 2,2-difenilpicril-hidrazina (DPPH-H), de coloração amarela, com conseqüente decréscimo da absorbância em 515 nm em meio alcoólico (FIGURA 11) (BLOIS, 1958; ARNAO et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2009; SUCUPIRA et al., 2012).

Figura 11. Reação do radical DPPH[•] com um composto antioxidante (A-H)

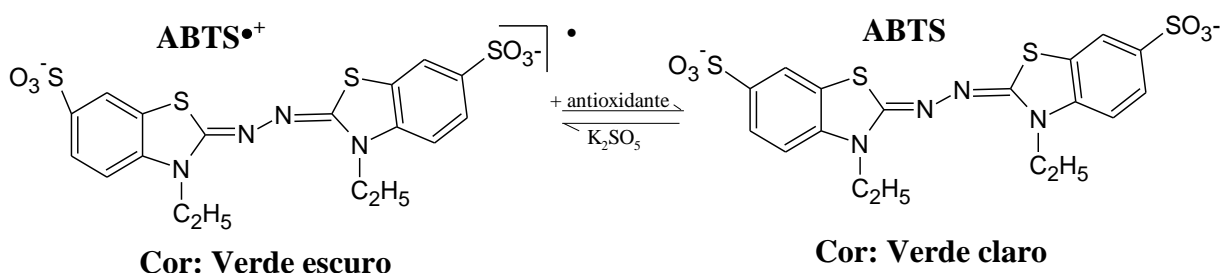


2.6.2 ENSAIO DE CAPTURA DO RADICAL 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS^{•+})

O radical 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS^{•+}) é produzido a partir de um precursor, o ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina)-6-sulfônico (FIGURA 12). O radical ABTS^{•+} é um composto cromóforo (coloração azul-esverdeada) quimicamente estável, apresenta alta solubilidade em água e um máximo de absorvância a 414 nm além de medidas secundárias de absorvância a 645, 734 e 815 nm. É utilizado para avaliar as habilidades dos flavonoides e agentes fenólicos como “scavengers” de radicais (PELLEGRINI et al., 1999; Vieira et al., 2011).

A captura do radical ABTS^{•+} provoca uma descoloração no radical e um conseqüente decréscimo na absorvância, que é quantificada a partir da mistura do radical com o antioxidante em diferentes concentrações (SUCUPIRA et., al, 2012).

Figura 12. Estabilização do radical ABTS^{•+} por um antioxidante e sua formação pelo Persulfato de Potássio.



Fonte: RUFINO et al., - Comunicado Técnico online n. 128; Embrapa, 2007.

O ensaio de captura do radical ABTS^{•+} apresenta excelente estabilidade, sendo um dos testes mais rápidos de atividade antioxidante e que oferece resultados reprodutíveis, e uma boa solubilidade, permitindo análises de compostos tanto de natureza lipofílica como hidrofílica (SUCUPIRA et al., 2012).

2.6.3 OUTROS ENSAIOS DE AVALIAÇÃO DE CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Os ensaios de captura das espécies reativas HOCl e H₂O₂, a análise do poder redutor e o ensaio de inibição do *burst* oxidativo frente a neutrófilos humanos ativados são metodologias alternativas que complementam o estudo do potencial antioxidante dos extratos que foram realizadas neste trabalho.

A análise do poder redutor é uma metodologia extremamente importante, pois a capacidade redutora juntamente com as características estruturais, são os principais fatores que conferem potencial antioxidante aos compostos fenólicos, principalmente os flavonoides (ABRAHÃO et al., 2009).

O ensaio de captura do HOCl e do H₂O₂, espécies não radicalares existentes em sistema biológico, complementam a atividade antioxidante analisada pelos métodos de captura do ABTS^{•+} e DPPH[•], uma vez que essas são espécies radicalares (VELLOSA, 2005).

O ensaio de inibição *burst* oxidativo em neutrófilos humanos ativados permite avaliar a real interação dos extratos vegetais quando em contato com células humanas e também avaliar o potencial antioxidante no que diz respeito à produção de ERs endógenos. Quando um extrato apresenta uma potente ação inibidora do *burst* oxidativo, ele pode atuar evitando os eventuais danos teciduais que EROs produzidas provocam no organismo (KANASHIRO et al., 2013).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade antioxidante dos extratos etanólicos de *Ageratum fastigiatum* (GARDN) R. M. KING et H. ROB., *Croton antisiphiliticus* MART., *Kielmeyra rubriflora* CAMB., *Miconia ferruginata* DC. e *Norantea adamantium* CAMB.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

3.2.1 Quantificar os fenólicos totais nos extratos pelo ensaio de Folin Ciocalteau;

3.2.2 Avaliar o Poder redutor dos extratos pelo ensaio de formação do complexo Azul da Prússia;

3.2.5 Avaliar a atividade antioxidante pelo ensaio de captura do radical DPPH[•];

3.2.4 Avaliar a atividade antioxidante pelo ensaio de captura do radical ABTS^{•+};

3.2.5 Avaliar a atividade seqüestradora de H₂O₂ e do HOCl pelo ensaio de redução do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) a ácido 5-5'-ditio-2-nitrobenzóico (DTNB);

3.2.6 Avaliar a interferência dos extratos no *burst* oxidativo de leucócitos polimorfonucleares neutrófilos (LPMN).

4 METODOLOGIA

4.1 EQUIPAMENTOS E REAGENTES

4.1.1 EQUIPAMENTOS

Os equipamentos e as microplacas utilizados para o preparo dos reagentes e soluções, bem como para a realização dos experimentos foram:

Agitador Placas (Kline – NOVA TÉCNICA[®]); Balança analítica (Shimadzu[®] AW220); Banho Maria (BM); Câmara de Neubauer (Neubauer Improved - Bright line; NEW OPTICS[®]); Centrifuga (Jouan Br4i multifunction Centrifuge – THERMO Electron Corporation[®]); Dessecador de Vidro; Multileitora de microplacas (SpectraMax[®] Paradigm[®] Multi-Mode Detection Platform); Estufa secagem de vegetais; Microscópio óptico (OLYMPUS[®] CX41); Microplaca 96 cavidades com Tampa, Fundo Chato, Poliestireno (PS), LOTE: 181212 – (GLOBAL PLAST[®]); Microplaca 96, Branca, PS, TC, com tampa, Fundo Plano, LOTE: E101003L – (GREINER[®] BIO-ONE BRASIL); Microplaca Microtitulação 96 poços fundo chato, LOTE: A314054 - KASVI[®]; Microplaca UV-STAR, com 96 cavidades, Fundo Plano, LOTE: E140833GB; REF.:655801 – (GREINER[®] BIO-ONE BRASIL); Moinho de facas; pHmetro (HANNA[®] - HI 3221 pH/ORP/ISE Meter); Rotaevaporador

4.1.2 REAGENTES

Todos os reagentes utilizados foram armazenados em condições específicas de temperatura e luminosidade, de acordo com as especificações técnicas dos respectivos fabricantes. Os reagentes utilizados para o preparo das soluções e para a realização dos experimentos foram:

2,2'-azino-bis-(ácido 3-etilbenzotiazolina- 6-sulfônico), sal diamônio (ABTS) – SIGMA[®], COD. A1888; PM = 548,68 g/mol; Acetato de Forbol Miristato (PMA) - SIGMA[®]; PM = 616,83 g/mol; P83139; Ácido 5-5'-ditio-2-nitrobenzóico (DTNB) – SIGMA[®] D8130, PM = 396,35 g/mol; Ácido clorídrico – ISOFAR[®]; ACS, PM= 36,46 g/mol; Lote: 040113; Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) – ISOFAR[®]; PM= 372,24 g/mol; Lote: 061635; Ácido gálico – IMPEX[®]; PM=188,14 g/mol; Lote: 1040419CQ; Ácido sulfúrico – DINÂMICA[®]; P.A ACS; PM= 98,08; Lote: 1308-1; Ácido tricloroacético – SYNTH[®]; PM= 163,39 g/mol;

Lote: 136530; Álcool etílico (Etanol) – PROQUIMIOS[®]; PA, PM= 46,07 g/mol; Lote: 10/0360; Álcool metílico (Metanol) – VETEC[®]; P.A ACS; P.M 32,04 g/mol; Lote: DCBB4595; Azul de Tripan; Borohidreto de Sódio – VETEC[®]; ONU 1426 P.M=37,83 g/mol; Lote: 0808689; Carbonato de Sódio Na₂CO₃ – DINÂMICA[®]; P.A, PM = 105,99 g/mol; Lote: 52562; Cloreto de amônio – DINÂMICA[®]; P.A, PM= 53,49 g/mol; Lote: 31479; Cloreto de sódio – PROQUIMIOS[®]; PA Cristalizado; PM= 58,45 g/mol; Lote: 08/0296; Cloreto férrico – CINÉTICA[®]; PM= 270,30 g/mol; Lote: 16538; Dimetilsulfóxido (DMSO) – VETEC[®]; P.A ACS PM= 78,13 g/mol; Lote: DCBB2889; DPPH – SIGMA-ALDRICH[®]; PM=394,32 g/mol; Lote: STBC1252V; Ferricianeto de potássio – SYNTH[®]; PM= 329,25 g/mol; Lote: 133004; Fosfato de potássio dibásico (K₂HPO₄) – VETEC[®]; P.A; PM= 174,18 g/mol; Lote: 0702303; Fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) – VETEC[®]; P.A; PM= 136,09 g/mol; Lote: 0708326; Fosfato de sódio bibásico (Na₂HPO₄) – DINÂMICA[®]; PM= 268,07 g/mol; Lote: 39882; Fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO₄) – CINÉTICA[®]; PM=137,99 g/mol; Lote: 7520; Gelatina em pó puríssima – ISOFAR[®]; REF.:726; Lote: 140098; Hidróxido de Sódio – PROQUIMIOS[®]; PA ACS; PM= 40,00 g/mol; Lote: 07/0843; Hipoclorito de Sódio – SANTA CLARA[®]; 2,0 a 2,5% p/v Cloro ativo; Lote: AS SC 084/15; Luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinadiona) – 97% SIGMA[®] A8511, PM = 177,16 g/mol; Peróxido de Hidrogênio – NEON[®] 35% P.A PM= 34,01 g/mol; Lote: 18723; Persulfato de Potássio – VETEC[®]; PM= 270,19 g/mol; Lote: DCBB3654.

4.2 PREPARO DE REAGENTES E SOLUÇÕES

As soluções e reagentes foram preparadas e armazenadas de acordo com as especificações técnicas e características de estabilidade de cada amostra. Foram respeitados o tempo e as condições de armazenamento para cada solução de acordo com suas características de estabilidade. Preparo de reagentes e soluções secundárias encontram-se no apêndice A.

EXTRATOS: Solução estoque - 2000 µg/mL

Foram pesados 0,010g do extrato e diluídos em 5 mL de metanol com aferição de volume em balão volumétrico de 5 mL. A partir da solução estoque, foram preparadas soluções variando a concentração de 25 µg/mL a 2000 µg/mL. Armazenadas em geladeira, ao abrigo da luz.

ÁCIDO GÁLICO (AG) - Solução estoque - 2000 µg/mL

Foram pesados 0,010g de AG, diluído em água Milli-Q (pH 7,0) e aferiu-se o volume em balão volumétrico de 25 mL. A partir da solução estoque foram preparadas diluições seriadas do AG variando as concentrações de 25 a 2000 µg/mL. Preparadas e utilizados somente no dia do experimento.

SOLUÇÃO DE DPPH[•] - 60µM

Foram dissolvidos 0,0012g de DPPH em metanol e aferiu-se o volume em um balão volumétrico de 50 mL. A solução foi preparada apenas no dia do experimento e armazenada ao abrigo da luz até a sua utilização.

SOLUÇÃO DE ABTS - 7 mM

Foram dissolvidos 0,096 g de ABTS em água Milli-Q (pH 7,0) e o volume final foi aferido em balão volumétrico de 50 mL. A solução foi armazenada em frasco de vidro âmbar devidamente identificado, sob refrigeração, por até 1 mês.

RADICAL ABTS^{•+}

Foram pipetados 5mL da solução estoque de ABTS 7mM e adicionou-se 88µL da solução de K₂S₂O₈ 140 mM. A mistura foi mantida ao abrigo da luz e à temperatura ambiente por um intervalo de 16 horas. Em seguida, dilui-se esta mistura em etanol até obter uma absorbância de 0,7nm ± 0,01nm a 734nm. O radical foi preparado apenas no dia do experimento.

SOLUÇÃO DE ÁCIDO 5-TIO-2-NITROBENZÓICO (TNB)

Os seguintes sais foram pesados separadamente com o auxílio de uma balança analítica: 0,0019g de ácido 5-5'-ditio-2-nitrobenzóico (DTNB); 0,0076g de Borohidreto de Sódio (NaBH₄); 0,0045g de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Diluiu-se os sais em um volume de 2,5 mL da solução estoque de Tampão Fosfato de Potássio 0,1 M pH 6.6 e aferiu-se o volume em um balão volumétrico de 5 mL. A solução foi incubada a 37°C por um intervalo de 30 minutos.

4.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

4.3.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Todas as plantas foram coletadas no município de Diamantina - MG e regiões subjacentes.

As exsicatas foram confeccionadas e armazenadas no herbário DIAM da Universidade Federal dos Vales Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), conforme descrito pela declaração constante no ANEXO A – Declaração de depósito das Exsicatas.

A coleta do material vegetal foi realizada pelo Prof. Dr. Luiz Elídio Gregório. Vide em ANEXO B a autorização emitida pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). Autorização de acesso e de remessa de amostra de componente do patrimônio genético n° 010476/2012-1. No ANEXO C encontra-se o comprovante de registro para coleta de material vegetal, submetido ao SISBIO (Sistema de Autorização e Informação em Sistema de Biodiversidade).

4.3.1.1 *Ageratum fastigiatum*

Coletada no município de Diamantina - MG na região do Campus JK da UFVJM.

Coordenadas: Lat. 18°12'6,70"S, Long. 43°34'12,99"W. Altitude 1386m.

Observações da coleta: Planta herbácea com presença de flores brancas/roxas; Partes coletadas: partes aéreas, incluindo caule, folhas e florescências.

Data da coleta: 01/02/2011

Autor da coleta: Prof^o Dr.^o Luiz Elídio Gregório (LEG 10)

Número de registro no Herbário DIAM: 4916

4.3.1.2 *Croton antisyphiliticus*

Coletada no município de Diamantina - MG na região do Campus da JK da UFVJM.

Coordenadas: Lat. 18°12'11,33"S; Long. 43°34'33,67"W

Observações da coleta: Herbáceas com presença de flores brancas e caule roxo. Partes coletadas: caule e folhas;

Data da coleta: 20/08/2011

Autor da coleta: Prof.^oDr.^o Luiz Elídio Gregório (LEG4)

Número de registro no Herbário DIAM: 3152

4.3.1.3 *Kielmeyera rubiflora*

Coletada no município de Diamantina MG na região do Parque Estadual do Biribiri (Cerrado/Campo Rupestre).

Coordenadas: Lat. 18°11'14,11" S Long. 43°37'14". Altitude 1118m

Observações da coleta: Planta com aproximadamente 1,5m. Partes coletadas: partes aéreas, incluindo caule, folhas e florescências.

Data da coleta: 07/11/2014

Autor da coleta: Prof^o Dr.^o Luiz Elídio Gregório (LEG 49)

Número de registro no Herbário DIAM: 4963

4.3.1.4 *Miconia ferruginata*

Coleta realizada na estrada para Conselheiro Mata distrito de Diamantina – MG (Cerrado/Campo Rupestre).

Coordenadas: Lat. 18°18'38"S Long. 43°52'47" W. Altitude 1054m

Observações da coleta: Árvore. Partes coletadas: caule

Data da coleta: 14/05/2013

Autor da coleta: Prof^o Dr.^o Luiz Elídio Gregório (LEG 69)

Número de registro no Herbário DIAM: 4964

4.3.1.5 *Norantea adamantium*

Foi coletada no município de Diamantina - MG, na região conhecida como Parque Estadual do Biribiri.

Coordenadas: Lat. 18°11'14,11"S, Long. 43°37'13,91"W. Altitude 1118m.

Observações da coleta: Partes coletadas: partes aéreas, incluindo caule, folhas e florescências.

Data da coleta: 22/10/12

Autor da coleta: Prof^o Dr.^o Luiz Elídio Gregório (LEG 19)

Número de registro no herbário DIAM: 4913.

4.3.2 PREPARO DOS EXTRATOS VEGETAIS

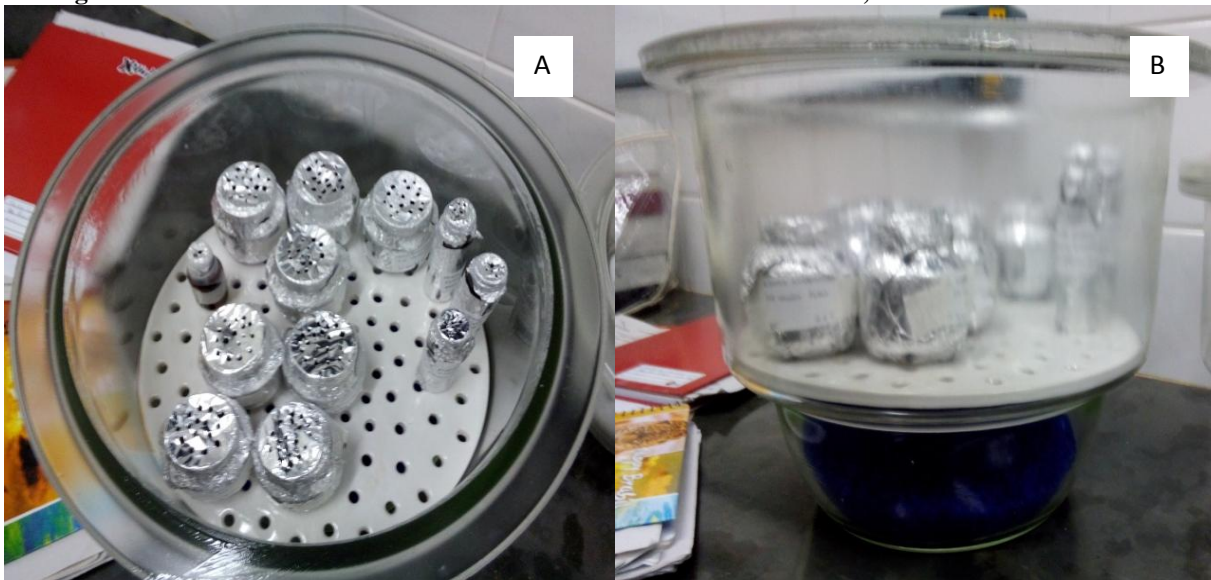
Após a coleta, o material vegetal foi submetido à desidratação em estufa de ar circulante a 40 °C por uma semana até atingir peso constante e em seguida foi realizado a moagem do material já seco em um moinho de facas.

O material vegetal moído foi direcionado para a extração seguindo o procedimento da maceração com etanol 96% seguindo a proporção de 1/10 peso/volume (p/v) à temperatura ambiente por uma semana, alternando em ciclos de 24 horas, sendo que a cada ciclo o solvente era trocado. Após a maceração o material vegetal foi filtrado e os extratos concentrados com o auxílio de um Evaporador rotativo a 40 °C.

Foram preparados seis extratos: Extrato etanólico bruto (EEB) das partes aéreas *Norantea adamantium*; EEB partes aéreas *Ageratum fastigiatum*; EEB partes aéreas de *Kielmeyera rubriflora*; EEB caule *Miconia ferruginata*; EEB caule *Croton antisiphiliticus* e EEB das folhas de *Croton antisiphiliticus*.

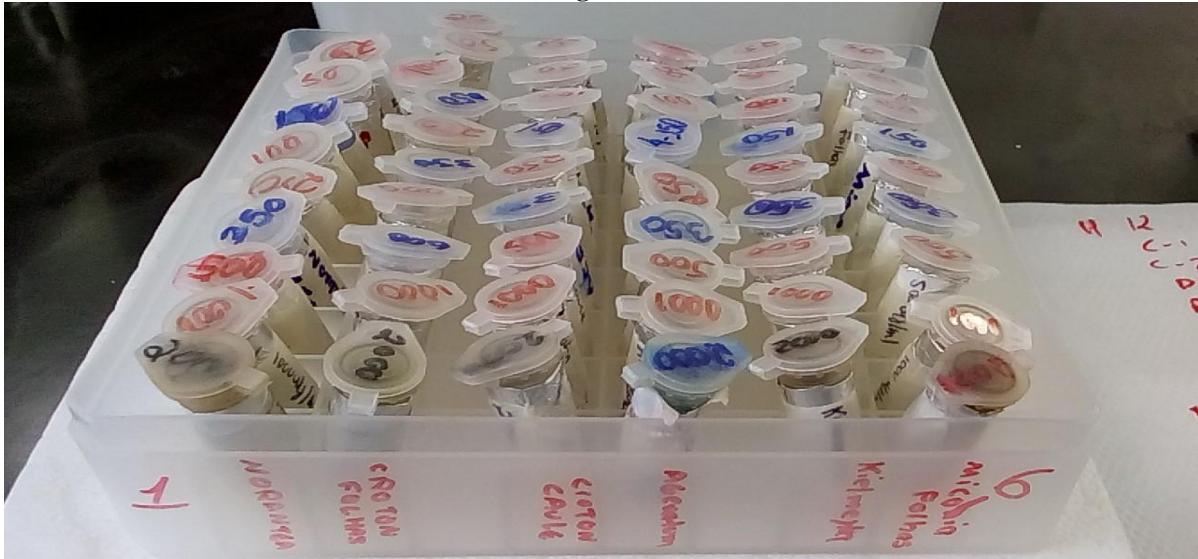
Os extratos secos foram armazenados em dessecador com sílica, sempre mantido a vácuo (FIGURA 13).

Figura 13. Armazenamento dos extratos secos. A – Dessecador de vidro; B- Dessecador com vácuo



Foram realizadas diluições seriadas, com várias concentrações a serem testadas. As diluições foram realizadas sempre no dia do experimento e armazenadas em geladeira até o momento do uso (FIGURA 14).

Figura 14. Extratos diluídos, armazenados em microtubos tipo Eppendorfs® de 1,5 mL, ao abrigo da luz, em geladeira

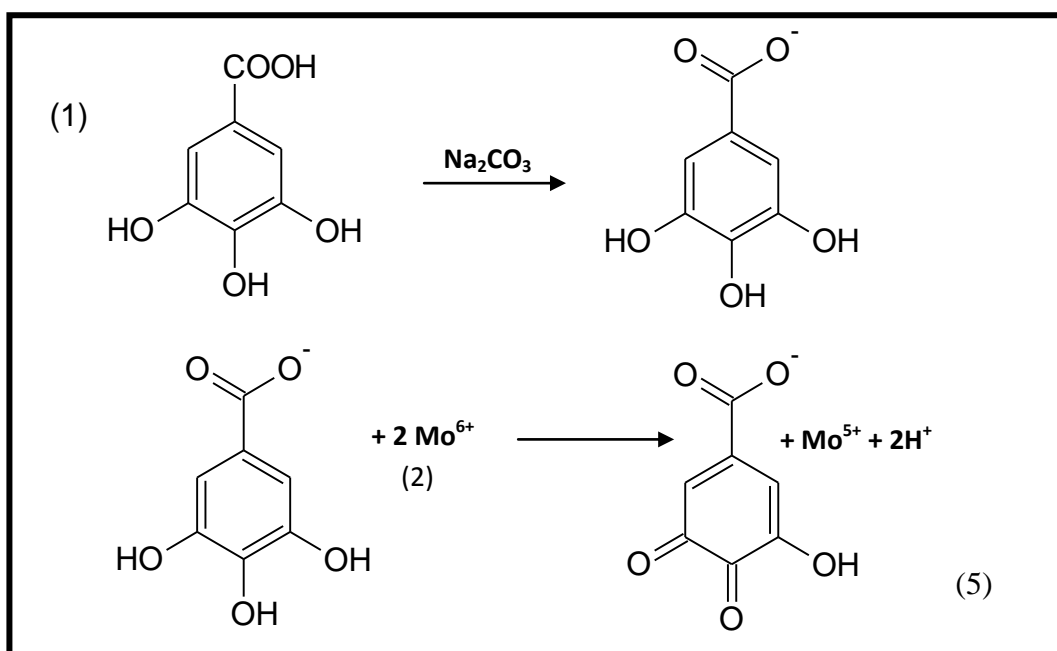


4.3.3 ENSAIO PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS (FT)

A quantificação de FT vem sendo utilizada como um método auxiliar na avaliação do potencial antioxidante devido às características estruturais de tais compostos que conferem alto potencial antioxidante a essa classe de substâncias e devido à estreita correlação entre o perfil de fenóis totais e a atividade antioxidante dos extratos (ALONSO et al. 2002; STEVANATO et al. 2004).

O conteúdo de compostos fenólicos dos extratos foi determinado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (FC) por meio de espectroscopia na região do visível de acordo com metodologia descrita por SINGLETON e ROSSI (1965), com algumas modificações.

O reagente FC consiste de uma mistura de dois ácidos: fosfomolibídico e fosfotunguístico, na qual o molibdênio e o tungstênio se encontram no estado de oxidação $+6$ (cor amarela no complexo $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Porém, em presença de certos agentes redutores como os compostos fenólicos (por exemplo o AG), formam-se os chamados complexos molibdênio-tungstênio azuis $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^4]$, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 e 6 (reação 5) e cuja intensidade de coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras (SINGLETON et al., 1999; HUANG et al., 2005).



Esquema de Reação do AG (1) com o Molibidênio (2), componente do reagente de Folin-Ciocalteu

Foram pipetados 12,5 μL de cada concentração dos extratos, 12,5 μL do reagente FC e 100 μL de água Milli-Q (pH= 7,0) em cada poço da microplaca (GLOBAL PLAST) que foi submetida à agitação e depois a um repouso de 5 minutos. Foram acrescentados 125 μL de carbonato de sódio (1M) e a microplaca mantida em incubação por 90 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz.

A leitura da absorbância foi realizada em 750 nm, utilizando o metanol como branco para zerar o leitor de microplacas.

O volume final da reação foi acertado para 250 μL , seguindo as devidas proporções a fim de realizar os experimentos em leitor de microplacas (SINGLETON e ROSSI, 1965).

Foi elaborada uma curva de calibração com concentrações conhecidas do padrão AG (0-250 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A leitura foi realizada em leitor de microplacas Spectramax[®], no comprimento de onda de 750 nm e os dados foram analisados pelo software do próprio equipamento versão SoftMax Pro 6.3. As absorbâncias obtidas para os extratos foram convertidas em concentrações de AG, calculadas a partir da equação da reta obtida para a curva de calibração, onde se substitui o Y pela absorbância encontrada e obtêm-se o valor de X, correspondente à concentração de AG. Os resultados foram expressos em equivalência de AG por grama de extrato (EAG/ g de extrato).

4.3.4 ENSAIO PARA DETERMINAÇÃO DO PODER REDUTOR (PR)

O poder dos extratos em reduzir íon metálico foi avaliado de acordo com a metodologia descrita por Yildirim e colaboradores (2001). Na determinação do poder redutor de íons metálicos, as substâncias fenólicas presentes nos extratos reagem com o íon ferricianeto $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ e são oxidadas, enquanto o $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ é reduzido a íon ferrocianeto $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. Este então reage com o íon férrico (Fe^{3+}) formando o ferrocianeto férrico ou hexacianeto de ferro III ($\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$), também conhecido como Azul da Prússia. A formação de coloração azul foi medida a 700 nm (GRAHAM, 1992).

Em ambiente escuro, transferiu-se uma alíquota de 300 μL de cada diluição do extrato ou padrão para microtubos tipo Eppendorfs[®] de 1,5 mL. Foram adicionados 300 μL de Tampão fosfato 0,2 mM e 450 μL de ferricianeto de Potássio (1%).

Os Eppendorfs[®] foram incubados a 50 °C por 30 minutos em banho maria (BM). Após o tempo de incubação acrescentou-se 450 μL de ácido tricloroacético (10%) e a mistura foi centrifugada a 2500 rpm por 8 minutos. Ao término da centrifugação foram retirados 600 μL da camada superior e transferidos para microtubos Eppendorfs[®] limpos onde foram acrescentados 600 μL de água destilada + 150 μL de Cloreto Férrico (0,1%) em cada.

Após homogeneização da mistura, foram pipetados 300 μL de cada microtubo Eppendorf[®] e transferidos para microplaca de 96 poços (GLOBAL PLAST[®]). A leitura foi realizada em leitor de microplacas (Spectramax[®]) a 700 nm, utilizando metanol como branco para zerar o equipamento.

Os testes foram realizados em triplicata, e o poder redutor foi considerado diretamente proporcional à absorbância observada. Os resultados apresentados para as amostras avaliadas correspondem à média \pm desvio padrão e estão correlacionados ao poder de redução do padrão utilizado.

4.3.5 ENSAIO DE CAPTURA DO RADICAL DPPH[•]

A atividade antioxidante foi quantificada nos extratos estudados pela realização do método de captura do radical DPPH[•] segundo Duarte-Almeida et al. (2006).

Em um ambiente escuro transferiu-se uma alíquota de 6 μL de cada diluição dos extratos ou padrão para cada poço de uma microplaca contendo 244 μL de radical DPPH[•] a 60 μM . A placa foi mantida em incubação por um intervalo de 30 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Foi realizada a leitura das absorvâncias do meio reacional contendo diferentes concentrações dos extratos e do padrão em 515 nm, utilizando metanol como branco para zerar o equipamento. Realizou-se um controle contendo somente o reagente DPPH e um padrão de referência (AG) para comparação dos resultados.

Os resultados da absorvância foram convertidos em Porcentagem de Inibição através da equação 1 e foi calculada a Concentração Eficiente (CE_{50}) para captura de 50% do radical.

$$\text{Inibição (\%)} = ((A_c - A_{am}) / A_c) \times 100 \quad (\text{Eq.1})$$

Onde A_c = Absorvância do controle
 A_{am} = Absorvância amostra

4.3.6 ENSAIO DE CAPTURA DO RADICAL ABTS^{•+}

A atividade de captura do radical ABTS^{•+} foi determinada segundo o método descrito por Re et al. (1999) com algumas modificações.

Em ambiente escuro, transferiu-se uma alíquota de 2,5 µL de cada diluição do extrato para cada poço da microplaca contendo 247,5 µL do radical ABTS^{•+}. A placa foi homogeneizada e incubada por 6 minutos ao abrigo da luz e à temperatura ambiente.

Após a incubação foi realizada a leitura da absorvância a 734 nm utilizando o álcool etílico como branco para calibrar o espectrofotômetro. Foi utilizado um controle contendo apenas o radical ABTS^{•+} e etanol e um padrão de referência (AG).

A leitura da absorvância foi convertida em porcentagem de inibição, calculada utilizando a Eq. 1.

4.3.7 ENSAIO DE CAPTURA DO HOCl

A atividade de captura de HOCl dos extratos foi avaliada seguindo-se o método de oxidação do TNB a DTNB com queda da absorvância em 412nm, segundo Ching et al. (1994), com algumas adaptações.

O TNB foi sintetizado a partir do DTNB e o HOCl foi preparado a partir da reação de Hipoclorito de Sódio (NaOCl) 1% v/v com ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1% v/v até estabilização

do pH em 6,2 (BENJAKUL et al., 2013). Todas as reações foram realizadas em tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4.

As concentrações da solução de HOCl e de TNB foram determinadas espectrofotometricamente através de seus coeficientes de extinção molar em 295 nm, $350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (ZGLICZYNSKI et al., 1971) e $13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (CHING et al., 1994) respectivamente.

As reações foram padronizadas para um volume final de $250 \mu\text{L}$ e foram utilizadas placas de poliestireno de 96 poços para a realização do experimento. Para leituras na região do ultravioleta, foram utilizadas placas de poliacrilato.

As amostras foram incubadas por 10 minutos a 37°C na presença de HOCl $23 \mu\text{M}$ e mais 5 minutos após adição de TNB $70 \mu\text{M}$, ambos os procedimentos foram realizados ao abrigo da luz. A leitura das absorbâncias foi realizada em 412nm .

Os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram convertidos em porcentagem de inibição através da equação 2 (VELLOSA, 2005).

$$\text{Inibição (\%)} = (1 - ((A_{\text{xnm}}\text{Max} - A_{\text{xnm}}\text{Teste}) / (A_{\text{xnm}}\text{Max} - A_{\text{xnm}}\text{Min}))) \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

$A_{\text{xnm}}\text{Max}$ = Absorbância na Ausência de Agente Oxidante e de amostra

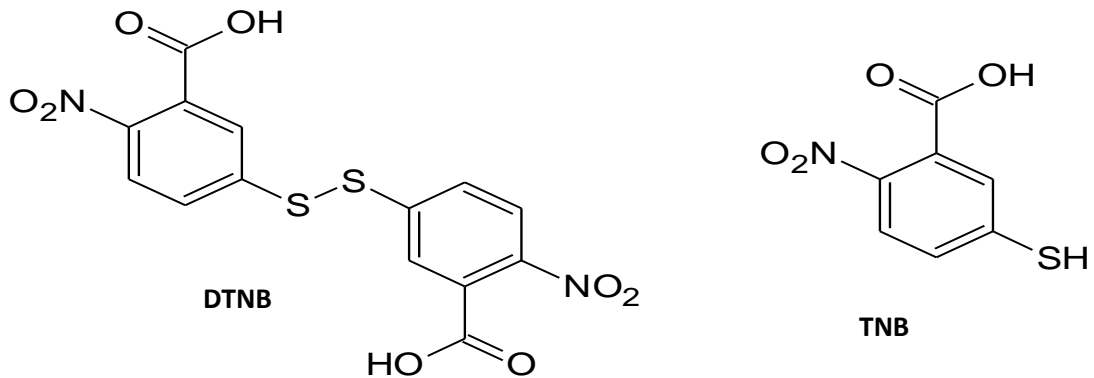
$A_{\text{xnm}}\text{Min}$ = Absorbância na presença de agente oxidante e ausência de amostra

$A_{\text{xnm}}\text{Teste}$ = Absorbância na presença de agente oxidante e amostra

4.3.8 ENSAIO DE CAPTURA DO H_2O_2

A atividade de captura de H_2O_2 dos extratos foi avaliada seguindo-se o método de oxidação do TNB a DTNB (FIGURA 15) com queda da absorbância em 412nm , segundo Ching et al. (1994) com algumas modificações.

Figura 15. Estruturas moleculares do DTNB e do TNB



O TNB foi preparado a partir do DTNB e a sua concentração foi determinada espectrofotometricamente, através de seu coeficiente de extinção molar em 412 nm ($13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; CHING et al., 1994). Da mesma forma determinou-se a concentração para H_2O_2 ($80 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em 230nm; BRESTEL, 1985).

As reações foram efetuadas em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0 à temperatura de 25°C. O experimento foi realizado em placa de poliestireno de 96 poços de fundo chato.

Pipetou-se a amostra (em diferentes concentrações), seguida por tampão (q.s.p. volume final da reação = 250 μL), TNB (70 μM) e H_2O_2 (100 μM). Incubou-se por 2 horas e leu-se a absorvância em 412nm. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão das porcentagens de inibição calculadas através da equação 2.

4.3.9 OBTENÇÃO DE NEUTRÓFILOS

4.3.9.1 COLETA DO SANGUE VENOSO

Foi coletado 10 mL de sangue humano venoso por punção da veia antecubital mediana, na fossa antecubital, utilizando tubos à vácuo contendo heparina como anticoagulante. Antes da realização do procedimento, foram separados todos os materiais necessários para a coleta, tubos, garrote, luvas, algodão, álcool 70% e seringas com agulha descartáveis tendo o cuidado de descartar a agulha em recipiente próprio para materiais perfuro cortantes.

Os procedimentos de coleta foram conduzidos por pessoal treinado e capacitado para tal procedimento e obedeceram as recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial para coleta de sangue venoso (2013). A coleta do material

biológico foi devidamente registrada e autorizada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFVJM (ANEXO D).

Após a utilização da amostra biológica nas análises, todo o material remanescente foi descartado ou estocado por tempo suficiente para repetição dos experimentos, quando necessário.

4.3.9.2 ISOLAMENTO DOS NEUTRÓFILOS

Os neutrófilos foram isolados do sangue total utilizando a metodologia da gelatina descrita por Lucisano e Mantovani, 1984 com algumas modificações.

O sangue coletado foi dividido em volumes iguais em diferentes tubos cônicos de centrífuga que foram centrifugados a 1000g por 10 minutos. Após a centrifugação o plasma foi descartado junto com a camada de mononucleares.

Foi adicionada gelatina 2,5% p/v em NaCl 0,15M na quantidade equivalente a duas vezes o volume de células restante (precipitado). Os tubos foram homogeneizados e mantidos em banho-maria a 37° por 30 minutos.

Ao término do intervalo de 30 minutos, foi recolhido o sobrenadante com auxílio de uma pipeta de Pasteur e transferido para outro tubo cônico para centrífuga limpo. Adicionou-se NaCl 0,15M na quantidade equivalente a duas vezes o volume do sobrenadante. Os tubos foram homogeneizados e submetidos à centrifugação a 650g por 10 minutos (sem refrigeração). Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado.

Adicionou-se ao precipitado solução de lise (NH_4Cl 0,83%, pH 7,2) na quantidade equivalente a duas vezes o volume do precipitado. A mistura foi homogeneizada e mantida em repouso em banho-maria a 37°C por 5 minutos. Após o intervalo, realizou-se a centrifugação a 650g por 10 minutos em seguida o sobrenadante foi descartado.

A etapa de lise deve ser repetida até que se obtenha um precipitado com o mínimo possível de hemácias.

Lavou-se o precipitado com solução de NaCl 0,15 M e centrifugou o tubo a 650g por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspendido para volume final de 1 mL com solução de PBS.

4.3.9.3 CONTAGEM EM CÂMARA DE NEUBAUER

A contagem dos neutrófilos foi realizada em câmara de Neubauer. Uma alíquota da suspensão de células foi diluída na proporção de 1:20 com Líquido de Tuerck e contou-se as células nos quatro quadrantes externos da câmara.

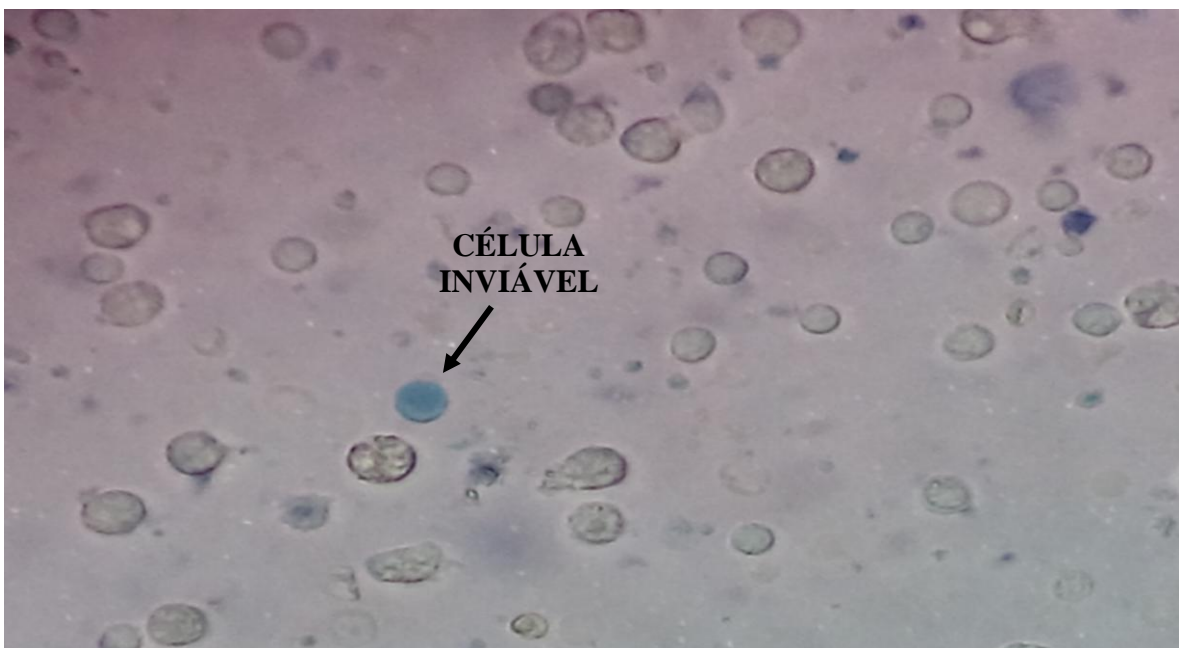
4.3.9.4 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR ATRAVÉS DO MÉTODO DO AZUL DE TRYPAN

Este método avalia a viabilidade celular através da integridade da membrana. As células viáveis, que possuem a membrana íntegra apresentam-se com aspecto translúcido, uma vez que não conseguem internalizar o corante, já as células inviáveis, que não possuem uma integridade de membrana, internalizam o corante azul de tripan e apresentam uma coloração azul-arroxeadada (FIGURA 16).

A viabilidade foi analisada com o corante Azul de Trypan 0,04%, sendo utilizado na proporção volume/volume com a suspensão de células. Após a mistura do corante com a suspensão de células realizou-se a contagem de células viáveis e inviáveis na câmara de Neubauer.

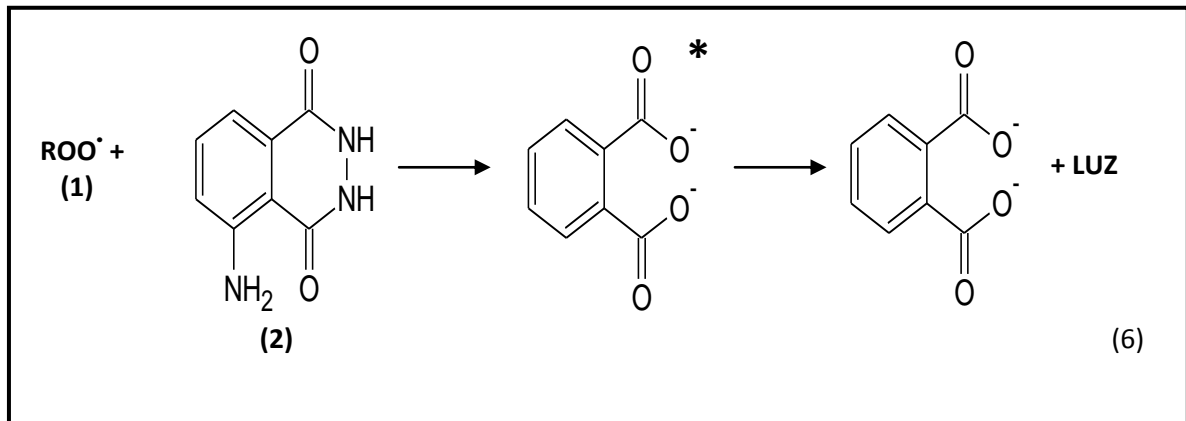
A porcentagem encontrada para as células viáveis foi superior a 95%.

Figura 16. Ensaio de viabilidade celular dos neutrófilos com o corante Azul de Trypan.



4.3.10 AVALIAÇÃO DO *BURST* OXIDATIVO EM NEUTRÓFILOS ESTIMULADOS

Quando os neutrófilos são ativados, as ERO geradas podem, via oxidação, converter moléculas como o luminol a derivados intermediários instáveis e excitados, que quando retornam ao seu estado fundamental emitem luz na forma de fótons (reação 6) (URBACZECK, 2008).



Reação do luminol (2) com radicais alquil-peroxilas (1) em meio alcalino para geração de luz

Esta produção de luz durante a reação química é conhecida por quimioluminescência (QLum) e é uma das principais características do *burst* oxidativo, podendo ser um indicador da ativação do metabolismo oxidativo. Desta forma, o luminol tem sido utilizado, como sonda quimioluminescente no estudo do metabolismo oxidativo dos neutrófilos.

A análise do *burst* oxidativo foi realizada seguindo a metodologia de oxidação do luminol, descrito por Kanashiro et al., 2004. Os neutrófilos, estimulados após o contato com o PMA, produzem ERO com alto poder de oxidação. Tais espécies oxidam as moléculas do luminol gerando luz que é detectada e quantificada pelo leitor de microplacas. Quanto maior for a intensidade de luz produzida, maior o número de moléculas do luminol estão sendo oxidadas.

Quando a suspensão de neutrófilos for incubada com os extratos, espera-se que os mesmos exercem um efeito protetor, neutralizando as ERO produzidas após a ativação dos neutrófilos e impedindo a oxidação das moléculas do luminol.

Em microplaca branca de 96 cavidades adicionou-se neutrófilos 1×10^6 /ml em PBS, luminol 0,28 mM e extratos dissolvidos em DMSO 5% (em tampão PBS) e incubou-se por 3 minutos a temperatura de $37^{\circ}C$. O volume final da reação foi padronizado em 250 μ L.

A reação do *burst* oxidativo foi disparada com a adição do estímulo PMA na concentração final de $1 \times 10^{-7} \text{M}$. Após o disparo da reação, a produção de luz foi quantificada durante 15 minutos em multileitora de microplacas (Spectramax[®]).

Foi realizado um branco utilizando somente o solvente da reação (DMSO 5%) e também um controle da Qlum dos neutrófilos sem o estímulo.

Os testes foram realizados em triplicata e a intensidade da Qlum foi obtida através da área sobre a curva (AUC). Os resultados foram convertidos em % inibição da Qlum calculado a partir da equação 3 e foram obtidas as EC_{50} dos extratos (KANASHIRO et al., 2004).

$$\% \text{ Inibição da Qlum} = [1 - (AUC_{\text{amostra}} / AUC_{\text{controle}})] \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

4.3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram realizados em triplicatas ($n=3$) e os resultados foram apresentados como a média \pm desvio padrão da média das repetições. Para detectar as diferenças entre as médias e avaliar estas diferenças ao longo do tempo foi utilizada análise de variância (ANOVA), com post hoc de Tukey ou Teste t na dependência do protocolo. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. O software utilizado foi o Microcal Origin (Scientific Graphing and Analysis Software) versão 7.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ENSAIO PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS

O Gráfico 1 representa a curva de calibração obtida utilizando concentrações conhecidas do padrão AG. Essa curva foi realizada para determinar a concentração dos compostos fenólicos nos extratos em estudo.

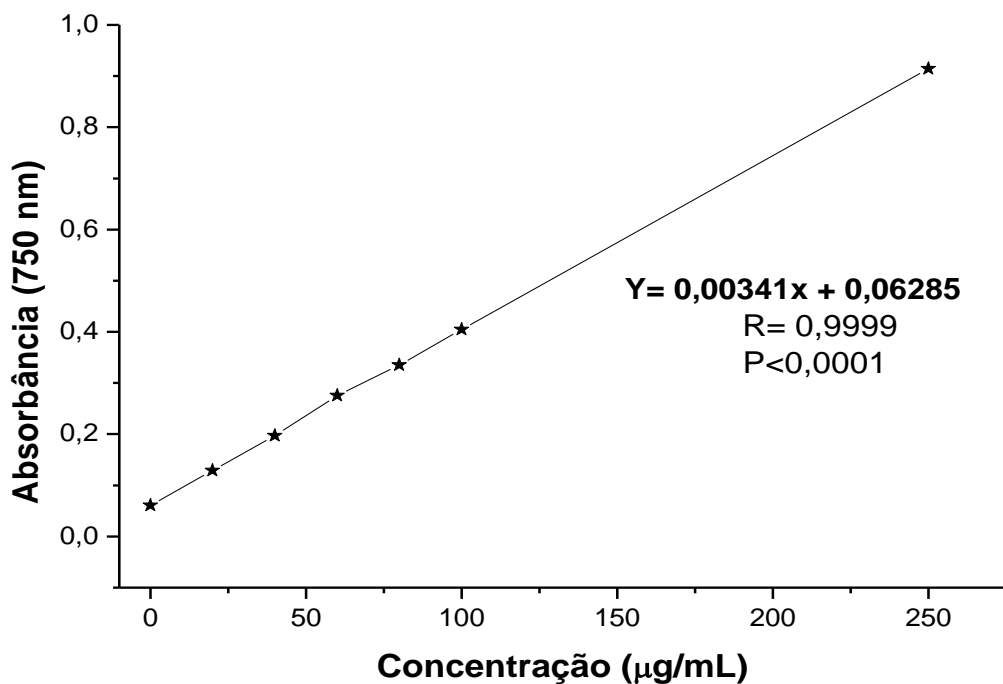


Gráfico 1. Curva de regressão linear do padrão AG (n=3)

À medida que se aumenta a concentração do AG verifica-se um aumento gradual na leitura da absorbância, no comprimento de onda de 750 nm, o que demonstra uma determinada linearidade entre o aumento das medidas. A linearidade da equação obtida pode ser confirmada através do coeficiente de determinação R (0,9999), cujo valor quanto mais próximo de 1, demonstra um comportamento linear entre as medidas X (concentração) e Y (absorbância) e também pelo valor de p (<0,0001), que quanto menor for esse valor, maior será a relação de dependência entre os valores.

A curva de calibração do padrão AG foi utilizada para o cálculo do teor de compostos fenólicos, apresentados no Gráfico 2 em miligramas de FT expressos em EAG/g de extrato.

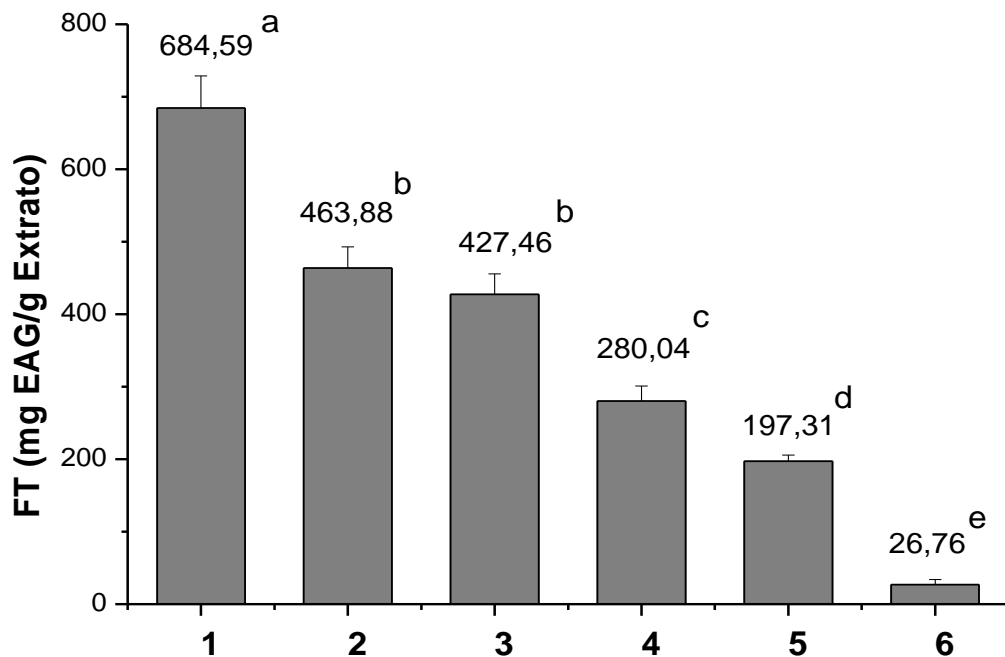


Gráfico 2. Teor de Fenólicos Totais (FT) expresso em mg EAG/g de Extrato (n=3). Letras iguais correspondem a resultados que não obtiveram diferença estatisticamente significativa (ANOVA, Tukey $n < 0,05$). 1 - *N. adamantium*; 2 - *K. rubriflora*; 3 - *C. antisiphiliticus* (caule); 4 - *C. antisiphiliticus* (folhas) 5 - *M. ferruginata*; 6 - *A. fastigiatum*.

O extrato etanólico das partes aéreas de *Norantea adamantium* foi o que apresentou maior teor de compostos fenólicos dentre os extratos testados, seguidos por *K. rubriflora* e *C. antisiphiliticus* (caule) que não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si, seguidos de *C. antisiphiliticus* (folhas), *M. ferruginata* e com o menor valor de FT, a *A. fastigiatum*.

Souza e colaboradores (2007) analisando o teor de compostos fenólicos de cinco plantas medicinais do semi árido piauiense encontrou valores de FT variando de 250 a 763 mg FT em EAG/g de extrato e as espécies apresentavam atividades antioxidantes satisfatórias. Roesler e seus colaboradores (2007) analisando a capacidade antioxidante de algumas frutas do Cerrado comprovaram a atividade antioxidante de alguns extratos cujos teores de FT encontrados variavam de 99,18 a 209,37 mg FT EAG/g de extrato. Chaves e seus colaboradores (2010) demonstraram a atividade antioxidante de extratos de *Anacardium occidentale* L. cujos valores de FT encontrados foram de 345,16 e 185,44 mg de EAG/g de extrato. Sá et al., (2012) também demonstraram que a atividade antioxidante está diretamente relacionada à presença de compostos fenólicos nos extratos, comprovando a atividade antioxidante em extratos cujos teores de FT encontrados foram em torno de 65 mg de FT em

EAG/g de extrato. Rolim et al. (2013), avaliando a constituição química e atividade antioxidante de *Byrsonima gardneriana* (Malpighiaceae) encontraram resultados de FT variando de 80 a 509 mg FT em EAG/g extrato, e comprovaram que os extratos possuíam atividade antioxidante satisfatória, quando comparadas ao padrão de referência Trolox.

Comparando os resultados de FT encontrados por alguns autores na literatura que utilizaram a mesma metodologia apresentada no presente estudo, pode-se verificar que os extratos em estudo, exceto o da *Ageratum fastigiatum*, apresentam altas concentrações de compostos fenólicos.

O teor de FT é extremamente importante para agregar potencial antioxidante a uma espécie vegetal, principalmente pelas suas características estruturais, que permitem um maior potencial de captura e estabilidade da energia ativa de espécies radicalares.

5.2 ENSAIO PARA DETERMINAÇÃO DO PODER REDUTOR

O poder redutor foi avaliado comparando-se o valor da absorbância obtida por cada concentração do extrato com as respectivas absorbâncias obtidas para as concentrações do padrão de referência AG (APÊNDICE B). Utilizou-se como 100% de atividade redutora a absorbância do padrão AG nas concentrações referidas para cada amostra (50, 100, 150, 250 e 350 µg/mL). Convertem-se os valores de absorbância de cada concentração das amostras em porcentagem de redução relacionada ao padrão através de uma regra de três simples. Os resultados foram apresentados como Porcentagem de redução em relação ao padrão versus as concentrações dos extratos (APÊNDICE C).

A partir desses valores de porcentagem de redução, foi calculada a Concentração Eficiente (CE_{50}) equivalente a 50% do poder de redução do padrão para cada extrato testado utilizando o programa Microcal Origin versão 8.0 (GRÁFICO 3); (pág. 55)

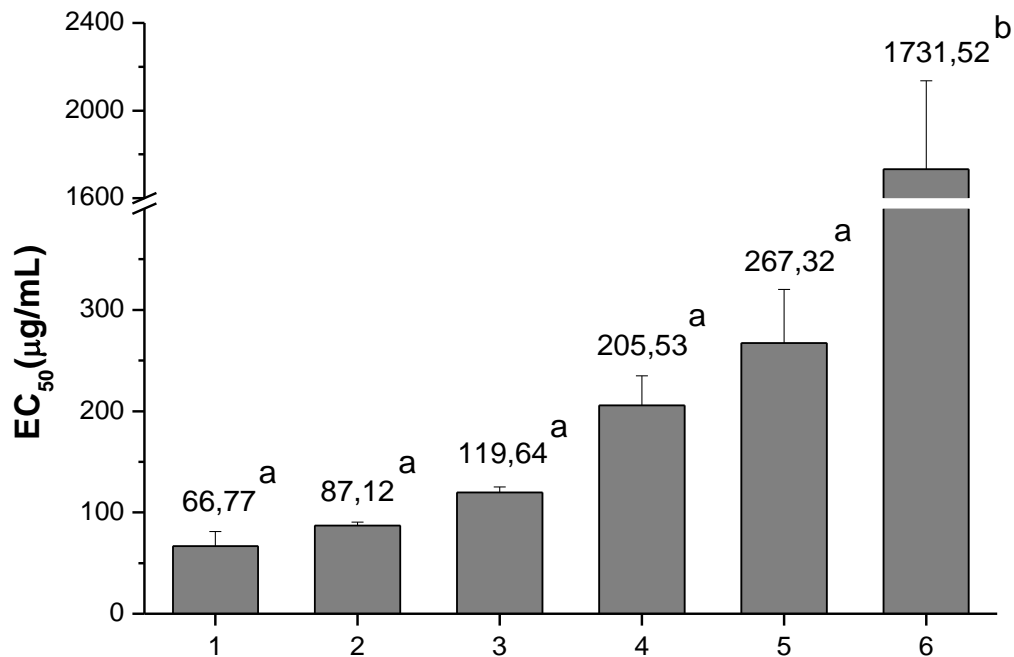


Gráfico 3. Poder Redutor, expresso em EC₅₀ (µg/mL). Letras iguais correspondem a valores que não apresentam diferença estatisticamente significativa (ANOVA, TUKEY $n < 0,05$), $n = 3 \pm dp$ da média. 1- *N. adamantium*; 2- *K. rubriflora*; 3- *C. antisiphiliticus* (caule); 4- *C. antisiphiliticus* (folhas) 5- *M. ferruginata*; 6- *A. fastigiatum*

Os valores de EC₅₀ encontrados para todos os extratos, exceto a *A. fastigiatum* não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si, o que demonstra que todos os demais extratos possuem um bom poder de redução.

Os resultados do poder redutor corroboram com os resultados encontrados para o teor de fenólicos totais, uma vez que, o extrato que apresentou menor valor de FT (26,76 mg FT em EAG/g Extrato) foi o que apresentou o maior valor para EC₅₀ do poder de redução (EC₅₀= 1731,52 µg/mL). OLIVEIRA et al., (2011) verificaram uma correlação positiva entre a concentração de compostos fenólicos e o poder redutor dos extratos.

Analisando os resultados individuais de cada extrato (APÊNDICE C) pode-se verificar que quanto maior a concentração do extrato maior parece ser o poder de redução do mesmo, demonstrando que o poder redutor dos extratos é dose dependente, assim como descrito por Silva et al., (2009) e por Diego (2013).

Dentre os extratos analisados o único que não apresentou resultado satisfatório para o poder redutor foi a *A. fastigiatum*, possivelmente devido ao fato deste extrato ter apresentado o menor valor de concentração para compostos fenólicos.

5.3 ENSAIO DE CAPTURA DO RADICAL DPPH[•]

A atividade de captura do radical DPPH[•] foi realizada segundo metodologia descrita por Duarte e Almeida, 2006. Os valores das absorbâncias, medidos em 515nm, foram convertidos em porcentagem de inibição utilizando a Eq. 1 (pág. 48) (VELLOSA, 2005).

Através dos gráficos de porcentagem de inibição versus concentração (APÊNDICE D) foi calculada a Concentração Eficiente para captura de 50% do radical livre DPPH[•] (EC₅₀) das amostras e do padrão de referência AG (GRÁFICO 4).

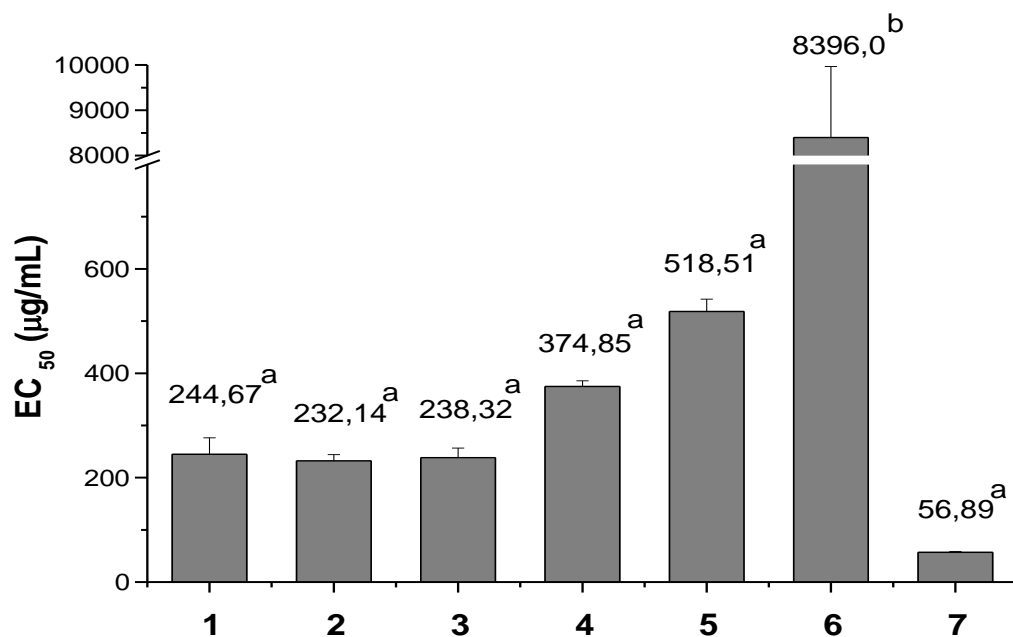


Gráfico 4. Atividade antioxidante – Captura do radical DPPH[•]. Letras iguais correspondem a valores que não possuem diferença estatisticamente significativa, letras diferentes indicam valores que obtiveram diferença estatisticamente significativa, ANOVA, Tukey com $n < 0,05$ ($n=3$, média \pm dp da média). 1- *N. adamantium*; 2- *K. rubriflora*; 3- *C. antisiphiliticus* (caule); 4- *C. antisiphiliticus* (folhas) 5- *M. ferruginata*; 6- *A. fastigiatum*; 7- Ác. gálico

Os resultados foram comparados ao padrão de referência AG e pode-se verificar que *A. fastigiatum* foi o único extrato que apresentou um valor EC₅₀ com diferença estatística significativa em comparação ao padrão AG.

Melo et al. (2008), avaliando a capacidade antioxidante de frutas *in natura* pelo método de captura de radicais DPPH[•], classificou as frutas em: forte poder antioxidante, quando capturavam acima de 70% dos radicais DPPH; moderado poder antioxidante, quando capturavam entre 50 e 70% e de fraca atividade antioxidante, quando capturavam menos de 50% dos radicais. Sousa et al., (2011) avaliando a atividade antioxidante de extratos de resíduos de polpas de frutas tropicais pelo método de captura do radical DPPH[•] obtiveram

resultados de EC_{50} de $386,46 \pm 1,41 \mu\text{g/mL}$ para frutas classificadas como forte poder antioxidante e resultado de $556,39 \pm 6,36 \mu\text{g/mL}$, classificadas como fraco poder antioxidante, segundo Melo et al., (2008)

Baseado na classificação descrita por Melo et al., 2008, e os resultados encontrados por Sousa et al., (2011) pode-se observar que todos os extratos apresentaram forte poder antioxidante, exceto a *A. fastigiatum* que apresentou um resultado de $EC_{50} = 8396 \mu\text{g/mL}$.

Os resultados de EC_{50} encontrados para todos os extratos, exceto para *Ageratum fastigiatum*, foram melhores que os resultados encontrados por Rocha et al. (2013), que avaliou a atividade antioxidante de alguns frutos característicos do cerrado piauiense.

Segundo Campos et al., (2003) os extratos e substâncias são considerados ativos quando apresentam $EC_{50} < 500\mu\text{g/mL}$, assim sendo, com exceção da *A. fastigiatum*, todos os demais extratos são considerados ativos para a atividade de captura do radical DPPH \cdot .

Um alto valor de EC_{50} reflete uma baixa capacidade de captura do radical em questão e conseqüentemente uma baixa capacidade protetora frente ao ataque de espécies radicalares.

Os resultados encontrados para os extratos corroboram com os resultados do poder redutor e dos teores de compostos fenólicos, uma vez que os extratos que apresentaram altos teores de compostos fenólicos foram os que apresentaram melhor poder de redução e também apresentaram uma boa ação de captura do radical DPPH \cdot , ao passo que o extrato que obteve a menor concentração de compostos fenólicos e o pior resultado de poder de redutor (*A. fastigiatum*), apresentou baixa capacidade de captura frente ao radical DPPH \cdot (APÊNDICE E).

A atividade de captura do radical DPPH \cdot é um importante método, amplamente utilizado para avaliar a capacidade antioxidante de substâncias isoladas e de extratos vegetais.

5.4 ENSAIO DE CAPTURA DO RADICAL ABTS \bullet^+

A atividade de captura do radical ABTS \bullet^+ foi apresentada como porcentagem de inibição para cada concentração dos extratos, calculada a partir da conversão do valor encontrado na leitura da absorbância utilizando a Eq. 1, descrito na metodologia.

Os gráficos de porcentagem de inibição versus a concentração para cada extrato e para o padrão AG foram plotados utilizando o programa Microcal Origin 7.0 (APÊNDICE F). A partir destes gráficos calculou-se a EC_{50} para a captura do radical catiônico ABTS \bullet^+ dos extratos e do padrão AG, através de regressão linear das retas obtidas com as concentrações versus a porcentagem de inibição para cada extrato (GRÁFICO 5).

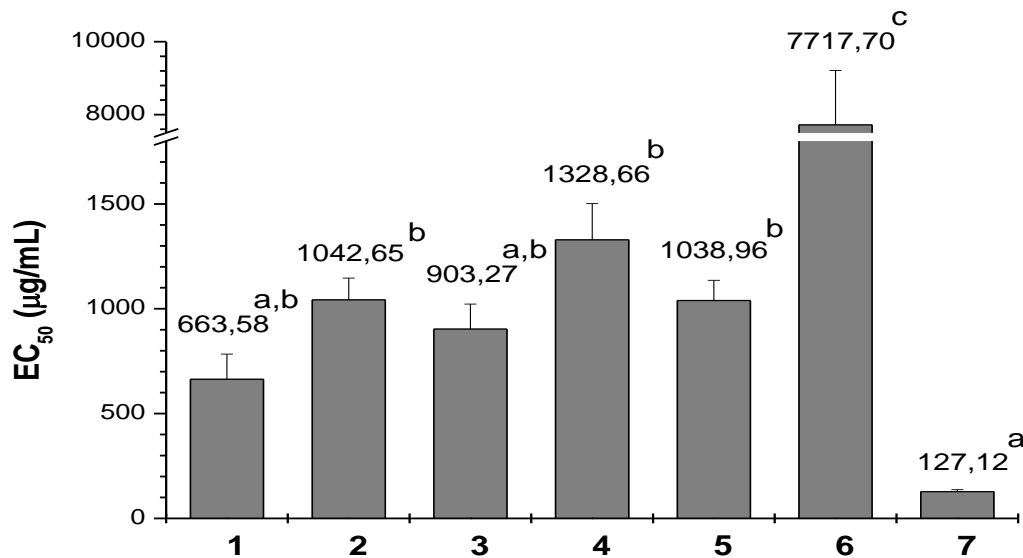


Gráfico 5. Atividade antioxidante – captura do radical cationico ABTS^{•+}. Valores apresentados como concentração eficiente para captura de 50% do radical. Letras iguais correspondem a valores que não apresentam diferença estatisticamente significativa (ANOVA, Tukey $n < 0,05$). Resultados apresentados como média \pm dp da média ($n=3$). 1 – *N. adamantium*; 2 – *C. antisyphiliticus* (folhas); 3 – *C. antisyphiliticus* (caule); 4 – *M. ferruginata*; 5 – *K. rubriflora*; 6 – *A. fastigiatum*; 7 - AG

Os extratos da *N. adamantium* (1) e *C. antisyphiliticus* – caule (3) não apresentaram diferença estatisticamente significativas quando comparados ao padrão AG, já os demais apresentaram EC₅₀ estatisticamente diferente em relação ao padrão.

A *A. fastigiatum* apresentou um valor extremamente alto para o EC₅₀ em comparação ao padrão e aos demais extratos analisados. Os extratos 1, 2, 3, 4 e 5 não apresentaram resultados com diferença estatística significativa entre si.

Os extratos que melhor exerceram atividade de captura do radical ABTS^{•+} foram *N. adamantium* e *C. antisyphiliticus* (caule) os demais extratos apresentaram valores de EC₅₀ relativamente altos em relação ao padrão de referência AG.

Castro (2012) avaliando a capacidade antioxidante de frutas brasileiras encontrou resultados de EC₅₀ para a captura do radical ABTS^{•+} variando de 100 a 3000 µg/mL. Velloso (2005) encontrou melhores resultados quando utilizou frações de extratos. No presente estudo e no estudo conduzido por Castro (2012) foram utilizados extratos brutos, o que parece interferir na atividade de captura dos radicais.

Os resultados do ensaio de captura do radical ABTS^{•+} corroboram com os teores de compostos fenólicos encontrados, o que parece demonstrar uma relação direta entre o conteúdo de tais compostos e a atividade antioxidante dos extratos. A atividade de captura do

radical $ABTS^{*+}$ também parece ser dose-dependente, pois à medida que se aumentou a concentração dos extratos aumentou também o poder de inibição frente ao radical $ABTS^{*+}$. Observando todos os resultados agrupados (APÊNDICE G) pode-se verificar que o extrato da *A. fastigiatum* apresentou uma atividade de captura do radical $ABTS^{*+}$ bem inferior aos demais extratos e ao padrão AG.

5.5 ENSAIO DE CAPTURA DO H_2O_2

A capacidade dos extratos em capturar o reagente H_2O_2 é apresentada como porcentagem de inibição deste reagente pelos extratos em diferentes concentrações (APÊNDICE H). A porcentagem de inibição foi calculada utilizando a Eq. 2 (pág.49).

Em concentrações inferiores a $250 \mu\text{g/mL}$ os extratos não apresentaram resultados com diferenças estatisticamente significativas, a porcentagem de inibição não chegou a 10% para nenhum dos extratos testados (APÊNDICE H). A *N. adamantium* e a *C. antisiphiliticus* (folhas) apresentaram melhores resultados a partir da concentração de $250 \mu\text{g/mL}$, uma vez que as porcentagens de captura obtidas apresentaram diferença estatística significativa quando comparados aos resultados em concentrações inferiores (APÊNDICE H). Porém, os melhores resultados de captura do H_2O_2 foram obtidos com a concentração de $1000 \mu\text{g/mL}$ e estão representados no GRÁFICO 6 (pág. 63).

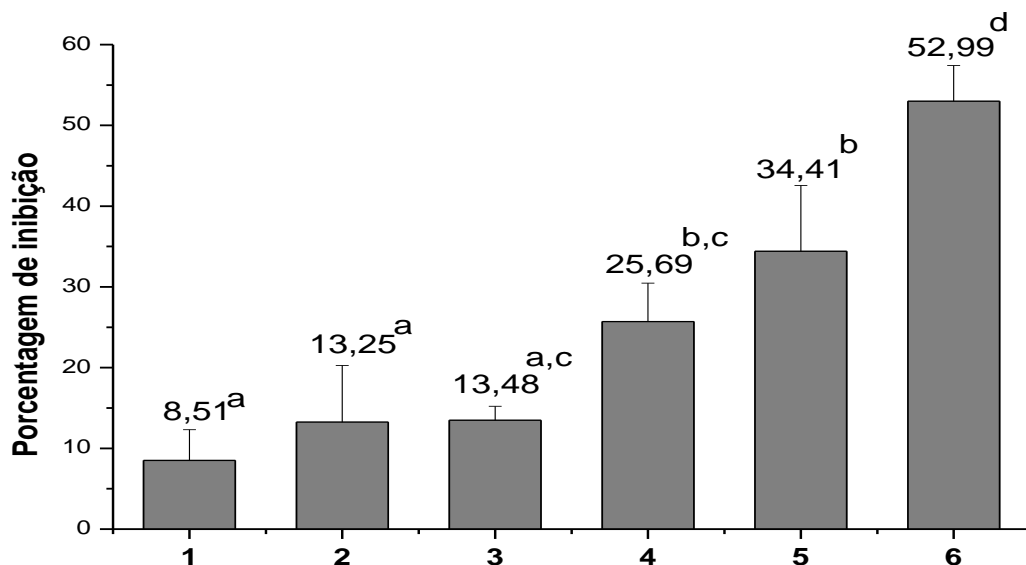


Gráfico 6. Atividade antioxidante - Captura do H_2O_2 - concentração dos extratos $1000 \mu\text{g/mL}$. Letras iguais correspondem a resultados que não possuem diferença estatisticamente significativa (ANOVA, Tuckey, $p < 0,05$)
 1 – *C. antisiphiliticus* (caule); 2 – *K. rubriflora*; 3 – *A. fastigiatum*; 4 – *N. adamantium*; 5 – *M. ferruginata*; 6 – *C. antisiphiliticus* (folhas).

Analisando o gráfico 6 pode-se verificar que os extratos mais potentes na captura do H_2O_2 , considerando a concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ foram: a *C. antisiphiliticus* (folhas), que apresentou a maior porcentagem de inibição (52,99%); a *N. adamantium* (34,41%) e *M. ferruginata* (25,69%) que não apresentaram diferença estatisticamente significativas entre si. Entre os menores valores de inibição ficaram a *A. fastigiatum* (13,48%), a *K. rubriflora* (13,25%) e a *C. antisiphiliticus* (caule) (8,51%), as três também não apresentaram diferença estatisticamente significativas entre si.

Vellosa (2005) avaliou a capacidade antioxidante de vários extratos vegetais de algumas plantas brasileiras e não obteve atividade de captura de H_2O_2 para nenhum dos extratos em estudo, porém, a maior concentração utilizada no estudo foi de 20 $\mu\text{g/mL}$. Castro (2012), avaliando a capacidade antioxidante de algumas frutas, não obteve resultados positivos para a captura do H_2O_2 , possivelmente devido às baixas concentrações dos extratos utilizados no estudo.

Os compostos que apresentam a ação de capturar o H_2O_2 exercem um efeito adicional protetor ao organismo, visto que esse composto participa da geração de várias espécies radicalares potencialmente tóxicas às células, além de atuar na peroxidação lipídica. Porém, conforme demonstrado nos resultados, no presente estudo encontramos valores satisfatórios para concentrações muito elevadas do extrato, o que não sabemos ser viável, pois estudos de toxicidade para tais extratos devem ser realizados.

5.6 ENSAIO DE CAPTURA DO HOCl

A ação de captura do HOCl foi avaliada seguindo-se a metodologia de oxidação do TNB a DTNB, com decréscimo da absorbância em 412nm, proposta por Ching et al, (1994) com algumas modificações. Quanto menor for a absorbância final da reação, menor será a capacidade do extrato em capturar o reagente oxidante HOCL.

Os resultados das absorbâncias foram convertidos em porcentagem de inibição utilizando a Eq. 2 citada na metodologia e os gráficos foram apresentados em porcentagem de inibição versus concentração em $\mu\text{g/mL}$ para cada extrato testado (GRÁFICO 7 A-F).

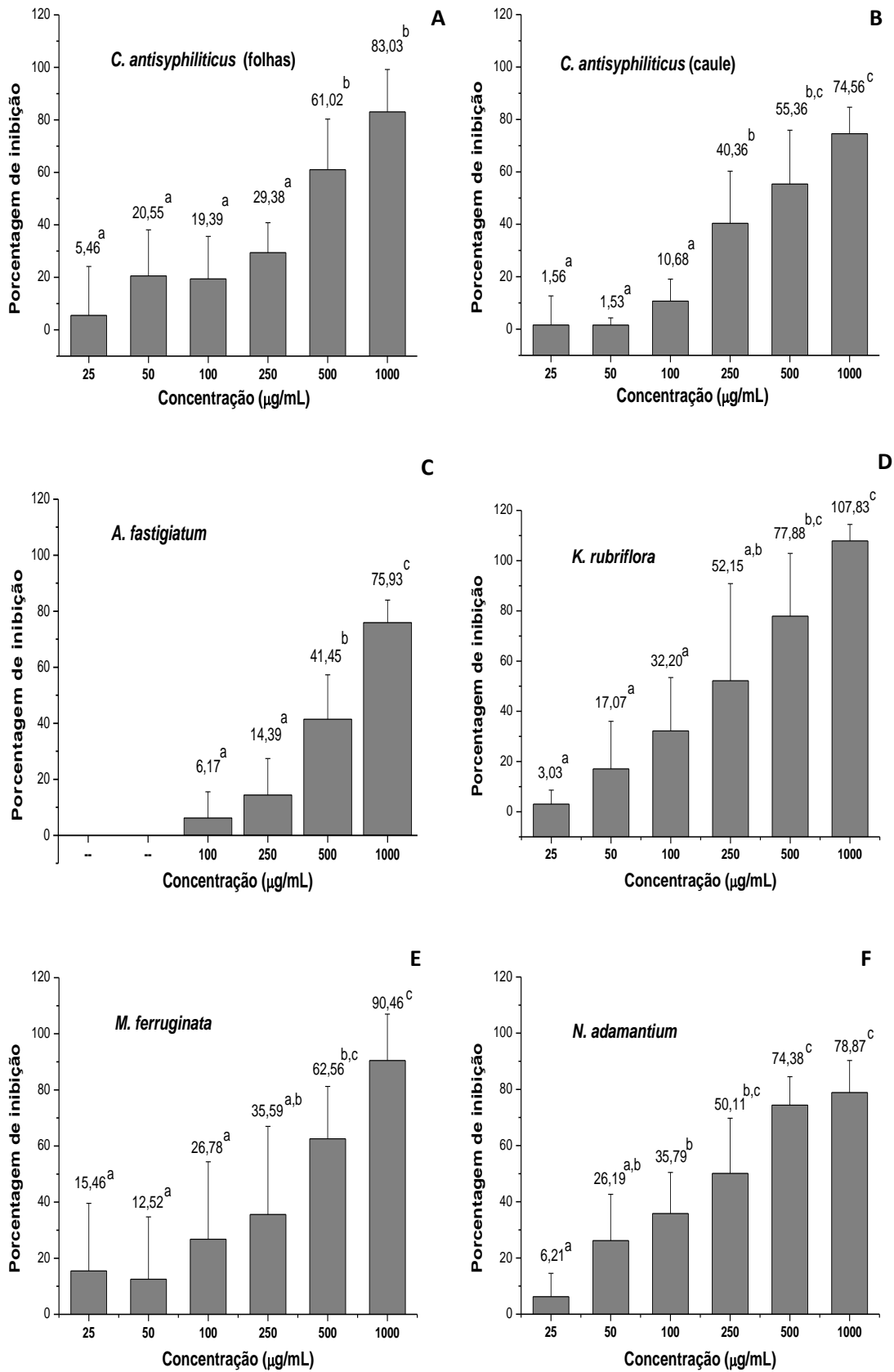


Gráfico 7 A-F. Atividade antioxidante - Captura do HOCl, método de oxidação do TNB. Letras iguais correspondem a valores que não apresentam diferenças estatisticamente significativas (Anova, Tukey, $p < 0,05$).

Analisando os resultados apresentados no gráfico 7 pode-se verificar que todos os extratos apresentaram atividade de captura frente ao reagente HOCl em todas as concentrações testadas, exceto o extrato da *A. fastigiatum* (Gráfico 7-C) que não apresentou atividade nas concentrações abaixo de 100 µg/mL.

A partir dos resultados encontrados, pode-se presumir que os extratos apresentam uma relação de dose-dependência para a atividade de captura do HOCl, uma vez que quanto maior a concentração testada, maiores foram os resultados encontrados para a porcentagem de inibição. Nunes (2016) também verificou uma relação de dose-dependência, estudando a atividade de captura do HOCl de extratos etanólicos de *Baccharis trimera* (Less) DC.

Todos os extratos foram eficientes na captura do HOCl pois atingiram o patamar de 50% de inibição, quando testados nas maiores concentrações. Os resultados das porcentagens de inibição dos extratos nas concentrações de 250, 500 e 1000 µg/mL estão apresentados no Gráfico 8.

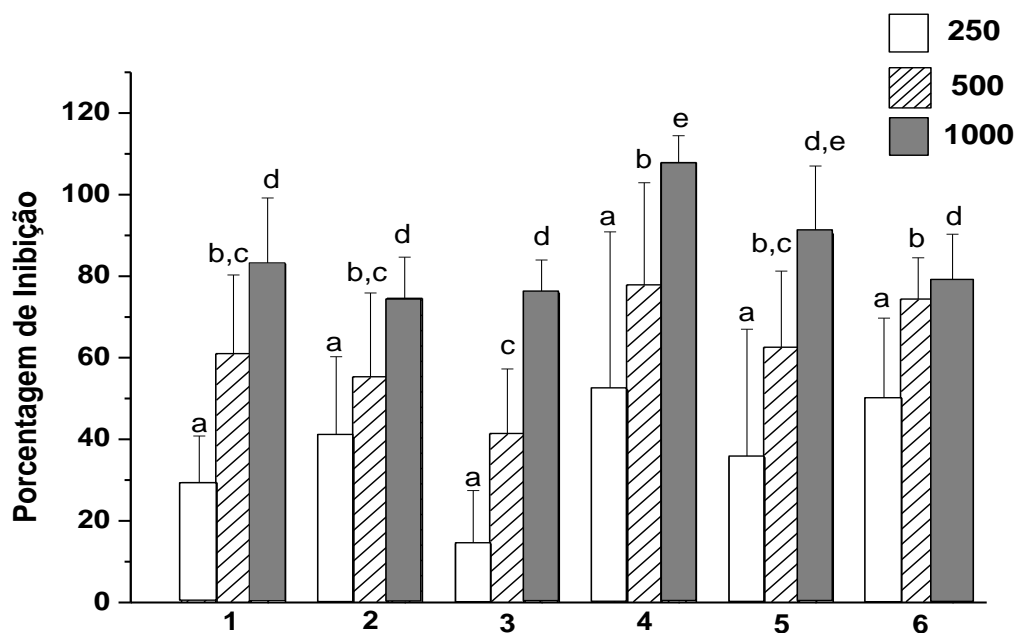


Gráfico 8. Atividade antioxidante – captura de HOCl nas concentrações de 250, 500 e 1000 µg/mL. Letras e símbolos iguais correspondem a valores que não obtiveram diferença estatisticamente significativa entre si. A análise estatística foi realizada entre as concentrações iguais para cada extrato (Anova, Tuckey com $p < 0,05$)
1 - *C. antisiphiliticus* (folhas); 2 - *C. antisiphiliticus* (caule); 3 - *A. fastigiatum*; 4 - *K. rubriflora*; 5 - *M. ferruginata*; 6 - *N. adamantium*;

Analisando o gráfico 8 pode-se verificar que na concentração de 250 µg/mL todos os extratos exerceram atividade de captura do HOCl e não houve nenhuma diferença estatisticamente significativa entre eles. Na concentração de 500 µg/mL pode-se verificar que

o extrato da *A. fastigiatum* foi o único que apresentou diferença estatística significativa em comparação com os valores encontrados para a *K. rubriflora* e *N. adamantium*.

Na maior concentração testada (1000 µg/mL) os extratos da *K. rubriflora* e da *M. ferruginata* apresentaram a melhor atividade de captura do HOCl com porcentagens de inibição em torno de 90-100 %. Os demais extratos também apresentaram atividade de captura nessa mesma concentração e não obtiveram diferença estatística significativa entre as porcentagens de inibição encontradas.

Alguns autores encontraram melhores resultados de porcentagem de inibição em concentrações mais baixas. Porém, assim como descrito por Velloso (2008), a maioria dos experimentos foi realizada com metabólitos isolados e purificados de extratos de plantas que já se conhecia uma atividade antioxidante intrínseca. Acredita-se que quanto menos interferentes houver na amostra, melhor será a atividade de captura frente ao HOCl.

Outro fator interferente que exerce considerável influência na atividade de captura do HOCl é o método de extração e o solvente utilizado, uma vez que essa atividade está diretamente relacionada com as substâncias químicas extraídas das plantas. Velloso (2008) analisou a atividade de captura do HOCl em extratos obtidos por diferentes métodos de extração e concluiu que os extratos etanólicos obtidos por ultrassom exerceram atividade de captura ligeiramente maior que os extratos obtidos por maceração, provavelmente devido ao maior poder de penetração do ultrassom sobre as estruturas das plantas.

Uma possibilidade de melhorar a atividade de captura dos extratos em estudo seria realizar uma nova extração utilizando a metodologia do ultrassom.

5.7 AVALIAÇÃO DO BURST OXIDATIVO EM NEUTRÓFILOS ESTIMULADOS

A análise do *burst* oxidativo nos permite identificar quais extratos possuem atividade diretamente relacionada à inibição da produção ou inativação de espécies reativas oxidativas produzidas por neutrófilos estimulados. Uma vez estimulados com o PMA os neutrófilos são ativados e começam uma produção em cascata de espécies oxidativas.

Essas espécies recém-produzidas convertem moléculas como o luminol a derivados intermediários instáveis e excitados, que quando retornam ao seu estado fundamental emitem luz na forma de fótons. A luz produzida é detectada pelo equipamento e apresenta uma correlação diretamente proporcional com a quantidade de espécies reativas formadas (URBACZECK, 2008; OLIVEIRA et al., 2012).

Quanto maior a intensidade de luz produzida, um maior número de moléculas do luminol está sendo oxidada e conseqüentemente menor a proteção exercida pelos extratos frente às espécies reativas.

A oxidação do luminol em meio aquoso, e conseqüentemente sua Qlum, pode ser obtida por vários agentes oxidantes como as EROs (peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso, radical ânion superóxido e mesmo o oxigênio singlete). A Qlum dependente de luminol é utilizada para a detecção de todas as ERO formadas no *burst* oxidativo, indistintamente (PARACATU, 2012).

A Qlum produzida foi quantificada na multileitora de microplacas (Spectramax®) e os resultados obtidos (AUC) foram convertidos em porcentagem de inibição para cada concentração dos extratos utilizando a Eq. 3 (pág.54). Os resultados obtidos a partir da equação 3 foram plotados no Origin 7.0 e apresentados como porcentagem de inibição versus concentração em µg/mL para cada extrato testado (APÊNDICE I). A partir dos gráficos de porcentagem de inibição versus a concentração foram obtidas as EC₅₀ de todos os extratos para melhor comparação dos resultados (GRÁFICO 9).

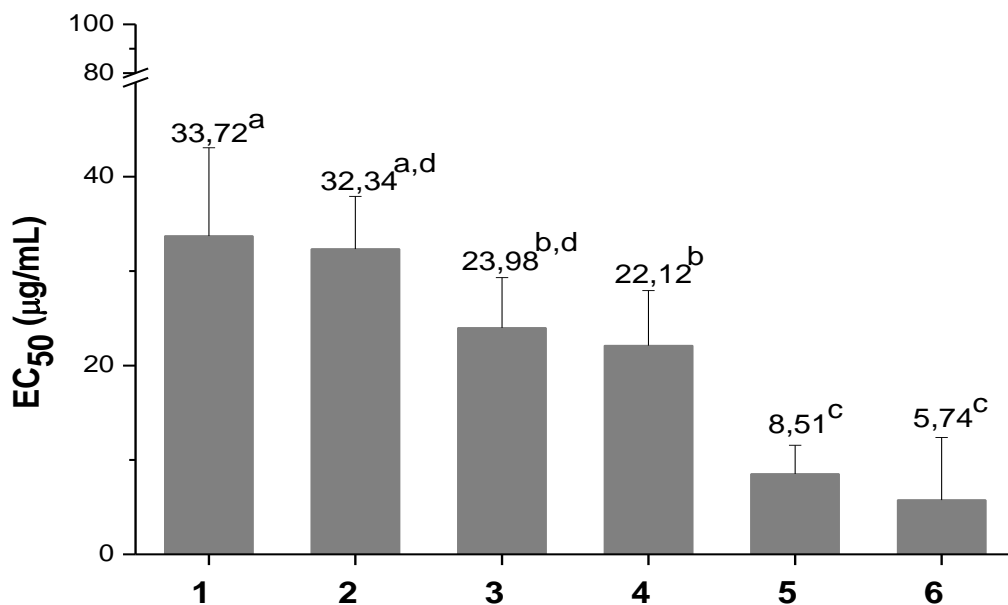


Gráfico 9. Inibição do *burst* oxidativo em neutrófilos humanos isolados estimulados com PMA – Resultados expressos como EC₅₀ dos respectivos extratos. Letras iguais correspondem a valores que não apresentam diferença estatisticamente significativa e letras diferentes apresentam diferença significativa (n = 9). ANOVA, Tukey com nível de significância <0,05. 1 - *N. adamantium*; 2 - *K. rubriflora*; 3 - *M. ferruginata*; 4 - *C. antisiphiliticus* (folhas); 5 - *C. antisiphiliticus* (caule); 6 - *A. fastigiatum*

Todas as espécies vegetais parecem ser eficientes na inibição ou inativação das espécies produzidas pelo *burst* oxidativo dos neutrófilos, uma vez que, apresentaram altas porcentagens de inibição em baixas concentrações dos extratos testados e atividade de inibição parece ser dose-dependente (APÊNDICE I).

Analisando os resultados do gráfico 9 pode-se verificar que os extratos que apresentaram menores valores de EC_{50} e que possuíram diferença estatisticamente significativa entre os demais foram a *A. fastigiatum* ($EC_{50} = 5,74 \mu\text{g/mL}$) e *C. antisiphiliticus* (caule) ($EC_{50} = 8,51 \mu\text{g/mL}$), seguidos por *C. antisiphiliticus* (folhas) e *M. ferruginata*, que não tiveram diferença estatisticamente significativa entre si e com os maiores valores de EC_{50} a *N. adamantium* e a *K. rubriflora*.

Oliveira (2012) estudando a atividade antiinflamatória de extrato de *Vaccinium corymbosum* (mirtilo), avaliou a capacidade de inibição do referido extrato no *burst* oxidativo de neutrófilos humanos isolados estimulados com PMA pela metodologia de oxidação do luminol e encontrou uma porcentagem de inibição em torno de 90% mesmo em concentrações baixas do seu extrato ($18\mu\text{g/mL}$), e também observou o comportamento dose-dependente. Fernandes (2013) estudando a padronização e avaliação biológica de extratos secos de *Psidium guajava* L., em ensaio semelhante obteve resultados de EC_{50} variando de 5 a 7 $\mu\text{g/mL}$ e também observou o comportamento dose-dependente dos extratos.

Os resultados encontrados no presente trabalho correlacionam-se com os resultados encontrados pela maioria dos autores na literatura.

Comparando os resultados de inibição do *burst* oxidativo com os teores de compostos fenólicos e poder redutor dos extratos, pode-se perceber que mesmo os extratos com menores teores de compostos fenólicos e baixo poder redutor, como a *A. fastigiatum* e *M. ferruginata*, apresentaram uma boa atividade inibitória do *burst* oxidativo frente a neutrófilos humanos estimulados, portanto presume-se que além dos compostos fenólicos, outros metabólitos presentes nestes extratos podem exercer influência na produção ou inativação das espécies reativas produzidas pelos neutrófilos.

Importante destacar que a análise do *burst* oxidativo não nos permite identificar quais espécies reativas estão sendo neutralizadas e também se os extratos exercem ou não atividade citotóxica frente aos neutrófilos, causando-lhes a morte, portanto, a análise dos resultados isolados não nos permite concluir que tais extratos exercem atividade inibitória eficiente sobre o *burst* oxidativo dos neutrófilos humanos, faz-se necessário um estudo de citotoxicidade dos mesmos.

5.8 CORRELAÇÕES ENTRE OS TEORES DE FT E AS EC₅₀ PARA CAPTURA DOS RADICAIS ABTS^{•+} E DPPH[•]

Estudos com diversas espécies botânicas têm demonstrado que os compostos fenólicos são, em maior parte, os responsáveis pelas atividades antioxidantes em extratos vegetais e, dentre estes, os flavonoides compõe o grupo que mais se destaca. Estima-se que quanto maior o teor de compostos fenólicos, maior será a capacidade dos extratos em capturar espécies radicalares (SUN et al., 2011; GHASEMZADEH et al., 2012)

A correlação foi obtida a partir da comparação dos resultados obtidos nos experimentos de atividade de captura dos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+} de cada extrato com os respectivos teores de FT encontrados. Foram plotados os valores de EC₅₀ versus o conteúdo de FT expressos em mg EAG/ g de extrato e a partir dos gráficos foram calculadas os coeficientes de correlação angular, também conhecido como correlação de Pearson (r).

O coeficiente de correlação r varia de -1 a 1, quanto mais próximo de zero, menor é a relação de linearidade entre as duas grandezas analisadas. Quanto mais próximo de 1, maior será a correlação entre as grandezas e as mesmas possuem uma relação diretamente proporcional, ou seja quando uma aumenta, a outra grandeza tende a aumentar, já quanto mais próximo de -1 for o valor do coeficiente r, maior será a correlação entre as grandezas analisadas, porém elas possuem uma relação inversamente proporcional, ou seja, quando uma grandeza aumenta a outra tende a diminuir o seu valor.

5.8.1 CORRELAÇÃO ENTRE FT (mg EAG/g extrato) e a atividade de captura do radical DPPH[•] (EC₅₀)

A correlação entre o conteúdo de FT e a atividade de captura do radical DPPH[•] foi realizada através da construção de um gráfico, onde foram plotados no eixo x os valores de FT, expressos em mg EAG/g de extrato e no eixo y as EC₅₀ expressas em µg/mL obtidas pelo método de captura do radical DPPH[•] para extrato analisado. A partir da construção do gráfico foi calculado o coeficiente de correlação r, utilizando o programa Microcal Origin 7.0.

Os resultados da correlação estão apresentados nos gráficos 10 A e B.

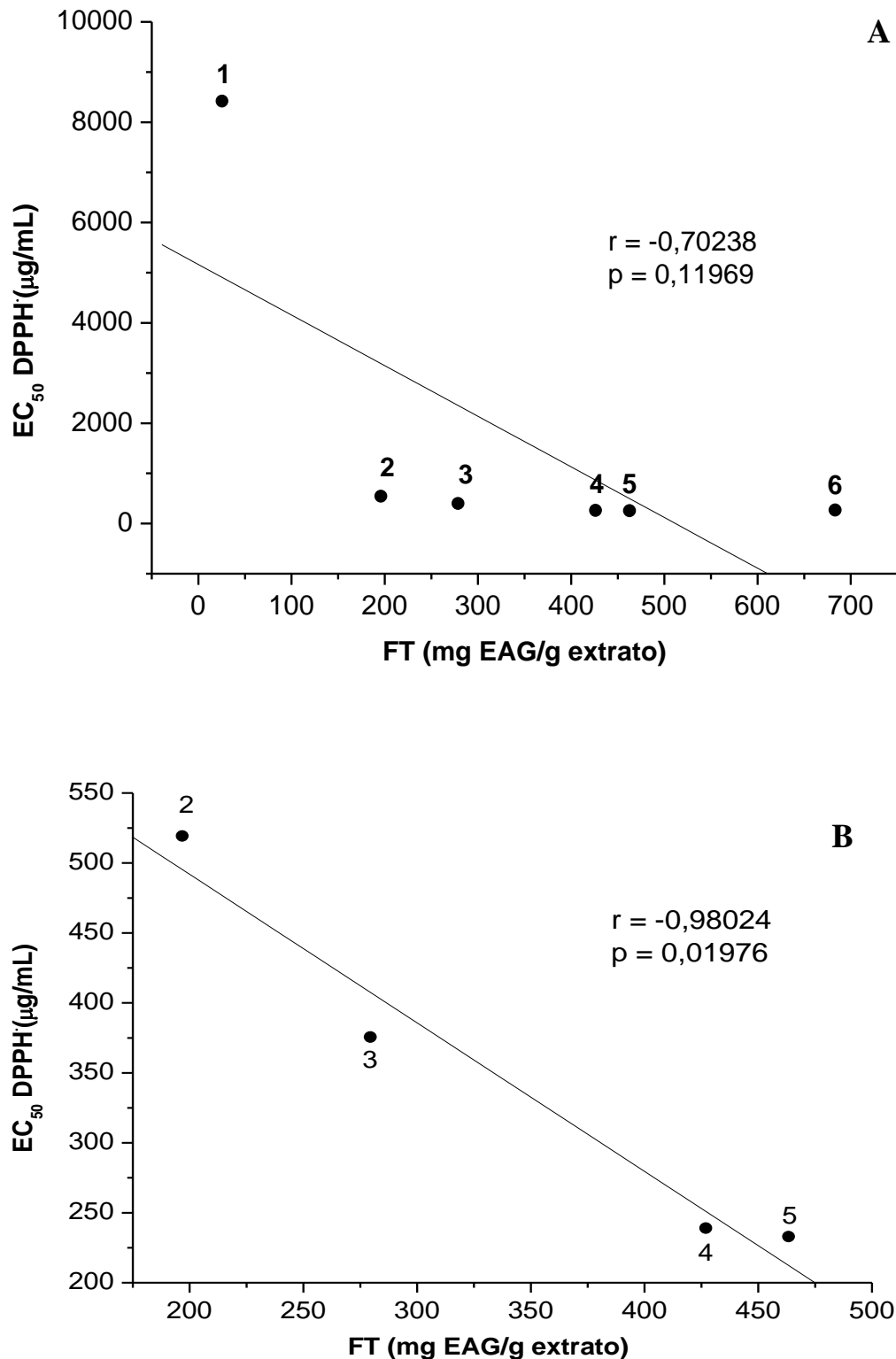


Gráfico 10 . Correlação entre os teores de FT e os valores de captura do radical DPPH' (EC₅₀).

A – correlação de todos os extratos. B – os extratos que apresentaram a melhor correlação. Correlação calculada entre FT, expressos em mg EAG/g extrato e atividade de captura do radical DPPH', expressa como a EC₅₀ em µg/mL. 1 – *A. fastigiatum*; 2 – *M. ferruginata*; 3 – *C. antisiphiliticus* (folhas); 4 – *C. antisiphiliticus* (caule); 5 – *K. rubriflora*; 6 – *N. adamantium*

Analisando os resultados dos gráficos 10 A e B, pode-se verificar que os extratos apresentaram uma determinada correlação positiva quando comparados os valores de FT e a EC_{50} para atividade de captura do radical DPPH[•], apresentando valores de $r = -0,70238$ quando analisados todos os extratos e $r = -0,98024$ quando comparados os extratos 2,3,4 e 5.

O resultado negativo do valor de r nos permite concluir que existe uma relação inversamente proporcional entre as grandezas analisadas, ou seja, à medida que a concentração de compostos fenólicos aumenta, diminui o valor de EC_{50} para a captura do radical DPPH[•], portanto, quanto maior o teor de FT nos extratos, melhor será a capacidade antioxidante dos mesmos em capturar a espécie radicalar DPPH[•].

Comparando-se os valores de r encontrados nos gráficos 10-A e 10-B pode-se verificar que os extratos da *N. adamantium* (6) e *A. fastigiatum* (1) não apresentam uma relação tão forte quanto os demais extratos analisados, visto que o valor de r encontrado no gráfico B, sem a presença desses extratos, foi mais próximo de -1. Possivelmente esses extratos possuem outros compostos que não os fenólicos, exercendo atividade de captura do radical DPPH[•], assim como sugere Sousa et al., (2007).

Sousa et al. (2007) estudando a atividade antioxidante de 5 plantas medicinais, também encontrou resultados de r bem próximos de -1, demonstrando a relação positiva entre os compostos fenólicos e atividade de captura do radical DPPH[•]. Ghasemzadeh et al. (2012) e Soares et al. (2014), também evidenciaram a correlação positiva entre os compostos fenólicos e a atividade antioxidante de alguns extratos vegetais, obtendo valores de r próximos a -0,8.

Diante dos resultados encontrados pode-se inferir que os compostos fenólicos são os principais antioxidantes presentes nos extratos, sendo os principais responsáveis pela atividade de captura do radical DPPH[•].

5.8.2 CORRELAÇÃO ENTRE FT (mg EAG/g extrato) e a atividade de captura do radical ABTS^{•+} (EC_{50} μ g/mL)

A correlação entre os teores FT dos extratos analisados e a atividade de captura do radical ABTS^{•+} de cada um foi obtida assim como descrito para a correlação entre FT e atividade de captura do DPPH[•], utilizando o programa Microcal Origin 7.0

Os resultados da correlação foram apresentados graficamente, e os valores de r obtidos pelo próprio programa a partir do gráfico de ABTS^{•+} (EC_{50} μ g/mL) versus FT (mg EAG/g extrato) (GRÁFICO 11 A-B).

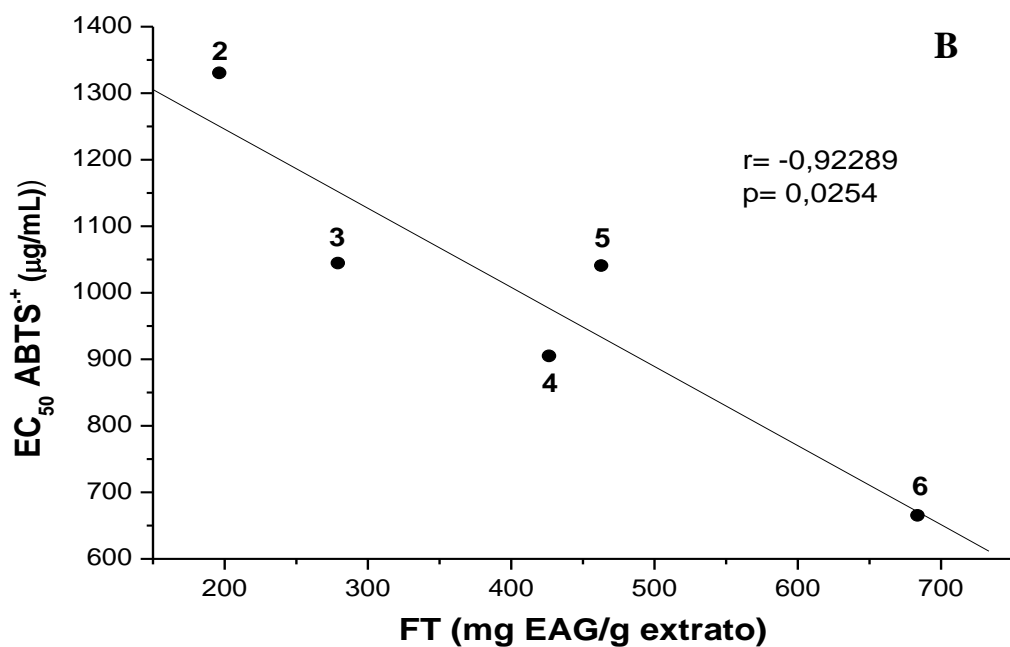
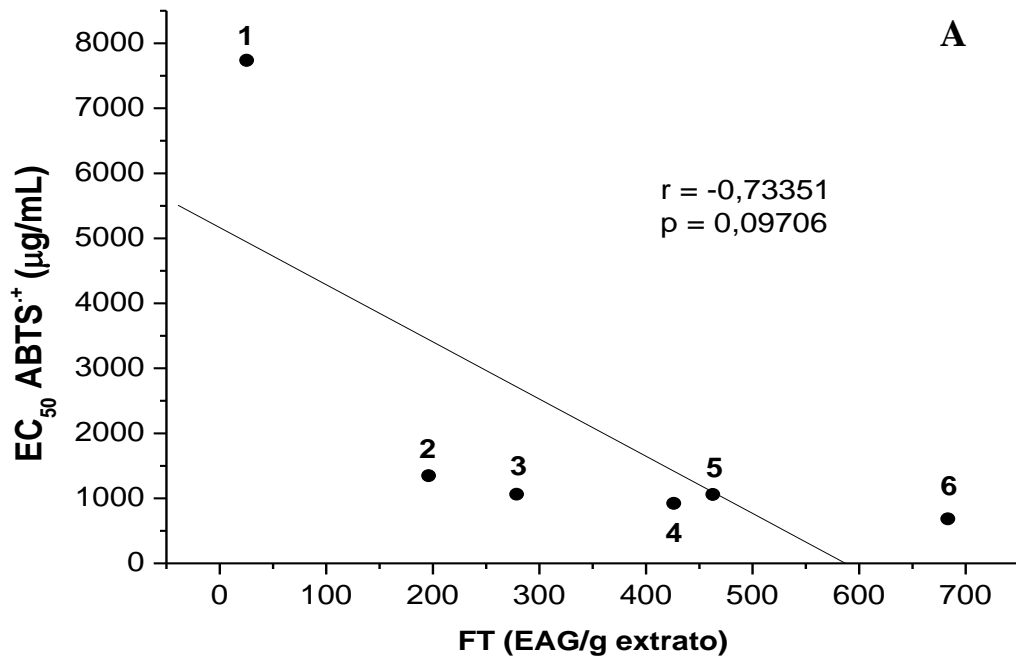


Gráfico 11. Correlação entre os teores de FT e os valores de atividade de captura do radical ABTS⁺ (EC_{50}). A – Todos os extratos; B – Correlação dos extratos, exceto a *A. fastigiatum*. Valor de r representa o coeficiente de correlação de Pearson. **1** – *A. fastigiatum*; **2** – *M. ferruginata*; **3** – *C. antisiphiliticus* (folhas); **4** – *C. antisiphiliticus* (caule); **5** – *K. rubriflora*; **6** – *N. adamantium*

Analisando os resultados encontrados nos gráficos 11 A e B pode-se observar que os extratos apresentaram uma correlação positiva, inversamente proporcional entre as grandezas analisadas, uma vez que o valor de r encontrado foi próximo a -1.

A diferença entre o valor de r quando analisamos todos os extratos juntos (gráfico 11A) e quando analisamos os extratos sem a presença da *A. fastigiatum* (gráfico 11B) nos permite inferir que o extrato da *A. fastigiatum* não apresenta uma correlação positiva tão forte entre o conteúdo de FT e a atividade de captura do radical ABTS^{•+}. Esses dados corroboram com os resultados apresentados para a atividade de captura do radical DPPH[•] e presume-se que essa espécie vegetal não apresenta altos teores de compostos fenólicos e possivelmente não apresenta outros compostos com atividade antioxidante de captura de espécies radicalares.

O gráfico 11B nos permite inferir que os demais extratos apresentaram uma correlação positiva, inversamente proporcional, ou seja, quanto maior for o conteúdo de FT menor tende a ser o valor de EC₅₀ para a captura do radical ABTS^{•+}, demonstrando que os compostos fenólicos são os principais constituintes antioxidantes presentes nesses extratos, podendo ser os responsáveis pela atividade antioxidante dos mesmos.

Soares et al. (2008) verificaram uma correlação positiva entre a atividade antioxidante de captura do radical ABTS^{•+} e o teor de FT encontrados em bagaço de maçã, com um $r = 0,9635$ e $p < 0,05$. Em estudo conduzido por Sun et al. (2002), foi encontrada uma relação direta ($r^2 = 0,9788$, $p < 0,01$) entre atividade antioxidante e o conteúdo de fenólicos totais em diferentes frutas.

Os resultados de todos os experimentos foram agrupados e apresentados na Tabela 2. Cada extrato foi classificado com um número de acordo com o nível de significância estatística dos seus resultados em comparação com os demais extratos, variando a escala de 1-5 de acordo com a atividade antioxidante de cada extrato para cada um dos testes realizados.

Tabela 3. Comparação dos resultados de todos os experimentos realizados para análise da atividade antioxidante.

| | <i>N. adamantium</i> | <i>K. rubriflora</i> | <i>C. antisiph.</i> (caule) | <i>C. antisiph.</i> (folhas) | <i>M. ferruginata</i> | <i>A. fastigiatum</i> |
|-----------------------------------|----------------------|----------------------|--------------------------------|---------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| FT | 5 | 4 | 4 | 3 | 2 | 1 |
| PR | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 |
| DPPH* | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 |
| ABTS⁺⁺ | 3 | 2 | 3 | 2 | 2 | 1 |
| H₂O₂ | 2 | 1 | 1 | 3 | 2 | 1 |
| HOCl | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 | 1 |
| Burst | 1 | 1 | 3 | 2 | 2 | 3 |

*Os extratos que apresentam o mesmo número em um mesmo experimento significa que apresentaram resultados sem diferença estatisticamente significativa (ANOVA, Tuckey, com nível de significância < 0,05). Quanto maior for o número atribuído a um extrato em um determinado teste, maior a atividade para o extrato no referido teste. Escala variando de 1-5 de acordo com a atividade dos extratos.

Através dos resultados compilados na tabela 2 e de acordo com a escala de classificação da atividade antioxidante, variando de 1-5, percebe-se que os extratos que apresentaram melhores resultados foram a *N. adamantium*, *K. rubriflora* e a *C. antisiphiliticus* (caule) e os piores resultados foram da *C. antisiphiliticus* (folhas), *M. ferruginata* e *A. fastigiatum*.

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Através dos estudos realizados neste trabalho, e analisando os resultados inéditos aqui encontrados, conclui-se que:

- Os extratos analisados possuem altos teores de compostos fenólicos em sua composição, exceto a *A. fastigiatum* que não obteve resultados estatisticamente significativos comparáveis aos teores encontrados para os demais extratos e também valores bem inferiores quando comparados a outras espécies vegetais com comprovada atividade antioxidante, descritas na literatura.
- Todos os extratos analisados, com exceção da *A. fastigiatum*, apresentaram bons poderes de redução. Os resultados encontrados para o PR corroboram com os teores de FT, portanto, conclui-se que com exceção da *A. fastigiatum* o poder redutor dos demais extratos é possivelmente devido à presença de compostos fenólicos em sua composição.
- Todos os extratos testados, exceto a *A. fastigiatum*, exerceram atividade de captura de espécies radicalares frente aos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}. A avaliação antioxidante, pelos métodos de captura dos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}, fornece apenas uma indicação da capacidade de uma substância de remover radicais livres. A correlação positiva entre os teores de FT e as atividades de captura das espécies radicalares em estudo nos permite concluir que os compostos fenólicos são os principais responsáveis pela atividade antioxidante de captura de radicais livres das espécies vegetais analisadas.
- Os extratos que apresentaram melhor capacidade de captura do reagente H₂O₂ em ordem decrescente foram: *C. antisyphiliticus* (folhas) > *M. ferruginata* = *N. adamantium* > *K. rubriflora* = *C. antisyphiliticus* (caule) = *A. fastigiatum*. Os melhores resultados foram encontrados em altas concentrações (> 250 µg/mL), em concentrações inferiores a 250 µg/mL os extratos não atingiram nem 10 % de inibição e também não houve atividade de captura com diferença estatística significativa entre os extratos.
- A captura do reagente HOCl foi mais eficiente em altas concentrações (>100 µg/mL). Todos os extratos analisados exerceram atividade de captura do reagente HOCl em todas

as concentrações analisadas, exceto a *A. fastigiatum*, que não apresentou atividade de captura em concentrações inferiores a 100 µg/mL. Os extratos que melhor apresentaram atividade de captura em ordem decrescente foram: *K. rubriflora* = *M. ferruginata* > *N. adamantium* = *C. antisiphiliticus* (caule) = *C. antisiphiliticus* (folhas) = *A. fastigiatum*.

- Os extratos que exerceram melhor atividade de inibição da produção ou inativação das espécies oxidantes produzidas no *burst* oxidativo dos neutrófilos foram a *A. fastigiatum* e a *C. antisiphiliticus* (caule), seguidos pela *M. ferruginata* e *C. antisiphiliticus* (folhas) e com menores atividades a *N. adamantium* e a *K. rubriflora*.
- Todos os extratos analisados, exceto a *A. fastigiatum* apresentaram boa atividade antioxidante, com destaque para a *N. adamantium* e a *C. antisiphiliticus* (caule) que apresentaram melhores resultados na maioria dos experimentos. A partir dos resultados preliminares encontrados no presente estudo, faz-se necessário um estudo mais aprofundado das espécies que obtiveram os melhores resultados.
- O presente estudo apresentou resultados inéditos de atividade antioxidante para espécies vegetais características do Cerrado que são utilizadas como plantas medicinais na região. Bons resultados de atividade antioxidante justificam em parte o uso das espécies vegetais como antiinflamatórias e tornam estas espécies, verdadeiras promissoras para o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos, bem como fonte natural para busca de novos compostos bioativos.
- Os extratos aqui testados podem ser uma fonte muito importante para o descobrimento de novos compostos antioxidantes, que poderão ser utilizados tanto para indústria farmacêutica quanto pela indústria alimentícia, como conservantes antioxidantes naturais.
- Perspectivas futuras: Purificação e isolamento de metabólitos dos extratos que obtiveram os melhores resultados antioxidantes, que devem ser testados pelas metodologias aqui descritas, bem como uma complementação com testes enzimáticos, ensaios de captura de outros metabólitos oxidativos, como HO_2^\bullet , HO^\bullet , $\text{O}^{2-\bullet}$ e espécies reativas de nitrogênio, como ONOO^- , ensaios de citotoxicidade que possam avaliar a toxicidade dos extratos nas concentrações em que apresentam atividade antioxidante.

REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, S. A., PEREIRA, R. G. F. A., DUARTE, S. M. S., LIMA, A. R., ALVARENGA, D. J., FERREIRA, E. B. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café (*Coffea arabica* L.). **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 2, p. 414-420, mar./abr., 2010.

ADEROGBA, M.A., McGaw LJ, Bezabih, M., Abegaz, B.M. Isolation and characterization of novel antioxidant constituents of Croton zambesicus leaf extract. **Natural Product Research**, v. 25, p. 1224-1233. 2011

ALVES, C. Q.; BRANDÃO, H. M.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; LIMA, L. S. Avaliação da atividade antioxidante de flavonoides. **Diálogos e ciência: Revista da rede de ensino FTC**. ano V. n. 12, pág. 1-8, 2007.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. E M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, Vol. 33, No. 10, pag. 2202-2210, 2010.

AMORIM, P. K.; BATALHA, M. A. Soil-vegetation relationships in hyperseasonal cerrado, seasonal cerrado, and wet grassland in Emas National Park (central Brazil). **Acta oecologica**, v.32, p.319– 327, 2007.

APOSTOL, I.; HEINSTEIN, P. F.; LOW, P. S. Rapid Stimulation of an Oxidative Burst during Elicitation of Cultured Plant Cells. **Journal of Plant Physiology**, vol 90, pages 109-116; 1989.

ARAÚJO, Larissa Cardoso Corrêa. **Avaliação da citotoxicidade e atividade anti-inflamatória de extratos e lectinas isoladas de sementes de *Moringa oleifera***. 2013, 110f. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-graduação em Ciências biológicas - Biotecnologia), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

ARCE, A. F. C.; SAIKALEY, M. R. A.; LIU, R.; SALEEM, A.; OTAROLA, M.; POVEDA, L.; SÁNCHEZ, P.; GARCÍA, M.; KAPLAN, M. A. C.; DURST, T.; ARNASON, J. Familia marcgraviacea: fitoquímica y actividad biológica. **SILAE XXII**, pg 246-247, 2013

ARNAO, M. B.; CANO, A.; ACOSTA, M. A method to measure antioxidant activity in organic media: application to lipophilic vitamins. **Redox Report**. V.5, n.6, pg. 365-370, 2000.

BABIOR, B. M. Phagocytes and oxidative stress. **American Journal of Medicine**. vol.109, pgs. 33-44, 2000.

BARADARAN, A.; NASRI, H.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. Oxidative stress and hypertension: Possibility of hypertension therapy with antioxidants. **Journal of Research in Medical Sciences**. Apr; vol. 19, no.4; págs: 358-67, 2014.

BARBOSA, Vanessa de Frias. **Caracterização do perfil da ação do ácido gálico e seus derivados sobre processos oxidativos in vitro e ex vivo**. 2010, 89 folhas. Tese de Doutorado (Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia aplicada a farmácia - Bioquímica) Universidade Estadual Paulista “Julio de mesquita Filho” - Faculdade de Ciências farmacêuticas. 89 f, Araraquara, 2010

BARBOSA, M. R.; SILVA, M. M. D. A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T. R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural** vol.44 no.3 págs.: 453-460, Santa Maria Mar, 2014.

BARREIROS, ANDRÉ L. B. S.; DAVID JORGE M.; DAVID JUCENI P. Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Química Nova** vol.29 no.1 págs. 113-126, São Paulo, 2006

BENJAKUL S, KITTIPHATTANABAWON P, SHAHIDI F, MAQSOOD S. Antioxidant activity and inhibitory effects of lead (*Leucaena leucocephala*) seed extracts against lipid oxidation in model systems. **Food Science Technology International**. Vol.19, no.4, págs 365–376. Aug, 2013

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**. Vol. 12, no. 2, págs: 123-130, 1999.

BLAINSKI, A., LOPES, G.C., e MELLO, J.C.P. Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. **Molecules** vol. 18, pags:6852-6865, Jun 2013

BLOIS, M. S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. **Nature**. v.181, no. 4617, págs: 1199-1120, 1958.

BOHLMANN F, AHMED M, KING RM, ROBINSON H. Labdane and eudesmane derivatives from *Ageratum fastigiatum*. **Phytochemistry** vol. 20, págs. 1434-1435, 1981

BOHLMANN F, LUDWIG GW, JAKUPOVIC J, KING RM, ROBINSON H. A daucanolid and further farsene derivatives from *Ageratum fastigiatum*. **Phytochemistry** vol. 22; págs. 983-986, 1983.

BRANDÃO, M. G. L.; PIGNAL, M.; ROMANIUC, S.; GRAEL, C. F. F.; FAGG, G. W. Useful Brazilian plants listed in the Field books of the French naturalist Auguste de Saint-Hilaire (1779-1853). **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 143, págs: 488 – 500, 2012.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSSET, C.; Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**. Vol. 28, Issue 1, Pages 25-30, 1995.

BRESTEL, E.P. Co-oxidation of luminol and hydrogen peroxide. Implications for neutrophil chemiluminescence. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, vol. 126, págs. 482-488, 1985.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relationships. **Free Radical Biology and Medicine**. Volume 22, Issue 5, Pages 749–760, 1997.

CASTRO, Juliana. F. A. **Estudo da atividade antioxidante em frutas nativas e exóticas brasileiras**. 2012, 85 folhas. Dissertação de mestrado (Biotecnologia - Bioquímica e Tecnologia Química), Universidade Estadual Paulista UNESP, Instituto de Química - Araraquara 85 f., 2012

CHAVES, M. H.; CITÓ, A. M. G. L.; LOPES, J. A. D.; COSTA, D. A.; OLIVEIRA, C. A. A.; COSTA, A. F.; JÚNIOR, F. E. M. B. Fenóis totais, atividade antioxidante e constituintes químicos de extratos de *Anacardium occidentale* L., Anacardiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. vol.20 no.1págs. 106-112, Curitiba Jan./Mar. 2010

CHING, T.; JONG, J.; BAST, A. A method for screening hypochlorous acid scavengers by inhibition of the oxidation of 5-thio-2-nitrobenzoic acid: application to anti-asthmatic drugs. **Analytical Biochemistry**, vol. 218, págs: 377-381, 1994.

CHRISTIAN A. SIEBRA, JEANINE M. NARDIN, ANGELA FLORÃO, FABIANA H. ROCHA, DENISE Z. BASTOS, BRÁS H. OLIVEIRA, ALMERINE M. WEFFORT-SANTOSS. Potencial antiinflamatório de *Annona glabra*, Annonaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Vol.19 no.1A, págs. 82-88, Jan/Mar, 2009.

COQUEIRO A., REGASINI, L.O, SKRZEK S.C.G., QUEIROZ, M.M.F., SILVA, D.H.S, BOLZANI, W.S. Free Radical Activity of *Kielmeyera variabilis* (Clusiaceae). **Molecules**. Vol 18; pags 2376-2385, 2013.

CZELUSNIAK, K.E.; BROCCO, A.; PEREIRA, D.F.; FREITAS, G.B.L. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. **Revista Brasileira de plantas medicinais**. vol.14 no.2 págs. 400-409, Botucatu, 2012

DEL-VECHIO-VIEIRA, G., SOUSA, O. V., MIRANDA, M. A., SENNA-VALLE, L., KAPLAN, M. A. C. Analgesic and Anti-inflammatory Properties of Essential Oil from *Ageratum fastigiatum*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. vol.52, no.5, pages: 1115-1121, Sept/Oct 2009.

Diego Pinto de Oliveira. **Caracterização química e avaliação biológica dos extratos hidroetanólicos obtidos do caule, folhas, glomérulo e raízes de Leonotis nepetifolia (L.) R.Br (Lamiaceae)**. 2013, 67 folhas. Dissertação de Mestrado (Faculdade de Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Alfenas – MG, Alfenas, 2013

DUQUE, Fernanda Farias; **Determinação do perfil cromatográfico e avaliação da atividade do extrato etanólico de Achillea millefolium sobre Colletotrichum gloeosporioides**. 2013, 58 folhas. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical). Universidade Federal do Espírito Santo, São Matheus ES, 2013.

EATON, J. W. Defenses against hypochlorous acid: parrying the neutrophil's rapier thrust. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, vol. 121, págs: 197-198, 1993

Elita Scio. Coumarins isolated from Kielmeyera genus (Clusiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. vol 85 no. 1, págs: 27-31, 2004

EVANS, J. F. The cysteinyl leukotriene receptors. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)**, vol. 69, no. 2-3, pages: 117–122, 2003

FARIAS, K.S.; SANTOS, T.S.N.; PAIVA, M.R.A.B.; ALMEIDA, S.M.L.; GUEDES P.T.; VIANNA, A.C.A; FAVARO, S.P.; BUENO, N.R.; CASTILHO, R.O. Antioxidant properties of species from the Brazilian cerrado by different assays. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Campinas, vol. 15, no. 4, págs:520-528, 2013.

FERREIRA, E. C., ROSSI, A. V. A quimiluminescência como ferramenta analítica: do mecanismo a aplicações da reação do luminol em métodos cinéticos de análise. **Química Nova**, vol.25 no.6, págs. 1003-1011, São Paulo Nov./ dec. 2002.

FONSECA, M.C.M. Epamig pesquisa, produção de Plantas Mediciniais para Aplicação no SUS. **Espaço para o produtor**, Viçosa, 2012.

FUJIMOTO, C. & YAMASOBA, T. Oxidative Stresses and Mitochondrial Dysfunction in Age-Related Hearing Loss. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity** Págs: 1-6, 2014.

FERNANDES, MAURETE DOS REIS VIEIRA. **Padronização e avaliação biológica de extratos secos de Psidium guajava L. obtidos por spray draig**. 2013, 237 pgs. Tese (Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto; Área: Medicamentos e cosméticos) 237 páginas. USP/SP, Ribeirão preto 2013.

FERREIRA, A. L. A. e MATSUBARA, L. S. Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, vol. 43, págs. 61-68, 1997.

GEORGE FOTAKIS; JOHN A. TIMBRELL. In vitro cytotoxicity assays; Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**. Vol.160, pages:171-177, 2006.

GHASEMZADEH, A.; OMIDVAR, V.; JAAFAR, H. Z. E.. Polyphenolic content and their antioxidant activity in leaf extract of sweet potato (*Ipomoea batatas*). **Journal of Medicinal Plants Research** Vol. 6, no.15, pags. 2971-2976, 23 April, 2012.

GIRALDO- CAÑAS, D. Estudios morfológicos y taxonómicos En El complejo norantea (marcgraviaceae): revisión de norantea, pseudosarcopera y schwartzia. **Biblioteca José Jerónimo Triana**. No. 22, 177 pags. Universidade Nacional da Colômbia, Bogotá, 2011.

GONÇALVES, ANY D. E. S. S., **Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonoides e vitamina C**. 2008, 88 folhas, Dissertação (Mestrado em Bromatologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo São Paulo, 88 folhas, Março, 2008

GORINSTEIN, S.; MARTIN-BELLOSA, O.; KATRICH, E.; LOJEK, A.; CIZ, M.GLIGELMO-MIGUEL, N.; HARUENKIT, R.; PARK, Y. S.; JUNG, S. T.; TRAKHTENBERG, S. Comparison of the main biochemical compounds and the antioxidant activity of some Spanish olive oils as determined by four different radical scavenging tests. **Journal of Nutritional Biochemistry**, vol. 14, págs. 154-159, 2003.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine, 3. Aufl., **Oxford University Press**, Oxford, 1999

HANCOCK JT, DESIKAN R, NEILL SJ. Does the redox status of cytochrome *c* act as a fail-safe mechanism in the regulation of programmed cell death? **Free Radicals in Biology and Medicine** vol 31; pgs 697-703, 2001

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**.no. 55, pages. 481-504, 2000.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**. vol. 96, págs. 67–202, 2002.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**. vol. 13, págs.572-584, 2002.

HIRSCHMANN, G. S.; ARIAS, A. R. A survey of medicinal plants of Minas Gerais, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 29, pages. 159- 172, 1990

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. vol. 53, no. 6, págs. 1841-1856, 2005.

KANASHIRO, A., KABEYA, L. M., POLIZELLO, A. C. M., LOPES, N. P., LOPES, J. L. C., LUCISANO-VALIM, Y. M. Inhibitory Activity of Flavonoids from *Lychnophora* sp. on Generation of Reactive Oxygen Species by Neutrophils upon Stimulation by Immune Complexes. **Phytotherapy Research**. Vol. 18, págs: 61–65, 2004

KIM, E.R & CHANG, D.K. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: The risk, pathogenesis, prevention and diagnosis. **World Journal of Gastroenterology**. Vol. 20 no.29, págs: 9872-9881, 2014.

KLINK, C. A., MACHADO, R. B. **A conservação do Cerrado brasileiro. Megadiversidade** | Volume 1 | Nº 1 |págs. 147-155, Julho 2005

KOBAYASHI SD¹, DELEO FR. Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**. vol.1, no.3, pages: 309-33. Nov-Dec; 2009.

KROL, W.; CZUBA, Z.; SCHELLER, S.; PARADOWSKI, Z.; SHANI, J. Structure activity relationship in the ability of flavonols to inhibit chemluminescence. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, vol.41, págs: 121-126, 1994.

KUANG-REN CHUNG. Stress Response and Pathogenicity of the Necrotrophic Fungal Pathogen *Alternaria alternata*. **Scientifica** Volume 2012, 17 pgs, 2012.

KVIECINSKI, MAICON R. **Avaliação das atividades antioxidante, antiinflamatória e antitumoral do extrato bruto hidro-etanólico e frações de Bidens pilosa L. (Asteraceae)**. 2007, 194 folhas. Dissertação Mestrado (Farmácia), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis 194 folhas – 2007

LIMA, F. O., BEZERRA, A. S. Flavonoides e radicais livres. **Disciplinarum Scientia. Série: Ciências Naturais e Tecnológicas**. Santa Maria, v. 13, n. 1, p. 111-124, 2012.

LIMA, L. A. R., SANTOS, D. L. D., FERREIRA, H. D., TRESVENZOL, L. M. F., DE PAULA, J. R., FUIZA, T. D. S. Prospecção fitoquímica e determinação do teor de umidade das folhas de *Miconia ferruginata* dc. (Melastomataceae). **Revista de Biotecnologia & Ciência** Vol. 1 CFBC , Nº. 2, pág. 1037, 2013

LUCISANO, Y.M.; MANTOVANI, B. Lysosomal enzyme release from polymorphonuclear leukocytes induced by immune complexes of IgM and of IgG. **Journal of Immunology**. vol.132, no.4, págs:2015-2020, 1984.

MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, Juiz de Fora, vol. 27, no. 1/2, págs: 33-39, 2008.

MEDEIROS, D., VALLE, L.D.S., ALVES, R.J.V. **Euphorbiaceae nativas de cerrado e campo rupestre da serra de são José, minas gerais, Brasil**. Arquivo do Musel Nacional do Rio de Janeiro, v.66, n.2, p.323-349, abr./jun., 2008

MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G.; NASCIMENTO, R. J. Capacidade antioxidante de frutas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. vol. 44, no. 2, abr./jun., págs.193-201, 2008

MIYAMOTO, S. ; MARTINEZ GLAUCIA R.; RETTORI, D.; AUGUSTO, O.; MEDEIROS, M. H. G.; DI MASCIO, P. Linoleic acid hydroperoxide reacts with hypochlorous acid, generating peroxy radical intermediates and singlet molecular oxygen. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. vol. 103 no.2 pags. 293-298, 2006.

MONTEIRO, M. C. M., SILVA, G. H., SILVA, C. V. D., LOPES, M. N., BOLZANI, V. D. S., MARXYOUNG, M. C. **Estudo químico dos caules de *Kielmeyera rubriflora* (Clusiaceae)**. 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006.

MOSMAN, TIM. Rapid Colorimetric Assay for Cellular growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, vol.65, págs:55-63, 1983.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**. vol. 31, no.1, pages: 1287-312, 2001.

NUNES, OTALIBIO CASTIGLIONI. **Avaliação in vitro da atividade anti-*Helicobacter pylori* e potencial antioxidante de extratos e frações de *Baccharis trimera* (Less.) DC.** 2016. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde. Vitória ES; 96 folhas, 2016

OKUSAGA, O.O. Accelerated aging in schizophrenia patients: the potential role of oxidative stress. **Aging and Disease**. Vol. 5, no. 4, págs: 256-262, 2013.

OLIVEIRA, A. C. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**. vol. 32, no. 3, págs: 689-702, 2009.

OLIVEIRA, MONICA FERREIRA. **Avaliação da resposta anti-inflamatória de um extrato de *Vaccinium corymbosum*(mirtilo) num modelo de Artrite Reumatóide.** 2012, 166 f. Dissertação (Mestrado em Controlo da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos); Universidade de Lisboa – Faculdade de Farmácia, 166 folhas, 2012

OLIVEIRA, A.K.M.; MOTA, C.M.G.; AGNES, D.C. Efeito de diferentes temperaturas na germinação de sementes e no crescimento inicial de plântulas de *Miconia albicans* (Melastomataceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Campinas, v.16, n.3, supl. I, págs:755-759, 2014.

PÁDUA, B. Da C., et al. Protective effect of *Baccharis trimera* extract on acute hepatic injury in a model of inflammation induced by acetaminophen. **Mediators of Inflammation**. Págs: 196 - 598, 12 nov 2014.

PARACATU, Luana Chiquetto. **Ácido cafeico e seus ésteres: inibição do burst oxidativo de neutrófilos e efeito anti-*Helicobacter pylori*.** 2012. 83 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2012

PELLEGRINI, N.; RE, R.; YANG, M.; EVANS, C. R. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis(3-ethylenebenzothiazoline-6 sulfonic acid radical cation decolorization assay. **Methods Enzymology**, vol. 299, pages. 379-389, 1999.

PIMENTA, A. B.; SEIXAS, S. R. S.; GREGÓRIO, L. E.; SANTOS, C. F. F. Actividad ansiolítica del extracto crudo de la *Kielmeyera rubriflora*(Pau Santo) en ratones. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, Vol. 21, No. 1 , págs. 83-95, 2016

Pinheiro L., Nakamura C.V, Dias Filho B.P, Ferreira A.G, Young M.C.M., Cortez D.A.G. Antibacterial Xantones from *Kielmeyera variabilis* Mart. (Clusiaceae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**.; vol. 98, no.4, págs:549-52. 2003

PIZZOLATTI, M. G., Bortoluzzi, A. J., Brighente, I. M. C., Zuchinalli, A., Carvalho, F. K., Candido, A. C. S., Peres, M. T. L. P. Clerodane diterpenes from bark of *Croton urucurana* baillon. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n.4, p. 609-614, 2013

RAMALHO, VALÉRIA C.; JORGE, NEUZA. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, vol. 29, no 4, págs: 755-760, 2006.

RATES, S. M. K. Promoção do Uso Racional de Fitoterápicos: uma abordagem no ensino de farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Porto Alegre, v. 11, n. 2, págs. 57-69, 2001.

RE, R. et al., Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay Free Radic. **Biological Medicine**; 26(9-10): págs: 1231-1237, Maio, 1999

RESENDE, M.L.V., SALGADO, S.M.L. & CHAVES, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira** vol. 28; pgs123-130 2003.

REIS., G. O., VICENTE, G., CARVALHO, F. K., HELLER, M., MICKE, G. A., PIZZOLATTI, M. G., FRÖDE, T. S. *Croton antisiphiliticus* Mart. attenuates the inflammatory response to carrageenan-induced pleurisy in mice. **Inflammopharmacol** vol. 22 págs 115–126, 2013

RIBEIRO, S. M. R. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**. vol. 21, no. 3, págs: 133-149, 2005.

RICE-EVANS, C.A; MILLER, N.J. PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free radical Biology and Medicine**. Vol.20, págs: 933-956, 1996.

RITTER, Cristiane. **Estresse oxidativo e desenvolvimento de doenças inflamatórias agudas: possível papel terapêutico de antioxidantes**. Tese de Doutorado (Pós-graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica) – 100f, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007

ROBERTS, C. K.; SINDHU, K. K. Oxidative stress and metabolic syndrome. **Life Sciences**. n. 84, p. 705–712, 2009

ROCHA, M. S.; FIGUEIREDO, R. W.; ARAÚJO, M. A. M.; MOREIRA-ARAÚJO, R. S. R. Caracterização físico-química e atividade antioxidante (in vitro) de frutos do cerrado piauiense. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal - SP, vol. 35, no. 4, págs: 933-941 Dezembro, 2013.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio dos cerrados na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais de Botucatu**, vol. 9, pags: 17 – 35, 2007.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Antioxidant activity of cerrado fruits. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**. vol.27 no.1, págs. 53-60, Campinas Jan./Mar. 2007

ROLIM, T. L.; WANDERLEY, F. T. S.; CUNHA, E. V. L. C.; TAVARES, J. F.; OLIVEIRA, A. M. F.; ASSIS, T. S. Constituintes químicos e atividade antioxidante de *Byrsonima gardneriana* (Malpighiaceae). **Química Nova**, Vol. 36, No. 4, pgs 524-527, 2013.

RUFINO, M. S. M., ALVES, R. E., BRITO, E. S., MORAIS, S. M., SAMPAIO, C. G., JIMÉNEZ, J. P., CALIXTO F. D. S. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS^{•+}**. Comunicado técnico online No. 128 – ISSN 1679-6535 Fortaleza , Ceara, Julho 2007

SÁ, P. G. S.; GUIMARÃES, A. L.; OLIVEIRA, A. P.; FILHO, J. A. S.; FONTANA, A. P.; DAMASCENO, P. K. F.; BRANCO, C. R. C.; BRANCO, A.; ALMEIDA, J. R. G. S. Fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante de *Selaginella convoluta* (Arn.) Spring (Selaginellaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. vol 33 no.4, paginas 561-566, 2012.

SAKARYA S., GUNAY N., KARAKULAK M., OZTURK B., ERTUGRUL B. Hypochlorous Acid: An Ideal Wound Care Agent With Powerful Microbicidal, Antibiofilm, and Wound Healing Potency. **WOUNDS** Vol. 26, no.12, pages: 342-350, Dezembro, 2014

SANCHEZ-MORENO, C. Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. **Food Science and Technology International**. vol. 8, no.3, págs: 121–137, 2002.

SCIO, ELITA. Cumarinas encontradas no gênero *Kielmeyera* - Família *Clusiaceae*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Vol. 85, no. 1, págs: 27-31, 2004

SIEUWERTS, A. M.; KLIJN, J. G. M.; PETER, H. A.; FOEKENS, J. A. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity

of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50-Values and Cell Survival. **European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, vol. 33, pages: 813-823, 1995.

SILVA, A. C. D., HIGUCHI, P., PIFANO, D.S. Padrão Espacial e Estrutura de Espécies do Gênero *Miconia Ruiz & Pav. (Melastomataceae)*. **Revista Brasileira de Biociências**. vol. 5, supl. 1, págs. 60-62, Porto Alegre, jul. 2007.

SILVA, A. F. S. *Hippeastrum vittatum (L'Hér) Herbert e Hippeastrum striatum (Lam.) Moore: análise química e avaliação biológica dos alcalóides isolados*. Tese de Doutorado (Faculdade de Farmácia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul - RS. 207 f, 2005.

SILVA, G. D. F.; SILVA, S. R. S.; BARBOSA, L. C. A.; DUARTE, L. P.; RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H.; FILHO, S. A. V.; OLIVEIRA, M. L. R. Antioxidant activity of *Maytenus imbricata* Mart., Celastraceae. **Revista brasileira de farmacognosia**. vol.19 no.2, págs. 530-536, João Pessoa Apr./June, 2009

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Jr.; Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic - Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**. vol. 16; pages 144-58, January, 1965.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. S. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**. vol. 299, págs: 152-178, 1999.

SINGH, R. P.; MURTHY, K. N. C.; JAYAPRAKASHA, G. K. Studies on the antioxidant activity of Pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. vol. 50, no. 81, pages: 81-86, 2002.

SOARES, M.; WELTER, L.; GONZAGA, L.; LIMA, A.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Evaluation of antioxidant activity and identification of phenolic acids present in the pomace of Gala variety apples. **Food Science and Technology**. vol. 28, no. 3, pages: 727-732, Campinas, jul.-set. 2008

SOARES, I. M.; BASTOS, E. G. P.; SOBRINHO, T. J. S. P.; ALVIM, T. C. A.; SILVEIRA, M. A.; AGUIAR, R. W. S.; ASCÊNCIO, S. D. Conteúdo fenólico e atividade antioxidante de diferentes cultivares de ipomoea batatas (l.) lam. obtidas por melhoramento genético para produção industrial de etanol. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**; vol 35 no.3; págs: 479-488, 2014

SOBRAL, I. S., SOUZA-NETA, L. C., COSTA, G. A. N., GUEDES, M. L. S., MARTINS, D., CRUZ, F. Xantonas, triterpenos e atividade antibacteriana do extrato em diclorometano de *Kielmeyera cuspidata Saddi*, Clusiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Vol. 19 págs. 686-689: Jul./Set. 2009

SOTOMAYOR, M. D. P. T., DIAS, I. L. T., LANZA, M. R. V. Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas. **Química Nova**, Vol. 31, No. 7, pages: 1755-1774, 2008.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-Jr., G. M.; AYRES, M. C. C; COSTA, C. L. S; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**. vol. 30, no. 2, pages: 351-355, 2007.

SOUSA, M. S. B.; VIEIRA, L. M; LIMA, A. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de resíduos de polpas de frutas tropicais. **Brazilian Journal of Food Technology** Campinas, vol. 14, no. 3, págs. 202-210, jul./set. 2011

SOUSA, R. M. F.; LIRA, C. S.; RODRIGUES, A. O.; MORAIS, S. A. L.; QUEIROZ, C. R. A. A.; CHANG, R.; AQUINO, F. J. T.; MUÑOZ, R. A. A.; OLIVEIRA, A. Atividade antioxidante de extratos de folhas de ora-pronóbis (*Pereskia aculeata* mill.) Usando métodos espectrofotométricos e voltamétricos in vitro. **Biosciense Journal**. Uberlandia, vol. 30, supplement 1, págs: 448-457, June, 2014

SOUZA, J.P; SANTOS, V.L.P.; FRANCO, C.R.C.; BORTOLOZO, E.A.F.Q.; FARAGO, P.V.; MATZENBACHER, N.I.; BUDEL, J.M. *Baccharis rufescens* Spreng. var. *tenuifolia* (DC.) Baker: contribuição ao estudo farmacognóstico. **Revista brasileira de plantas medicinais**. vol.15 no.4 Botucatu, 2013

SUÁREZ, A. I., Chavez, K., Blanco, Z., Compagnone, R.S., Tillett. S., Torrico, F. Estudio fitoquímico de la corteza de *Croton gossypifolius* colectada en Venezuela. **Revista latinoamericana de química** v. 41, n. 3, p, 161-170, 2013.

SUCUPIRA, N.R.; SILVA A. B.; PEREIRA G. e COSTA, J.N. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**. vol. 4, págs 263-269, 2012

SUN, J.; CHU, Y.F.; WU, X.; LIU, R.H. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 50, pages: 7449-7454, 2002.

URBACZEK A. C. **Burst oxidativo dos neutrófilos humanos: estudo da influência do polimorfismo do receptor para IgG Fc γ γ RIIIb na cooperação com os receptores para complemento.** Dissertação (Mestrado. UNESP, Araraquara – SP, 147 pgs., 2008

VALADARES, M.C., CASTRO, N.C., CUNHA, L. C. *Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.** Vol. 43, n. 4, pág. 631-638, out/dez, 2007.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.**vol. 39, pages: 44–84, 2007.

VASCONCELOS, S.M.L; GOULART, M.O.F; MOURA, J.B.F; BENFATO, M.D.S; MANFREDINI, V. Reactive oxygen and nitrogen species, antioxidants and markers of oxidative damage in human blood: main analytical methods for their determination. **Química Nova,** Vol. 30, No. 5, págs: 1323-1338, 2007

VELLOSA, JOSÉ C. R. **Avaliação da capacidade antioxidante de extratos vegetais de plantas brasileiras e sua contribuição ao estudo de inibição da enzima mieloperoxidase.** Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara 129 f., 2005

VELLOSA J. C. R.; BARBOSA, V. F.; OLIVEIRA, O. M. M. F. Pesquisa de produtos naturais: plantas e radicais livres. **Revista Eletrônica de Farmácia.** vol. 5, no. 2, págs: 119-130, 2007.

VELLOSA, JOSÉ C. R. **Estudo bioquímico do efeito de alguns flavonóides de *Pterogyne nitens Tulasne* (Fabaceae) em processos oxidativos: sistema modelo “químicos”, enzimáticos” e “celulares”.** Tese (Doutorado em Análises Clínicas), 112f . 2008. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara 129 f., 2008

VIEIRA, G. D., BARBOSA, M. V. D., LOPES, B. C., SOUSA, O. V., FERNANDES, L. D. R. S., ESTEVES, R.L., KAPLAN, M.A.C. Caracterização morfoanatômica de *Ageratum fastigiatum* (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia.** Vol 18: págs: 769-776, Dez. 2008

VIEIRA, R. F.; MARTINS, M. V. M. Recursos genéticos de plantas medicinais do Cerrado: uma compilação de dados. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.** Vol. 3, no. 1, págs: 13-36, 2000

ZGLICZYNSKI, T.J.M.; STELMASZYNSKA, T.; DOMANSKA, J.; OSTROWISKI, W. Chloramines as intermediates of oxidation reaction of amino acids by myeloperoxidase. **Biochimica et Biophysica Acta**, vol. 235, págs. 419-424, 1971.

WALLE, T. Flavonoids and isoflavones (phytoestrogens): absorption, metabolism and bioactivity. **Free radical biology and medicine**. vol. 36, no. 7, pages: 829-837, 2004.

WANG L, PHD, BASSIRI M, PHD,NAJAFI R, PHD,NAJAFI K, MD,YANG J, BS,KHOSROVI B, PHD, HWONG W, BS, BARATI E, BS, BELISLE B, PHD, CELERI C, MS, AND ROBSON MC, MD.Hypochlorous acid as a potential wound care agent Part I. Stabilized Hypochlorous Acid: A Component of the Inorganic Armamentarium of Innate Immunity. **Journal of Burns and Wounds** Vol. 6, pages: 65-79, Abril, 2007

W. S. ROCHA; LOPES, R. M., SILVA, D. B. D. S., VIEIRA, R. F.; SILVA, J. P. D.; AGOSTINI-COSTA, T. D. S. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 33, no. 4, págs: 1215-1221, Jaboticabal – SP, Dezembro, 2011

Wu, J., LIUNG, Y., TANG, L., ZHANG, F., CHEN, F. A study on structural features in early flower development of *Jatropha curcas* L. and the classification of its inflorescences. **African Journal of Agricultural Research** Vol. 6(2), pp. 275-284, 18 January, 2011

www.mma.gov.br/biomas/cerrado, acessado em 04/04/16 às 19:00

www.revista-fi.com Dossiê Antioxidante: Os antioxidantes. **Food Ingredients Brasil** N° 06, pgs 16-30, 2009

YANG, P. et al. Sumoylation modulates oxidative stress relevant to the viability and functionality of pancreatic beta cells. **American Journal of Translational Research**. vol. 6, no. 4, págs: 353-60. Jul, 2014.

YAO, L. H. et al. Flavonoids in food and their health benefits. **Plant Foods for Human Nutrition**. vol. 59, pages.113-122, 2004.

YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A.A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Vol. 49, no. 8, pages: 4083-9. Aug; 2001.

YU CHEN; WOLFGANG G. JUNGER. Measurement of Oxidative *Burst* in Neutrophils. **Methods in Molecular Biology**. vol. 844, pages: 115–124, 2012.

APÊNDICE A – PREPARO DE REAGENTES E SOLUÇÕES

ACETATO DE FORBOL MIRISTATO (PMA)

Para preparar as alíquotas em concentrações 10^{-3} M, diluiu-se o conteúdo do frasco, que continha 1 mg de PMA em um volume de 1,6 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO). A partir da solução estoque, foram preparadas alíquotas em concentração de 10^{-5} M e armazenadas em microtubos tipo Eppendorf[®] hermeticamente fechado sem a presença de oxigênio. As alíquotas foram mantidas congeladas e armazenadas em dessecador de vidro com vácuo até o momento do uso.

ÁCIDO TRICLOROACÉTICO (Cl_3CCOOH) - 10%

Foram dissolvidos 10 g de Cl_3CCOOH em água Milli-Q (pH 7,0) e o volume foi aferido em um balão volumétrico de 100 mL. Solução foi armazenada em frasco de vidro âmbar devidamente identificado à temperatura ambiente por até 1 mês.

AZUL DE TRIPAN - 0,04 %

Foram pesados 0,04 g do reagente azul de tripan com o auxílio de uma balança analítica e diluído em solução salina (NaCl) 0,15M. A solução foi filtrada em papel de filtro.

CARBONATO DE SÓDIO (Na_2CO_3) – 1 mol/L (M)

Foram pesados 2,6497g de Na_2CO_3 e diluído em água Milli-Q (pH 7,0). Aferiu-se o volume em balão volumétrico de 25 ml.

CLORETO DE AMÔNIO (NH_4Cl) - 0,83%

Foram pesados 0,83 g de NH_4Cl e dissolver em água destilada, aferir o volume em balão volumétrico de 100 ml.

CLORETO DE SÓDIO (NaCl) - 0,15M

Foram pesados 4,3875 g NaCl e dissolvidos em água destilada com auxílio de um agitador magnético. Aferiu-se o volume em balão volumétrico de 500 mL. A solução foi conservada em geladeira até momentos antes do uso.

CLORETO FÉRRICO (FeCl₃) - 0,1%

Foram dissolvidos 0,1 g de FeCl₃ em água Milli-Q (pH 7,0) e o volume foi aferido em um balão volumétrico de 100 mL. A solução foi armazenada em frasco de vidro âmbar devidamente identificado à temperatura ambiente por até 1 mês.

FERRICIANETO DE POTÁSSIO (C₆FeN₆K₄) – 1%

Foram dissolvidos 1g de C₆FeN₆K₄ em água Milli-Q (pH 7,0) e aferiu-se o volume em um balão volumétrico de 100 mL. Reagente foi armazenado em frasco de vidro âmbar devidamente identificado à temperatura ambiente por até 1 mês.

FOSFATO DE POTÁSSIO DIBÁSICO (K₂HPO₄) – 1M

Foram pesados 4,3534 g K₂HPO₄ e dissolvidos em água destilada. O volume foi aferido em balão volumétrico de 25 mL.

FOSFATO DE POTÁSSIO MONOBÁSICO (KH₂PO₄) – 1M

Foram pesados 3,4022 g de KH₂PO₄ e dissolvidos em água destilada. Aferiu-se o volume em um balão volumétrico de 25 mL.

GELATINA - 2,5 %

Foram pesados 0,5 g de gelatina e solubilizados em 20 ml de NaCl 0,15 M. A gelatina foi adicionada aos poucos e a mistura foi homogeneizada com o auxílio de um bastão de vidro até obter a solução final.

FOSFATO DE SÓDIO MONOBÁSICO (Na₂HPO₄) – 0,2M

Foram pesados 5,5196 g de Na₂HPO₄ e diluído em água Milli-Q (pH 7,0). O volume foi aferido em balão volumétrico de 200 mL.

FOSFATO DE SÓDIO BIBÁSICO (NaH₂PO₄) – 0,2M

Foram pesados 5,3614 g de NaH₂PO₄ e diluído em água Milli-Q (pH 7,0). O volume foi aferido em um balão volumétrico de 100 mL.

TAMPÃO FOSFATO 0,2 M PH=6,6

Foram pipetados 75 mL da solução de NaH₂PO₄ 0,2M e misturados a 125 mL da solução de Na₂HPO₄ 0,2M. O pH foi ajustado em 6,6.

TAMPÃO SALINA FOSFATO (PBS) pH 7,2 - 7,4

Foram pesados 0,256g de fosfato de sódio monobásico; 1,178g fosfato de sódio bibásico e 8,76g de NaCl separadamente utilizando balança analítica. Os sais foram solubilizados em água destilada com auxílio de um agitador magnético em um béquer de 1000 mL. O pH foi ajustado para 7,2 - 7,4 e aferiu-se o volume em um balão volumétrico de 1000mL.

PERSULFATO DE POTÁSSIO (K₂S₂O₈) - 140 mM

Foram dissolvidos 0,1892g de K₂S₂O₈ em água Milli-Q (pH 7,0) e aferiu-se o volume em um balão volumétrico de 10 mL. A solução foi armazenada em frasco de vidro âmbar à temperatura ambiente por até 1 mês.

TAMPÃO FOSFATO DE POTÁSSIO - 0,1 M

Pipetou-se 24,85 ml da solução de K₂HPO₄ 1M e 25 mL da solução de KH₂PO₄ 1M. As soluções foram misturadas com um auxílio de um agitador magnético e aferiu-se o volume em um balão volumétrico de 500 mL.

LUMINOL – 3,0 X 10⁻²M

Foram pesados 0,0059g de luminol e diluído em água Milli-Q. O volume foi acertado em 1000 µL utilizando um microtubo tipo Eppendorf[®] de 1,5 mL.

APÊNDICE - B

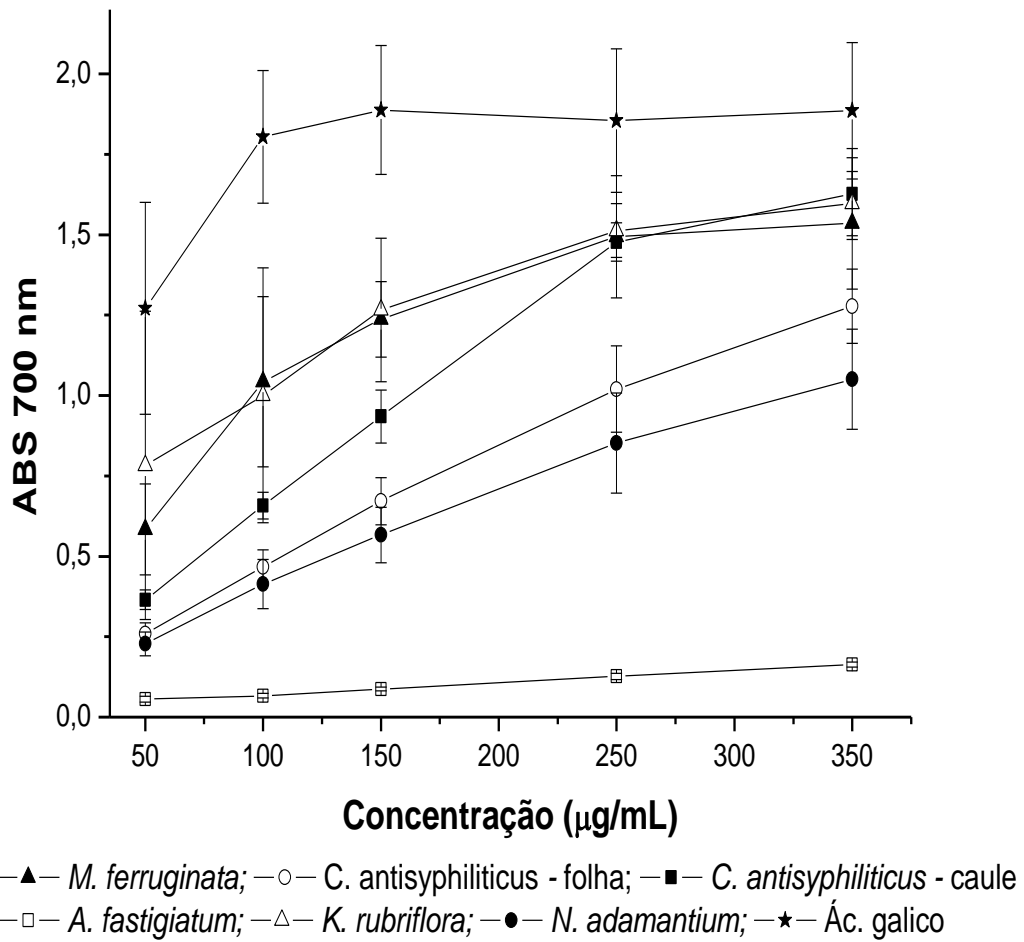


Gráfico 12. Poder redutor dos extratos e do padrão AG. Absorbância obtida em 700 nm versus a concentração em $\mu\text{g/mL}$.

APÊNDICE C

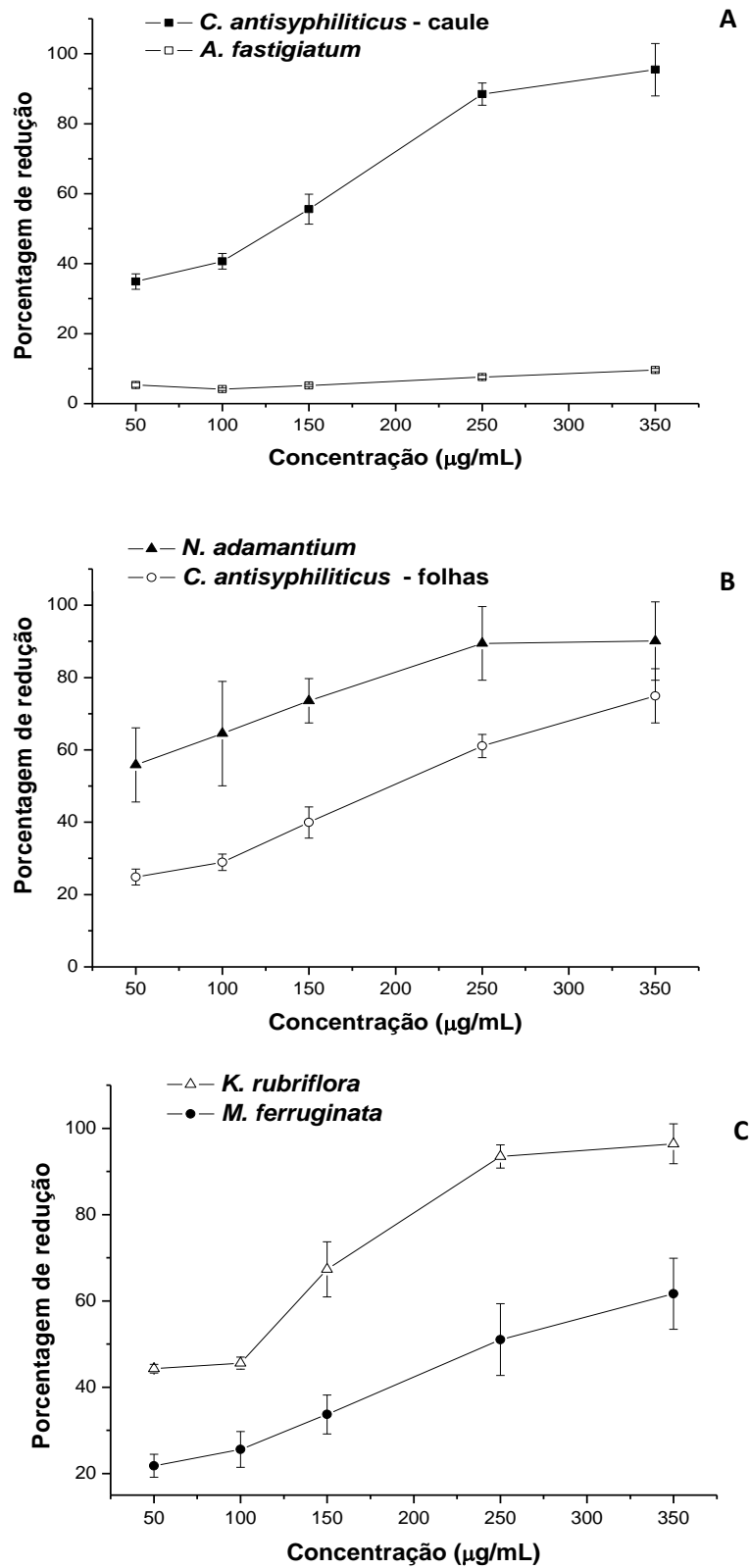


Gráfico 13 (A-C). Poder redutor dos extratos apresentados como porcentagem de redução em relação ao padrão AG versus concentração (µg/mL)

APÊNDICE D

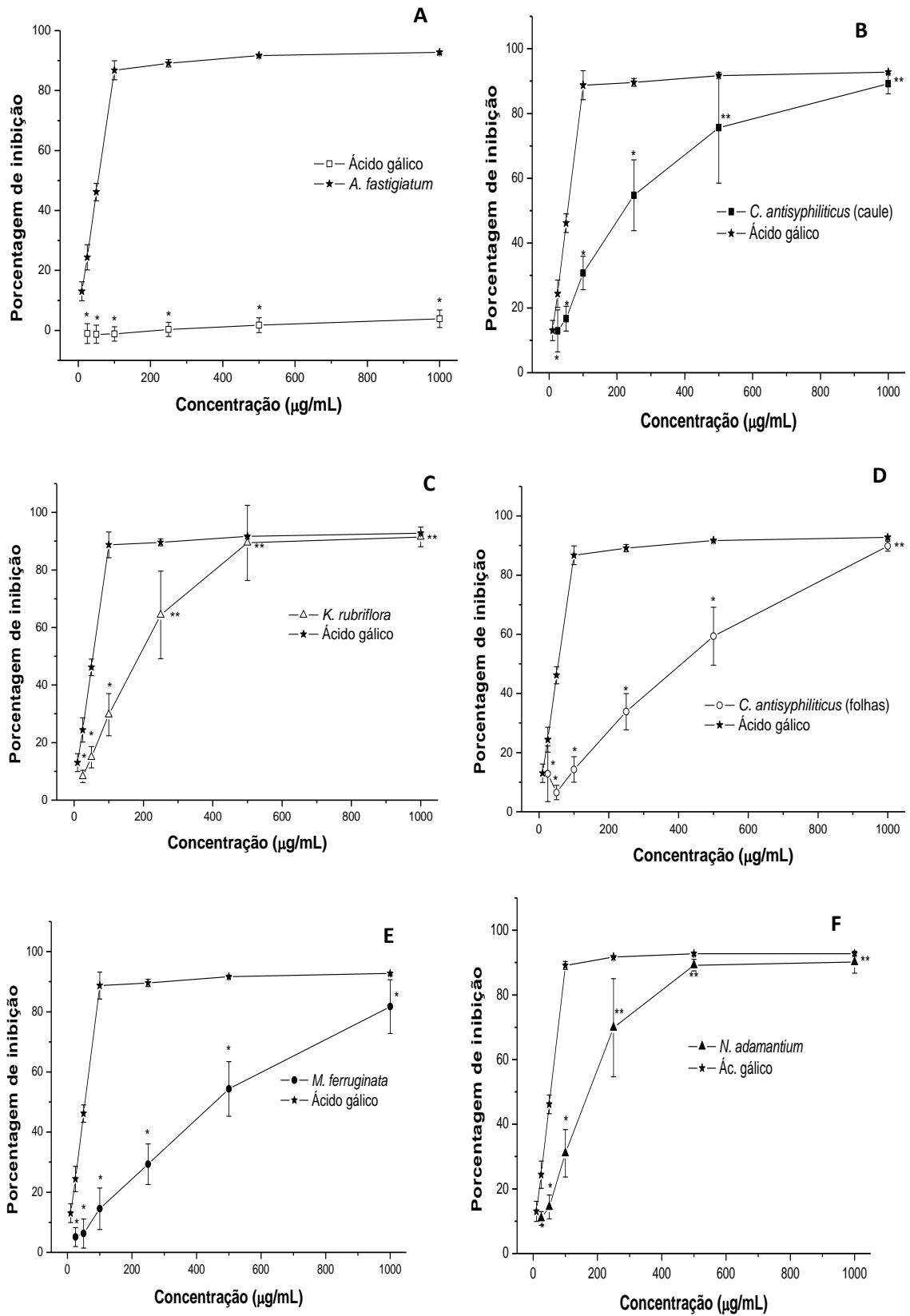


Gráfico 14 (A-F). Atividade antioxidante - captura do radical DPPH^{*}

*Apresentam diferença estatística significativa com o padrão AG;

**Não apresentam diferença estatística significativa com o padrão AG.

APÊNDICE E

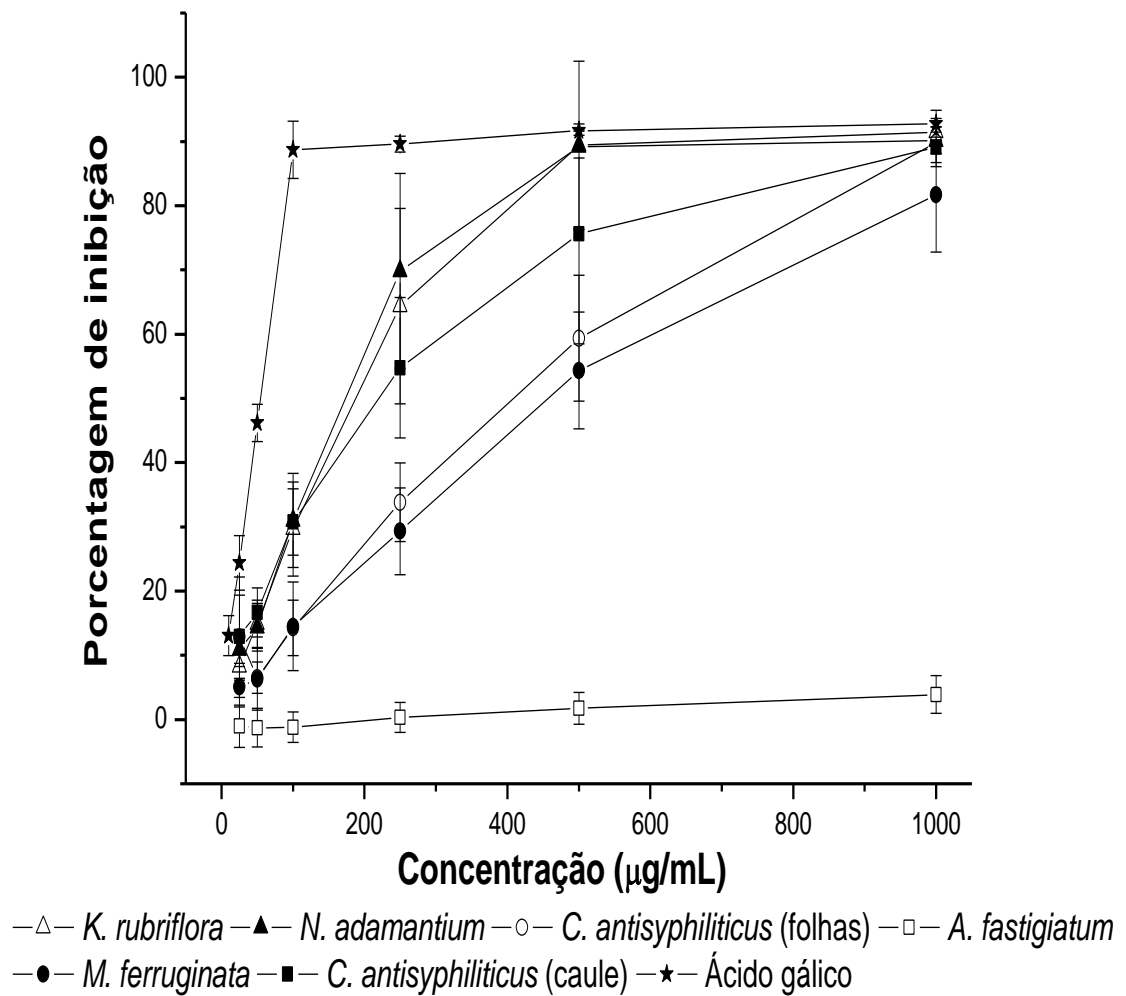
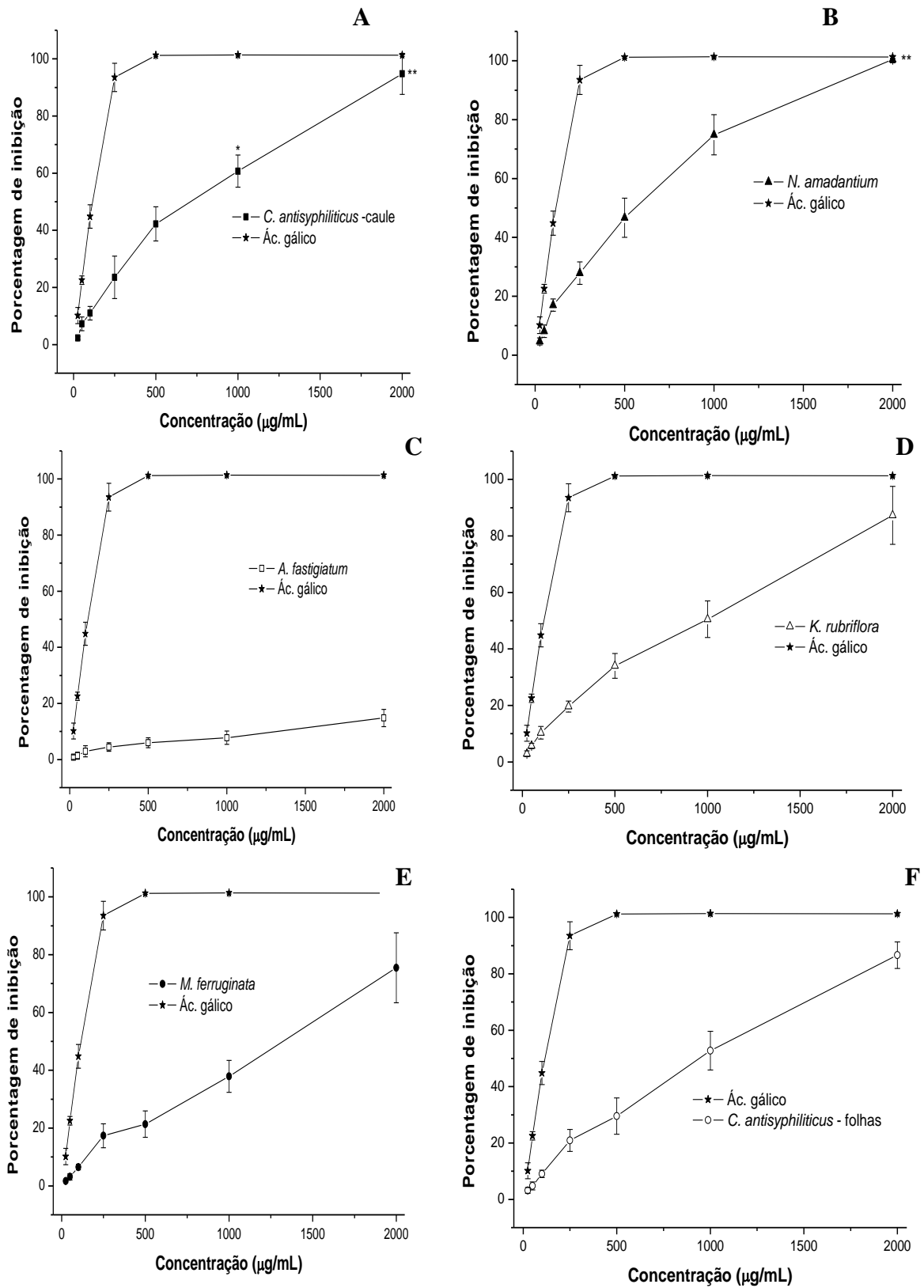


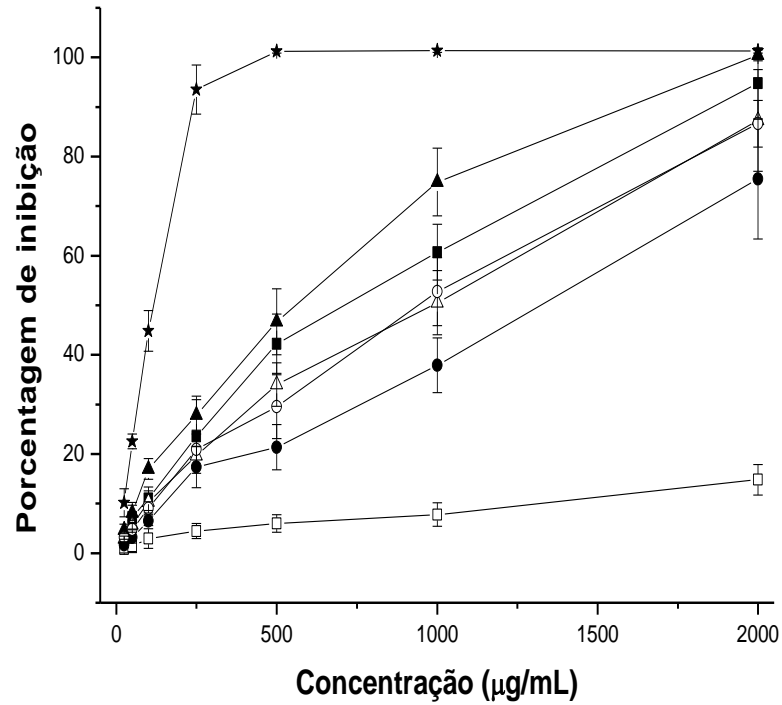
Gráfico 15. Atividade de captura do radical DPPH' - resultado do padrão e de todos os extratos agrupados; Porcentagem de inibição versus concentração ($\mu\text{g/mL}$)

APÊNDICE F

Gráfico 16 (A-F). Atividade antioxidante - captura do radical ABTS^{•+}

** Valores que não apresentaram diferença estatisticamente significativa ao padrão AG

APÊNDICE G



—▲— *N. adamantium* Camb. —■— *C. antisyphiliticus* Mart. - Caule —□— *A. fastigiatum* Gardn.
 —△— *K. rubriflora* Camb. —●— *M. ferruginata* Dc. —★— Ác. gálico —○— *C. antisyphiliticus* Mart. - Folhas

Gráfico 17. Captura do radical ABTS^{•+} - resultado do padrão AG e de todos os extratos agrupados. Porcentagem de inibição versus concentração (µg/mL)

APÊNDICE H

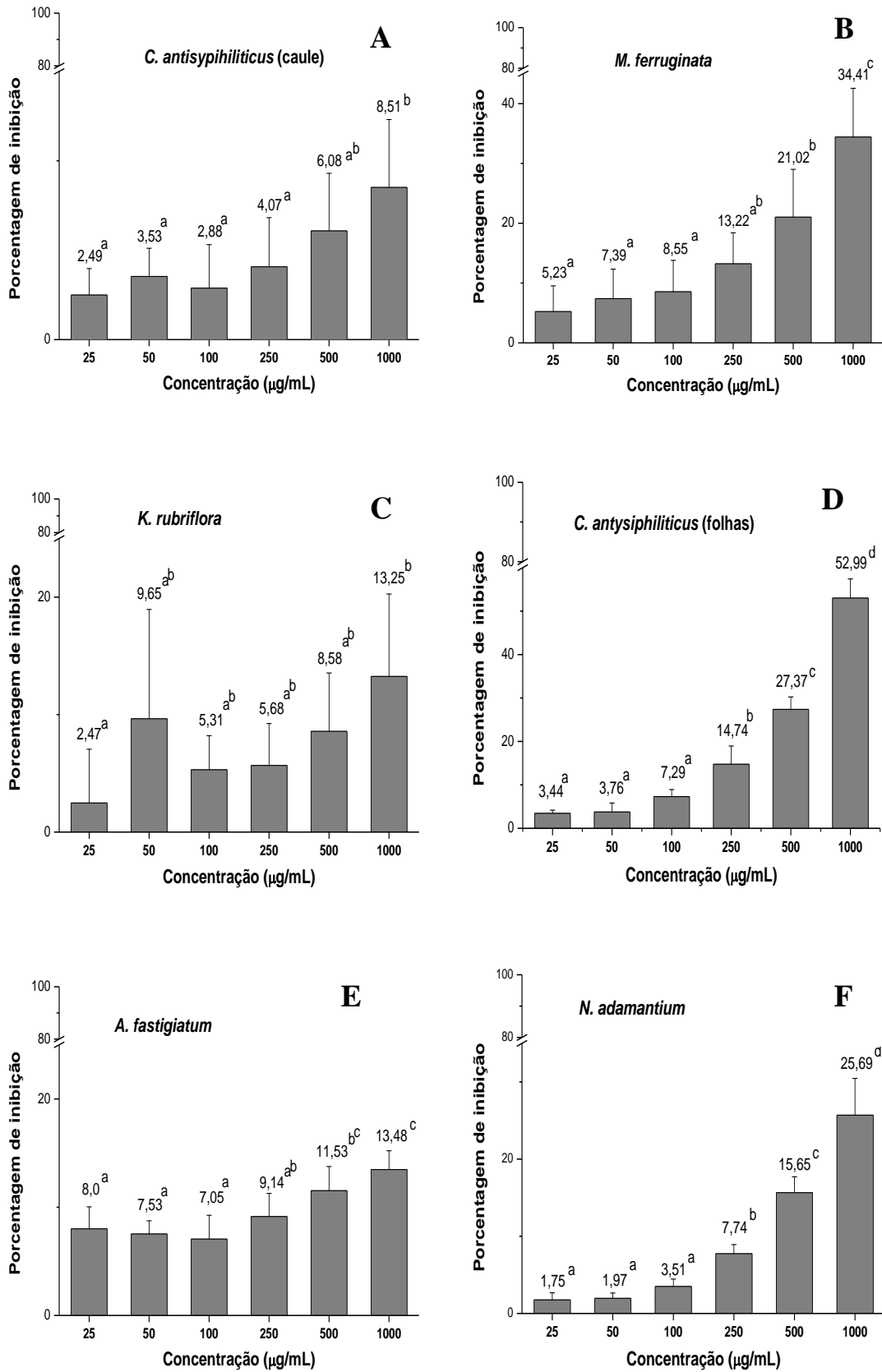


Gráfico 18 (A-F). Captura do H₂O₂. Porcentagem de Inibição x Concentração (µg/mL)
 **Letras iguais correspondem a valores que são estatisticamente semelhantes

APÊNDICE I

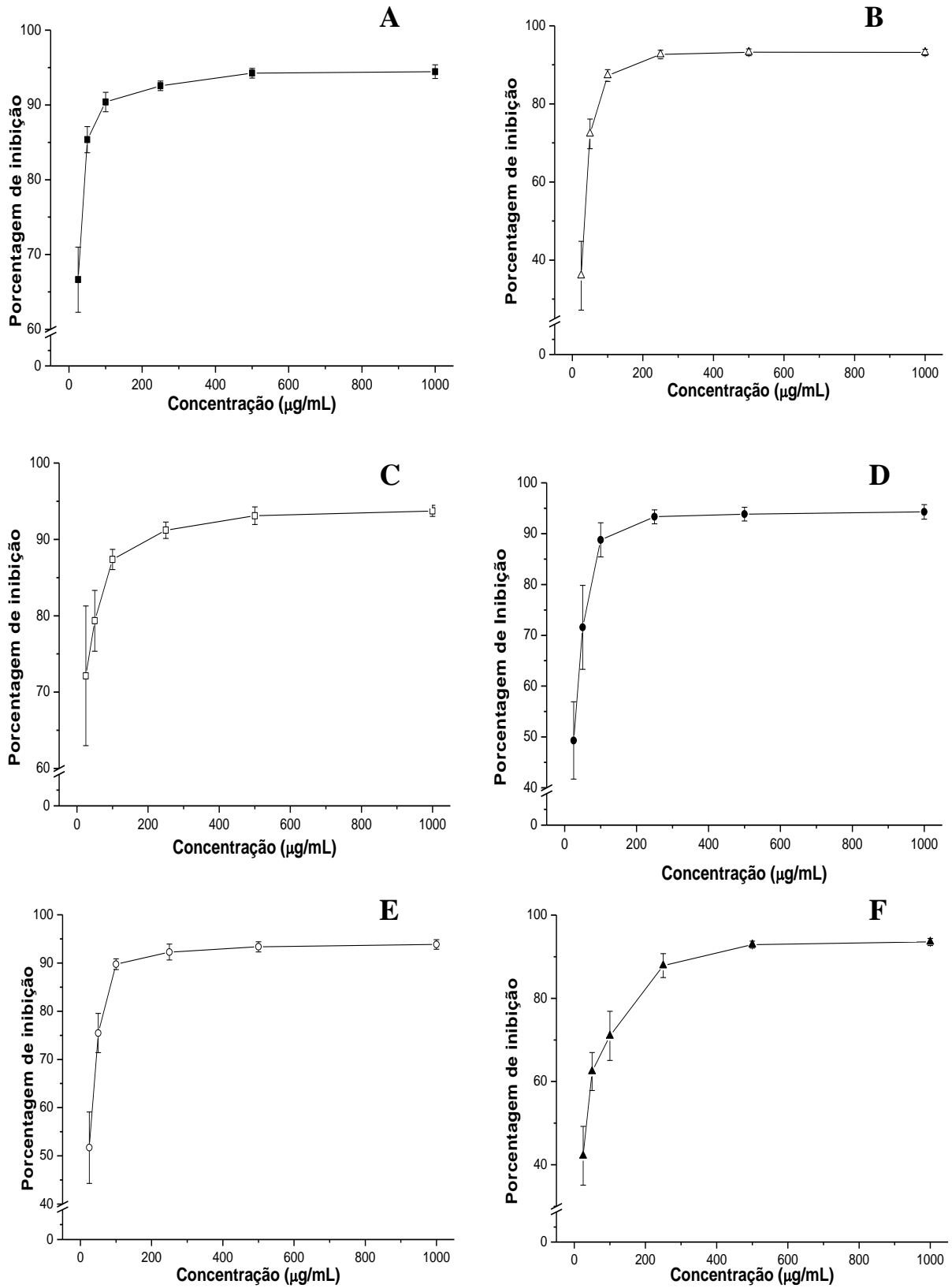


Gráfico 19 (A-F). Interferência dos extratos no “burst” oxidativo de neutrófilos estimulados (PMA)

-●- *M. ferruginata*; -○- *C. antisiphiliticus* (folhas); -▲- *N. adamantium* -△- *K. rubriflora*
 -■- *C. antisiphiliticus* (caule); -□- *A. fastigiatum*

ANEXO A - DECLARAÇÃO DE DEPÓSITO DE EXSICATAS NO HERBÁRIO DIAM



Herbário DIAM

UFVJM- Diamantina- MG

herbario.diam@ufvjm.edu.br

-Ministério da Educação-
Universidade Federal dos Vales do
Jequitinhonha e Mucuri

Diamantina 30 de setembro de 2014

DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que as amostras abaixo descritas foram devidamente depositadas no Herbário DIAM da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri:

| Tipo de material | Espécie | Data de Coleta | Local de Coleta | Código do coletor | Número de depósito |
|------------------|--------------------------------|----------------|--|-------------------|--------------------|
| 01 Exsicata | <i>Agarista oleifolia</i> | 17/12/13 | Campus JK-UFVJM Diamantina, Minas Gerais, Brasil 18°12'7.80"S; 43°34'2.33"W | LEG95 | DIAM 4912 |
| 01 Exsicata | <i>Ageratum fastigiatum</i> | 01/02/11 | Campus JK-UFVJM Diamantina, Minas Gerais, Brasil 18°12'6.70"S; 43°34'12.99"W. | LEG10 | DIAM 4916 |
| 01 Exsicata | <i>Croton antisiphiliticus</i> | 20/08/11 | Campus JK-UFVJM Diamantina, Minas Gerais, Brasil 18°12'11.33"S; 43°34'33.67"W | LEG04 | DIAM 3152 |
| 01 Exsicata | <i>Gomphrena arborescens</i> | 22/01/13 | Campus JK-UFVJM Diamantina, Minas Gerais, Brasil 18°12'6.70" S. 43°34'12.99"W | LEG45 | DIAM 4910 |
| 01 Exsicata | <i>Kielmeyera rubriflora</i> | 05/02/13 | Parque Estadual do Biribiri, Diamantina, Minas Gerais, Brasil 18°11'14.1"S; 43°37'14.0"W | LEG49 | DIAM 4963 |
| 01 Exsicata | <i>Miconia ferruginata</i> | 14/05/13 | Estrada para Conselheiro Mata., Diamantina, Minas Gerais, Brasil 18°18'38.0"S;43°52'47.0"W | LEG69 | DIAM 4964 |
| 01 Exsicata | <i>Myrsine emarginella</i> | 24/05/13 | Parque Estadual do Biribiri, Diamantina, Minas Gerais, Brasil 18°11'34.5"S; 43°34'37.4"W | LEG84 | DIAM 4965 |
| 01 Exsicata | <i>Norantea adamantium</i> | 22/09/12 | Parque Estadual do Biribiri, Diamantina, Minas Gerais, Brasil 18°11'14.11"S; 43°37'13.91"W | LEG19 | DIAM 4913 |



Herbário DIAM

UFVJM- Diamantina- MG

herbario.diam@ufvjm.edu.br



-Ministério da Educação-
Universidade Federal dos Vales do
Jequitinhonha e Mucuri

| | | | | | |
|-------------|---------------------------------|----------|--|-------|-----------|
| 01 Exsicata | <i>Pseudobombax longiflorum</i> | 29/07/13 | Rodovia MG 451, Olhos D'Água/Diamantina, Minas Gerais, Brasil 17°34'23,1"S 43°31'16,2"W | LEG87 | DIAM 4967 |
| 01 Exsicata | <i>Qualea dichotoma</i> | 22/09/12 | Parque Estadual do Biribiri, Diamantina, Minas Gerais, Brasil 18°14'60"S; 43°61'75"W. | LEG17 | DIAM 4914 |
| 01 Exsicata | <i>Shefflera macrocarpa</i> | 17/12/13 | Campus JK-UFVJM Diamantina, Minas Gerais, Brasil 18°12'7.80"S; 43°34'2.33"W. | LEG94 | DIAM 4915 |
| 01 Exsicata | <i>Vochysia elliptica</i> | 14/05/13 | Estrada para Conselheiro Mata., Diamantina, Minas Gerais, Brasil 18°18'21.0"S 43°54'04.0" W | LEG71 | DIAM 4966 |

Instituição depositante: Própria UFVJM

Autorização para acesso ao Patrimônio Genético/ CNPq – Processo n. 010476/2012-1

Projeto de pesquisa financiado pelo CNPq - Processo n. 476367/2011-5

Coordenador: Prof. Dr. Luiz Elídio Gregório / PPGCiFarm - UFVJM

Profa. Dra. Fabiane Nepomuceno da Costa

Curadora do Herbário DIAM – UFVJM,
Instituição Fiel Depositária Cedenciada no CGEN
Processo n. 02000.001852/2012-91

ANEXO B – AUTORIZAÇÃO DO CNPq PARA ACESSO E REMESSA DE AMOSTRA DE COMPONENTE DO PATRIMÔNIO GENÉTICO



4401710515718736

AUTORIZAÇÃO DE ACESSO E DE REMESSA DE AMOSTRA DE COMPONENTE DO PATRIMÔNIO GENÉTICO nº 010476/2012-1

O CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO - CNPq, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), por meio da Deliberação CGEN nº 246, de 27 de agosto de 2009, para autorizar instituições nacionais, públicas ou privadas, que exerçam atividades de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, a acessar e remeter amostras de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico, neste ato representado pelo seu Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde, nos termos da Portaria CNPq nº 161/2010, autoriza a instituição abaixo qualificada a acessar e remeter amostras de componentes do patrimônio genético.

Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI - UFVJM

CNPJ: 168.883.150/0001-57

Representante Legal: ANA CRISTINA RODRIGUES LACERDA

Cargo/Função: Diretor Presidente

CPF: 833.843.756-53 **RG:** M5801271

Projeto: Elaboração de extratoteca e banco de dados químicos a partir de plantas nativas da região de Diamantina MG (Vale do Jequitinhonha).

Coordenador do Projeto: Luiz Elídio Gregório

CPF: 267.891.418-63 **RG:** 280919773 - SSP / SP

Finalidade do projeto: O projeto prevê a coleta de plantas nativas da região de Diamantina (MG) conforme dados de localização presentes em exsicatas dos herbários DIAM e HDJF da UFVJM, sua identificação, a elaboração de uma extratoteca e a obtenção de um banco de dados químicos a partir de análises de reações cromogênicas e de precipitação, cromatografia em camada delgada comparativa e aplicação de técnicas hifenadas (CLAE-DAD-EM, CLAE-DAD-EM/EM e CG-EM).

Amostras a serem acessadas:

Espécie(s): *Agarista oleifolia*; *Ageratum fastigiatum*; *Agonandra brasiliensis*; *Averrhoidium gardnerianum*; *Byrsonima basiloba*; *Byrsonima coccolobifolia*; *Byrsonima pachyphylla*; *Callisthene minor*; *Chomelia brasiliana*; *Chrysophyllum marginatum*; *Croton antisiphiliticus*; *Diospyros burchellii*; *Enterolobium gummiferum*; *Eriotheca pentaphylla*; *Gomphrena officinalis*; *Guapira venosa*; *Himatanthus drasticus*; *Hirtella glandulosa*; *Jacaranda micrantha*; *Kielmeyera rubriflora*; *Lafoensia vandelliana*; *Marlierea laevigata*; *Miconia ferruginata*; *Myrcia tomentosa*; *Myrsine guianensis*; *Norantea adamantium*; *Pera glabrata*; *Pseudobombax longiflorum*; *Qualea dichotoma*; *Schefflera macrocarpa*; *Vochysia elliptica*.

Tipo de material/quantidade de amostras: Serão coletadas somente as partes aéreas de 10 indivíduos para cada espécie. Espera-se obter 0,5 kg de flores; 0,5 kg de frutos/sementes e 2,0 kg de folhas.

Local de depósito de subamostra: UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

Equipe do projeto: LUIZ ELIDIO GREGORIO / CPF 267.891.418-63

FABIANE NEPOMUCENO DA COSTA / CPF 189.752.668-77

CARLOS VICTOR MENDONÇA FILHO / CPF 584.753.546-53

CRISTIANE FERNANDA FUZER GRAEL / CPF 130.801.108-38

Validade da Autorização: 10/10/2012 a 01/10/2014

A instituição acima qualificada deverá enviar ao CNPq, por meio da Plataforma Carlos Chagas, relatório anual sobre o andamento do projeto de pesquisa, nos termos do Decreto nº. 4.946/2003.

Esta autorização está vinculada às informações, declarações e termos de compromisso firmados pelo coordenador do projeto e pelo representante legal, constantes do Processo nº 010476/2012-1. Atividades de acesso aos conhecimentos tradicionais associados, de acesso e de remessa de componente do patrimônio genético com finalidade comercial, aplicação industrial, bioprospecção ou desenvolvimento tecnológico não estão autorizadas.

Caso seja identificado uso econômico de produto ou processo, passível ou não de proteção intelectual, originado das amostras de componente do patrimônio genético acessado no âmbito desta autorização, a instituição beneficiada se compromete a adotar as providências cabíveis, nos termos da legislação vigente, junto ao CGEN/MMA.

A remessa de amostra de componente do patrimônio genético deverá ser precedida da assinatura do Termo de Transferência de Material (TTM) ou do Termo de Responsabilidade para Transporte de Amostra de Componente do Patrimônio Genético (TRM). Para a remessa de componente do patrimônio genético para instituição sediada no exterior, deverá ser solicitada ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, por meio de formulário específico e mediante a apresentação de TTM ou TRTM, licença de exportação complementar a autorização de remessa, mormente quando se tratar de remessa de espécies constantes nos Anexos da Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção (Cites).

Brasília, 10 de Outubro de 2012

Paulo Sergio Lacerda Beirao
Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde

Para visualizar a versão digital da Autorização de Acesso e de Remessa de Amostra de Componente do Patrimônio Genético, V.Sa. poderá utilizar a ferramenta disponibilizada pelo CNPq para esse fim na página <http://servicosweb.cnpq.br/visualizador/> e informar o número do protocolo 4401710515718736 para recuperá-la do banco de dados do CNPq, ou poderá selecionar o arquivo salvo em seu computador (em formato PKCS7). V.Sa. pode também usar outro aplicativo disponível no mercado capaz de reconhecer arquivos no padrão PKCS7 para fazer a visualização e extração do documento.

ANEXO C – COMPROVANTE DE REGISTRO PARA COLETA DE MATERIAL VEGETAL



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico

| | |
|----------------------------|--|
| Número: 29793-4 | Data da Emissão: 28/03/2012 18:22 |
| Dados do titular | |
| Nome: Luiz Elidio Gregorio | CPF: 267.891.418-63 |

Ressalvas

| | |
|---|---|
| 1 | As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia. |
| 2 | A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras. |
| 3 | O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior. |
| 4 | É necessário a obtenção de anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como de consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade |
| 5 | Este documento não abrange a coleta de vegetais hidróbios, tendo em vista que o Decreto-Lei nº 221/1967 e o Art. 36 da Lei nº 9.605/1998 estabelecem a necessidade de obtenção de autorização para coleta de vegetais hidróbios para fins científicos.. |
| 6 | A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação. |
| 7 | Este documento não é válido para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e c) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna. |
| 8 | Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen . |

Táxons registrados

| Nível taxonômico | Táxon(s) |
|------------------|--|
| ESPECIE | Remijia ferruginea, Diospyros burchellii, Himatanthus spp., Hirtella glandulosa, Jacaranda micrantha, Marlierea spp., Kielmeyera rubriflora, Lakoensia vandelliana, Miconia ferruginata, Myrcia tomentosa, Eriotheca pentaphylla, Croton antisyphiliticus, Paepalanthus ruficeps, Qualea dichotoma, Agonandra brasiliensis, Callisthene minor, Paepalanthus trichopetalus, Paepalanthus polygonus, Vochysia elliptica, Schefflera macrocarpa, Agarista deifolia, Chrysophyllum marginatum, Pseudobombax longiflorum, Pera glabrata |
| FAMILIA | Primulaceae, Eriocaulaceae, Rubiaceae, Sapindaceae, Amaranthaceae, Asteraceae |
| GENERO | Gomphrena, Guapira, Byrsonima, Chomelia, Norantea, Enterolobium, Ageratum |

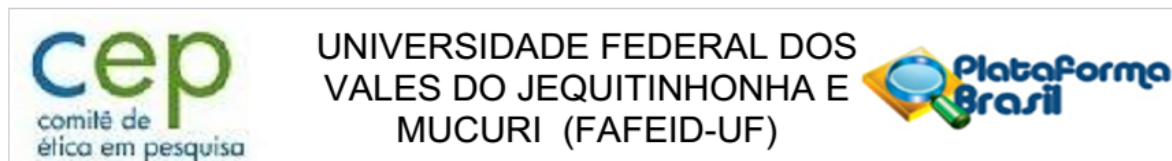
Este documento (Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 25622829



Página 1/1

ANEXO D – AUTORIZAÇÃO PARA COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO (CEP)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da capacidade antioxidante e citotoxicidade de extratos de plantas do cerrado

Pesquisador: Rubia Regina Gonçalves Sivieri

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 28067914.7.0000.5108

Instituição Proponente: Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 570.765

Data da Relatoria: 18/03/2014

Apresentação do Projeto:

Espécies reativas de oxigênio (ERO) podem interferir em vários processos celulares e vários estudos sugerem que a utilização de certas plantas que contém moléculas antioxidantes possa estar relacionada com a capacidade de melhorar o perfil de remoção de ERO e melhorar a condição celular. Nesse sentido, o presente estudo objetiva avaliar a capacidade antioxidante e citotóxica celular de extratos de plantas utilizadas na medicina popular. Para isso, serão coletadas amostras de sangue de 15 indivíduos saudáveis e dessas amostras serão separadas células sanguíneas que serão utilizadas nos estudos.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a capacidade antioxidante e o efeito citotóxico de extratos de plantas do cerrado e sua interferência nos processos celulares.

Objetivo Secundário:

- Quantificar os fenólicos totais nos extratos; - Avaliação do potencial antioxidante dos extratos traçando um perfil de ação sobre diferentes espécies reativas como HOCl, H₂O₂, O₂⁻ e ensaios químicos padrões para detecção do potencial antioxidante como ABTS e DPPH;- Avaliar a

Endereço: Rodovia MGT 367 - Km 583, nº 5000
Bairro: Alto da Jacuba **CEP:** 39.100-000
UF: MG **Município:** DIAMANTINA
Telefone: (38)3532-1240 **Fax:** (38)3532-1200 **E-mail:** cep@ufvjm.edu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DOS
VALES DO JEQUITINHONHA E
MUCURI (FAFEID-UF)



Continuação do Parecer: 570.765

citotoxicidade pelo método do MTT dos extratos e- Avaliar a atividade sequestradora dos radicais gerados no sistema H₂O₂/luminol/HRP por quimiluminescência.

Hipótese:

Os extratos de plantas possuem componentes antioxidantes e, assim, poder-se-á correlacionar as suas composições com suas ações nos diversos tratamentos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos são relacionados ao possível desconforto no momento da coleta de sangue e no possível aparecimento de um pequeno hematoma (arroxamento na pele) no local da coleta. Porém, esses riscos serão minimizados devido à experiência da pessoa que coletará o sangue, a qual realizará o procedimento de forma técnica. Todo o procedimento será realizado com material estéril e descartável e em local reservado de forma individual. As amostras de sangue serão codificadas preservando a identificação do participante.

Benefícios:

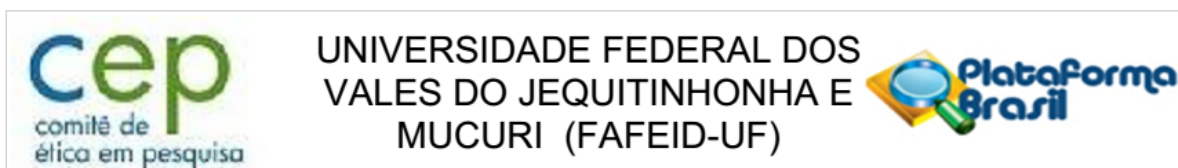
Os benefícios são indiretos e estão relacionados com conhecimento sobre a capacidade dos extratos estudados em interferir nos processos celulares e, dessa forma, contribuir para a correlação entre sua composição e seu uso popular.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Metodologia Proposta:

Os voluntários serão convidados diretamente para participar da pesquisa e caso aceitem participar lhes será apresentado o TCLE com todas as informações referentes à pesquisa bem como da sua participação, a qual está condicionada à manutenção dos preceitos éticos previstos pela Resolução 466/12 do CNS. O tamanho amostral será de 15 participantes, dos quais serão coletados 10 mL de sangue periférico. Os participantes serão questionados se existe alguma queixa atual em relação à saúde e se em alguma doação de sangue eles já se sentiram mal e, em caso positivo, o participante será excluído do estudo. As amostras (10 mL) de sangue venoso periférico serão coletadas com seringa e agulha descartáveis e armazenadas em tubos esterilizados e também descartáveis contendo heparina. Antes da realização do procedimento, será separado o material necessário para a coleta e após o procedimento o material será descartado em recipiente próprio. A coleta será realizada no laboratório de hematologia por uma pessoa treinada e com experiência no procedimento. O local de coleta apresenta todas as condições adequadas ao procedimento de

Endereço: Rodovia MGT 367 - Km 583, nº 5000
Bairro: Alto da Jacuba **CEP:** 39.100-000
UF: MG **Município:** DIAMANTINA
Telefone: (38)3532-1240 **Fax:** (38)3532-1200 **E-mail:** cep@ufvjm.edu.br



Continuação do Parecer: 570.765

coleta. Será realizada a técnica de coleta respeitando as condições assépticas. As células mononucleares (MO) e polimorfonucleares (PMN) presentes no sangue venoso coletado de voluntários serão separadas por Gradiente de Densidade. Os leucócitos serão incubados com os vários extratos em várias concentrações e as atividades citotóxicas serão avaliadas segundo SIEUWERTS et al.(1995) e a atividade antioxidante será avaliada através do sistema H₂O₂/luminol/enzima horseradish peroxidase e medida por quimiluminescência.

Critério de inclusão:

Os indivíduos deverão ser saudáveis com idade acima de 18 anos.

Critério de Exclusão:

Indivíduos com queixa de algum problema de saúde ou que já se sentiram mal durante alguma doação de sangue.

Metodologia de Análise de Dados:

Os experimentos serão realizados em triplicatas (n=3) e as análises estatísticas serão realizadas pela ANOVA com pós-teste de Bonferroni considerando o nível de significância p 0,05.

Desfecho Primário:

Espera-se detectar níveis consideráveis de atividade antioxidante nos extratos estudados.

Tamanho da Amostra no Brasil: 15

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

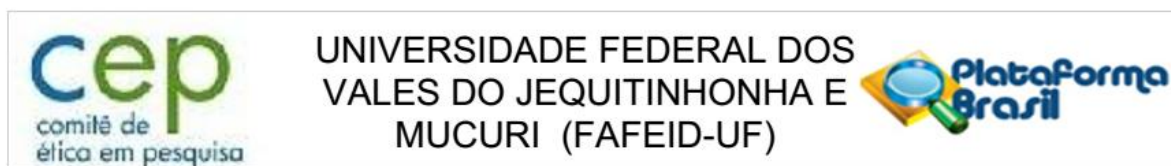
O pesquisador apresentou: Folha de rosto, Projeto gerado pela plataforma, Cronograma, TCLE e carta de anuência do setor.

Recomendações:

- Segundo a Carta Circular nº. 003/2011/CONEP/CNS, de 21/03/11, há obrigatoriedade de rubrica em todas as páginas do TCLE pelo sujeito de pesquisa ou seu responsável e pelo pesquisador, que deverá também apor sua assinatura na última página do referido termo.

- Relatório final deve ser apresentado ao CEP ao término do estudo em 30/09/2014. Considera-se como antiética a pesquisa descontinuada sem justificativa aceita pelo CEP que a aprovou.

Endereço: Rodovia MGT 367 - Km 583, nº 5000
Bairro: Alto da Jacuba **CEP:** 39.100-000
UF: MG **Município:** DIAMANTINA
Telefone: (38)3532-1240 **Fax:** (38)3532-1200 **E-mail:** cep@ufvjm.edu.br



Continuação do Parecer: 570.765

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto atende aos preceitos éticos para pesquisas envolvendo seres humanos preconizados na Resolução 466/12 CNS.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

DIAMANTINA, 27 de Março de 2014

Assinador por:
Thais Peixoto Gaiad Machado
(Coordenador)

Endereço: Rodovia MGT 367 - Km 583, nº 5000
Bairro: Alto da Jacuba **CEP:** 39.100-000
UF: MG **Município:** DIAMANTINA
Telefone: (38)3532-1240 **Fax:** (38)3532-1200 **E-mail:** cep@ufvjm.edu.br