

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Dayana Barbosa da Cruz

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CITOTOXICIDADE DE PLANTAS DO CAMPO  
RUPESTRE BRASILEIRO: *Gomphrena arborescens* L.f., *Gomphrena virgata* Mart.,  
*Miconia ferruginata* DC. e *Vochysia elliptica* Mart.**

**Diamantina**

**2017**

Dayana Barbosa da Cruz

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CITOTOXICIDADE DE PLANTAS DO CAMPO  
RUPESTRE BRASILEIRO: *Gomphrena arborescens* L.f., *Gomphrena virgata* Mart.,  
*Miconia ferruginata* DC. e *Vochysia elliptica* Mart.**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Paula Rodrigues

**Diamantina**

**2017**

Ficha Catalográfica - Sistema de Bibliotecas/UFVJM  
Bibliotecário: Edmar dos Reis de Deus CRB6-2486

C955a Cruz, Dayana Barbosa da.  
2017 Atividade antioxidante e citotoxicidade de plantas do Campo Rupestre brasileiro: *Gomphrena arborescens* L.f., *Gomphrena virgata* Mart., *Miconia ferruginata* DC. e *Vochysia elliptica* Mart. / Dayana Barbosa da Cruz. – Diamantina, 2017.

108 p. :il.

Orientadora: Profª. Dra. Ana Paula Rodrigues.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2017.

1. Atividade antioxidante. 2. Citotoxicidade. 3. Estresse oxidativo. 4. Campo Rupestre. 5. Vochysiaceae. I. Rodrigues, Ana Paula. II. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. III. Título.

**CDD 571.2**

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

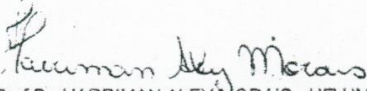
DAYANA BARBOSA DA CRUZ

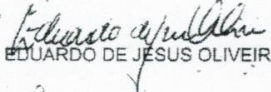
**Atividade Antioxidante e Citotoxicidade de Plantas do Campo Rupestre brasileiro: *Gomphrena arborescens* L.f., *Gomphrena virgata* Mart., *Miconia ferruginata* DC. e *Vochysia elliptica* Mart.**

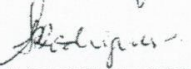
Dissertação apresentada ao PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - STRICTO SENSU, nível de MESTRADO como parte dos requisitos para obtenção do título de MAGISTER SCIENTIAE EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Orientador : Prof.ª Dr.ª Ana Paula Rodrigues

Data da aprovação : 28/08/2017

  
Prof.Dr. HARRIMAN ALEY MORAIS - UFVJM

  
Prof.Dr. EDUARDO DE JESUS OLIVEIRA - UFVJM

  
Prof.ª Dr.ª ANA PAULA RODRIGUES - UFVJM

DIAMANTINA

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus Pais e Irmãos, os quais foram meus alicerces nessa caminhada rumo ao conhecimento. À todos aqueles que me incentivaram e foram fonte de motivação.

## AGRADECIMENTOS

“Se os sonhos estão nas nuvens... Eles estão no lugar certo, agora construa os alicerces!” Esta frase de Shakespeare foi uma das primeiras que ouvi de um professor logo ao ingressar na Universidade. Naquele tempo, meus sonhos já estavam nas nuvens e desde então busquei construir meus alicerces em bases sólidas que permitissem alcançar meus objetivos. Hoje, encontro-me prestes a alcançar mais um sonho, e como nenhuma vitória é conquistada sozinha, quero agradecer a todos aqueles que me apoiaram das mais diversas formas para que eu pudesse chegar às nuvens.

Primeiramente a Deus, pois sem Ele, eu nada seria. Por ser minha motivação diária através da fé e esperança. Por ser a força que me impulsionou a seguir em frente quando, por algumas vezes, pensei em desistir. A Ele, agradeço por cada dia que me levanto com perfeitas capacidades de pensar e trabalhar, buscando a evolução do espírito e a compaixão ao próximo.

A minha mãe, Maria de Lourdes Barboza, por ser mãe e amiga. Por me acompanhar diariamente, participando de cada etapa vencida e principalmente por saber me confortar quando tudo parecia difícil demais para ser suportado. Por ser minha melhor companheira de viagens e na vida, por me ensinar que coragem e perseverança são características essenciais àqueles que pretendem alcançar as nuvens. Por ser o meu alicerce mais sólido.

Ao meu pai, Arinos Damião da Cruz, por me ensinar que o trabalho dignifica o homem. Por ser o meu conselheiro nos momentos de indecisão e me apoiar em todas as minhas decisões, mesmo não concordando com todas elas. Por ter me dado o apoio necessário para me dedicar exclusivamente aos estudos durante grande parte desta caminhada.

Aos meus irmãos Heider e Andrei por compreenderem os momentos de estresse e discussões, por suportarem meu gênio difícil e “revolucionário”. Agradeço por fazerem parte do meu alicerce de suporte diário, pelos almoços ou lanches em família, momentos nos quais podíamos dar uma pausa nas rotinas agitadas para conversarmos um pouco. Por nos presentear com a companhia mais que especial das minhas cunhadas, Fernanda e Luana, que sempre enchem a casa de delicadeza e carinho.

Ao destino, que através dos seus desfechos imprevisíveis, presenteou-me novamente com a companhia de um ser humano especial, que me traz tranquilidade e me faz acreditar a cada dia mais nos desígnios de Deus. Agradeço a Hugo Vieira, pelo carinho, lealdade, respeito e companheirismo. Por me incentivar a buscar caminhos diferentes e acreditar nos meus conhecimentos mais do que eu mesma.

A minha imensa e amada família, agradeço a cada um que direta ou indiretamente me incentivou, apoiou e colaborou para que eu conquistasse mais esta vitória.

Aos amigos e colaboradores do Laboratório de Hematologia e Imunologia Clínica, em especial a Kéllen, Philipe, Rúbia, Giulian e aos técnicos Ricardo e Patrícia Guimarães por toda a ajuda no desenvolvimento deste trabalho e pelas conversas e companheirismo diários.

Aos colaboradores do CIPQ-Saúde e dos laboratórios de Parasitologia e Imunologia, em especial aos colegas Marcelo e Gabriel, que compartilharam seus conhecimentos e tempo, ao técnico Gustavo Bahia pela ajuda diária nas coletas e disponibilidade, e aos professores Gustavo Eustáquio Brito e Helen Rodrigues Martins por cederam seus laboratórios para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos demais técnicos e funcionários da UFVJM pela colaboração de maneira direta ou indireta, pelas conversas, ensinamentos e serviços prestados.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, fundamentais para a construção do meu aprendizado e características profissionais.

Aos colegas da turma do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas 2015/2, por todo o companheirismo e carinho, pelas informações compartilhadas e apertos compartilhados, em especial a Laura Roberta de Sá, minha amiga de longa data com a qual dividi vários momentos de angústia e incertezas.

Aos meus colegas “calouros” das demais turmas do PPGCFarm por me acolherem generosamente e compartilharem experiências e muitas informações valiosas para o meu desenvolvimento profissional e pessoal.

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

A minha Orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Paula Rodrigues pela generosidade em me acolher novamente no Laboratório de Hematologia e Citologia. Pela compreensão em cada etapa deste percurso tortuoso. Pelos ensinamentos fundamentais ao desenvolvimento deste trabalho e à construção do meu conhecimento. Pelos conselhos, conversas e principalmente, por fazer além do que lhe seria “obrigação” para continuar me orientando. Por ter aberto as portas da sua casa para me orientar em horários não convencionais. Agradeço e sou grata por toda a confiança depositada em meu trabalho.

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

A Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) e a UFVJM pelo apoio financeiro necessário para a realização deste trabalho.



“Celui qui a la prétention d’enseigner  
ne doit jamais cesser d’apprendre.”

John Cotton Dana

## RESUMO

As plantas medicinais têm sido utilizadas pela humanidade, desde seus primórdios, com finalidades terapêuticas. Atualmente, cerca de 25% dos medicamentos são obtidos de espécies vegetais. Considerando a enorme biodiversidade do nosso país destaca-se o potencial para a descoberta de novas moléculas bioativas oriundas de produtos naturais. Espécies radicalares são produzidas continuamente em processos metabólicos fisiológicos, no entanto o desequilíbrio entre agentes pró-oxidantes e defesas antioxidantes provoca o aumento de espécies reativas circulantes conduzindo ao estresse oxidativo relacionado a etiologia de doenças cardiovasculares, inflamatórias, imunológicas, e relacionadas ao processo de envelhecimento como o Alzheimer e Parkinson. Para prevenir esse processo e as consequências ao organismo, tem-se aumentado a busca de compostos antioxidantes. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antioxidante de cinco extratos etanólicos brutos de partes aéreas ou raíz de espécies vegetais já utilizadas na medicina popular da região. Estas espécies foram: *Gomphrena arborescens* L.f. e *Gomphrena virgata* Mart. (*Amarantaceae*), *Miconia ferruginata* DC. (*Melastomataceae*) e *Vochysia elliptica* Mart. (*Vochysiaceae*), coletadas no município de Diamantina – MG e regiões subjacentes. Utilizando a metodologia de Folin-Ciocalteu pode-se observar que todos os extratos, exceto *G. virgata* raíz, apresentaram teores de compostos fenólicos totais (CFT) com destaque para *V. elliptica* e *M. ferruginata* (792,36 e 561,89 mg EAG/g extrato, respectivamente). A atividade redutora dos extratos avaliada pela captura de radicais DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup> demonstrou maior captura para os extratos com maior teor de CFT, sendo esta correlação forte e positiva. Realizou-se ainda, avaliação da interferência dos extratos na atividade sequestradora de radicais gerados em um sistema HRP/Luminol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e também os efeitos sobre o *burst* oxidativo de neutrófilos humanos isolados, ativados com PMA. Apenas os extratos de *V. elliptica* e *M. ferruginata* foram testados, apresentando atividade protetora frente as espécies radicalares produzidas tanto pelo sistema, quanto pelo *burst* oxidativo. A avaliação da viabilidade celular de neutrófilos em cultura na presença de todos os extratos sem estímulos exteriores demonstrou que estes não são citotóxicos mesmo na maior concentração testada (1000 µg/mL), tendo a *V. elliptica* apresentado possível atividade citoprotetora nesta concentração.

**Palavras-chave:** Atividade Antioxidante; Citotoxicidade; Estresse Oxidativo; Campo Rupestre; Vochysiaceae; Melastomataceae; Amaranthaceae.

## ABSTRACT

Medicinal plants have been used by mankind since its beginnings for therapeutic purposes. Currently, about 25% of medicines are obtained from plant species. Considering the enormous biodiversity of our country stands out the potential for the discovery of new bioactive molecules coming from natural products. Radical species are continuously produced in physiological metabolic processes, however the imbalance between pro-oxidant agents and antioxidant defenses causes the increase of circulating reactive species leading to oxidative stress related to the etiology of cardiovascular diseases, inflammatory, immune, and related to the aging process such as Alzheimer's and Parkinson's. To prevent this process and the consequences to the body, the search for antioxidant compounds has increased. Thus, the present work had as objective to evaluate the antioxidant potential of five crude ethanolic extracts of aerial parts or root of vegetal species already used in the popular medicine of the region. These species were: *Gomphrena arborescens* L.f. and *Gomphrena virgata* Mart. (*Amarantaceae*), *Miconia ferruginata* DC. (*Melastomataceae*) and *Vochysia elliptica* Mart. (*Vochysiaceae*), collected in the municipality of Diamantina - MG and subjacent regions. Using the methodology of Folin-Ciocalteu it can be observed that all extracts except *G. virgata* roots, presented total phenolic compounds (CFT), with emphasis on *V. elliptica* and *M. ferruginata* (792.36 and 561.89 mg EAG / g extract, respectively). The reductive activity of the extracts evaluated by the DPPH<sup>•</sup> and ABTS<sup>•+</sup> radical capture showed higher capture for extracts with higher CFT content, being this correlation strong and positive. We also evaluated the interference of the extracts in the sequestering activity of radicals generated in an HRP/Luminol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system and also the effects on the oxidative burst of isolated human neutrophils activated with PMA. Only the extracts of *V. elliptica* and *M. ferruginata* were tested, presenting protective activity against the radical species produced by both the system and the oxidative burst. The evaluation of the cell viability of neutrophils in culture in the presence of all the extracts without external stimuli, demonstrated that they are not cytotoxic even at the highest concentration tested (1000 µg / mL), and *V. elliptica* presented possible cytoprotective activity at this concentration.

**Keywords:** Antioxidant activity; Cytotoxicity; Oxidative Stress; Campo Rupestre; Vochysiaceae; Melastomataceae; Amaranthaceae.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS <sup>++</sup>	<i>2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt</i>
Abs	Absorbância
a.C.	antes de Cristo
AC	Abserobância do controle
Aam	Absorbância da amostra
AG	Ácido gálico
ASC	Área sob a curva
BHT	Butil-hidroxitolueno
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CGEN	Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DPPH <sup>•</sup>	<i>2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical</i>
EAG	Equivalentes de ácido gálico
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FC	Folin-Ciocalteu
FT	Fenólicos totais
Gpx	Glutathione peroxidase
Gr	Glutathione reductase

GST	Glutathione S-transferase
HO <sup>•</sup>	Radical hidroxila
HO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	Radical peroxila
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IC <sub>50</sub>	<i>Inhibitory concentration 50%</i>
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Radical superóxido
ON <sup>•</sup>	Óxido nítrico
ONOO <sup>-</sup>	<i>Peroxinitrito</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PMA	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
PPGCFarm	Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
QLDL	Quimioluminescência dependente do luminol
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Sistema de Biodiversidade
SOD	Superóxido dismutase
UFVJM	Universidade Federal dos Vales Jequitinhonha e Mucuri
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
UV	Ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>27</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>29</b>
2.1 Histórico da utilização de plantas medicinais .....	29
2.2 Desenvolvimento de produtos naturais .....	31
2.3 Produtos naturais de origem vegetal .....	33
2.4 O Campo Rupestre como fonte de substâncias bioativas .....	35
2.5 Espécies vegetais em estudo .....	37
2.5.1 Espécies de <i>Gomphrena</i> .....	37
2.5.2 <i>Vochysia elliptica</i> Mart. ....	39
2.5.3 <i>Miconia ferruginata</i> DC. ....	40
2.6 A formação de espécies reativas de oxigênio pelo organismo.....	41
2.7 Os antioxidantes.....	43
2.8 Métodos para determinação da atividade antioxidante.....	44
2.9 Quantificação do teor de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu .....	45
2.10 Avaliação da captura do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazina (DPPH <sup>•</sup> ).....	46
2.11 Avaliação da captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfônico) (ABTS <sup>•+</sup> ) .....	47
2.12 Determinação da atividade sequestradora dos radicais gerados no sistema HRP/Luminol/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por quimioluminescência .....	48
2.13 Avaliação do <i>burst</i> oxidativo em neutrófilos .....	49
2.14 Avaliação da citotoxicidade dos extratos pela viabilidade celular pelo método do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT).....	50
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>53</b>
3.1 Objetivo geral.....	53
3.2 Objetivos específicos.....	53
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>55</b>
4.1 Reagentes.....	55
4.2 Protocolos Experimentais .....	55

4.2.1 Obtenção de material vegetal .....	55
4.2.2 Preparo dos extratos vegetais .....	56
4.2.3 Determinação do teor de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu .....	56
4.2.4 Avaliação da captura do radical DPPH <sup>•</sup> .....	57
4.2.5 Avaliação da captura do radical ABTS <sup>•+</sup> .....	57
4.2.6 Determinação da atividade sequestradora dos radicais gerados no sistema HRP/Luminol/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por quimioluminescência .....	58
4.2.7 Obtenção de neutrófilos.....	58
4.2.7.1 Coleta do sangue venoso .....	58
4.2.7.2 Isolamento de neutrófilos pelo método da gelatina .....	59
4.2.7.3 Determinação da viabilidade celular inicial pela contagem em câmara de Neubauer pela metodologia do Azul de Trypan.....	59
4.2.7.4 Contagem diferencial pela coloração de May-Grünwald Giemsa.....	60
4.2.8 Avaliação do <i>burst</i> oxidativo em neutrófilos .....	60
4.2.9 Avaliação da citotoxicidade dos extratos pela viabilidade celular pelo método do MTT .....	61
4.3 Análises estatísticas .....	61
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>63</b>
<b>5.1 Determinação do teor de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu .....</b>	<b>63</b>
<b>5.2 Avaliação da captura do radical DPPH<sup>•</sup> .....</b>	<b>65</b>
<b>5.3 Avaliação da captura do radical ABTS<sup>•+</sup> .....</b>	<b>67</b>
<b>5.4 Determinação da atividade sequestradora dos radicais gerados no sistema HRP/Luminol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por quimioluminescência .....</b>	<b>69</b>
<b>5.5 Determinação da viabilidade celular inicial pela contagem em câmara de Neubauer pela metodologia do Azul de Trypan .....</b>	<b>72</b>
<b>5.6 Contagem diferencial pela coloração de May-Grünwald Giemsa .....</b>	<b>73</b>
<b>5.7 Avaliação do <i>burst</i> oxidativo em neutrófilos .....</b>	<b>73</b>
<b>5.8 Avaliação da citotoxicidade dos extratos pela viabilidade celular pelo método do MTT .....</b>	<b>76</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>79</b>

<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>81</b>
<b>ANEXO A Preparo de Reagentes e Soluções .....</b>	<b>93</b>
<b>ANEXO B Declaração de Depósito de Exsicatas no Herbário DIAM.....</b>	<b>97</b>
<b>ANEXO C Comprovante de registro para Coleta de Material Vegetal .....</b>	<b>99</b>
<b>ANEXO D Autorização do CNPQ para Coleta de Plantas.....</b>	<b>100</b>
<b>ANEXO E Autorização para Coleta de Material Biológico (CEP).....</b>	<b>102</b>
<b>ANEXO F Testes de correlação de Pearson para os resultados de quantificação do teor de compostos fenólicos totais e radicais DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•</sup> .....</b>	<b>106</b>







## 1 INTRODUÇÃO

Durante a evolução humana, diversas espécies vegetais foram utilizadas com finalidades terapêuticas de maneira empírica. Com a revolução industrial e a inserção da síntese orgânica de novas moléculas precursoras de medicamentos, houve um declínio na utilização dos recursos naturais. No entanto, devido à resistência de determinados patógenos e doenças aos medicamentos disponíveis no mercado e às limitações de criação de estruturas moleculares de maior complexidade por síntese industrial, tem-se observado o aumento da pesquisa de produtos naturais como fonte de novas substâncias bioativas.

Evidências indicam o papel-chave das espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) no organismo, podendo estas causar um grande número de desordens celulares ao provocarem a oxidação de lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos. Cerca de 95% das patologias observadas em pessoas acima de 35 anos estão associadas com a produção de radicais. Esta produção é controlada por compostos antioxidantes de origem endógena ou provenientes de fontes exógenas variadas, como a dieta alimentar ou medicamentos. As ERO e ERN são os principais responsáveis pelo processo de envelhecimento e doenças degenerativas associadas, como câncer, doenças cardiovasculares, aterosclerose, diabetes *mellitus*, doenças inflamatórias, autoimunes e neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer. Os antioxidantes abrangem diversas classes de compostos químicos, dentre os quais os ácidos fenólicos, tocoferóis e extratos de plantas, sendo utilizados na prevenção da oxidação de outras moléculas inibindo o início ou a propagação da reação de oxidação em cadeia.

Tendo em vista os possíveis efeitos citotóxicos de antioxidantes sintéticos, como o butil-hidroxitolueno (BHT) e seus potenciais efeitos carcinogênicos, verificou-se o aumento da busca de novos compostos antioxidantes naturais. Além disso, tem-se observado o crescente uso de produtos antioxidantes com fins profiláticos em patologias associadas aos processos inflamatórios e de envelhecimento celular, no intuito de prevenir ou minimizar os danos oxidativos às células. Deste modo, grupos de pesquisa científica trabalham intensificando a busca de compostos naturais bioativos que sejam menos tóxicos.

Considerando a falta de conhecimento científico das ações terapêuticas de plantas medicinais da flora nativa da região de Diamantina, foram realizados testes bioquímicos *in vitro* no estudo das espécies *Gomphrena arborescens* L.f., *Gomphrena virgata* Mart., *Miconia ferruginata* DC., e *Vochysia elliptica* Mart., avaliando o potencial antioxidante e citotoxicidade destes.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Histórico da utilização de plantas medicinais

A utilização da natureza para fins terapêuticos é tão antiga quanto a civilização humana. Tal uso baseava-se na observação, analogia, tentativa e erro, até a descoberta da finalidade de cada planta. Nas sagradas escrituras e o papiro de Ebers, encontram-se as primeiras descrições sobre plantas medicinais feitas pelo homem. Neste foram enumeradas cerca de 100 doenças e descritas um grande número de drogas de natureza animal e vegetal. Durante o período anterior à era cristã na civilização grega, destacaram-se Hipócrates, pai da medicina, por tomar a natureza como guia na escolha dos remédios e Teofrasto que escreveu vários livros sobre a história das plantas. Culturas antigas faziam amplo uso de drogas psicoativas. Evidências arqueológicas mostram artefatos descobertos no Equador e Timor que comprovam a utilização de nozes de bétele e folhas de coca, respectivamente (PINTO *et al*, 2002; FOGLIO *et al.*, 2006; DEVIENNE, RADDI e POZETTI, 2004; MATA, 2009).

Na Idade Média, devido à maior preocupação com questões religiosas, somente a partir do século VII a ciência readquiriu importância entre os árabes, sendo estes responsáveis pelo emprego dos purgativos vegetais e o conhecimento do sabor doce da urina dos diabéticos. No século XV, Paracelso cria a teoria da “assinatura dos corpos” que relaciona a atividade farmacológica de uma planta ao seu aspecto morfológico (PINTO *et al*, 2002).

As grandes navegações permitiram a descoberta de novos continentes e conseqüentemente de um grande arsenal terapêutico de origem natural. As culturas Inca, Maya, Asteca, Olmeca e Tolteca consignaram diversas drogas de valor terapêutico significativo, como epecacuanha, quina e coca (PINTO *et al*, 2002).

Há registros de que os primeiros médicos portugueses que vieram para o Brasil, diante da escassez de medicamentos empregados comumente na Europa, foram obrigados a perceber a importância dos remédios de origem vegetal utilizados pelos povos indígenas (BRASIL, 2012). Com a vinda da Corte Real para o Brasil e a abertura dos portos, expedições científicas começaram a chegar ao país com o objetivo de dar conhecimento aos europeus da exuberância da fauna e flora encontrada na colônia. Em 1838, Ezequiel Correia dos Santos isolou o alcaloide pereirina das cascas do pau-pereira, em uma farmácia do Rio de Janeiro, sendo um dos primeiros compostos a ser isolado puro no Brasil (PINTO *et al*, 2002).

No século XIX o botânico francês Augusto de Saint-Hilaire, compôs um herbário contendo 4.500 espécies desconhecidas dos cientistas. Em suas incursões pelo sertão brasileiro, percorreu diversas cidades situadas na província das Minas Gerais, entre elas o

Arraial do Tijuco (Diamantina), onde coletou diversas exsiccatas e informações dos sertanejos sobre o uso popular de novas espécies vegetais encontradas na região (SAINT-HILAIRE, 1824; 1828). Em 1804 o farmacêutico alemão Friedrich Wilhelm Adam isolou a morfina da *Papaver somniferum*, inspirando a descoberta de uma nova classe de hipno-analgésicos de emprego mais efetivo e seguro, os derivados 4-fenil-piperidínicos como a morfina, codeína e a papaverina. Destaca-se ainda a extração de cardenólídeos (digoxina) de espécies de *Digitalis* com propriedades diuréticas e tóxicas (BARREIRO, 2009).

Após a Segunda Guerra Mundial, grandes avanços nos estudos de biossíntese de produtos naturais foram observados. A utilização de métodos espectroscópicos em identificação estrutural possibilitou a determinação de estruturas complexas em curto espaço de tempo e a redução das quantidades de material necessário para análise (PINTO *et al.*, 2002; FOGLIO *et al.*, 2006).

O período pós-guerra foi de prosperidade para o desenvolvimento dos fármacos sintéticos, como os anti-histamínicos, ansiolíticos e anti-inflamatórios não-esteroidais. (VIEGAS-JR; BOLZANI e BARREIRO, 2006). Com a revolução industrial, a química experimental permitiu a síntese laboratorial de novas substâncias orgânicas, substituindo a química empírica, desencadeando a produção acelerada de novos medicamentos, mais puros e concentrados e, favorecendo a priorização das drogas sintéticas em detrimento da fitoterapia. No entanto, a capacidade de síntese de novas moléculas orgânicas é limitada, diferentemente dos metabólitos secundários das espécies vegetais, que estão em constante processo de adaptação e transformação (FIRMO *et al.*, 2011).

Há relatos da terapia com medicamentos vegetais em sistemas de medicinas milenares como, por exemplo, a chinesa, tibetana ou indiana-ayurvédica. A referência mais completa sobre prescrição de ervas chinesas é a enciclopédia chinesa Modern Day publicada em 1977 que lista 4800 medicamentos de origem vegetal (BRASIL, 2012).

Fontes naturais estão disponíveis em abundância e oferecem as melhores possibilidades de encontrar substâncias ativas de interesse terapêutico (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2010). Atualmente, o interesse governamental e profissional na pesquisa com espécies vegetais em uso na medicina popular tradicional registrou um aumento expressivo, evidenciando a importância da associação do conhecimento popular aos avanços tecnológicos e ao desenvolvimento sustentável (FOGLIO *et al.*, 2006; FIRMO *et al.*, 2011).

## 2.2 Desenvolvimento de produtos naturais

Importantes substâncias biologicamente ativas podem ser encontradas em fungos, insetos, bactérias, organismos marinhos e plantas, sendo a maioria dos fármacos em uso clínico originárias de produtos naturais ou desenvolvidos por síntese química planejada através destes (BARREIRO, 2009).

O interesse por produtos naturais cresceu devido à crença das populações de que estes são isentos ou não possuem efeitos colaterais, o que nem sempre é confirmado pelas pesquisas científicas de avaliação da eficácia, segurança e garantia da qualidade (LAGE, 2011).

A biodiversidade do Brasil é considerada uma fonte de substâncias biologicamente ativas e sua preservação é fundamental, tanto pelo valor intrínseco da riqueza biológica, quanto pelo enorme potencial como fonte de novos fármacos (BARREIRO, 2009).

Países emergentes como o Brasil têm nos produtos da biodiversidade alternativas vantajosas de inovação. Cerca de 25% dos medicamentos modernos são derivados direta ou indiretamente de plantas medicinais, por aplicação de tecnologias ao conhecimento tradicional. No caso de medicamentos antitumorais e antimicrobianos, esses valores chegam a 60% (BRASIL, 2012).

Estima-se que 25% dos 8 bilhões de dólares do faturamento da indústria farmacêutica em 1996, foram originados de medicamentos derivados de plantas (BRASIL, 2006).

Considerando a utilização crescente de recursos naturais para o desenvolvimento de novos produtos que apresentem atividade biológica, fez-se necessário o estabelecimento de normas que garantam a conservação, a utilização sustentável e a repartição justa e equitativa dos benefícios derivados da exploração dos recursos genéticos (BRASIL, 2000). Neste contexto, a Convenção sobre a Diversidade Biológica afirma o estabelecido pela legislação que confere o título de patrimônio da humanidade aos recursos genéticos além de estabelecer medidas que regulamentam e administram a coleta desses recursos de habitats naturais com a finalidade de conservação *ex situ* de maneira a não ameaçar o ecossistema e populações *in situ* de espécies (BRASIL, 2000).

A Lei de Patentes, número 9.279, de 14 de maio de 1996, tem repercussão direta sobre a biodiversidade brasileira, regulando os direitos e obrigações relativos à propriedade industrial. Sua relação com a biodiversidade reside na possibilidade de patenteamento dos componentes da biodiversidade, no entanto, no Art. 18, inciso III, é definido que não são patenteáveis “*o todo ou parte dos seres vivos, exceto microrganismos transgênicos que atendam aos três requisitos de patenteabilidade: novidade, atividade inventiva e aplicação*

*industrial*”. Sendo assim, produtos da diversidade biológica na forma em que ocorrem na natureza, são considerados descobertas, mas não atendem ao requisito de inventividade necessário para a obtenção de patentes (SIMÕES *et al.*, 2007).

No Brasil não houve um processo coordenado visando o desenvolvimento de fármacos a partir de plantas. É importante que os pesquisadores envolvidos estejam cientes que o químico de produtos naturais pode estar envolvido no isolamento e identificação dos constituintes ativos e também desenvolver pesquisas na tentativa de validar métodos analíticos modernos visando o controle de qualidade destas plantas (PINTO *et al.*, 2002).

A pesquisa e produção de novos fármacos a partir de plantas medicinais envolvem diversos campos do conhecimento e métodos de análise. Esse processo geralmente se inicia com o trabalho de um botânico, etnobotânico ou ecólogo que serão responsáveis pela coleta e identificação da planta. Estas podem ter algum composto ativo relacionado ao uso na medicina popular de uma população ou região. Os extratos das plantas serão preparados por fitoquímicos para então serem submetidos à triagem biológica através de ensaios farmacológicos. A presença de efeito farmacológico irá direcionar o processo de isolamento do princípio ativo através do biomonitoramento por testes de atividade (LAGE, 2011).

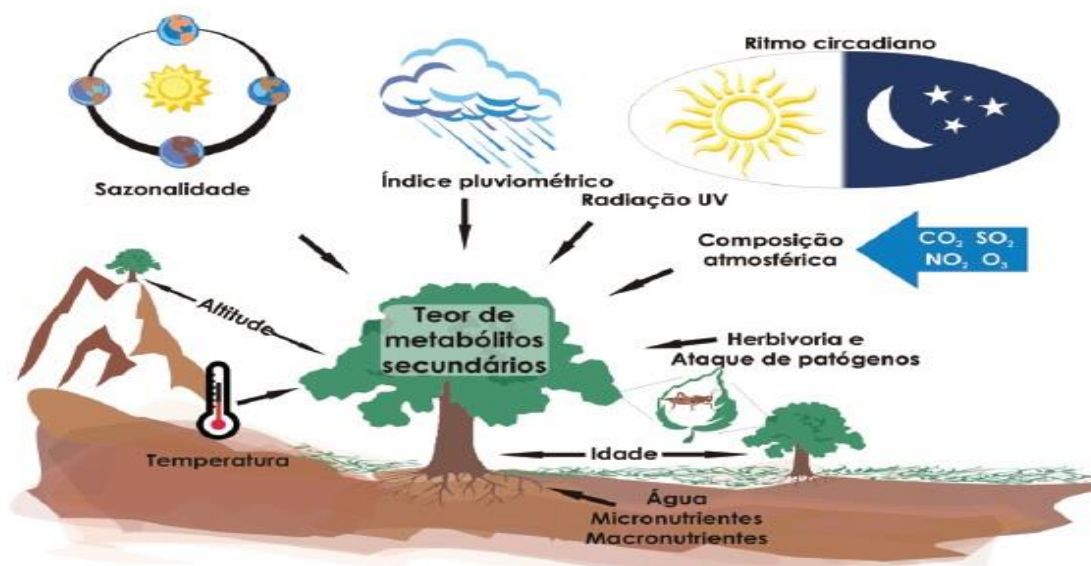
Várias estratégias estão englobadas no processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos e uma combinação de métodos tradicionais e modernos, de natureza multi e interdisciplinar se fazem necessários. Por muitas décadas a descoberta de substâncias bioativas se baseou em uma abordagem de tentativa e erro, guiada por modelos experimentais em culturas *in vitro* ou *in vivo*. (DIAS e DESSOY, 2009).

Grande maioria das substâncias bioativas são metabólitos secundários produzidos pelas espécies vegetais como estímulo as variações do ambiente. Alguns fatores (figura 6) podem influenciar o conteúdo de metabólitos secundários como a sazonalidade e o ritmo circadiano. A idade e o desenvolvimento, bem como os diferentes órgãos vegetais, podem influenciar a quantidade total de metabólitos produzidos e as proporções relativas dos componentes da mistura. A época em que uma planta é coletada é um dos fatores de maior importância, por exemplo, as folhas da *Digitalis obscura* apresentam as menores concentrações de cardenólídeos na primavera e uma fase de rápido acúmulo no verão (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

Outros fatores como temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes altitude, poluição atmosférica e indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos podem influenciar de diversas maneiras a produção de metabólicos secundários (figura 1), seja no sentido de inibir ou aumentar a produção destes (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).



**Figura 1- Fatores que influenciam na produção de metabólitos secundários**

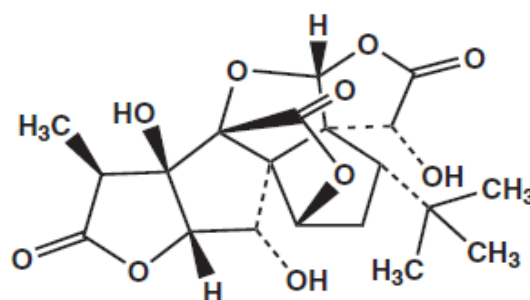


Fonte: adaptado de GOBBO-NETO, 2007.

### 2.3 Produtos naturais de origem vegetal

A medicina tradicional chinesa tem contribuindo de maneira marcante para a descoberta de novos produtos naturais biologicamente ativos, tendo como exemplo o isolamento dos terpenos polioxigenados do extrato da árvore *Ginkgo biloba* (figura 2).

**Figura 2 – Exemplo de ginkgolídeo isolado da *Ginkgo biloba*.**



Fonte: Adaptado de BARREIRO, 2009.

A química medicinal busca, entre outras, substâncias com atividade citotóxica e potencial anticancerígena, empregando um grande número de abordagens diferentes nessa pesquisa (LAGE, 2011).

Os pró-fármacos devem ter destaque especial, pois a biotransformação da forma inativa do fármaco, liberando a porção ativa no local de ação ou próximo a este, é uma estratégia útil no planejamento de quimioterápicos com alta especificidade de ação (DIAS e DESSOY, 2009).

Dentre os fármacos anticâncer originados de produtos vegetais introduzidos na terapêutica nas últimas décadas (listados na tabela 1), a grande maioria foi descoberta por processos empíricos. Atualmente os programas de prospecção incluem uma etapa inicial de testes *in vitro* em linhagens tumorais humanas utilizando técnicas automatizadas como High Troughtput Screening (HTS). Estes medicamentos movimentam cerca de 60 bilhões de dólares por ano (COSTA-LOTUFO *et al*, 2010).

**Tabela 1 – Produtos naturais ou fármacos derivados de plantas utilizados na terapia do câncer.**

<b>Fármaco</b>	<b>Fonte</b>	<b>Alvo Molecular</b>	<b>Indicação Terapêutica</b>
Vimblastina	<i>Catharanthus roseus</i>	Tubulina Microtúbulos	Leucemia linfoblástica aguda; câncer de testículo; doença de Hodking.
Vincristina			
Vindesina			
Vinorelbina			
Paclitaxel	<i>Taxus brevifolia</i>	Tubulina	Câncer de mama
Docetaxel		Microtúbulos	
Podofilotoxina	<i>Podophyllum peltatum</i>	Topoisomerase II	Câncer de pulmão, ovário e testículo; leucemia linfocítica aguda.
Etoposídeo			
Teniposídeo			
Topotecano	<i>Camptotheca accuminata</i>	Topoisomerase I	Câncer de cólon
Irinotecano			

Fonte: Adaptado (COSTA-LOTUFO *et al*, 2010).

No Brasil as pesquisas relacionadas às ciências que lidam com identificação e caracterização de biomoléculas com potencial terapêutico estão se desenvolvendo. Entretanto, apesar da descoberta de algumas moléculas promissoras, nenhuma ainda passou para a etapa clínica. Enquanto isso o país despense milhões de dólares na importação de medicamentos e

matérias-primas de origem natural para o tratamento de diversas patologias (COSTA-LOTUFO *et al*, 2010).

Os produtos naturais são uma fonte quase ilimitada de metabólitos bioativos que podem ser utilizados no desenvolvimento de novos fármacos. Ensaio moleculares que demandem quantidades mínimas de extratos e substâncias devem ser utilizados preferencialmente antes da decisão pelo isolamento de um composto (FUNARI *et al*, 2013; MARTINS, 2013).

Para isto, o controle de qualidade da matéria prima natural torna-se necessário, dado que as espécies, mesmo pertencentes a um mesmo grupo, podem apresentar perfis metabólicos diferentes no que se refere às classes e concentrações. Segundo a Organização Mundial da Saúde, o controle de qualidade de produtos bio-derivados para fins terapêuticos é essencial, uma vez que a presença de um marcador em um produto ou matéria-prima com composição complexa não reflete necessariamente as suas propriedades biológicas (FUNARI *et al*, 2013).

O Governo Federal, reconhecendo a importância dos produtos naturais derivados de plantas, elaborou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, como um elemento fundamental na implementação de ações para promover a melhoria da qualidade de vida da população. Fomentando a pesquisa, desenvolvimento tecnológico e inovação com base na biodiversidade, abrangendo espécies vegetais nativas e exóticas adaptas (BRASIL, 2006).

#### **2.4 O Campo Rupestre como fonte de substâncias bioativas**

Diante da grande biodiversidade brasileira, o bioma Campo rupestre é uma região de transição entre o Cerrado, a Caatinga e a Mata Atlântica, no leste do país, sendo uma rica fonte de obtenção de plantas para a pesquisa de novos compostos bioativos com potencial antioxidante. O bioma Cerrado é reconhecido como a savana mais rica do mundo e, sua vegetação representa 23% do território brasileiro, como demonstrado na figura 3. Cerca de 50% de sua área se situa em altitudes entre 300 e 600 metros acima do nível do mar sendo apenas 5,5% além de 900 metros (KLEIN, 2002;NERI *et al.*, 2007; VASCONCELOS, 2011).



## 2.5 Espécies vegetais em estudo

As espécies vegetais foram coletadas no município de Diamantina e região no qual predomina o bioma Campo Rupestre. Quatro espécies vegetais já utilizadas pela população dessa região com finalidades terapêuticas foram empregadas neste estudo: *Gomphrena arborescens* L.f. e *Gomphrena virgata* Mart. da família *Amarantaceae*; *Miconia ferruginata* DC. uma *Melastomataceae* e; *Vochysia elliptica* Mart. da família *Vochysiaceae*.

### 2.5.1 Espécies de *Gomphrenas*

A família *Amaranthaceae* é dominante em ecossistemas áridos e semi-áridos e apresenta uma série de características que permite sua sobrevivência em diferentes habitats e nas condições ambientais mais desfavoráveis. No Brasil ocorrem 19 espécies do gênero *Gomphrena* no Cerrado, sendo seis dessas usadas na medicina popular (*G. arborescens*, *G. globosa*, *G. leucocephala*, *G. pohlii*, *G. vagae* *G. mollis*) tendo ações terapêuticas relacionadas ao combate a infecções nas vias respiratórias como bronquite e asma, diarreia, febrífugas, tônicas e em dermatites, com utilização das partes aéreas e raízes (FANK-DE-CARVALHO e GRACIANO-RIBEIRO, 2005). Foram documentadas atividades farmacológicas de espécies do gênero *Gomphrena* como anticâncer, antimalárica, antimicrobiana e analgésica. No entanto, ainda existem diversas espécies a serem estudadas no intuito de elucidar as características fitoquímicas e atividades biológicas, contribuindo para o estabelecimento de monografias (PRASANTH *et al*, 2017; CAI, SUN e CORKE, 2003).

A espécie *Gomphrena arborescens* L.f. (figura 5) é um subarbusto nativo dos Campos Rupestres. Ocorre nos Estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Distrito Federal, São Paulo e Minas Gerais. A planta é conhecida popularmente como paratudo, perpétua do mato, paratudinho e raiz-do-padre-salerna tendo suas raízes utilizadas em garrafadas no combate à febre, asma e bronquite. A raiz da espécie tem ainda funções aromática, excitante, tônica e febrífuga, sendo útil na debilidade geral. Suas folhas são utilizadas contra dismenorreia (FANK-DE-CARVALHO e GRACIANO-RIBEIRO, 2005).

**Figura 5–*Gomphrena arborescens* L.f.**



Fonte: plantillustrations.org

Outra espécie dessa família é a *Gomphrena virgata* Mart. (figura 6) que é um subarbusto, amplamente distribuída no Brasil e conhecido como Cangussu-branco, também utilizada popularmente no tratamento de inflamações, infecções e dores, sendo a forma mais utilizada o infuso das raízes (FANK-DE-CARVALHO, MARCHIORETTO e BÁO, 2010; FANK-DE-CARVALHO *et al.*, 2010).

**Figura 6- *Gomphrena virgata* Mart.**



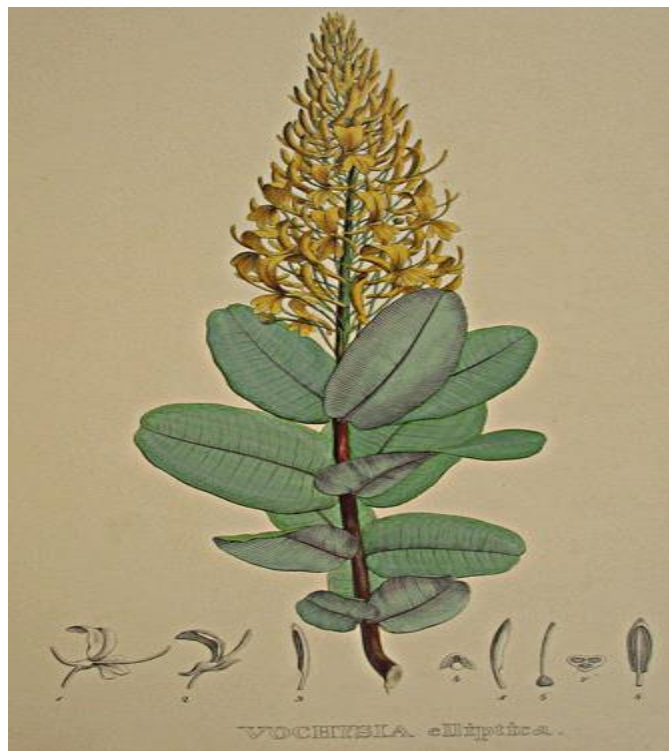
Fonte: plantillustrations.org

### 2.5.2 *Vochysia elliptica* Mart.

Com mais de 200 espécies distribuídas nas florestas tropicais e savanas, especialmente do Brasil, a família *Vochysiaceae* está representada por 160 espécies, sendo uma delas alvo de nossos estudos, a *Vochysia elliptica* Mart. (figura 7). Esta espécie nativa do cerrado brasileiro, conhecida popularmente como pau doce, ocorre nos estados da Bahia, Goiás, Rio de Janeiro, Tocantins, Distrito Federal e em Minas Gerais. Floresce de fevereiro a maio, setembro e outubro e frutifica em maio, setembro e outubro (GONÇALVES, ROMERO e YAMAMOTO, 2013). Na medicina popular, são descritas ações anti-inflamatória, antiasmática, antifúngica e antibacteriana (KHALIL *et al.*, 2006).

Estudo realizado com frações do extrato bruto das cascas do caule e folhas de espécie pertencente à mesma família (*Vochysia thyrsoidea*) demonstrou relevante potencial citotóxico, pela inibição do crescimento tumoral (SOUSA *et al.*, 2014; KHALIL *et al.*, (2006) descreveram ainda um potencial antioxidante em diferentes extratos de *Vochysia discolor* Mart. Outra espécie, pertencente ao mesmo gênero, a *Vochysia tucanorum* Mart., revela ação farmacológica gastroprotetora, provavelmente devido aos triterpenóides (GOMES *et al.*, 2009).

**Figura 7- *Vochysia elliptica* Mart.**



Fonte: plantillustrations.org

### 2.5.3 *Miconia ferruginata* DC.

A espécie *Miconia ferruginata* DC. (figura 8) pertence à família *Melastomataceae*, possuindo cerca de 200 gêneros, sendo que um dos maiores gêneros da família é o gênero *Miconia* que conta com aproximadamente 250 espécies distribuídas no Brasil. São conhecidas cerca de 1000 espécies do gênero, no entanto, nem um por cento das espécies foram estudadas. Conhecida popularmente como pixirica-do-campo e babatenão, é utilizada em infusão e banhos para tratamento de doenças de pele (SILVA, HIGUCHI e PIFANO, 2007; LIMA *et al.*, 2013; OLIVEIRA, MOTA e AGNES, 2014).

Estudos químicos apontam a presença de terpenoides e flavonoides responsáveis pelas atividades biológicas descritas do gênero, tais como ação antimicrobiana, antitumoral, antinociceptiva, leishmanicida e antioxidante (VASCONCELOS *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2008; PEIXOTO *et al.*, 2011; SERPELONI *et al.*, 2011).

**Figura 8 – *Miconia ferruginata* DC.**



Fonte: fm1.fieldmuseum.org



## 2.6 A formação de espécies reativas de oxigênio pelo organismo

Radicais livres são moléculas altamente instáveis e com grande reatividade química. São definidos como qualquer átomo ou molécula contendo elétrons desemparelhados nas suas camadas de valência, permitindo que sejam doadores ou aceptores de elétrons (LOBO *et al.*, 2010). A oxidação de uma substância é definida como a incorporação de oxigênio em sua estrutura, convertendo esta em um derivado com menor número de elétrons. A transferência de elétrons é um dos processos químicos fundamentais para a sobrevivência das células. No entanto, tal processo propicia a produção de átomos ou moléculas altamente instáveis e reativas, radicalares ou não, que podem causar danos oxidativo às células e tecidos (ALVES *et al.*, 2010).

As organelas citoplasmáticas são as principais fontes de espécies reativas, uma vez que estas metabolizam oxigênio, nitrogênio e cloro, gerando grande quantidade de metabólitos. As espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) englobam substâncias tais como os radicais superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroperoxila ( $HO_2^{\bullet}$ ), hidroxila ( $HO^{\bullet}$ ) e espécies não radicalares como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o oxigênio singlete ( $O_2^{\bullet}$ ), o ácido hipocloroso (HOCl), o óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ) e o peróxidonitrito ( $ONOO^-$ ) (ANDRADE *et al.*, 2007; FRIES e FRASSON, 2010; CHANG e LIN, 2012; BONACORSI *et al.*, 2013).

Espécies reativas atuam como mediadores para transferência de elétrons, participando de diversos mecanismos fisiológicos do organismo como processos metabólicos, produção de energia, vias de sinalização celular na fagocitose, regulação do crescimento celular e síntese de algumas substâncias biológicas importantes. No entanto, quando em excesso, essas espécies reativas causam efeitos deletérios, danificando membranas celulares, organelas, a mitocôndria, proteínas e o DNA, provocando alterações estruturais e morfológicas nas células (ALVES *et al.*, 2010). No intuito de combater os radicais livres, o organismo produz substâncias antioxidantes endógenas, capazes de retardar ou prevenir a oxidação de moléculas ao inibirem o início ou a propagação da reação de oxidação em cadeia, além de reparar certos danos ocasionados às células (ANDRADE *et al.*, 2007; FRIES e FRASSON, 2010).

O desequilíbrio entre substâncias pró-oxidantes e antioxidantes, chamado estresse oxidativo, ocorre quando as enzimas antioxidantes endógenas como a superóxido desmutase (SOD), a glutatona peroxidase (Gpx), glutatona redutase (Gr), glutatona S-transferase (GST) e a catalase, estão em proporção inferior aos pró-oxidantes (lipo-oxigenase, flavina desidrogenase, ciclo-oxigenase, NADPH oxidase e enzimas do sistema P450), sendo incapazes de impedir as ações deletérias destes sobre o organismo, como o rompimento da

homeostase celular, oxidação de proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA (GOVINDARAJAN *et al.*, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2005; FRIES e FRASSON, 2010).

O processo de respiração celular consome oxigênio e este é convertido em  $H_2O_2$  por dismutação do  $O_2^{\cdot-}$ , de maneira espontânea ou pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD). Apesar de fracamente reativo, o  $H_2O_2$  exerce importante papel no estresse oxidativo por transpor as membranas celulares e gerar o radical  $HO^{\cdot}$ , além de outras espécies oxidantes com ação microbicida, como o  $HOCl$  e o  $ONOO^-$ .

Apesar de não ser uma espécie radicalar, o  $HOCl$  é o principal oxidante produzido pelos leucócitos, sendo também permeável às membranas celulares. Quando em excesso, contribui na produção de outras espécies reativas de oxigênio envolvidas no processo de envelhecimento e desenvolvimento de patologias relacionadas. Fagócitos ativados produzem  $HOCl$ , gerando outras ERO tais como,  $O_2^{\cdot-}$  e  $HO^{\cdot}$ , via reação com  $H_2O_2$  (BARREIROS, DAVID e DAVID, 2006; KVICINSKI, 2007; ALVES *et al.*, 2010).

Entre as ERN, destaca-se a produção do  $NO^{\cdot}$ , que atua como sinalizador celular em diversos processos, como relaxamento dos músculos lisos, controle da pressão arterial e neurotransmissão. No entanto, quando em altas concentrações no organismo, este radical pode se combinar com o superóxido, formando o  $ONOO^-$ , um radical instável e muito potente (SMITH, MARKS e LIEBERMAN, 2007; VALKO *et al.*, 2007).

Em processos inflamatórios e infecciosos, os neutrófilos são as primeiras células do sistema imunológico a serem ativas. Esses leucócitos polimorfonucleares migram, por quimiotaxia, até o local afetado no intuito de reconhecer e fagocitar o patógeno. Durante o processo de *burst* oxidativo essas células consomem  $O_2$  convertendo-o em  $H_2O_2$  sob ação do complexo enzimático NADPH oxidase, que será consumido pela enzima mieloperoxidase, gerando o  $HOCl$ . A geração de espécies químicas com alto potencial de reatividade é essencial para a defesa do organismo na fagocitose (DAHLGREN e KARLSSON, 1999; ARNHOLD, 2004; WANG *et al.*; 2007, SAKARYA *et al.*; 2014).

O estresse oxidativo propicia o aparecimento de desordens celulares causadas pelos processos de oxidação em cadeia que levam a perda de estabilidade das membranas podendo evoluir para patologias tais como câncer, aterosclerose, inflamação, enfisema, doença respiratória aguda, injúria por reperfusão e artrite reumatoide (OLIVEIRA *et al.*, 2014; VALKO *et al.*, 2007.; VELLOSA, BARBOSA e OLIVEIRA, 2007).

## 2.7 Os Antioxidantes

Considerando o papel-chave dos radicais livres e outros oxidantes como grandes responsáveis pelo envelhecimento e doenças degenerativas associadas, faz-se necessário a utilização de substâncias antioxidantes exógenas, provenientes da dieta alimentar ou de produtos farmacêuticos que permitam o reestabelecimento do equilíbrio entre agentes pró-oxidantes e antioxidantes. Compostos antioxidantes são capazes de estabilizar os radicais livres, exercendo um papel importante na modulação enzimática, estimulação do sistema imune, diminuição da agregação plaquetária e modulação do metabolismo hormonal (JAUREGUI *et al.*, 2007).

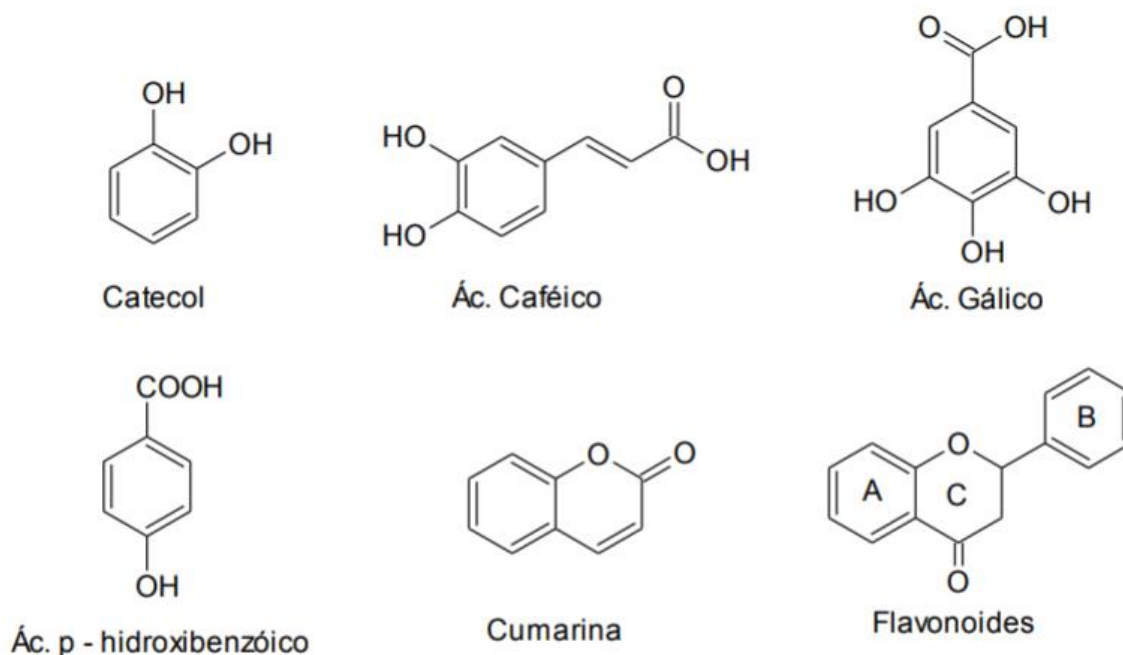
Os compostos fenólicos são metabólitos essenciais para o crescimento e reprodução de plantas e atuam como agentes protetores diante de patógenos, sendo secretados como mecanismo de defesa a condições de estresse como radiação UV, ataque de herbívoros, longos períodos de estiagem, etc (JAUREGUI *et al.*, 2007).

As substâncias com núcleo fenólico (figura 9) atuam como eficientes captadores de ERO e ERN, além de reduzirem e quelarem íons férrico que catalisam a peroxidação lipídica, sendo, portanto, consideradas bons agentes antioxidantes naturais, apresentando substâncias tais como flavonóides, flavonas, chalconas, isoflavonas, taninos, lignanos e ácidos fenólicos (AL-MAMARY, AL-MEERI e AL-HABORI, 2002; DELAZAR *et al.*, 2006).

Diversos estudos apontam os extratos vegetais contendo compostos fenólicos e flavonóides como detentores de atividade antioxidante (NEVES *et al.*, 2009; SOUSA *et al.*, 2007; CHAVES *et al.*, 2010; KÜÇÜKBOYACI *et al.*, 2012; BONACORSI *et al.*, 2013; CARNEVALE-NETO *et al.*, 2013).

Os flavonóides são uma classe de metabólitos secundários, pertencentes à classe dos fenólicos (figura 10) que apresentam em sua estrutura dois anéis fenil (A e B), ligados através de um anel pirano (C) (GROTEWOLD, 2006). Esta estrutura molecular, comumente de baixo peso molecular, confere aos polifenóis características ideais para o sequestro de radicais, atuando na captura e neutralização de espécies oxidativas como ânion superóxido, radicais hidroxila e peróxido, atuando de maneira sinérgica com outros antioxidantes como as vitaminas C e E (ALVES *et al.*, 2007; SIMÕES *et al.*, 2007; DUQUE, 2013).

**Figura 9– Exemplos de compostos fenólicos e estrutura básica de flavonóides.**



Estas moléculas são encontradas como pigmentos naturais em diversas espécies vegetais e atuam na proteção contra agentes oxidantes naturais. Atualmente, estes compostos têm sido objeto de considerável interesse científico e terapêutico, devido aos relatos de atividades biológicas importantes, como anti-inflamatória, anticoagulante, antibacteriana, vasodilatadora, antitumorais e antioxidantes (DEWICK, 2002; SILVA *et al.*, 2005; DORNAS *et al.*, 2007; HUBER e AMAYA, 2008).

Devido às características lipofílicas dos flavonóides, estes são assimilados pelas membranas celulares, restringindo a função moduladora de fluidez exercida pelas ER e, portanto, decrescendo a cinética das reações de oxidação que levam ao quadro de estresse oxidativo (CAO, SOFIC e PRIOR, 1997; ALVES *et al.*, 2007; LIMA e BEZERRA, 2012)

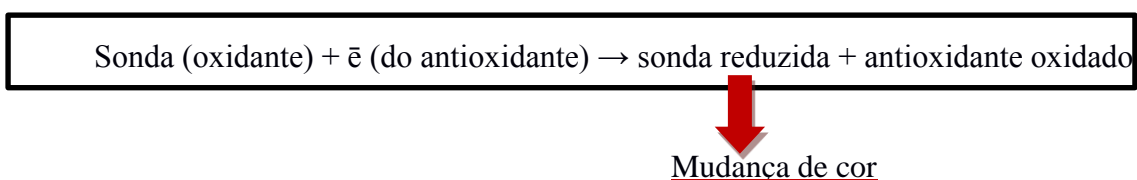
## 2.8 Métodos para determinação da atividade antioxidante

A avaliação da capacidade antioxidante de espécies vegetais em sistemas biológicos pode ser realizada por ensaios *in vitro* ou *in vivo* que possam determinar através de reações químicas, a habilidade de um composto em inibir ou sequestrar radicais livres. As técnicas utilizadas auxiliam na seleção inicial de espécies de plantas para estudos químicos e farmacológicos com maior especificidade (ALVES *et al.*, 2010).

Métodos diretos caracterizam-se pela competição entre uma sonda oxidável e o antioxidante (extratos) pelos radicais gerados por uma fonte de radicais livres. Como substratos para oxidação podem ser utilizados lipídios, proteínas, DNA, plasma sanguíneo, membranas biológicas, etc (TOMEI, 2008).

O processo dos ensaios indiretos é caracterizado por uma reação de oxirredução entre o oxidante (sonda para monitorar a reação) e o antioxidante (extratos), baseados na seguinte reação de transferência de elétrons (figura 10):

**Figura 10- Reação de oxirredução entre a sonda e o antioxidante.**



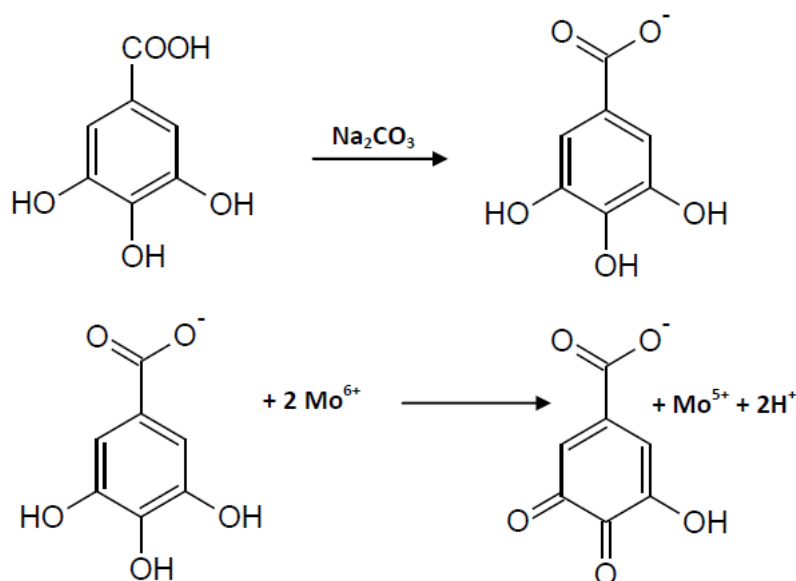
Ao ser reduzida pelo antioxidante, a sonda sofre mudanças colorimétricas cuja intensidade da mudança de cor será proporcional à atividade antioxidante ou à concentração do mesmo (TOMEI, 2008).

## 2.9 Quantificação do teor de compostos fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu

O método de Folin-Ciocalteu é utilizado para a quantificação de fenóis em uma amostra, sendo conhecido também como ensaio de fenólicos totais. Desenvolvido por Singleton e colaboradores em 1965, este ensaio foi padronizado 34 anos depois (SINGLETON *et al.*, 1999). Este reagente consiste de mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungúístico que se encontram no estado de oxidação + 6 (cor amarela no complexo  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados molibdênio azul e tungstênio azul  $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^4]$ , nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 e 6 e, cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras (SOUSA *et al.*, 2007).

A figura 11 demonstra a reação do ácido gálico (AG), um composto fenólico, com o molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu e o carbonato de sódio durante o tempo de incubação. Os complexos molibdênio-tungstênio azuis  $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^4]$ , permitem a quantificação de compostos redutores na solução.

**Figura 11 – Reação do AG (1) com o Molibdênio (2), componente do reagente de Folin-Ciocalteu**



As características estruturais dos compostos fenólicos conferem a estes, alto potencial antioxidante. Deste modo, o ensaio para determinação e quantificação dos compostos fenólicos totais (FT) em um extrato vegetal vem sendo utilizado como método inicial para auxiliar na avaliação deste potencial (ALONSO *et al.*, 2002; STEVANATO, FABRIS, MOMO, 2004).

## 2.10 Avaliação da captura do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazina (DPPH<sup>•</sup>)

A ação de um antioxidante pode ser determinada pelo mecanismo de sequestro de radicais livres em solução. O método de sequestro do radical livre DPPH<sup>•</sup> é utilizado para quantificar a atividade antioxidante total dos extratos estudados. O radical DPPH<sup>•</sup> é um cromóforo estável, com um pico de absorção no comprimento de onda de 517 nm, em meio alcoólico, apresentando solução de coloração violeta intensa. Quando em contato com os componentes presentes nas soluções teste, o DPPH<sup>•</sup> sofre redução observando-se uma mudança da coloração da solução original para amarela, proporcional à concentração da substância com potencial antioxidante presente, em conformidade com as leis de Lambert e Beer (ANDRADE *et al.*, 2007). A avaliação da atividade captadora de radical é obtida pela porcentagem de inibição, conforme a equação 1:

$$\% \text{ de Inibição} = [(\text{Abs. do controle} - \text{Abs. da amostra}) / \text{Abs. do controle}] \times 100 \quad (1)$$

Esta metodologia, descrita por Brand-Williams (1995), permite a quantificação da atividade antioxidante dos extratos brutos estudados pelo mecanismo de sequestro dos radicais DPPH<sup>•</sup> em solução. Quando em contato com os componentes presentes nas soluções teste, o radical sofre redução observando-se uma mudança da coloração da solução original para amarela, proporcional à concentração da substância com potencial antioxidante presente (ANDRADE *et al.*, 2007).

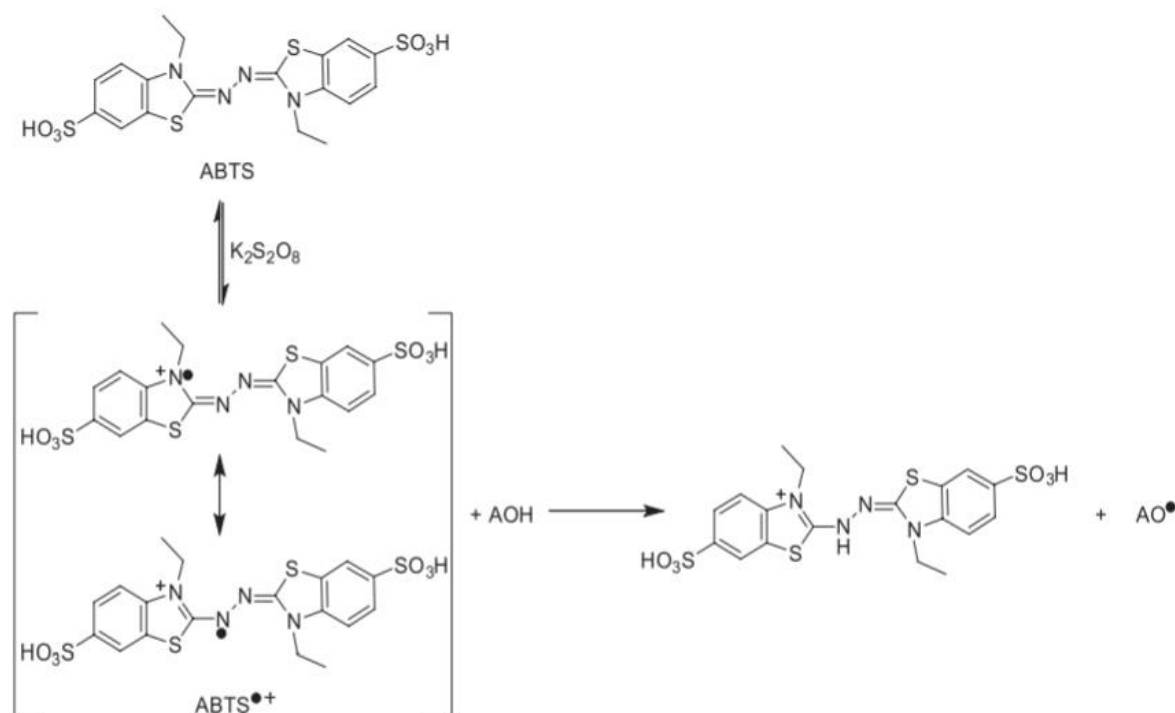
Os resultados da absorbância são extrapolados para uma curva de calibração obtida com diferentes concentrações do padrão ácido gálico e, a determinação da concentração da amostra ou padrão que causa 50% de inibição da concentração inicial de DPPH (IC<sub>50</sub>), pode ser obtida por regressão linear dos pontos plotados graficamente (SILVA *et al.*, 2005, ANDRADE *et al.*, 2007).

### **2.11 Avaliação da captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS<sup>•+</sup>)**

Outro método muito utilizado para medir a atividade antioxidante é a captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS<sup>•+</sup>), que pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática (figura 12) e possui um máximo de absorbância a 414 nm. Essa metodologia permite medir a atividade de compostos hidrofílicos e lipofílicos a partir do decréscimo na absorbância (RUFINO *et al.*, 2007).

A capacidade de sequestrar o radical ABTS<sup>•+</sup> é determinada segundo o método descrito por Re *et al.* (1999) com modificações. AG em diferentes concentrações foi utilizado como padrão para construção de uma curva de calibração analítica para determinação da atividade antioxidante (RUFINO *et al.*, 2007).

**Figura 12 - Estabilização do radical  $ABTS^{\bullet+}$  por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.**



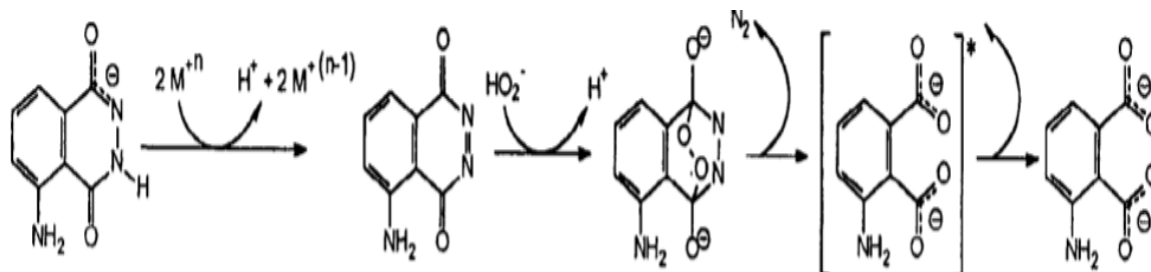
Fonte: OLIVEIRA *et al.*, 2014.

## 2.12 Determinação da atividade sequestradora dos radicais gerados no sistema HRP/Luminol/ $H_2O_2$ por quimioluminescência

Este ensaio utilizou um sistema enzimático, no qual as ERO são geradas pela oxidação do luminol na presença de  $H_2O_2$ , catalisado pela enzima HRP (TOMEI, 2008; GRESSLER *et al.*, 2010). A reação de oxidação exata que ocorre no sistema ainda não foi completamente elucidada, no entanto, Albertin e colaboradores propuseram em 1998 um mecanismo para a reação quimioluminescente do luminol em meio alcalino e na presença de um íon metálico, utilizando o  $H_2O_2$  como agente redutor (figura 13).



**Figura 13 – Proposta de mecanismo para a reação quimioluminescente do luminol em meio alcalino e na presença de um íon metálico, utilizando o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como agente redutor.**



Fonte: Adaptada de Albertain *et al.*, 1998.

A oxidação do luminol pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, catalisada pela enzima HRP, gera espécies reativas instáveis que emitem luminescência devido ao aparecimento de formas eletronicamente excitadas que ao tentarem voltar ao seu estado estável, liberam elétrons. A adição de um agente com potencial sequestrador de radicais, resulta na diminuição da quimioluminescência (FERREIRA e ROSSI, 2002).

Apenas as amostras dos extratos etanólicos brutos com potencial efeito antioxidante, caracterizado pela maior capacidade de captura de radicais avaliados anteriormente, foram avaliadas frente aos radicais gerados através da oxidação do luminol pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na presença da HRP, através da redução da quimioluminescência (KROL *et al.*, 1994; TOMEI, 2008; GRESSLER *et al.*, 2010).

### 2.13 Avaliação do *burst* oxidativo em neutrófilos

O *burst* oxidativo refere-se aos eventos metabólicos que ocorrem devido ao estímulo celular por determinadas substâncias que levam ao aumento do consumo de oxigênio e produção de espécies reativas, processo essencial para a destruição dos microrganismos fagocitados pelos leucócitos, mas que podem causar de igual maneira uma série de danos celulares e teciduais (PARACATU, 2012).

Estes eventos dependem da atividade da enzima NADPH oxidase que catalisa a redução de oxigênio para radical ânion superóxido, conduzindo à produção de uma grande variedade de reativos oxidantes com ação microbicida, mas que podem causar de igual maneira uma série de danos celulares e teciduais (KROL *et al.*, 1994; PARACATU, 2012).

A avaliação do *burst* respiratório pela quimiluminescência dependente do luminol (QLDL) é realizada a partir do contato entre o luminol e a suspensão de neutrófilos estimulados pelo Acetato de Forbol Miristato (PMA).

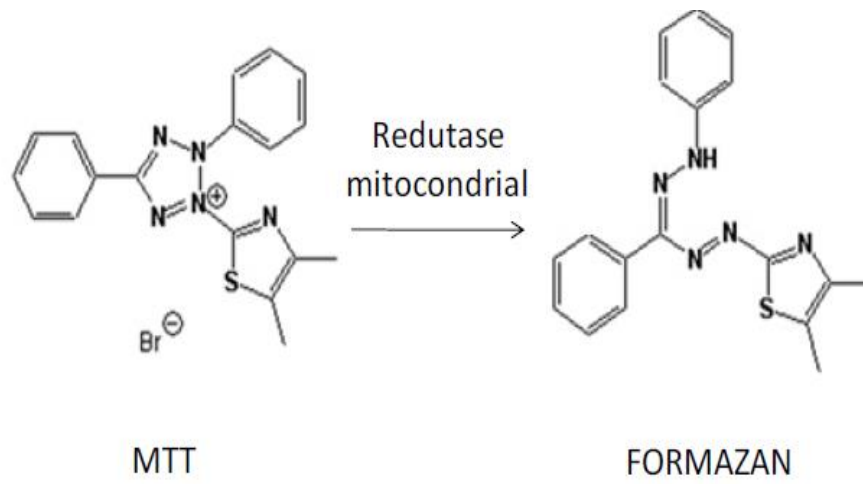
#### **2.14 Avaliação da citotoxicidade dos extratos pela viabilidade celular pelo método do brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT)**

Os sais de tetrazólio como o brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) podem ser usados para mesurar a atividade metabólica de células viáveis. Estes sais são reduzidos a formazano pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial, uma que se encontra no estado ativa somente em células com metabolismo e cadeia respiratória intactos. Após solubilizado, o formazano é quantificado fotometricamente e correlacionado ao número de células viáveis em suspensão (SIEUWERTS, 1995).

O ensaio de viabilidade celular pelo MTT é baseado na redução deste sal, um substrato amarelo escuro solúvel em água que penetra na célula por endocitose, pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase assim como pela NADPH originando cristais de formazan de cor azul escuro (figura 14). Estes cristais se acumulam em compartimentos endossomais e/ou lisossomais, e posteriormente são transportados para fora das células por exocitose, indicando que a redução do MTT depende da atividade redox celular e, portanto, corresponde a um reflexo da função mitocôndrial. Assim, alterações na atividade dessa organela resultam em mudanças na quantidade de formazan produzido e, conseqüentemente na absorbância do meio reacional (HUSSAIN, NOURI e OLIVER, 1993).

A avaliação dos efeitos citotóxicos dos extratos pode ser realizada frente ao contato dos neutrófilos humanos com as soluções dos extratos por tempo determinado de incubação, pela metodologia de redução do MTT, descrito por Sieuwerts *et al.* (1995), que evidencia a atividade mitocondrial.

Figura 14 - Redução do MTT por enzimas mitocondriais.





### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar a capacidade antioxidante e a citotoxicidade dos extratos etanólicos de *Gomphrena arborescens* L.f., *Gomphrena virgata* Mart., *Miconia ferruginata* DC. e *Vochysia elliptica* Mart.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Quantificar os compostos fenólicos totais nos extratos etanólicos;
- Avaliar a atividade antioxidante quantitativa pelos métodos de captura dos radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH<sup>•</sup>) e 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS<sup>•+</sup>);
- Avaliar a atividade sequestradora dos radicais gerados no sistema quimioluminescente HRP/Luminol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;
- Avaliar a interferência dos extratos no *burst* oxidativo de neutrófilos;
- Realizar teste de citotoxicidade dos extratos etanólicos em neutrófilos, através da metodologia da redução do brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT).



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Reagentes

Os reagentes utilizados nos experimentos da determinação das atividades antioxidante e citotóxica dos extratos estão listados abaixo. O modo de preparo, assim como as condições específicas de armazenamento foram descritas detalhadamente no anexo (ANEXO A).

Acetato de Forbol Miristato (PMA) - SIGMA®; Ácido clorídrico – ISOFAR®; Ácido Gálico – IMPEX®; Ácido sulfúrico – DINÂMICA®; Ácido tricloroacético – SYNTH®; Álcool etílico (Etanol) P.A – PROQUIMIOS®; Álcool metílico P.A (Metanol) – VETEC®; Azul de Tripan; Carbonato de Sódio P.A – DINÂMICA®; Cloreto de amônio – DINÂMICA®; Cloreto de Sódio P.A – PROQUIMIOS; Dimetilsulfóxido P.A (DMSO) – VETEC®; 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) – SIGMA-ALDRICH®; Fosfato de Potássio dibásico – VETEC®; Fosfato de Potássio monobásico P.A– VETEC®; Fosfato de Sódio bibásico– DINÂMICA®; Fosfato de Sódio monobásico– CINÉTICA®; Gelatina em pó Puríssima – ISOFAR®; Hidróxido de Sódio P.A – PROQUIMIOS®; Hipoclorito de Sódio 2,0 a 2,5% p/v – SANTA CLARA®; Luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,6,4-ftalazinadiona) 97% - SIGMA®; Peróxido de Hidrogênio 35% P.A – NEON®; Persulfato de Potássio – VETEC®; 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazol-6-ácido sulfônico (ABTS) – SIGMA®, brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) – SIGMA®.

### 4.2 Protocolos Experimentais

#### 4.2.1 Obtenção do material vegetal

As espécies utilizadas neste estudo foram coletadas no município de Diamantina, Minas Gerais, pelo Prof<sup>o</sup> Dr. Luiz Elídio Gregório e as exsiccatas foram armazenadas no herbário DIAM/UFVJM, conforme descrito na “Declaração de Depósitos das Exsiccatas” do ANEXO B.

O comprovante de registro que permite a coleta de material vegetal, submetido ao SISBIO (Sistema de Autorização e Informação em Sistema de Biodiversidade), encontra-se no ANEXO C.

As autorizações para retirada de material vegetal e de acesso de remessa de amostra de componente do patrimônio genético n° 010476/2012-1, respectivamente, autorização do CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e autorização do CGEN (Conselho de Gestão do Patrimônio Genético), estão no ANEXO D.

#### **4.2.2 Preparo dos extratos vegetais**

Os extratos utilizados foram cedidos pelo Prof. Dr. Luiz Elídio Gregório (UNIFESP) e fazem parte de uma coleção de plantas do Cerrado às quais estão sendo estudadas em conjunto por diversos laboratórios de pesquisa da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM.

Os materiais vegetais coletados foram desidratados em estufa de ar circulante a 40 °C até atingir peso constante (período de uma semana). Em seguida, foi realizada moagem em moinho de facas e direcionamento do material para extração pelo método de maceração em etanol 96% na proporção de 1:10 peso/volume, à temperatura ambiente, pelo período de uma semana havendo troca do solvente a cada 24 horas. Em seguida, o material vegetal foi filtrado e os extratos obtidos foram concentrados utilizando-se evaporador rotativo a 40 °C. Os extratos secos foram armazenados em dessecador a vácuo com sílica.

Os extratos brutos concentrados foram diluídos em metanol, em quantidade suficiente para preparo das soluções estoque a 2000 µg/mL e as diluições seriadas de cada extrato preparadas somente no dia da realização dos experimentos.

Os ensaios para determinação da atividade antioxidante dos extratos foram feitos por métodos diretos, baseados em estudos de cinética química e; por métodos indiretos, mediados pela transferência de elétrons.

#### **4.2.3 Determinação do teor de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu**

Para a quantificação dos compostos FT dos extratos brutos em estudo, adaptou-se a metodologia de Singleton e Rossi (1965) para sua realização microplacas.

Pipetou-se 100 µl de água Milli-Q (pH= 7,0); 12,5 µL de cada concentração dos extratos (250 a 2000 µg/mL) e 12,5 µL do reagente Folin-Ciocalteu em cada poço da microplacade 96 poços. Esta foi submetida à agitação de 30 segundos e repouso de 5 minutos. Em seguida, acrescentou-se 125 µL de carbonato de sódio (1M), obtendo um volume final de



250 µL por poço e a microplaca foi mantida à temperatura ambiente, ao abrigo da luz 90 minutos (SINGLETON e ROSSI, 1965).

A determinação das absorvâncias em 750 nm foi realizada no leitor de microplacas Spectramax® utilizando o metanol como branco. Concentrações conhecidas do padrão AG (10-200 µg/mL) foram utilizadas para elaboração da curva de calibração e obtenção da equação da reta, que permitiu a conversão das absorvâncias das amostras em concentrações equivalentes de AG para cada extrato. Os resultados foram expressos em equivalentes de AG por grama de extrato (EAG/ g de extrato).

#### 4.2.4 Avaliação da captura do radical DPPH•

Em uma microplaca de 96 poços foram adicionados 244 µL de DPPH• 60 µM, em ambiente escuro e em seguida, adicionou-se uma alíquota de 6 µL de cada diluição dos extratos e do padrão AG, obtendo um volume final de 250 µL. Controle contendo somente o reagente DPPH•60 µM para análise dos resultados.

A placa foi mantida à temperatura ambiente e ao abrigo da luz por um período de 30 minutos, após os quais foi realizada leitura das absorvâncias do meio reacional a 515 nm em leitor de microplacas Spectramax®, utilizando o metanol como branco.

Os resultados das absorvâncias foram convertidos em Porcentagem de Inibição através da equação 2.

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

Onde  $A_c$  = Absorvância do controle

$A_{am}$  = Absorvância amostra (2)

#### 4.2.5 Avaliação da captura do radical ABTS•<sup>+</sup>

A metodologia descrita por Re *et al.* (1999) permitiu a determinação do poder de captura do radical ABTS•<sup>+</sup>, gerado através de uma reação de oxidação pelo persulfato de potássio em meio ácido, por um agente antioxidante.

Baseados nesta metodologia, com algumas modificações, foi realizado o ensaio para quantificação da captura deste radical através da adição de uma alíquota 2,5 µL de cada diluição dos extratos em 247,5 µL do radical ABTS•<sup>+</sup>, obtendo-se um volume final de 250 µL

por poço em uma microplaca de 96 poços, em ambiente escuro. Controle contendo apenas o radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  e etanol e um padrão de referência (AG) foram realizados. Após homogeneização, a placa foi mantida à temperatura ambiente por 6 minutos ao abrigo da luz.

Realizou-se leitura das absorvâncias a 734 nm utilizando o etanol como branco para calibrar o equipamento (Spectramax®). A leitura da absorvância foi convertida em porcentagem de inibição, calculada utilizando a equação 2.

#### **4.2.6 Determinação da atividade sequestradora dos radicais gerados no sistema HRP/Luminol/ $\text{H}_2\text{O}_2$ por quimioluminescência**

Em microplacas brancas (Greiner® BIO-ONE) contendo 96 poços, foi adicionado tampão PBS em volume previamente calculado para completar os poços para volume final de 250  $\mu\text{L}$ . Em seguida, foram pipetados  $\text{H}_2\text{O}_2$  e luminol em volumes suficientes para concentrações finais de  $5 \times 10^{-5}$  M e  $1 \times 10^{-4}$  M, respectivamente. Tampão PBS foi utilizado como branco e Trolox como padrão (5 a 20  $\mu\text{g/mL}$ ). Os extratos foram adicionados em concentrações variadas (5 a 500  $\mu\text{g/mL}$ ). A reação foi disparada pela adição da HRP  $1 \times 10^{-6}$  M concentração final. A leitura da quimioluminescência foi realizada por período de 3 minutos em leitor de microplacas Spectramax®, obtendo-se a área sob a curva para a cinética de cada reação (KROL *et al.*, 1994; TOMEI, 2008; GRESSLER *et al.*, 2010)..

#### **4.2.7 Obtenção de neutrófilos**

##### **4.2.7.1 Coleta do sangue venoso**

Foram coletados 20 mL de sangue venoso por punção da veia antecubital mediana, na fossa antecubital, de doadores saudáveis, e esse volume foi transferido para 3 tubos contendo heparina como anticoagulante. O procedimento de coleta seguiu as recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial (2013).

A autorização para coleta e uso de material biológico em pesquisa foi concedida pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFVJM (ANEXO E).

Todo o material utilizado para coleta e as amostras coletadas foram devidamente descartadas logo após utilização ou realização dos experimentos.

#### **4.2.7.2 Isolamento de neutrófilos pelo método da gelatina**

Utilizou-se a metodologia descrita por Lucisano e Mantovani (1984), com algumas modificações, para a separação de neutrófilos do sangue venoso coletado.

Em tubos cônicos, tipo Falcon de 15 mL, foram adicionados volumes iguais de sangue venoso recém-coletado. Realizou-se centrifugação por 10 minutos a 1.000g e ao seu término, o plasma sobrenadante foi descartado juntamente com a camada de mononucleares.

Adicionou-se ao precipitado, gelatina 2,5% em NaCl 0,15 M, na quantidade equivalente a duas vezes o volume restante em cada tubo. Homogeneizou-se a mistura e os tubos foram mantidos em banho-maria a 37 °C por 30 minutos.

Após decantação por gravidade dos eritrócitos em suspensão, ocorrida no período de 30 minutos, o sobrenadante, contendo os polimorfonucleares, foi coletado e transferido para novos tubos cônicos tipo Falcon de 15 mL, distribuindo-se os volumes de maneira igualitária em cada tubo. NaCl 0,15 M em volume equivalente a duas vezes o volume já contido em cada tubo foi adicionado e após homogeneização realizou-se nova centrifugação por 10 minutos a 650g.

O sobrenadante foi descartado e adicionou-se ao precipitado 4 mL de solução de lise ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,83%, pH 7,2), quando necessário. A mistura foi homogeneizada e mantida em repouso em banho-maria a 37°C por 5 minutos com seguinte centrifugação por 10 minutos a 650g. Em seguida o sobrenadante foi descartado e a etapa de lise repetida apenas se necessário para a obtenção de uma suspensão sem a presença de hemácias.

Lavou-se o precipitado por duas vezes com solução de NaCl 0,15 M através de centrifugações por 10 minutos a 650g.

Ao final do processo, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspendido para volume final de 2 mL em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino contendo 1% de L-glutamina e, 1,5% de antibióticos (penicilina-estreptomicina).

#### **4.2.7.3 Determinação da viabilidade celular inicial pela contagem em câmara de Neubauer pela metodologia do Azul de Trypan**

A contagem dos polimorfonucleares e a determinação da viabilidade celular inicial foram realizadas ao mesmo tempo utilizando-se a câmara de Neubauer, através da diluição de 10  $\mu\text{L}$  da suspensão celular em 90  $\mu\text{L}$  da solução de Azul de Trypan 0,4%.

Foram contados os quatro quadrantes externos da câmara, fazendo-se a diferenciação de células viáveis (translúcidas) e não viáveis (azuis). Este método avalia a viabilidade celular através da integridade da membrana.

Para determinação da quantidade de células/mL de suspensão, utilizou-se a equação 3:

$$n^{\circ} \text{ células/mL} = (\text{total de células contadas} / n^{\circ} \text{ quadrantes}) \times \text{Fator de diluição} \times 10.000 \quad (3)$$

#### 4.2.7.4 Contagem diferencial pela coloração de May-Grünwald Giemsa

Para contagem diferencial das células, 50µL de suspensão celular foi espalhado sobre uma lâmina. Após secagem, adicionou-se metanol em volume suficiente para cobrir o esfregaço e fixa-lo.

No dia posterior, o esfregaço foi recoberto com 20 gotas do corante May-Grünwald por 3 minutos. Em seguida, o excesso de corante foi descartado e as lâminas lavadas delicadamente com água destilada. Adicionou-se 20 gotas de solução diluída de Giemsa, preparada no momento da coloração (uma gota de Giemsa concentrado para cada mililitro de água destilada) e após 20 minutos, esta foi lavada novamente com água destilada e deixada para secar naturalmente na posição vertical.

As lâminas foram observadas em microscópio óptico com objetiva de imersão.

#### 4.2.8 Avaliação do *burst* oxidativo em neutrófilos

Para determinação da atividade protetora dos extratos frente as ERO formadas no processo de oxidação celular causada por estímulos externos, foram adicionados em poço de microplacas (Greiner® BIO-ONE), volume calculado de tampão PBS para obtenção de volume final de 250 µL por poço;  $1,7 \times 10^6$  células por poço; luminol a 0,288 mM; extratos em diluições variadas e PMA  $4 \times 10^{-7}$  M (KROL *et al.*, 1994; PARACATU, 2012).

A cinética da reação foi acompanhada por um período de 15 minutos e os resultados foram expressos em área sob a curva (ASC). Foram realizados 3 experimentos, em triplicata e em dias diferentes.

#### **4.2.9 Avaliação da citotoxicidade dos extratos pela viabilidade celular pelo método do MTT**

A avaliação dos efeitos citotóxicos dos extratos foi realizada frente ao contato dos neutrófilos humanos com as soluções dos extratos etanólicos brutos por tempo determinado de incubação, pela metodologia de redução do MTT, descrito por Sieuwerts *et al.*(1995).

Em microplaca de 96 poços, foram adicionadas  $1 \times 10^6$  células, extratos em concentrações variadas (25 a 1000  $\mu\text{g/mL}$ ) e meio RPMI 1640 suplementado para completar o volume final de 200  $\mu\text{L}$ . Em seguida a placa foi incubada por 18 horas em estufa a 37 °C, contendo 5% de  $\text{CO}_2$ .

Após, a placa foi centrifugada por 15 minutos a 2500 rpm e o sobrenadante descartado foi substituído por 200  $\mu\text{L}$  de solução de MTT diluído em meio RPMI suplementado na proporção de 20  $\mu\text{L}$  de MTT para 180  $\mu\text{L}$  de RPMI. Incubou-se a placa novamente por um período de 4 horas.

Ao término da segunda incubação, a placa foi centrifugada como anteriormente e o sobrenadante descartado foi substituído por 200  $\mu\text{L}$  DMSO P.A. A placa foi mantida em agitador por 15 minutos para garantir a diluição dos cristais de formazano.

A leitura das absorbâncias foi realizada em leitor de microplacas (Spectramax®), a 540 nm. Controle negativo de morte foi realizado pela incubação apenas de suspensão de células em meio RPMI e, controle positivo de morte foi realizado através da adição de solução de cloreto de cádmio 2 mM aos poços. Os resultados foram expressos em Porcentagem de Viabilidade Celular comparados ao controle negativo de morte.

#### **4.3 Análises estatísticas**

Os experimentos foram realizados em blocos inteiramente casualizados, sendo feitos em 3 replicatas e em cada análise, foram feitas triplicatas. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão e a comparação entre as médias foi feita por Teste t e análise de variância por ANOVA one-way. Diferenças estatísticas foram consideradas significativas para  $p \leq 0,05$ , utilizando programa estatístico.

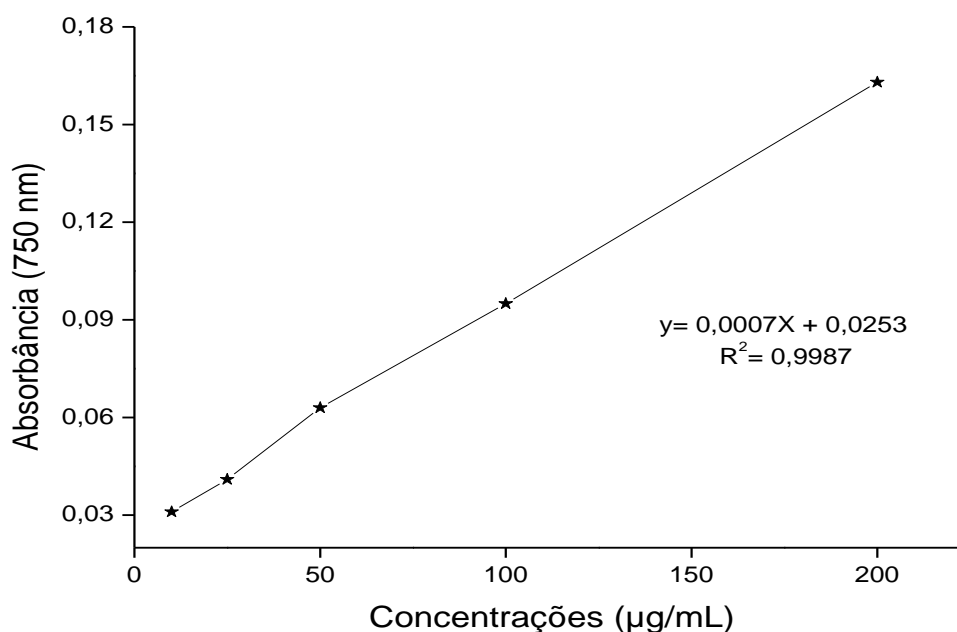


## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Determinação do teor de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu

Concentrações conhecidas do padrão AG foram utilizadas para obtenção da curva de calibração (gráfico 1) e possibilidade na determinação da concentração dos compostos fenólicos totais dos extratos em estudo.

**Gráfico 1– Curva de calibração do padrão ácido gálico (AG) para determinação de compostos fenólicos totais.**

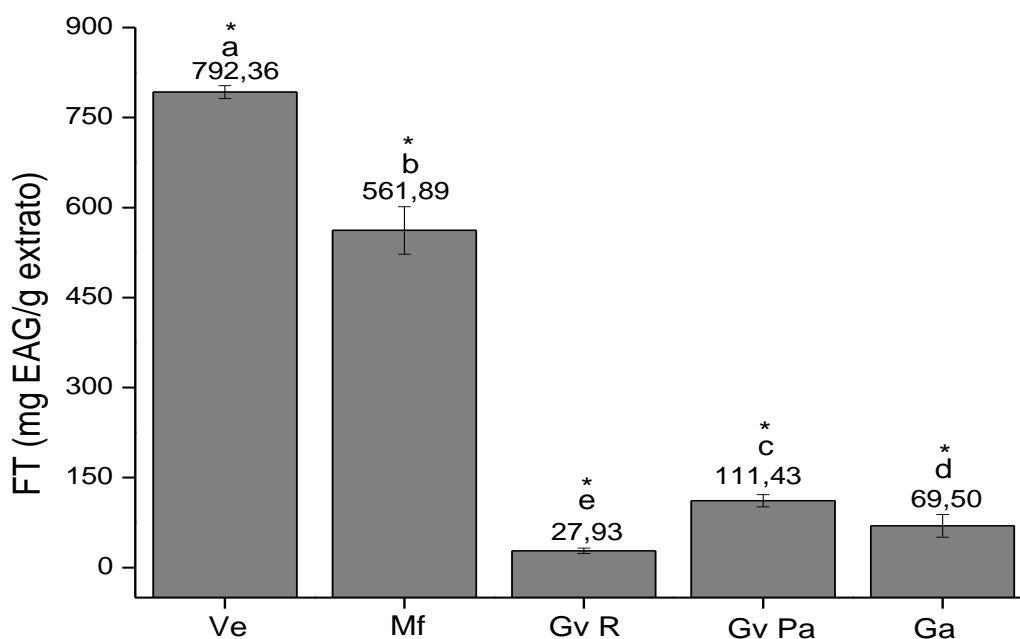


Experimento realizado em triplicata com n=3.

A curva de calibração feita a partir de concentrações conhecidas do padrão ácido gálico apresenta perfil concentração-dependente, onde o aumento da concentração reflete em aumento da absorbância na mistura reacional e conseqüente aumento no teor de compostos fenólicos totais. O coeficiente de variação próximo de 1 ( $R^2=0,9987$ ), indica alta linearidade das variáveis estudadas (concentração, absorbância), permitindo que a equação da reta seja utilizada para posterior cálculo do teor de compostos fenólicos dos extratos brutos das espécies em estudo.

O gráfico 2 representa o teor de compostos fenólicos totais das espécies estudadas, calculado a partir da substituição dos valores das absorvâncias das amostras na variável Y da equação da reta determinada pela curva de calibração. Os resultados foram apresentados em miligramas de fenólicos totais equivalente de AG por grama do extrato.

**Gráfico 2– Determinação do teor de compostos fenólicos totais em miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de extrato.**



Experimento realizado em triplicata, com n=4. (Ve) *V. elliptica*; (Mf) *M. ferruginata*; (Gv R) *G. virgata*, raíz; (Gv Pa) *G. virgata*, partes aéreas; (Ga) *G. arborescens*. Letras diferentes demonstram diferença estatisticamente significativa (ANOVA, one-way). \*Diferença estatística com nível de significância  $p < 0,05$ .

Os extratos etanólicos brutos das partes aéreas das espécies de *V. elliptica* e *M. ferruginata* apresentaram o maior teor de compostos fenólicos totais, sendo 792,36 e 561,89 mg EAG/g extrato, respectivamente. As espécies de *Gomphrena* apresentaram menor conteúdo de compostos fenólicos, tendo a *Gomphrena arborescens* 69,50 mg, a *Gomphrena virgata* raíz 27,93 e a *G. virgata* partes aéreas 111,43 mg EAG/g extrato. Estes dados demonstram que para a espécie *G. virgata*, os compostos fenólicos podem estar mais concentrados nas partes aéreas da planta, tais como caule, folhas e flores.



Os compostos fenólicos são considerados os principais compostos fitoquímicos com atividade antioxidante devido a sua alta capacidade de captura de radicais livres (KUMAR, 2012). A capacidade dos compostos fenólicos de reduzir os radicais livres deve-se aos grupos hidroxilas de sua estrutura, possuindo papel fundamental na atividade antioxidante, pela transferência de hidrogênio para radicais que serão estabilizados. Alguns estudos demonstram a relação entre o conteúdo fenólico e a capacidade antioxidante de espécies vegetais (KONGNOU *et al.*, 2016).

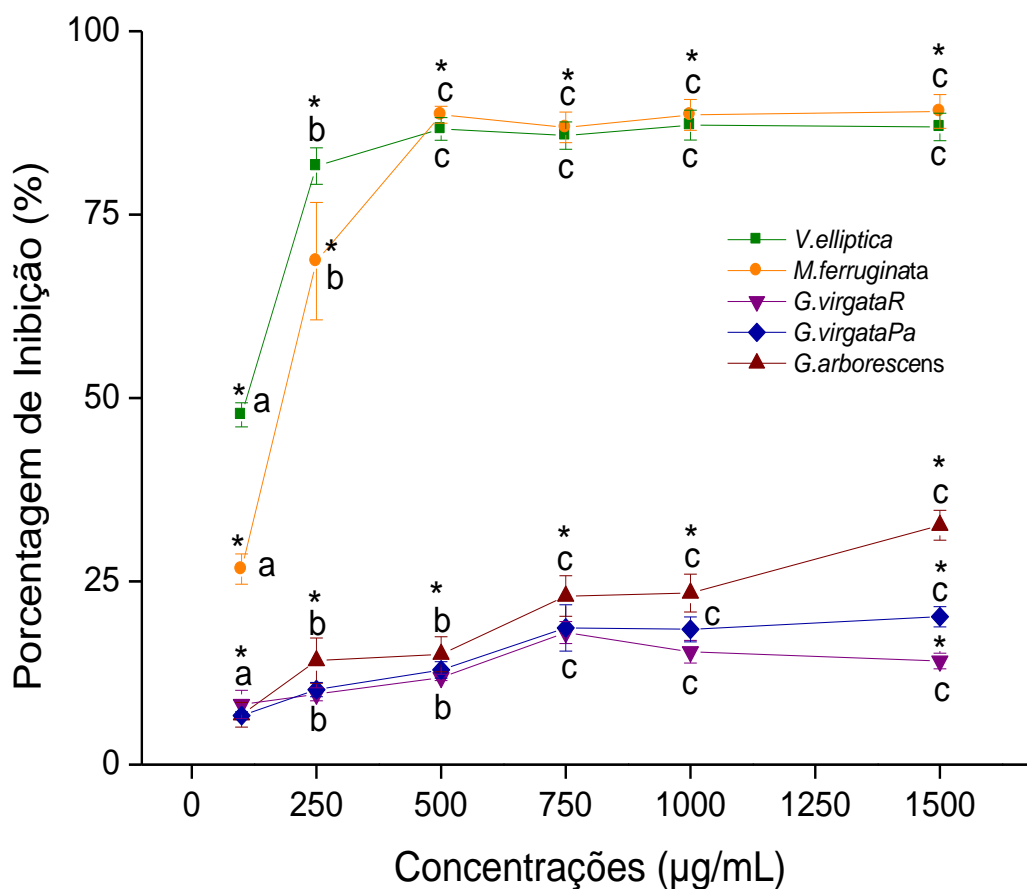
Foi demonstrado por diversos autores (SA *et al.*, 2012; SOUSA *et al.*, 2014) que a atividade antioxidante está diretamente relacionada à presença de compostos fenólicos nos extratos, comprovando o potencial antioxidante em extratos cujos teores de FT encontrados foram acima de 60 mg de FT em EAG/g de extrato. Nos resultados obtidos, o extrato de *G. virgata* raiz possui menor quantidade de CFT comparo aos demais extratos. O extrato de *G. arborescens* possui menor quantidade de compostos fenólicos, podendo indicar reduzido poder antioxidante.

Comparando-se os resultados obtidos nos ensaios com alguns valores encontrados na literatura (ROCHA, 2014; TOMEI, 2008) para extratos etanólicos brutos de espécies das famílias *Vochysiaceae* e *Amaranthaceae*, 164,07 mg EAG/g extrato e 305,05 mg EAG/g extrato, respectivamente, pode-se afirmar que as espécies estudadas possuem quantidades significativas de compostos fenólicos totais, conferindo a estes, importante atividade antioxidante. Em estudo realizado por Mazzolin (2013) com roedores, utilizando espécie da família *Vochysiaceae*, comprovou-se efeito de redução da diarreia e inflamação intestinal, demonstrando ação antioxidante importante na prevenção de diversos processos lesivos que envolvem o estresse oxidativo.

## **5.2 Avaliação da captura dos radicais DPPH<sup>•</sup>**

O ensaio de captura do radical DPPH<sup>•</sup> mede a capacidade das amostras de doação de hidrogênio para estabilizar os radicais em solução. Para tanto, foi utilizada a metodologia descrita por Duarte e Almeida, 2006, em que os valores das absorbâncias foram medidos em 515nm e convertidos em porcentagem de inibição de acordo com a equação 2 (gráfico 3).

Gráfico 3- Porcentagem de inibição da captura do radical DPPH•.



Experimento realizado em triplicata com  $n=3$ . (Verde) *V. elliptica*; (Laranja) *M. ferruginata*; (Roxo) *G. virgata*, raiz; (Azul) *G. virgata*, partes aéreas; (Bonina) *G. arborescens*. Letras diferentes demonstram concentrações do mesmo extrato que apresentam diferença estatisticamente significativa (ANOVA, one-way  $p<0,05$ ). \*Diferença estatística entre mesmas concentrações de extratos diferentes ( $p<0,05$ ).

Pode-se verificar que os extratos brutos de *V. elliptica* e *M. ferruginata* apresentaram maior capacidade inibitória do radical DPPH• quando comparados às espécies do gênero *Gomphrena*. Para as primeiras, as respostas apresentam perfil concentração-dependente até 500 µg/mL, quando atingem um platô (85,58%), indicando a concentração mínima capaz de atingir o máximo de inibição dos radicais.

De acordo com a classificação proposta por Melo e colaboradores (2008 e 2011), considera-se forte poder antioxidante, quando a captura de radicais DPPH• for superior a 70%; moderado, quando a captura está entre 50 e 70% e fraco, para captura menor que 50%.

Sendo assim, podemos classificar os extratos brutos de *V. elliptica* e *M. ferruginata* como forte poder antioxidante, e os extratos do gênero *Gomphrena* como fraco poder antioxidante.

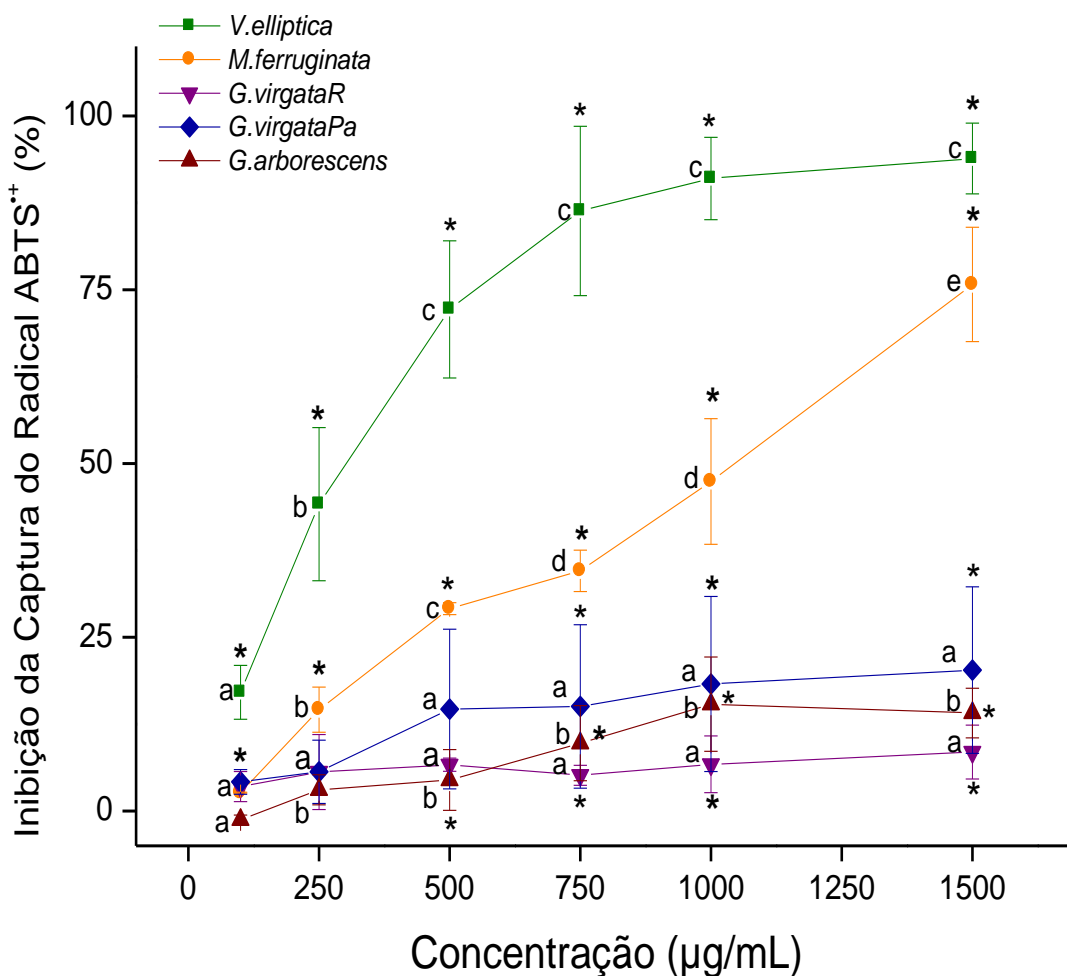
Estudo realizado por Tomei, em 2008, demonstra valor de porcentagem de inibição da captura do radical DPPH<sup>•</sup> igual a 68% para a concentração de 25 µg/mL de extrato bruto etanólico de planta pertencente à família *Amaranthacea* (gênero *Gomphrena*), no entanto o gênero e espécie, assim como o bioma da coleta foram diferentes, o que pode explicar a diferença existente relacionada ao poder de captura de radicais em solução, uma vez que o estudo testou os extratos em concentrações superiores.

A literatura comprova que extratos vegetais contendo quantidades importantes de compostos fenólicos totais possuem potencial atividade antioxidante (LIMA *et al.*, 2006; TOMEI, 2008; ROCHA, 2014). Os resultados obtidos apresentam as espécies que possuem maior quantidade de compostos fenólicos totais, *V. elliptica* e *M. ferruginata*, como aquelas que capturaram maior quantidade de radicais livres, indo de encontro ao descrito por estes autores.

A análise da correlação de Pearson (gráfico 10 – Anexo F1) para a comparação dos dados de teor de compostos fenólicos totais e captura do radical DPPH<sup>•</sup> demonstra que existe uma forte correlação positiva entre os testes, com valor de 0,9640, o que significa que quanto maior o teor de compostos fenólicos nos extratos, maior será sua capacidade de capturar radicais DPPH<sup>•</sup> e, portanto, maior potencial antioxidante.

### **5.3 Avaliação da captura do radical ABTS<sup>•+</sup>**

A atividade antioxidante determinada pela captura do radical ABTS<sup>•+</sup> através da metodologia descrita por Re *et al.*, 1999, está representada no gráfico 4, como porcentagem de inibição relativa a cada concentração dos extratos, calculada a partir da conversão do valor da absorbância resultante, utilizando a equação 2.

Gráfico 4- Porcentagem de inibição da captura do radical DPPH<sup>•</sup>.

Experimento realizado em triplicata com n=3. (Verde) *V. elliptica*; (Laranja) *M. ferruginata*; (Roxo) *G. virgata*, raiz; (Azul) *G. virgata*, partes aéreas; (Bonina) *G. arborescens*. Letras diferentes demonstram concentrações do mesmo extrato que apresentam diferença estatisticamente significativa (ANOVA, one-way p<0,05). \*Diferença estatística entre mesmas concentrações de extratos diferentes (p<0,05).

Os resultados da inibição da captura do radical ABTS<sup>•+</sup> demonstram resposta concentração-dependente para os extratos de *M. ferruginata* e *V. elliptica* evidenciando um platô entre 500 µg/mL e 1500 µg/mL para esta última, indicando a concentração mínima capaz de induzir a maior porcentagem de inibição (72,17%). A concentração máxima de *M. ferruginata* produz uma inibição de 75,75%, no entanto, para concentrações abaixo de 1000 µg/mL a inibição não alcança os 50%, evidenciando uma menor capacidade do extrato na

captura do radical  $ABTS^{\bullet+}$  e, portanto menor atividade antioxidante frente a este ensaio, quando comparada a *V. elliptica*.

As espécies de *Gomphrena* apresentam baixa capacidade de inibir a captura dos radicais  $ABTS^{\bullet+}$ , indicando poder antioxidante inferior aos demais extratos, de acordo com esta metodologia, com máximo de inibição em 20,29% para as partes aéreas da *G. virgata*.

Komalavalli e colaboradores, em 2014, avaliaram a capacidade antioxidante da espécie *Sonerila tinneveli*, pertencente à família *Melastomataceae* (mesma família da *M. ferruginata*) encontrando 88,27% de inibição do radical  $ABTS^{\bullet+}$  a uma concentração de 800  $\mu\text{g/mL}$  do extrato etanólicos da planta.

Cada metodologia possui particularidades devido aos diversos tipos de radicais e aos diferentes sítios de ação; sendo assim, não podemos utilizar apenas um método para representar de forma segura e precisa a verdadeira atividade antioxidante de uma substância (SUCUPIRA *et al.*, 2012).

A análise da correlação de Pearson (gráfico 11 – Anexo F2) para a comparação dos resultados de teor de compostos fenólicos totais e captura do radical  $ABTS^{\bullet+}$  demonstra que existe uma forte correlação positiva entre os testes, com valor de 0,9379, o que significa que quanto maior o teor de compostos fenólicos nos extratos, maior será sua capacidade de capturar radicais  $ABTS^{\bullet+}$  e, portanto, maior potencial antioxidante.

A correlação feita para os testes de captura dos radicais DPPH $\bullet$  e  $ABTS^{\bullet+}$  (gráfico 12 – Anexo F3) demonstrou ainda que os extratos possuem forte correlação positiva, com valor de 0,8152, permitindo inferir que quanto maior o potencial de captura do radical DPPH $\bullet$ , maior será o potencial de captura do radical  $ABTS^{\bullet+}$ . Esta relação é ainda maior quando excluídos os resultados do extrato de *M. ferruginata*.

Sendo assim, pode-se afirmar que os extratos brutos das espécies *V. elliptica* e *M. ferruginata* são aquelas que possuem a maior capacidade antioxidante, quando comparados aos demais extratos testados.

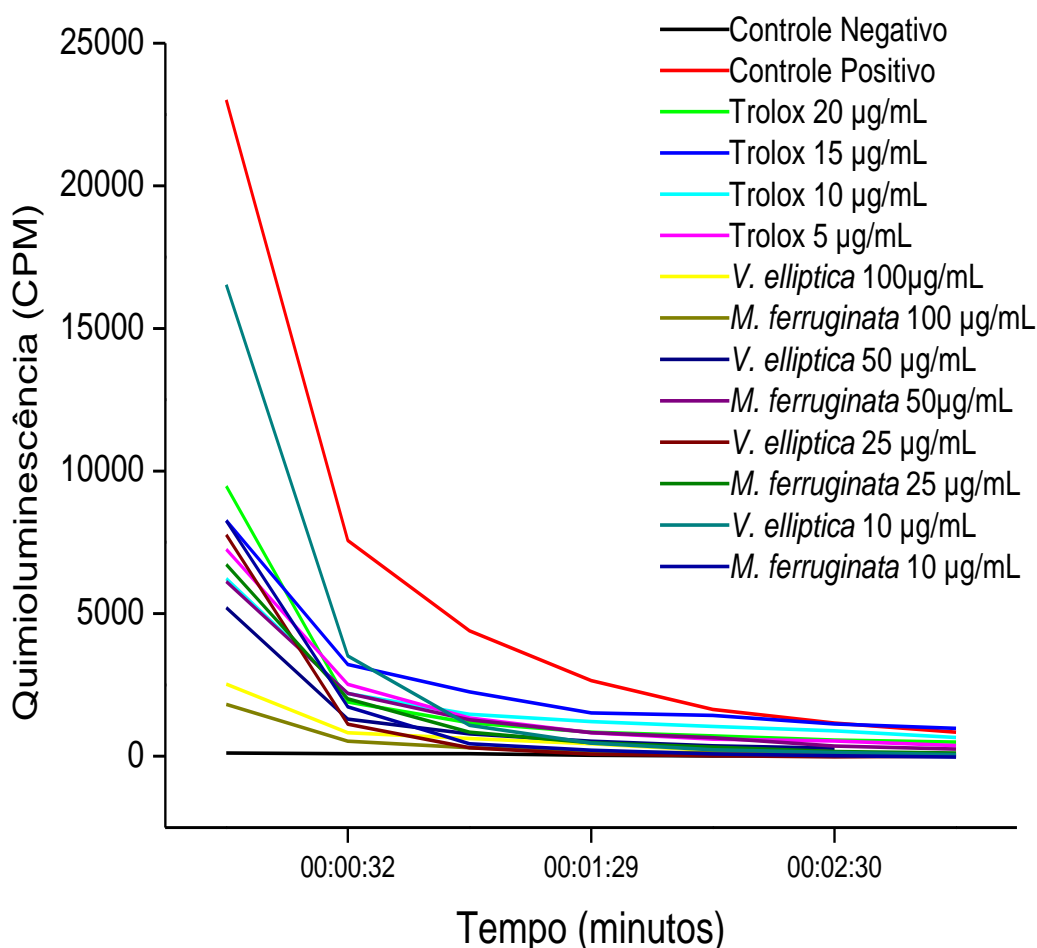
#### **5.4 Determinação da atividade sequestradora dos radicais gerados no sistema HRP/Luminol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por quimioluminescência**

Este ensaio utilizou um sistema enzimático, no qual as ERO são geradas pela oxidação do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pela enzima HRP, na presença do luminol como sonda detectora de tais espécies (TOMEI, 2008; GRESSLER, 2010).

O gráfico 5 representa a cinética da reação dos extratos testados (*V. elliptica* e *M. ferruginata*) para os controles negativo e positivo, assim como dos extratos nas concentrações de 10, 25, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ .

Os resultados finais da cinética da reação (gráfico 6), tempo total de 3 minutos, foram expressos em área sob a curva (ASC) para os extratos de *V. elliptica* e *M. ferruginata* nas concentrações de 5, 25, 50, 100, 250 e 500  $\mu\text{g/mL}$ , utilizando o trolox como padrão nas concentrações de 5, 10, 15 e 20  $\mu\text{g/mL}$  (gráfico 6).

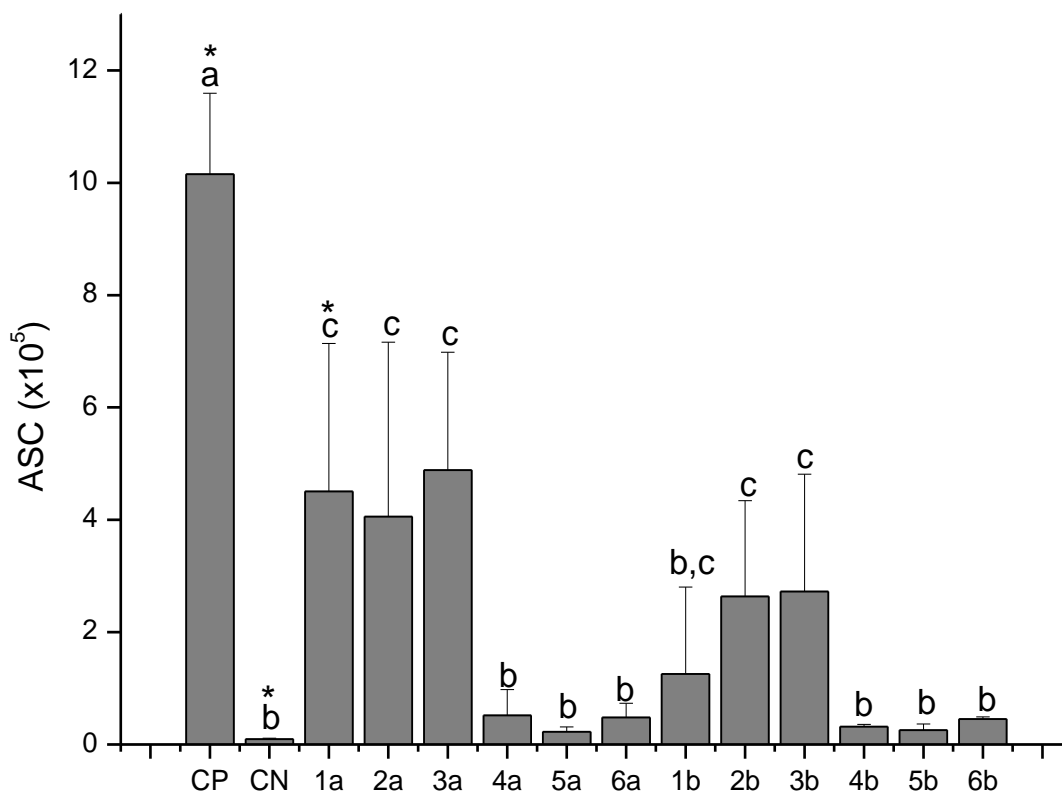
**Gráfico 5 - Efeito dos extratos etanólicos de *V. elliptica* e *M. ferruginata* na cinética do sistema HRP/LUMINOL/ $\text{H}_2\text{O}_2$ .**



CP- Controle Positivo (contém enzima HRP); CN- Controle Negativo (Não contém enzima HRP); Ve 10, 25, 50 e 100 - *V. elliptica* nas concentrações de 10, 25, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ; Mf 10, 25, 50 e 100 - *M.*

*ferruginata* nas concentrações de 10, 25, 50 e 100 µg/mL. Experimento realizado em triplicata com n=3.

**Gráfico 6 – Capacidade sequestradora de radicais em sistema químiluminescente HRP/Luminol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**



CP- Controle Positivo (contém enzima HRP); CN- Controle Negativo (Não contém enzima HRP); 1a, 2a, 3a, 4a, 5a e 6a - *Vochysia elliptica* nas concentrações de 5, 25, 50, 100, 250 e 500 µg/mL; 1b, 2b, 3b, 4b, 5b e 6b - *Miconia ferruginata* nas concentrações de 5, 25, 50, 100, 250 e 500 µg/mL. Experimento realizado em triplicata com n=3. Letras diferentes demonstram concentrações do mesmo extrato que apresentam diferença estatisticamente significativa (ANOVA, one-way p<0,05). \*Diferença estatística entre mesmas concentrações de extratos diferentes (p<0,05).

Foi realizado um controle positivo dos ensaios contendo a enzima HRP no meio reacional para proporcionar o máximo de produção de ERO para as condições propostas, obtendo-se um valor médio de ASC de  $10,15 \pm 1,44 \times 10^5$ , caracterizando uma elevada quimioluminescência devida à produção de ERO no meio. No controle negativo não foi adicionado à enzima HRP, portanto, ele representa a linha de base do teste, apresentando ASC de  $0,09 \pm 0,02 \times 10^5$ .

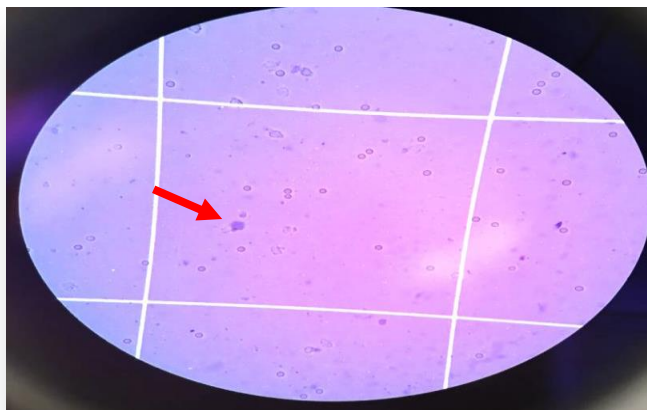
Os extratos etanólicos de *V. elliptica* e *M. ferruginata* nas concentrações de 5, 25, 50, 100, 250 e 500 µg/mL foram testados frente ao sistema completo, ou seja, com a adição da enzima HRP, demonstrando elevada capacidade sequestradora de ERO dispersas no meio reacional, apresentando ASC de até  $4,88 \pm 2,1 \times 10^5$  e  $2,72 \pm 2,08 \times 10^5$ , respectivamente para as maiores concentrações dos extratos. Estes valores permitem inferir que esses extratos, mesmo em baixas concentrações, possuem alto potencial de atividade antioxidante, pois inibem a reação de oxidação do sistema ou captura os radicais formados por estas reações. Concentrações acima de 50µg/ml causam inibição ou redução quase que por completo da quimioluminescência do sistema.

Em estudo similar, Chang e Lin (2012), utilizaram a metodologia do sistema enzimático para determinar a atividade antioxidante da *Terminalia chebula*. Neste estudo, a presença confirmada de compostos fenólicos totais corroborou com o resultado de captura de ERO dispersas no meio reacional, caracterizado pela baixa concentração de extrato necessária para inibir em 50% os valores comparados ao controle.

### **5.5 Determinação da viabilidade celular inicial pela contagem em câmara de Neubauer pela metodologia do Azul de Trypan**

Na contagem dos polimorfonucleares e determinação da viabilidade celular inicial realizadas utilizando-se a câmara de Neubauer, a porcentagem de células viáveis foi superior a 95% em todos os experimentos (figura 15 ).

**Figura 15 – Viabilidade Celular pela metodologia do Azul de Trypan 0,4% em Câmara de Neubauer.**



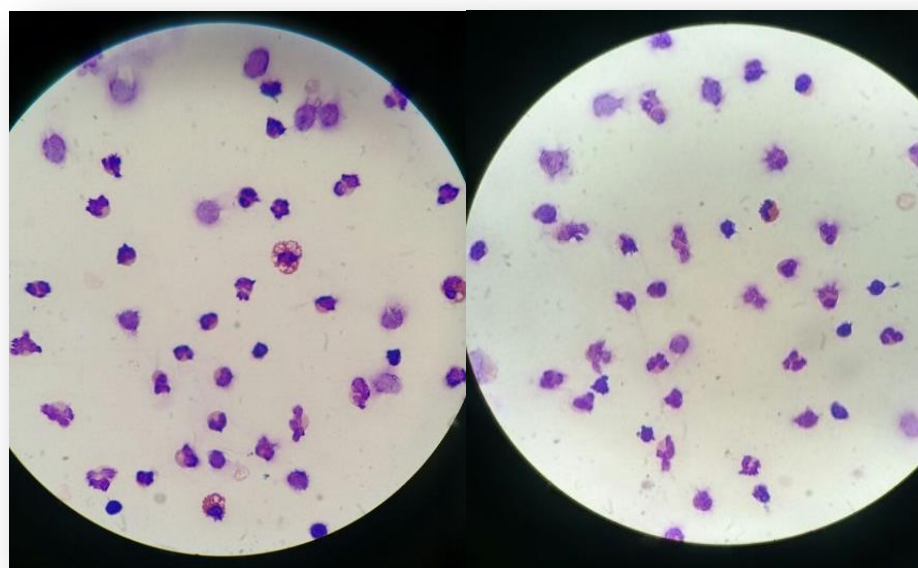
A seta vermelha aponta para uma célula inviável. Célula inviável demonstrada pela seta vermelha.



## 5.6 Contagem diferencial pela coloração de May-Grünwald Giemsa

A observação das lâminas em microscópio óptico com objetiva de imersão permitiu a visualização de quantidade superior a 85% de neutrófilos (figura 16) em todos os experimentos.

**Figura 16 – Contagem diferencial de lâminas coradas com May-Grünwald Giemsa**



## 5.7 Avaliação do *burst* oxidativo em neutrófilos

O *burst* oxidativo refere-se a uma série de eventos metabólicos que ocorrem devido ao estímulo de fagócitos envolvendo o aumento do consumo de oxigênio e produção de ERO, processo essencial para a destruição dos microrganismos fagocitados pelos neutrófilos.

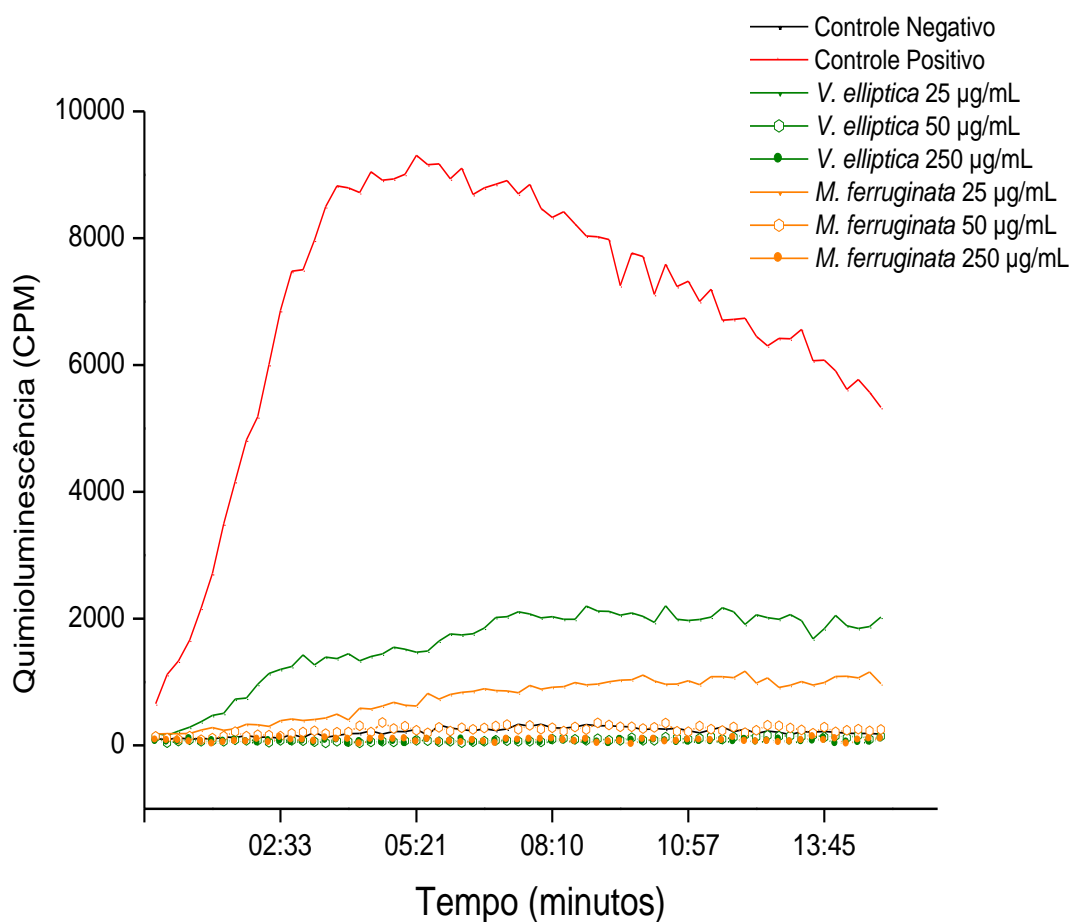
A avaliação do *burst* oxidativo pela quimiluminescência dependente do luminol (QLDL) foi realizada a partir da estimulação de neutrófilos contidos na suspensão celular pelo PMA, gerando ERO que oxidam o luminol, já presente no meio reacional, o que faz com que a luz seja emitida e captada pelo equipamento Spectramax®. O potencial redutor dos extratos foi testada adicionando-se concentrações variadas destes ao meio antes do disparo da reação com o PMA (PARACATU, 2012).

As ERO produzidas quando os neutrófilos são estimulados pelo PMA convertem o luminol em derivados intermediários instáveis e excitados, que ao retornarem ao seu estado

fundamental emitem luz na forma de fótons. A luz produzida é detectada pelo equipamento, sendo diretamente proporcional a quantidade de espécies reativas formadas (LIMA, 2016).

A cinética da reação dos extratos testados (*V. elliptica* e *M. ferruginata*) para os controles negativo e positivo, assim como dos extratos nas concentrações de 25, 50 e 250  $\mu\text{g/mL}$  foi representada no gráfico 7 e os resultados expressos em ASC apresentados no gráfico 8.

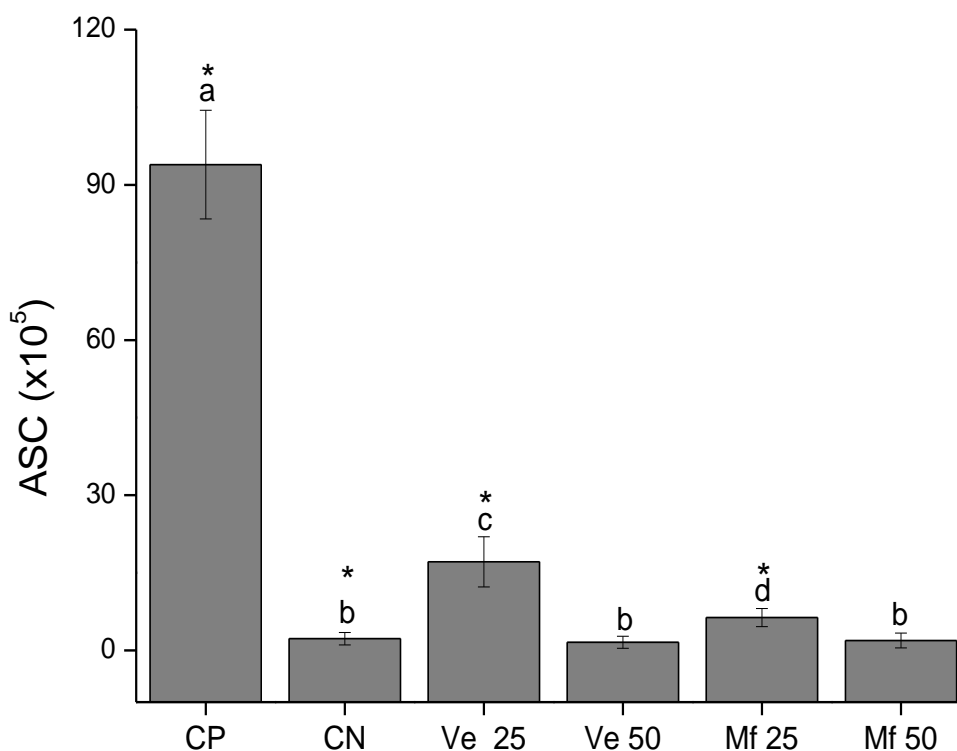
**Gráfico 7 - Efeito dos extratos etanólicos de *V. elliptica* e *M. ferruginata* no burst oxidativo de neutrófilos estimulados pelo PMA.**



Controle Positivo - estimulado pelo PMA; Controle Negativo - não contém PMA; *Vochysia elliptica* nas concentrações de 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$ ; *Miconia ferruginata* nas concentrações de 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$ . Experimento realizado em triplicata com  $n=3$ .

Os neutrófilos estimulados produziram ERO que foram liberadas no meio reacional, mas estes foram capturados ou estabilizados pelos extratos de *V. elliptica* e *M. ferruginata* nas concentrações de 25 e 50 µg/mL.

**Gráfico 8– Efeito dos extratos etanólicos de *V. elliptica* e *M. ferruginata* no burst oxidativo de neutrófilos estimulados pelo PMA.**



CP- Controle Positivo (estimulado pelo PMA); CN- Controle Negativo (Não contém PMA); Ve25 e 50- *V. elliptica* nas concentrações de 25 e 50 µg/mL; Mf25 e 50- *M. ferruginata* nas concentrações de 25 e 50 µg/mL. Experimento realizado em triplicata com n=3. Letras diferentes demonstram concentrações do mesmo extrato que apresentam diferença estatisticamente significativa (ANOVA, one-way p<0,05). \*Diferença estatística entre mesmas concentrações de extratos diferentes (p<0,05).

Como pode ser observado, o controle positivo contendo PMA, apresentou ASC média de  $93,91 \pm 10,48 \times 10^5$ , valor que caracteriza grande quantidade de ERO no meio que reagem com o luminol e emitem luz captada pelo equipamento. Ao controle negativo, por sua vez, não foi adicionado PMA para estimular os neutrófilos. Sendo assim, durante o tempo de incubação da cinética da reação, estes não produziram ERO para emitirem luz, apresentando baixa ASC  $2,26 \pm 1,20 \times 10^5$ . Observa-se que as maiores concentrações, de ambos extratos,

foram capazes de reduzir o sinal quimioluminescente para valores semelhantes estatisticamente aos resultados apresentados pelo controle negativo,  $1,58 \pm 1,17 \times 10^5$  e  $1,92 \pm 1,45 \times 10^5$ , respectivamente para *V. elliptica* e *M. ferruginata*.

Tais resultados demonstram que os extratos mesmo em baixas concentrações são capazes de inibir o sinal quimiluminescente avaliado pela técnica, porém nem toda a inibição desse sinal pode ser relacionada ao poder antioxidante, pois existe também a possibilidade dos extratos estarem impedindo ou atrapalhando o evento fagocítico por alguma via.

Como em outros testes mais específicos para determinação do poder antioxidante, já relatados neste estudo, foram obtidos bons resultados para essas espécies, acredita-se que grande parte da inibição da quimiluminescência se dê pela capacidade de sequestrar ou inativar os radicais.

## **5.8 Avaliação da citotoxicidade dos extratos pela viabilidade celular pelo método do MTT**

A avaliação dos efeitos citotóxicos dos extratos foi realizada pela metodologia de redução do MTT frente a neutrófilos humanos isolados a partir do sangue total.

O gráfico 9 apresenta os resultados de viabilidade de neutrófilos incubados por 18 horas na presença de todos os extratos em diferentes concentrações, comparados aos controles negativo e positivo ( $\text{CdCl}_2$ ) de morte celular.

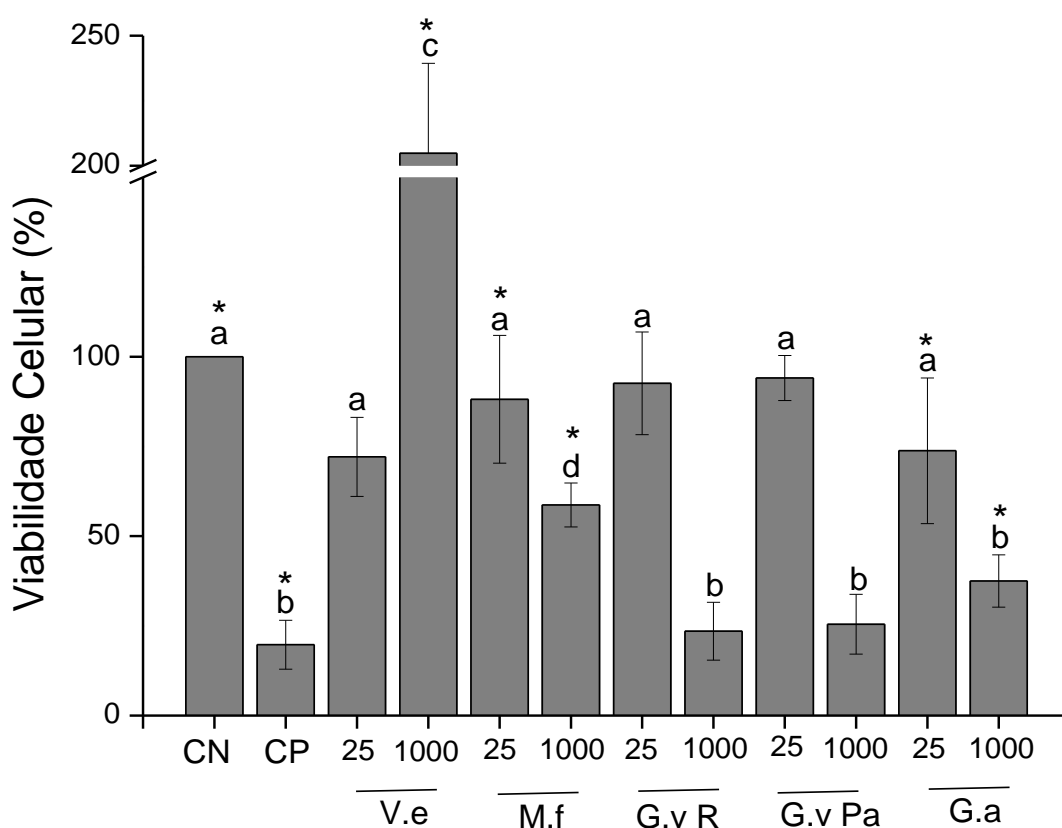
A análise do gráfico permite inferir que os extratos etanólicos de *V. elliptica* e *M. ferruginata* não são citotóxicos nas concentrações de 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$ , sendo que a primeira espécie, na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$  demonstrou atividade citoprotetora com viabilidade  $204,75 \pm 34,57\%$ , superior ao controle negativo de morte celular.

Em estudo realizado por Sousa em 2014, utilizando o extrato bruto das cascas, do caule e folhas de *Vochysia thyrsoidea* (*Vochysiaceae*), este não demonstrou potencial citotóxico relevante.

As espécies de *Gomphrena* (família *Amaranthaceae*) na concentração de 25  $\mu\text{g/mL}$  apresentam viabilidade estatisticamente semelhante ao controle negativo de morte, indicando que estas não possuem efeito citotóxico sobre os neutrófilos incubados por 18 horas, nesta concentração. No entanto, o aumento da concentração das mesmas espécies para 50  $\mu\text{g/mL}$  apresenta efeitos citotóxicos elevados, causando morte celular comparável estatisticamente ao controle positivo de morte ( $19,75 \pm 6,81\%$ ).

Ramos (2016), no estudo dos efeitos de extratos da família *Amaranthaceae* em células da linhagem FMM-1 (Fibroblastos gengivais humanos), demonstrou ação não citotóxica para concentrações de 50, 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$ , considerando toxicidade celular os resultados abaixo do limiar de 50% de viabilidade. Tomei, 2008, avaliou a citotoxicidade de extrato a 100  $\mu\text{g/mL}$ , da mesma família pela metodologia da exclusão do Azul de Trypan e concluiu que a espécie estudada não apresentou efeitos citotóxicos (viabilidade de 78.5%). Apesar de se tratarem da mesma família, as plantas estudadas são de espécies diferentes, o que justifica os resultados encontrados.

**Gráfico 9 – Viabilidade Celular pela metodologia do MTT.**



Experimento realizado em triplicata com  $n=3$ . CN- controle negativo de morte celular; CP- controle positivo de morte celular causada pelo  $\text{CdCl}_2$ ; (Ve) *V. elliptica*; (Mf) *M. ferruginata*; (GvR) *Gomphrena virgata*, raiz; (GvPa) *Gomphrena virgata*, partes aéreas e (Ga) *Gomphrena arborescens*; nas concentrações de 25 $\mu\text{g/mL}$  e 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Período de incubação de 18 horas. Letras diferentes demonstram diferença estatisticamente significativa (ANOVA, one-way). \*Diferença estatística com significância  $p<0,05$ .



## 6 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados no presente estudo permitem concluir que:

Com relação ao teor de compostos fenólicos totais, pode-se afirmar que os extratos de *V. elliptica* e *M. ferruginata* possuem maior quantidade desses compostos em sua composição (792,36 e 561,89 mg EAG/g extrato, respectivamente), quando comparados aos extratos das espécies de *Gomphrena*, que possuem menor teor (27,93 mg EAG/g extrato para *G. virgata* raíz). Considerando os valores expressos na literatura, em experimentos similares aos nossos, podemos considerar que todos os extratos possuem potencial antioxidante promissor com exceção da *G. virgata* raíz, por apresentar valores de compostos fenólicos muito inferiores quando comparado a outras espécies vegetais com comprovada atividade antioxidante.

Considerando a capacidade de captura de espécies radicalares em solução, apenas os extratos de *V. elliptica* e *M. ferruginata* foram efetivos frente aos radicais DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup>, de maneira concentração dose-dependente. Apesar de estes métodos fornecerem apenas uma indicação da capacidade dos extratos de removerem radicais livres em solução, quando realizados em conjunto com outros ensaios, podem-se estabelecer correlações entre os resultados que indicam potencial atividade antioxidante. Sendo assim, afirma-se que os extratos contendo maior teor de compostos fenólicos totais, são também aqueles que apresentam maior capacidade de captura de espécies radicalares. As espécies de *Gomphrena* apresentaram menor capacidade de captura comparadas aos demais extratos, mesmo nas concentrações mais elevadas, demonstrando menor potencial antioxidante.

A atividade sequestradora de radicais em um sistema HRP/Luminol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi significativa para os extratos de *V. elliptica* e *M. ferruginata* em pequenas concentrações (5, 25 e 50 µg/mL). Isto nos permite inferir que estes extratos possuem elevado potencial antioxidante. Concentrações maiores poderiam causar maior efeito de inibição ou inativação dos radicais produzidos pela reação de oxidação, no entanto, concentrações superiores a 50 µg/mL geravam resultados com grande quantidade de ruídos devido à sensibilidade do equipamento. As espécies de *Gomphrena* não foram testadas por não terem demonstrado potencial antioxidante considerável nos ensaios anteriores.

Os mesmos extratos foram testados frente a atividade de inibição da produção ou inativação das espécies radicalares oxidantes produzidas no *burst* respiratório de neutrófilos estimulados pelo PMA. Mais uma vez, foi demonstrado elevado poder antioxidante dos extratos de *V. elliptica* e *M. ferruginata* em baixas concentrações evidenciando o alto potencial dessas espécies como agentes antioxidantes naturais.

Quanto à citotoxicidade, todos os extratos foram testados em variadas concentrações, sendo que nenhum apresentou atividade citotóxica mesmo nas maiores concentrações. Pode-se destacar a espécie *V. elliptica* que na maior concentração apresentou possível atividade citoprotetora, com viabilidade celular superior ao controle negativo de morte. Considerando que todas as espécies estudadas fazem parte da medicina popular da região, é importante enfatizar a não toxicidade desses extratos.

Entre os extratos analisados a *V. elliptica* e a *M. ferruginata* apresentaram atividade antioxidante promissora, além de não serem citotóxicas. Apesar de não possuírem atividade antioxidante relevante, as espécies de *Gomphrena* podem ser avaliadas para outras atividades, tais como antibacteriana, antifúngicas, leishmanicida, imunomoduladora etc, uma vez que não apresentaram perfil citotóxico.



**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ALBERTIN, R.; ARRIBAS, M. A. G.; BASTOS, E. L.; RÖPKE, S.; SAKAI, P. N.; SANCHES, A. M. M.; STEVANI, C. V.; UMEZU, Ilka S.; YU, J.; BAADER, W. J. Quimiluminescência orgânica: alguns experimentos de demonstração para a sala de aula. **Química Nova**, vol. 21, n. 6, p. 772-779, 1998.

AL-MAMARY, M.; AL-MEERI, A.; AL-HABORI, M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of Honey. **Nutrition Research**, vol. 22, p. 1041-1047, 2002.

ALONSO, A. M. *et al.* Determination of antioxidant activity of wine byproducts and its correlation with polyphenolic content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 50, n. 21, p. 5832-5836, 2002.

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, p. 1-8, 2007.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, vol. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

ANDRADE, C. A.; COSTA, C. K.; BORA, K.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G.; KERBER, V. A. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol.17, n. 2, p. 231-235, 2007.

ARNHOLD, J. Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. **Biochemistry**, v.69, p. 4-9, 2004.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S.. Biodiversidade: Fonte Potencial para a Descoberta de Novos Fármacos. **Química Nova**, vol. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID J. M.; DAVID J. P. Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organisms defense. **Química Nova**, vol. 29, n. 1, p. 113-126, São Paulo, 2006.

BONACORSI, C.; FONSECA, L. M.; RADDI, M. S. G.; KITAGAWA, R. R.; VILEGAS, W. Comparison of Brazilian Plants Used to Treat Gastritis on the Oxidative Burst of *Helicobacter pylori*-Stimulated Neutrophil. **Evidence-Based Complementary and**

**Alternative Medicine.** 2013. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/ecam/2013/851621/>>. Acesso em 23 de maio de 2017.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**, Amsterdam, v.28, n. 1, p.25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde, Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde, Departamento de Atenção Básica. **Práticas Integrativas e Complementares: Plantas Medicinais e Fitoterapia na Atenção Básica**. Brasília, 2012.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **A Conversão sobre Biodiversidade Biológica**. Brasília, 2000.

CAI, Y.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant Activity of Betalains from Plants of the Amaranthaceae. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 51, n. 8, p. 2288-2294, 2003.

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

CARNEVALE-NETO, F.; SIQUITELLI, C. D.; PILON, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; CASTRO-GAMBOA, I. Dereplication of Phenolic Derivatives of *Qualea grandiflora* and *Qualea cordata* (Vochysiaceae) using Liquid Chromatography coupled with ESI-QToF-MS/MS. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, vol. 24, n. 5, p. S1-S3, 2013.

CHANG, C. L.; LIN, C. S. Phytochemical Composition, Antioxidant Activity, and Neuroprotective Effect of *Terminalia chebula* Retzius Extracts. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2012. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/ecam/2012/125247/>>. Acesso em 23 de maio de 2017.

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, n. 1, p. 106-112, jan./mar. 2010

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N.; MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual Química**, vol. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

CRITICAL ECOSYSTEM PARTNERSHIP FUND. Perfil do Ecossistema Hotspot de Biodiversidade do Cerrado. 2016.

DAHLGREN, C.; KARLSSON, A. Respiratory burst in human neutrophils. **Journal of Immunological Methods**, vol. 232, p. 3–14, 1999.

DELAZAR, A.; TALISCHI, B.; NAZEMIYEH, H.; REZAZADEH, H.; NAHAR L.; SARKER, S. D. Chrozophorin: a new acylated flavone glucoside from *Chrozophora tinctoria* (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol. 16, p. 286-290, 2006.

DEVIENNE, K.F.; RADDI, M.S.G.; POZETTI, G.L. Das Plantas Mediciniais aos Fitofármacos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, vol. 6, n. 3, p. 11-14, 2004.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: A biosynthetic approach**. New York: John Wiley, 2<sup>a</sup> ed., p. 148-150, 2002.

DIAS, C. L.; DESSOY, M. A.. Quimioterapia da Doença de Chagas: Estado da Arte e Perspectivas no Desenvolvimento de Novos Fármacos. **Química Nova**, vol. 32, n. 9, p. 2444-2457, 2009.

DORNAS, W. C.; OLIVEIRA, T. T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R. G; SANTOS, A. F; NAGEM, T. J. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicadas**, vol. 28, n. 3, p. 241-249, 2007.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH'. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, vol. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

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

FANK-DE-CARVALHO, S. M.; GRACIANO-RIBEIRO, D. Arquitetura, anatomia e histoquímica das folhas de *Gomphrena arborescens* L.f. (Amaranthaceae). **Acta botânica brasílica**, vol. 19, n. 2, p. 377-390, 2005.

FANK-DE-CARVALHO, S. M.; MARCHIORETTO, M. S.; BÁO, S. N. Leaf anatomy, morphology and ecological aspects of Amaranthaceae species from Reserva Particular do Patrimônio Natural Cara Preta, in Alto Paraíso, GO, Brazil. **Biota Neotrópica**, vol. 10, n. 4, 2010.

FANK-DE-CARVALHO, S.M.; GOMES, M.R.A.; SILVA, P.Í.T.; BÁO, S.N. Leaf surfaces of *Gomphrena* spp. (Amaranthaceae) from Cerrado biome. **Biocell**, vol. 34, n. 1, p. 23-35, 2010.

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, n. 6, p. 1003-1011, 2002.

FIASCHI, P.; PIRANI, J.R. Review of plant biogeographic studies in Brazil. **Journal of Systematics and Evolution**, vol. 47, p. 477-496, 2009.

FIRMO, W. C. A.; MENEZES, V. J. M.; PASSOS, C. E. C.; DIAS, C. N.; ALVES, L. P. L.; DIAS, I. C. L.; NETO, M. S. OLEA, R. S. G. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de Pesquisa**, São Luís, vol. 18, n. especial, p. 90-95, dez. 2011.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. Disponível em: <[http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos\\_07/a\\_04\\_7.pdf](http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_04_7.pdf)>. Acesso em 16 de março de 2017.

FRIES, A. T.; FRASSON, A. P. Z. Avaliação da atividade antioxidante de cosméticos anti-idade. **Revista Contexto e Saúde**, vol. 10, n. 19, p. 17-23, 2010.

FUNARI, C. S.; CASTRO-GAMBOA, I.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S. Metabolômica, uma Abordagem Otimizada para Exploração da Biodiversidade Brasileira: Estado da Arte, Perspectivas e Desafios. **Química Nova**, vol. 36, n. 10, p. 1605-1609, 2013.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P.. Plantas Medicinais: Fatores de Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários. **Química Nova**, vol. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOMES, R. C.; BONAMIM, F.; DARIN, D. D.; SEITOS, L. N. Antioxidative action of methanolic extract and buthanolic fraction of *Vochysia tucanorum* Mart. in the gastroprotection. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 121, n. 3, p. 466-471, 2009.

GONÇALVES, D.J.P.; ROMERO, R; YAMAMOTO, K. Vochysiaceae no Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, vol. 64, n. 4, p. 863-875, 2013.

GOVINDARAJAN, R.; RASTOGI, S.; VIJAYAKUMAR, M.;SHIRWAIKAR, A.; RAWAT, A. K. S.; MEHROTRA, S.; PUSHANGADAN, P. Studies on the Antioxidant Activities of *Desmodium gangeticum*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, vol. 26, n. 10, p. 1424-1427, 2003.

GRESSLER, V.; MOURA, S.; FLORES, A. F. C.; FLORES, D. C.; COLEPICOLO, P.; PINTO, E. Antioxidant and Antimicrobial Properties of 2-(4,5-Dihydro-1H-pyrazol-1-yl)-pyrimidine and 1-Carboxamidino-1H-pyrazole Derivatives. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, vol. 21, n. 8, p. 1477-1483, 2010.

GROTEWOLD, E. The Science of Flavonoids. **Departament of Cellular and Molecular Biology**, Ohio, USA, p. 1-5, 2006.

HUBER, L. S.; AMAYA, D. B. R. Flavonóis e Flavonas: Fontes Brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, vol. 19, n. 1, p. 97-108, 2008.

HUSSAIN, R. F.; NOURI, A. M. E.; OLIVER, R. T. D. A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. **Journal of Immunological Methods**, vol. 160, p. 89-96, 1993.

JÁUREGUI, A. M. M.; RAMOS-ESCUADERO, D. F.; URETA, C. ALVARADO-ORTIZ; CASTAÑEDA, B. Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promissórios. **Revista da Sociedade Química do Perú**, vol. 73, n. 3, p. 142-149, 2007.

KHALIL, N. M.; PETACCI, F.; LEITE R. R. S.; SILVA, E.; SOUZA G. F.; OLIVEIRA, R. E. L.; COSTA, F.; ROCHA V. A.; MENDONÇA, FILHO C. V. Antioxidant Activity of *Vochysia discolor* Mart. flowers. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, vol. 25, n.. 4, p. 564-566, 2006.

KLEIN A. L. **Eugen Warming e o cerrado brasileiro: um século depois**. São Paulo: Editora UNESP; Imprensa Oficial do Estado, 2002.

KOGNOU, A. L. M.; PAWAR, R. S.; NGANE, R. A. N.; PATERIYA, P.; PAL, P. N.; TCHINDA, A. T.; AGBOR, G. A.; ETAME, R. M. E.; MOUOKEU, R. S.; MOUELLE, A. S.; GUEIFFEIER, C. E. Antioxidant, analgesic and antipyretic activities of ethanol of the Stem Bark *Dichaetanthera africana* (Hooker F.) Jacq. Felix. (Melastomataceae). **British Journal of Pharmaceutical Research**, vol. 14, n. 5, p. 1-12, 2016.

KOMALAVALLI, T.; YOKESWARI, N.; MUTHUKUMARASAMY, S.; MOHAN, V.R. Evaluation of total phenolic, flavonoid contents and in vitro antioxidant properties of *Sonerila tinneveliense* fischer (Melastomataceae). **World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences**, vol. 3, n. 6, p. 2115-2127, 2014.

KROL, W.; CZUBAA Z.; SCHELLERA, S.; PARADOWSKI, Z.; SHANITB, J. Structure-activity relationship in the ability to inhibit chemiluminescence of flavonols. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 41, p. 121-126, 1994.

KÜÇÜKBOYACI, N.; GÜVENÇ, A.; TURAN, N. N.; AYDIN, A. Antioxidant activity and total phenolic content of aqueous extract from *Raphanus raphanistrum*. **Turky Journal of Pharmaceuticals Sciences**, vol. 9, n. 1, p. 93-100, 2012.

KUMAR, A. Importance for Life 'Psidium guava'. **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, vol. 3, n. 1, 2012.

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

LAGE, G. A.. **Isolamento, Identificação Química e Bioprospecção de Metabólitos Secundários nas Folhas de *Annonacrassiflora* Mart.** 2011. Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.

LIMA, A. R.; BARBOSA, V. C.; SANTOS, F. P. R.; GOUVEA, C. M. C. P. In vitro evaluation of the antioxidant activity of the hydroalcoholic extract of leaves of bardana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol. 16, n. 4, p. 531-536, 2006.

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

LIMA, L. A. R., SANTOS, D. L. D., FERREIRA, H. D., TRESVENZOL, L. M. F., DE 37 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 e Ciência**, vol. 1, n. 2, 2013.

LIMA, P. D. A. **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.)**. 109 f. 2016. Dissertação (Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina.

LOBO, V.; PATILI, A.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods : impacts on human health. **Pharmacognosy Review**, vol.4, n. 8, p. 118-126, julho/dezembro 2010.

LUCISANO, Y.M. & MANTOVANI, B. **Journal of Immunology**, Baltimore, vol. 132, p. 2015-2020, 1984.

MARTINS, J. C. Medicamentos à base de plantas: contributo para o aproveitamento dos recursos naturais nacionais. **Revista Portuguesa de Farmacoterapia**, vol. 5, n. 1, p. 22-38, 2013.

MATA, N. D. S. **Participação da mulher Wajãpi no uso tradicional de plantas medicinais**. 141 f. 2009. Dissertação (Meio Ambiente, Cultura e Desenvolvimento Regional), Universidade Federal do Amapá – AP, 2009.

MAZZOLIN, L. P. **Avaliação da atividade antioxidante de *Qualea parviflora* sobre a doença inflamatória intestinal e a úlcera gástrica induzida em roedores**. 61 f. 2013. Tese (Biologia Geral e Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Botucatu.

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, n. 2, p. 193-201, abril/junho 2008.

MELO, C. M. T.; COSTA, L. A.; BONNAS, D. S. Compostos Fenólicos E Capacidade Antioxidante de Pimentas *Capsicum chinense* (bode), *Capsicum baccatum* variedade *praetermissum* (cumari) e *Capsicum frutescens* (malagueta). **Enciclopédia Biosfera**, vol. 7, n. 12, p. 1-6, 2011.

NERI, A.V.; NETO, J.A.A.M.; SILVA, A.F.; MARTINS, S.V.; JUNIOR, A.W.S. Composição Florística de uma Área de Cerrado *Sensu Stricto* no Município de Senador Modestino Gonçalves, Vale do Jequitinhonha (Mg) e Análise de Similaridade Florística de Algumas Áreas de Cerrado em Minas Gerais. **Revista Árvore**, vol. 31, n. 6, p. 1109-1119, 2007.

NEVES, L. C.; ALENCAR, S. M.; CARPES, S. T. Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellífera*. **Brazilian Journal of Food Technology**, VII Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages, p. 107-110, junho 2009

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 medicinais**, vol. 16, n. 3, suppl.1, pp.755-759, 2014.

OLIVEIRA, S.; SOUZA, G. L. A.; ECKERT, C. R.; SILVA, T. A.; SOBRAL, E. S.; FÁVERO, O. A.; FERREIRA, M. J. P.; ROMOFF, P.; BAADER, W. J. Evaluation of antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts. **Química Nova**, vol. 37, n. 3, p. 497-503, 2014.

PARACATU, L. C. **Ácido cafeico e seus ésteres: inibição do “burst” oxidativo de neutrófilos e efeito anti-*Helicobacter Pylori***. 82 f. 2012. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia) - Faculdade De Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

PEIXOTO, J. A.; ANDRADE e SILVA, M. L.; CROTTI, A. E.; CASSIO S. V. R.; GIMENEZ, V. M.; JANUÁRIO, A. H.; GROppo, M.; MAGALHÃES, L. G.; DOS SANTOS, F. F.; ALBUQUERQUE, S.; DA SILVA FILHO, A. A.; CUNHA, W. R. Antileishmanial Activity of the Hydroalcoholic Extract of *Miconia langsdorffii*, Isolated Compounds, and Semi-Synthetic Derivatives. **Molecules**, vol. 16, n. 2, p. 1825-1833, 2011.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFÂNIO, R. A.. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. **Química Nova**, vol. 25, supl. 1, p. 45-61, 2002.

PRASANTH, DSNBK; PRASANNA, M. M.; PRIYANKA, M.; PALA, N. N.; LAKSHMI, P. B.; MOUNIKA Y.; RAO, A. L. Pharmacognostic evaluation of *Gomphrena serrata* root. **Universal Journal of Pharmaceutical Research**, vol. 2, n. 4, p. 6-10, julho/agosto 2017.



RAMOS, L. P. **Atividade antimicrobiana e citotoxicidade dos extratos glicólicos de *Pfaffia paniculata* K. e *Juglans regia* L.** 85 f. 2016. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos.

RAPINI, A.; RIBEIRO, P.L., LAMBERT, S.; PIRANI, J.R. A flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. **Megadiversidade**, vol. 4, p. 16-24, 2008.

RE, R. et al., Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay Free Radical. **Free Radical Biology and Medicine**, vol. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

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

ROCHA, R. R. **Estudo da composição química dos óleos essenciais e as atividades antioxidante, antimicrobiana e antiprotzoária do óleo essencial e de extratos etanólicos de folhas de *Qualea grandiflora* e *Qualea multiflora* Mart.** 112 f. 2014. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

RODRIGUES, J.;MICHELIN, D. C.; RINALDO, D.; ZOCOLO, G. J.; DOS SANTOS, L. C.; VILEGAS, W.; SALGADO, H. R. Antimicrobial Activity of *Miconia* Species (Melastomataceae). **Journal of Medicinal Food**, vol. 1, n. 1, p. 120-126, 2008.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS<sup>++</sup>. **Comunicado técnico da EMBRAPA**, Fortaleza, CE. 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. Fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante de *Selaginella convoluta* (Arn.) Spring (*Selaginellaceae*). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, vol. 33, n. 4, p. 561-566, 2012.

SAINT-HILAIRE, A. **Histoire des plants les plus remarquables du Brésil et du Paraguay.** Imprimeur-libraire, Paris, 1824.

SAINT-HILAIRE, A. **Plantes usuelles des Bresiliens.** Grimbert Libraire, Paris, 1828.

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, n.12, p. 342-350, dezembro 2014.

SERPELONI, J. M.; MAZZARON, B. G. R.; PRATES, M. M.; YANAGUI, K.; VILEGAS W.; APARECIDA, V. E.; DE SYLLOS, C. I. M. Cytotoxic and mutagenic evaluation of extracts from plant species of the *Miconia* genus and their influence on doxorubicin-induced mutagenicity: an in vitro analysis. **Experimental and Toxicologic Pathology**, vol. 63, n. 5, p. 499-504, 2011.

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, p. 813-823, 1995.

SILVA, A. C. D., HIGUCHI, P., PIFANO, D.S. Padrão Espacial e Estrutura de Espécies do 22 Gênero *Miconia* Ruiz & Pav. (*Melastomataceae*). **Revista Brasileira de Biociências**, v.ol. 5, n. 23, supl. 1, p. 60-62, julho 2007.

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

SILVA, C.G.; HERDEIRO, R.S.; MATHIAS, C.J.; PANEK, A.D.; SILVEIRA, C.S.; RODRIGUES, V.P.; RENNO, M.N.; FALCÃO, D.Q.; CERQUEIRA, D.M.; MINTO, A.B.M.; NOGUEIRA, F.L.P.; QUARESMA, C.H.; SILVA, J.F.M.; MENEZES, F.S.; ELEUTHERIO, E.C.A. Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. **Pharmacological Research**, vol. 52, p. 229–233, 2005.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª ed. Porto Alegre, Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 2007.

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, p. 152-178, 1999.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Jr.; Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic 39 - Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, vol. 16, p. 144-158, janeiro 1965.

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 87 of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC<sub>50</sub>-values and Cell Survival. **European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, vol. 33, p. 813-823, 1995.

SMITH, C.; MARKS, A. D.; LIEBERMAN, M.; **Bioquímica médica básica de Marks: uma abordagem clínica**. 2<sup>a</sup> ed., Porto Alegre: Artmed, p. 439-457, 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLINICA E MEDICINA LABORATORIAL. **Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML): coleta e preparo da amostra biológica**. Manole: Minha Editora. Barueri, São Paulo, 2013.

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, n. 2, p. 351-355, 2007.

STEVANATO, R.; FABRIS, S.; MOMO, F. New enzymatic method for determination of total phenolic content in tea and wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**., vol. 52, p. 6287-6293, 2004.

SUCUPIRA, N. R.; SILVA A. B.; PEREIRA G.; COSTA J. N. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, vol. 14, n. 4, p. 263-269, 2012.

TAVARES, L. C.. QSAR: A Abordagem de Hansch. **Química Nova**, vol. 27, n. 4, p. 631-639, 2004.

TOMEI, R. R. **Prospecção de antioxidantes em *Alternanthera marítima* (planta in natura e obtida por cultura de células)**. 123 f. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TESLER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry and cell biology**, vol. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VELLOSA J. C. R.; BARBOSA, V. F.; OLIVEIRA, O. M. M. F. Pesquisa de produtos naturais: plantas e radicais livres. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 5, n. 2, p. 119-130, 2007.

VASCONCELOS, M. A.; ROYO, V. A.; FERREIRA, D. S.; CROTTI, A. E.; ANDRADE, E.; SILVA, M. L.; CARVALHO, J. C.; BASTOS, J. K.; CUNHA, W. R. In vivo analgesic and antiinflammatory activities of ursolic acid and oleanoic acid from *Miconia albicans* (Melastomataceae). **Journal of Bioscience**, vol. 61, n. 7-8, p. 477-482, 2006.

VASCONCELOS, M. F. O que são campos rupestres e campos de altitude nos topos de montanha do Leste do Brasil? **Revista Brasileira de Botânica**, vol.34, n.2, p.241-246, abril/junho 2011.

VIEGAS-JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. **Química Nova**, vol. 29; n. 2, p. 326-337, 2006.

WANG L.; BASSIRI M.; NAJAFI, R.; NAJAFI, K.; YANG, J.; KHOSROVI, B.; HWONG, W.; BARATI, E.; BELISLE, B.; CELERI, C.; ROBSON, M. C. 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, p. 65-79, abril 2007.

## ANEXO A - PREPARO DE REAGENTES E SOLUÇÕES

### **EXTRATOS: Solução estoque - 2000 µg/mL**

Pesou-se 0,010g de cada extrato bruto e estes foram diluídos em 5 mL de metanol ou DMSO (2% para as espécies de *Gomphrenas* e 3% para *V. elliptica* e *M. ferruginata*) com aferição de volume em balão volumétrico. Para os extratos de *V. elliptica* e *M. ferruginata*, fez-se necessário imersão dos balões em ultrassom por 50 minutos para diluição dos extratos. Para a realização dos experimentos, foram preparadas soluções diluídas a partir das soluções estoque, em concentrações de 1000 µg/mL a 25 µg/mL. Armazenadas em geladeira ao abrigo da luz.

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

Pesou-se 0,010g de AG que foram diluídos em 25 mL de água Milli-Q (pH 7,0) aferindo-se o volume em balão volumétrico. Diluições seriadas variando de 10 a 1000 µg/mL foram preparadas no dia do experimento a partir da solução estoque.

### **SOLUÇÃO DE ABTS - 7 mM**

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

### **RADICAL ABTS<sup>•+</sup>**

Foram pipetados 5mL da solução estoque de ABTS 7mM e adicionou-se 88µL da solução de persulfato de potássio K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 140 mM. Esta solução foi mantida ao abrigo da luz e à temperatura ambiente por 16 horas e em seguida, diluída em etanol para obtenção de uma absorbância de 0,7nm ± 0,01nm a 734nm. O radical foi preparado apenas no dia do experimento.

### **ACETATO DE FORBOL MIRISTATO (PMA)**

Foram utilizadas soluções estoque na concentração de 10<sup>-5</sup> M diluídas em DMSO para obtenção de soluções com concentrações finais de 10<sup>-7</sup> M em poços de 250 µL. As alíquotas estoque foram mantidas congeladas até o momento do uso.

**ÁCIDO TRICLOROACÉTICO (Cl<sub>3</sub>CCOOH) - 10%**

Dissolveu-se 10 g de Cl<sub>3</sub>CCOOH em 100 mL de água Milli-Q (pH 7,0) e o volume foi aferido em balão volumétrico. A solução foi armazenada em frasco de vidro âmbar à temperatura ambiente por até 1 mês.

**AZUL DE TRIPAN - 0,04 %**

Dissolveu-se 0,04 g do reagente Azul de Tripán em solução salina (NaCl) 0,15M. A solução foi filtrada em papel de filtro 0.22 µm e armazenada em vidro âmbar à temperatura ambiente.

**CARBONATO DE SÓDIO (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) – 1 mol/L (M)**

Dissolveu-se 2,6497g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> em 25 mL de água Milli-Q (pH 7,0) e o volume foi aferido em balão volumétrico. A solução foi armazenada ao abrigo da luz à temperatura ambiente.

**CLORETO DE AMÔNIO (NH<sub>4</sub>Cl) - 0,83%**

Pesou-se 0,83 g de NH<sub>4</sub>Cl e dissolvidos em 100 mL de água destilada, aferindo-se o volume em balão volumétrico.

**CLORETO DE SÓDIO (NaCl) - 0,15M**

Foram dissolvidos 4,3875 g NaCl em 500 mL de água destilada com auxílio de um agitador magnético, aferindo-se o volume em balão volumétrico. Armazenamento em geladeira até o momento do uso.

**SOLUÇÃO DE DPPH- 60µM**

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

**FERRICIANETO DE POTÁSSIO (C<sub>6</sub>FeN<sub>6</sub>K<sub>4</sub>) – 1%**

Dissolveu-se 1,0g de C<sub>6</sub>FeN<sub>6</sub>K<sub>4</sub> em água Milli-Q (pH 7,0) e aferiu-se o volume em balão volumétrico de 100 mL. A solução foi armazenada em frasco de vidro âmbar à temperatura ambiente por até 1 mês.

**SOLUÇÃO DE FOSFATO DE POTÁSSIO DIBÁSICO ( $K_2HPO_4$ ) – 1M**

Pesou-se 4,3534 g  $K_2HPO_4$  que foram dissolvidos em 25 mL de água destilada, aferindo-se o volume em balão volumétrico.

**SOLUÇÃO DE FOSFATO DE POTÁSSIO MONOBÁSICO ( $KH_2PO_4$ ) – 1M**

Em 25 mL de água destilada foram dissolvidos 3,4022 g de  $KH_2PO_4$ , o volume foi aferido em balão volumétrico.

**SOLUÇÃO DE FOSFATO DE SÓDIO MONOBÁSICO ( $Na_2HPO_4$ ) – 0,2M**

Pesou-se 5,5196 g de  $Na_2HPO_4$  diluídos em 200 mL de água Milli-Q (pH 7,0) tendo volume aferido em balão volumétrico.

**SOLUÇÃO DE FOSFATO DE SÓDIO BIBÁSICO ( $NaH_2PO_4$ ) – 0,2M 28**

Pesou-se 5,3614 g de  $NaH_2PO_4$  que foram diluídos em 100 mL de água Milli-Q (pH 7,0) e o volume foi aferido em balão volumétrico.

**GELATINA - 2,5 %**

Pesou-se 0,5 g de gelatina que foram adicionados lentamente a 20 mL de NaCl 0,15 M, obtendo-se uma suspensão a ser utilizada imediatamente.

**SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO 0,2 M, pH=6,6**

Pipetou-se 75 mL da solução  $NaH_2PO_4$  0,2M que foram adicionados a 125 mL da solução  $Na_2HPO_4$  0,2M. O pH foi ajustado em 6,6.

**SOLUÇÃO 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 em balança analítica. Em béquer de 1L, solubilizaram-se os sais em água destilada com auxílio de um agitador magnético. O pH foi ajustado para 7,2 - 7,4 e aferiu-se o volume em balão volumétrico de 1000mL.

**SOLUÇÃO DE PERSULFATO DE POTÁSSIO ( $K_2S_2O_8$ ) - 140 mM**

Dissolveu-se 0,1892g de  $K_2S_2O_8$  em 10 mL de água Milli-Q (pH 7,0) e aferiu-se o volume em balão volumétrico. Armazenamento em frasco âmbar à temperatura ambiente, por até 1 mês.

**SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO DE POTÁSSIO - 0,1 M**

Pipetou-se 24,85 ml da solução de  $K_2HPO_4$  1M e 25 mL da solução de  $KH_2PO_4$  1M. As soluções foram misturadas com um auxílio de um agitador magnético e aferiu-se o volume em balão volumétrico de 500 mL.

**SOLUÇÃO ESTOQUE LUMINOL –  $3,0 \times 10^{-2}M$** 

Pesou-se 0,0059g de luminol que foi diluído em 1000  $\mu$ L de água Milli-Q e armazenado em microtubo tipo Eppendorf® de 1,5 mL.

**SOLUÇÃO MTT - solução estoque 5 mg/mL**

A solução estoque de MTT 5 mg/mL foi preparada através da dissolução de 5 mg de MTT em 1 mL de tampão PBS 1X, pH 7,4 estéril. A solução foi armazenada na geladeira em temperatura entre 2°C e 8°C, em frasco âmbar recoberto por papel alumínio por até 1 mês.

**MEIO DE CULTIVO RPMI 1640 SUPLEMENTADO – pH 7,2**


A solução de meio de cultivo RPMI 1640® foi cedido pelo Laboratório de Imunologia (LabImuno) da UFVJM. Após confirmação do pH, o meio refiltrado a vácuo utilizando filtro 0,22  $\mu$ m e suplementado em capela de fluxo laminar com 10% de soro fetal bovino contendo L-glutamina e 1,5% de antibióticos (penicilina/estreptomocina).

**SOLUÇÃO DE CLORETO DE CÁDIMIO ( $CdCl_2$ ) 2mM**


Para a preparação de solução de  $CdCl_2$  2mM, utilizou-se solução estoque a 40 mM armazenada em geladeira, diluída no momento do uso.



## ANEXO B - DECLARAÇÃO DE DEPÓSITO DE EXSICATAS NO HERBÁRIO DIAM



**Herbário DIAM**  
UFVJM- Diamantina- MG  
[herbario.diam@ufvjm.edu.br](mailto:herbario.diam@ufvjm.edu.br)



**UFVJM**  
-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](mailto: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 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 Elídio 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 <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte <a href="http://www.icmbio.gov.br/sisbio">www.icmbio.gov.br/sisbio</a> - 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 <a href="http://www.mma.gov.br/cgen">www.mma.gov.br/cgen</a> .

#### Táxons registrados

Nível taxonômico	Táxon(s)
ESPECIE	Remijia ferruginea, Diospyros burchellii, Himatanthus spp., Hirtella glandulosa, Jacaranda micrantha, Marlierea spp., Kielmeyera rubriflora, Lafoensia vandelliana, Miconia ferruginata, Myrcia tomentosa, Eriotheca pentaphylla, Croton antisiphiliticus, 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](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 25622829



## ANEXO D - AUTORIZAÇÃO DO CNPq PARA COLETA DE PLANTAS



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 hífenadas (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 MENDONCA 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.

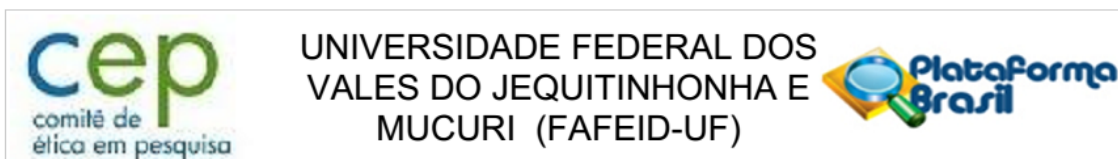
A remessa de amostra de componente do patrimônio genético deverá ser precedida da assinatura do Termo de Transferência de Material (TTM) ou do Termo de Responsabilidade para Transporte de Amostra de Componente do Patrimônio Genético (TRM). Para a remessa de componente do patrimônio genético para instituição 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 E – 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, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup> 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/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:

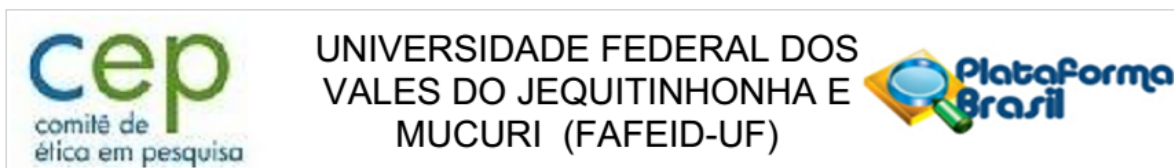
Os benefícios são indiretos e estão relacionados com conhecimento sobre a capacidade dos extratos estudados em interferir nos processos celulares e, dessa forma, contribuir para a correlação entre sua composição e seu uso popular.

#### **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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/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

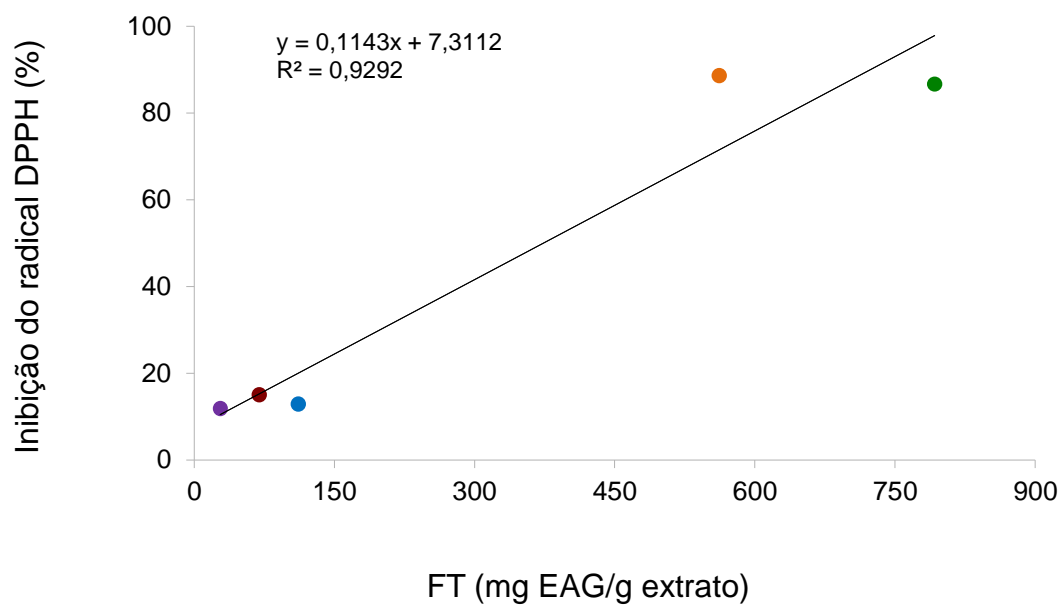
---

**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

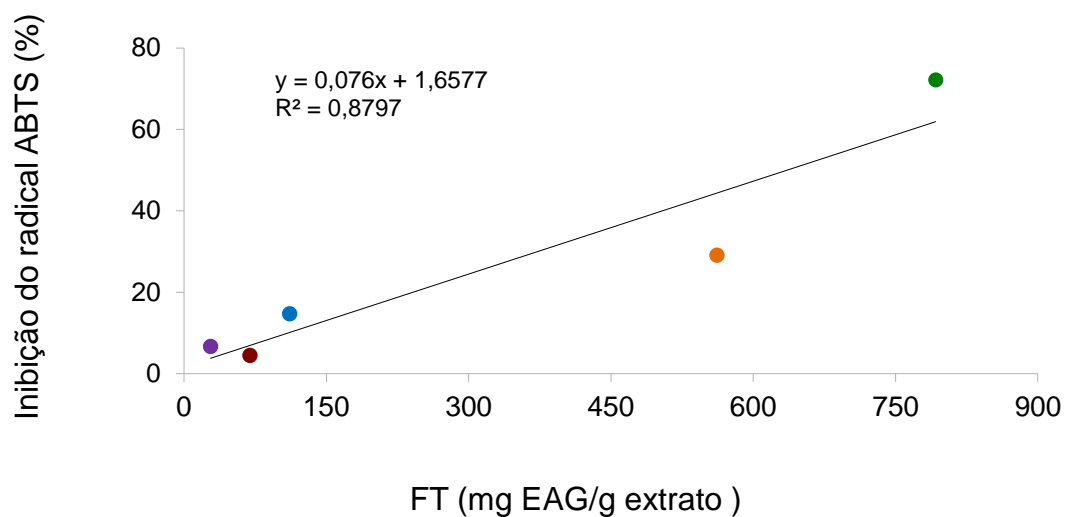
## ANEXO F – TESTES DE CORRELAÇÃO DE PEARSON

F1 - Gráfico 10 - Teste de correlação entre FT (mg EAG/g extrato) e a capacidade de captura do radical DPPH• (%)



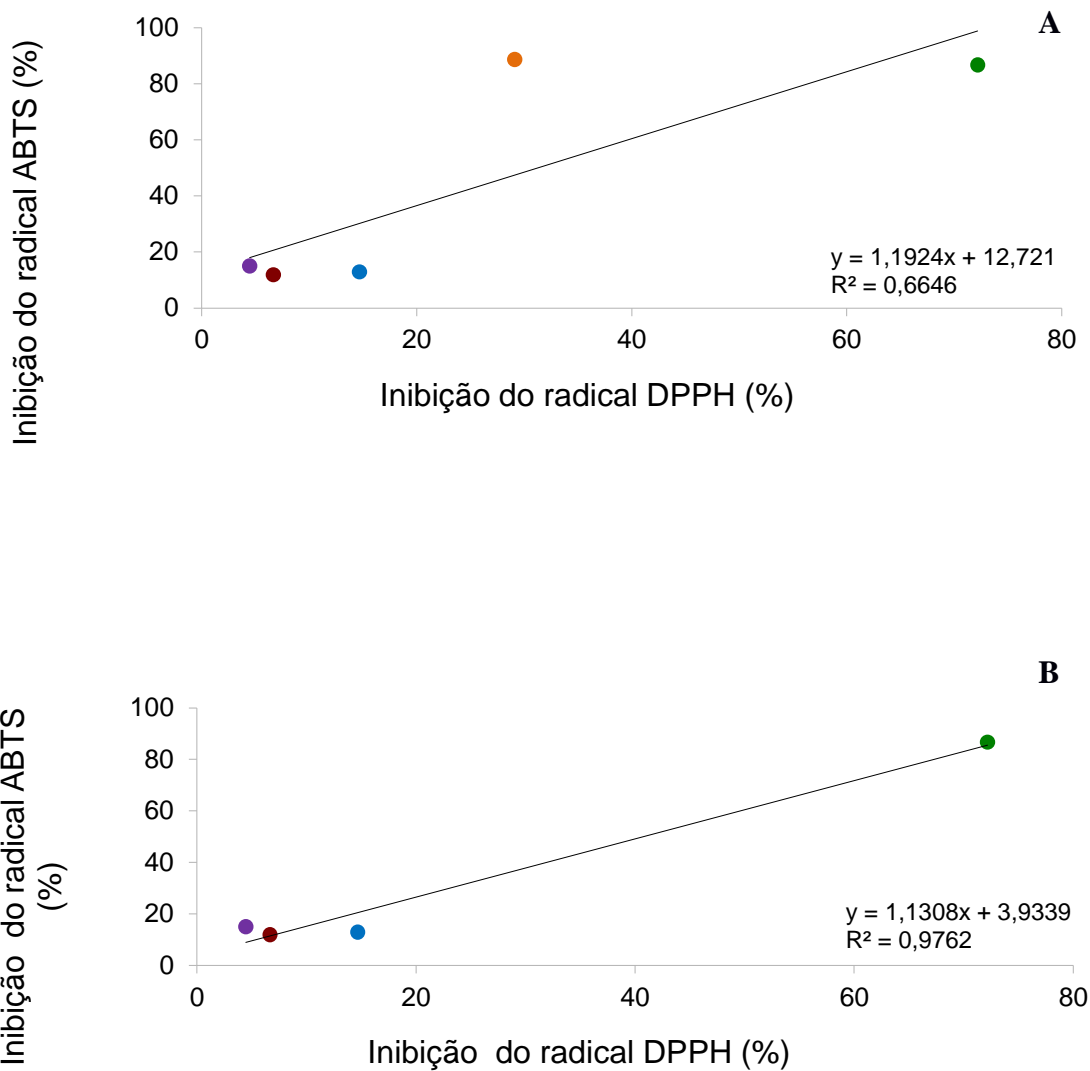
Experimentos realizados em triplicata com  $n=3$ . Cada ponto representa uma espécie estudada, sendo *V. elliptica* (verde); *M. ferruginata* (laranja); *G. virgata*, partes aéreas (azul); *G. arborescens* (bonina); *G. virgata*, raíz (roxo).

F2 - Gráfico 11 - Teste de correlação entre FT (mg EAG/g extrato) e a capacidade de captura do radical ABTS<sup>•+</sup> (%)



Experimentos realizados em triplicata com  $n=3$ . Cada ponto representa uma espécie estudada, sendo *V. elliptica* (verde); *M. ferruginata* (laranja); *G. virgata*, partes aéreas (azul); *G. arborescens* (bonina); *G. virgata*, raíz (roxo).

**F3 - Gráfico 12 - Teste de correlação entre a capacidade de captura do radical DPPH<sup>•</sup> (%) e a capacidade de captura do radical ABTS<sup>•+</sup> (%)**



Experimentos realizados em triplicata com n=3. Cada ponto representa uma espécie estudada, sendo *V. elliptica* (verde); *M. ferruginata* (laranja); *G. virgata*, partes aéreas (azul); *G. arborescens* (bonina); *G. virgata*, raíz (roxo). A – todos os extratos, B - extratos que apresentaram melhor correlação.