



CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

JOSÉ ADELSON ALVES DO NASCIMENTO JUNIOR

**Avaliação do potencial antioxidante e atividade  
citotóxica de extratos metanólicos de plantas  
medicinais da Caatinga**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Recife  
2016

JOSÉ ADELSON ALVES DO NASCIMENTO JUNIOR

**Avaliação do potencial antioxidante e atividade  
citotóxica de extratos metanólicos de plantas  
medicinais da Caatinga**

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica  
e Fisiologia, como parte dos requisitos  
necessários à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Maria Tereza dos Santos Cor-  
reia

Recife  
2016

JOSÉ ADELSON ALVES DO NASCIMENTO JUNIOR

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTES E  
HEMOLITICAS DE PLANTAS DA CAATINGA**

Dissertação apresentada para o  
cumprimento parcial das  
exigências para obtenção do  
título de Mestre em Bioquímica  
e Fisiologia pela Universidade  
Federal de Pernambuco

Aprovado em :17/06/2016

---

Prof. Dra. Maria Tereza dos S. Correia(Orientador)

---

Titular Interno (Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão)

---

Titular Interno (Dr. Tulio Diego da Silva)

---

Titular Externo (Dra. Clebia Maria Alves de Almeida)

Catálogo na Fonte:  
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Nascimento Júnior, José Adelson Alves do

Avaliação do potencial antioxidante e atividade citotóxica de extrato metanólicos de plantas medicinais da caatinga / José Adelson Alves do Nascimento Júnior. – Recife: O Autor, 2016.

58 f.: il.

Orientadores: Maria Teresa dos Santos Correia

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Bioquímica, 2016.

Inclui referências e anexos

1. Plantas medicinais 2. Caatinga 3. Plantas da caatinga I. Correia, Maria Teresa dos Santos II. Título.

581.634

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-123

Dedico esta dissertação a Deus e às pessoas que tanto amo mas que tive que me afastar para poder executar este mestrado.

## **Agradecimentos**

Primeiramente agradeço a Deus porque sem ele nada eu teria nessa vida.

Aos meus avós, José Gonçalves (Vô Gordinho) e Maria Quitéria (Vó Teta), por terem me aguentado todos esses anos e por serem meu segundo pai e segunda mãe, por todo amor, carinho, dedicação, educação e princípios ensinados ao longo de toda minha vida.

À minha família, meu pai, José Adelson, que é meu ícone de coragem, determinação e persistência; à minha mãe Sandra Cristina que me mostra todos os dias o que é ser uma pessoa forte, direita e digna; e a minha irmã, Maria Fernanda que é a parte de mim que não consigo viver sem e que já mostrou que por mais que problemas possam aparecer na vida, passamos por cima deles e a vida segue, aos três quero agradecer todo o amor e todo incentivo que tive ao longo desse tempo, por me ajudarem a não desistir e por terem acreditado em mim.

À minha noiva Nadine Pontes, por todo amor, paciência de todos esses anos junto e ao mesmo tempo separados, pelo carinho e dedicação, e por ser essa pessoa tão maravilhosa.

Às Profas. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia e Márcia Vanusa, pela orientação, estima, atenção dada ao longo deste trabalho e por terem proporcionado mais um avanço na minha vida acadêmica.

A Túlio Diego (Guiguinho), pela atenção e grande ajuda dada nos trabalhos e, acima de tudo, pela sua grande amizade.

À Universidade Federal de Pernambuco e o Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Fisiologia, em nome dos servidores e funcionários.

Aos grandes amigos Marco Henrique e Kayk Richardes por sempre estarem ao meu lado e me mostrarem o valor da amizade verdadeira.

A todos os integrantes do BioMol e do Uberlândia, por todo o apoio e dedicação.

Bem, e agradeço a todos aqueles que, mesmo não estando nesta pequena lista, colaboraram de alguma maneira para o desenvolvimento da minha carreira na pesquisa.

“As vezes é preciso aprender a correr antes de começar a andar.”  
Tony Stark (Homem de Ferro)

## Resumo

O bioma Caatinga é hoje um dos três principais ecossistemas da América do Sul, representando uma fonte potencial para a busca de novas moléculas. Dentre essas moléculas, encontram-se aquelas com atividade antioxidante que auxiliam no combate aos radicais livres, reduzindo o estresse oxidativo. A literatura evidencia que os antioxidantes presentes no mercado são de origem sintética e há uma série de efeitos tóxicos causados por seu uso prolongado, o que estimula a busca por novos produtos de origem natural. O trabalho investigou a atividade antioxidante de extratos metanólicos de três espécies vegetais encontradas no Bioma Caatinga: *Abarema cochliacarpus* (AC), *Stryphnodendron pulcherrimum* (SP) e *Tanaecium xanthophyllum* (TX) por metodologias *in vitro*: ensaio do DPPH, ABTS, fosfomolibdênio. Adicionalmente foi realizada as metodologias de FRAP e Poder Redutor, posteriormente a investigação fitoquímica dos extratos bem como dosagem do teor de fenóis e flavonóides totais com o intuito de apontar os possíveis compostos ativos responsáveis por tal atividade e, por fim, a análise por HPLC afim de qualificar e quantificar os fenóis presentes na amostra e a atividade citotóxica foi feita por atividades contra células HeLa e de hemácias humanas. A análise do perfil fitoquímico evidenciou a presença de saponinas, taninos e terpenóides e glicosídeo cardiôtonico, em todos os extratos, enquanto que pholataninos foram encontrados em AC e TC, antraquinona em TC, Alkaloide não foi encontrado em nenhum dos extratos. As dosagens de fenóis totais e flavonóides dos extratos variaram de 97,13 a 112,39 (mg EAG. g<sup>-1</sup> extrato) e 23,54 a 28,96 (mg EQ. g<sup>-1</sup> extrato), respectivamente. Os valores de CI<sub>50</sub> da atividade sequestradora de radicais DPPH variaram de 0,457 a 1,162 µg/mL. A CI<sub>50</sub> de sequestro de radicais ABTS variou de 244,2 a 281,1 e a porcentagem da capacidade antioxidante total (%CAT) de 11,50 a 24,38 %. A atividade de redução do íon do ferro pelo método de FRAP ficou entre 477,78 e 850,89 µg/mL, e atividade de poder redutor indicou uma absorbância de 1.4 para o extrato SP seguido de 1.1 e 0.89 dos extratos AC e TC onde obtiveram leituras próximas a absorbância do controle quercetina que foi 1.5. A atividade hemolítica de todos os extratos apresentaram hemólise abaixo de 3% o que indica que não obtiveram atividade citotóxica contra células humanas, a avaliação dos ensaios de atividade citotóxica contra células tumorais mostrou que os extratos não apresentam atividade contra células tumorais. No presente estudo evidenciou-se o papel chave dos compostos fenólicos na atividade antioxidante dos extratos estudados, e que os mesmos não apresentam citotoxicidade como os compostos já utilizados. Mais estudos são necessários para isolar esses compostos para melhor caracterizá-los, assim como a realização de testes de atividade antioxidante *in vivo*.

Palavras Chave: Produtos Naturais, Caatinga, Atividade Antioxidante, *Mimosoideae*, *Bignoniaceae*

## Abstract

The biome Caatinga is one of three main open ecosystems of South America, representing an environment of potential source of new molecules. Among molecules characterized this biome presented antioxidant activity that helps to fight free radicals, reducing oxidative stress. Studies shown that the antioxidants present in the market are of synthetic origin, and large part is related to toxic effects caused by prolonged use. This fact driving the search for new natural products antioxidants. The present study investigate the antioxidant activity of methanol extracts of three species of plants found in the Caatinga: *Abarema cochliocarpos* (AC), *Stryphnodendron pulcherrimum* (SP) and *Tanaecium xanthophyllum* (TX), for in vitro methodologies: DPPH assay, ABTS, Fosfomolibdênio (capacity total antioxidant - CAT), the oxidation of ions by FRAP and The Power Reducing. Moreover, the phytochemical investigation of extracts and total phenols and flavonoids were measured by HPLC analysis and Folin Chateau, respectively. The cytotoxic effect of extracts was observed against tumor cells and erythrocytes of human. The phytochemical analysis revealed the presence of saponines, tannins, terpenoid and glycosides for all extracts, but only pholabatannis was found in CA and CT, and anthraquinone in CT. Finally, the presence of alkaloids was not evidenced in the extracts. Total phenols and flavonoids of extracts ranged from 97.13 to 112.39 (mg GAE. G-1 extract) and 23.54 to 28.96 (mg EQ. G-1 extract), respectively. The IC<sub>50</sub> values of DPPH radical scavenging activity ranged from 0.457 to 1.162 g / ml. For the radical sequestration ABTS, IC<sub>50</sub> values ranger from 244.2 to 281.1, and the percentage of total antioxidant capacity (% CAT) from 11.50 to 24.38%. The iron ion reduction activity by FRAP method was between 477.78 and 850.89 mg / mL, and for reducing power activity indicated an absorbance of 1.4 by SP extract followed 1.1 and 0.89 by AC and CT extracts, respectively, the absorbance of quercetin control was 1.0. The cytotoxic analysis in human erythrocytes and against tumor cells revealed not cytotoxic action of extracts. Therefore the present study revealed a key role of phenolic compounds in the antioxidant activity of the extracts studied. Although, more studies are needed to isolate these compounds, to better characterize them, as well as the realization of antioxidant activities in vivo tests.

Keywords: Natural products, Caatinga, Antioxidant activity, *Mimosoideae*, *Bignoniaceae*

## Lista de ilustrações

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 – Mapa de Distribuição da Vegetação da Caatinga no Brasil . . . . .  | 16 |
| Figura 2 – Vegetação da Caatinga - Parna do Catimbau . . . . .                | 17 |
| Figura 3 – <i>Stryphnodendron pulcherrimum</i> (Willd.) Hochr . . . . .       | 19 |
| Figura 4 – <i>Abarema cochliacarpus</i> (Gomes) Barneby&J.W.Grimes . . . . .  | 20 |
| Figura 5 – Gráfico de sequestro de radical livre por método de DPPH . . . . . | 51 |
| Figura 6 – Gráfico de redução do radical ABTS . . . . .                       | 52 |
| Figura 7 – Absorbancias do teste de Poder Redutor . . . . .                   | 53 |
| Figura 8 – Gráfico de Atividade Hemolítica . . . . .                          | 54 |
| Figura 9 – Gráfico da Atividade Citotóxica por método de MTT . . . . .        | 55 |

## Lista de tabelas

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1 – Atividade antioxidante dos extratos metanólicos de <i>S. pulcherrimum</i> ,<br><i>A.Couchiliacarpus</i> e <i>T.Cyrthathum</i> pelos métodos in vitro de DPPH ,<br>ABTS e FRAP. .... | 56 |
| Tabela 2 – Tabela com as absorvâncias dos extratos de <i>S.pulcherrimum</i> e<br><i>A.cochliacarpus</i> e <i>T.Cyrthathum</i> , para a avaliação de RP . . . . .                               | 57 |
| Tabela 3 – Classes de metabólitos secundários avaliadas nos extratos vegetais  | 58 |

## Lista de abreviaturas e siglas

|      |   |
|------|---|
| ABTS | 2,2'-Azinobis(3-Etilbenzotiazolina-6-Ácido sulfônico) |
| AC   | Abarema cochliacarpos                                 |
| BHA  | Hidroxianisole Butilado                               |
| BHT  | Hidroxitolueno Butilado                               |
| CAT  | Capacidade Antioxidante Total                         |
| DPPH | 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl                         |
| EAG  | Equivalente Ácido Gálico                              |
| FRAP | Ferric Reducing Antioxidant Power                     |
| RL   | Radicais Livres                                       |
| RNS  | Espécies Reativas de Nitrogênio                       |
| ROS  | Espécies Reativas de Oxigênio                         |
| SP   | Stryphnodendron pulcherrimum                          |
| TBHQ | Terc-Butil-Hidroquinona                               |
| TEAC | Capacidade Antioxidante Equivalente ao Troxol         |
| TPTZ | 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine                      |
| TX   | Tanaecium xanthophyllum                               |

## Sumário

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1     | INTRODUÇÃO  | 14 |
| 2     | FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA   | 16 |
| 2.1   | Plantas Medicinais  | 16 |
| 2.2   | Caatinga  | 17 |
| 2.2.1 | <i>Tanaecium cythatum</i>   | 19 |
| 2.2.2 | <i>Stryphnodendron pulcherrimum</i> (Willd.) Hochr  | 19 |
| 2.2.3 | <i>Abarema cochliacarpus</i> (Gomes) Barneby&J.W.Grime  | 20 |
| 2.3   | Estresse Oxidativo  | 21 |
| 2.4   | Plantas e Antioxidantes   | 22 |
| 2.5   | Compostos fenólicos como antioxidantes  | 23 |
| 2.6   | Métodos de avaliação antioxidante in vitro  | 25 |
| 3     | OBJETIVOS   | 27 |
| 3.1   | GERAL   | 27 |
| 3.2   | ESPECÍFICOS   | 27 |
| 4     | REFERÊNCIAS   | 28 |
| 5     | ARTIGO  | 33 |
| 6     | Introdução  | 34 |
| 7     | Metodologia   | 35 |
| 7.1   | Coleta, Processamento e Obtenção dos Extratos Vegetais  | 35 |
| 7.2   | Sequestro de radicais livres (SRL) pelo método do DPPH  | 35 |
| 7.3   | Sequestro do Radical ABTS   | 36 |
| 7.4   | Atividade antioxidante total  | 36 |
| 7.5   | Poder redutor   | 36 |
| 7.6   | FRAP  | 37 |
| 7.7   | Atividade citotóxica  | 37 |
| 7.8   | Atividade hemolítica  | 38 |
| 7.9   | Análise fitoquímica   | 38 |
| 7.10  | Dosagem de fenóis totais  | 38 |
| 7.11  | Dosagem de flavonoides  | 39 |
| 7.12  | HPLC  | 39 |
| 7.13  | Análise Estatística   | 40 |
| 8     | Resultados e Discussão  | 40 |
| 8.1   | Avaliação da atividade antioxidante   | 40 |
| 8.2   | Avaliação da ação citotóxica e hemolítica   | 41 |
| 8.3   | Conteúdo fenóis totais e flavonóides totais   | 42 |
| 8.4   | Screening fitoquímico e análise HPLC dos principais componentes fenólicos dos extratos das três plantas | 44 |
| 9     | CONCLUSÕES  | 47 |
| 10    | REFERÊNCIAS   | 48 |

## 1. Introdução

O Domínio Caatinga abrange uma região semi-árida do Nordeste Brasileiro e constitui um dos principais ecossistemas da América do Sul, com cerca de 900.000 km<sup>2</sup>, o que corresponde a aproximadamente 10% do território do Brasil (WERNECK, 2011; BOMFIM, 2016). Por um longo período, a Caatinga foi classificada como região pobre na biodiversidade e endemismo de espécies, entretanto, estudos têm retificado esses equívocos, mostrando que a Caatinga abriga um biota muito rica e diversificada (LEAL; SILVA, 2003) (ALBUQUERQUE et al., 2007a), com altos níveis de espécies en-dêmicas e com características peculiares devido a adaptação às condições ambientais locais prevalentes como clima semiárido típico, intensa radiação solar, altas tempera-turas, baixa umidade e chuvas escassas (PASSOS; MESQUITA; BORGES-NOJOSA, 2016) (DPR, 2016).

Apesar dessa diversidade, a maioria das regiões da Caatinga permanecem desconhecidas ou pouco pesquisadas. Apesar de sua ameaça contínua por atividades antropogênicas (LEAL et al., 2005), a Caatinga permanece negligenciada, com cerca de apenas 1% de sua área estando incluída em unidades de proteção completa de conservação (LEAL; SILVA, 2003). A Caatinga é também o ecossistema brasileiro menos investigado cientificamente (SILVA et al., 2012).

Muitas espécies de plantas medicinais da Caatinga são amplamente conhecidas e utilizadas na medicina popular tradicional e para a produção comercial de produtos fitoterápicos, porém poucos estudos farmacológicos foram realizados para comprovar a sua eficácia . A investigação de espécies de planta da Caatinga com propriedades medicinais pode contribuir para a identificação de novos farmacos. Nesse contexto, a atividade antioxidante de produtos naturais tem sido investigada para avaliar seu poten-cial uso em estudos de condições relacionadas com o estresse oxidativo, como câncer, desordens autoimunes, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2008).

Abarema cochliacarpus (Gomes) Barneby & J.W. Grimes, popularmente conhe-cida como “barbatimão”, é uma planta da família Fabaceae nativa do Brasil, ocorrendo predominantemente na Mata Atlântica e Caatinga (SILVA et al., 2010c). Análise fitoquí-mica do extrato metanólico de *A. cochliacarpus* permitiu a detecção de saponinas, catequinas, taninos, fenóis e antraquinonas (SILVA et al., 2009). Esta

espécie tem sido bastante utilizada na medicina popular para tratamento de úlceras externas e gástricas, inflamação e câncer (AGRA et al., 2008; SANTOS, 2008) .

O gênero *Stryphnodendron* pertence à família Fabaceae e subfamília Mimosoideae e é constituído de 48 espécies (RIBEIRO et al., 2015), incluindo *Stryphnodendron pulcherrimum*, chamado popularmente de barbatimão, jubarbatimão, juerana-branca, paricá, paricazinho e caubi. *S. pulcherrimum* tem um papel ecológico importante como atrativo de abelhas do grupo meliponina (MONTEIRO; RAMALHO, 2010). Estudos prévios de espécies de *Stryphnodendron* identificaram atividades antiulcerogênica, antioxidante, cicatrizante, antimicrobiana, e leishmanicida (LOPES et al., 2005; LUIZE et al., 2005; SOUZA et al., 2007a).

A família Bignoniaceae é predominantemente tropical, e inclui cerca de 80 gêneros e 840 espécies de árvores, arbustos, cipós e lianas, dentre eles o gênero *Tanaecium* com 17 espécies. Os membros do gênero *Tanaecium* têm padrões de distribuição variável, que vão desde a América Central até a metade norte da América do Sul. A espécie *Tanaecium cyrtanthum* é encontrada na floresta seca e vegetação da Caatinga na Bolívia, Paraguai, Brasil e Argentina. Espécies do gênero *Tanaecium* têm sido muito utilizadas no Brasil como inseticidas naturais (FAZOLIN et al., 2007).

O objetivo deste trabalho foi analisar a composição fitoquímica e a citotoxicidade dos extratos metanólicos de três plantas endêmicas da Caatinga: *A. cochliacarpus*, *S. pulcherrimum* e *T. cyrtanthum* e avaliar a sua atividade antioxidante por diferentes métodos *in vitro*.

## 2. Fundamentação Teórica

### 2.1 Plantas Medicinais

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos remotos. A busca por um tratamento de doenças, por meio da ingestão de ervas, foi uma das primeiras formas de utilização de plantas (PEREIRA; CARDOSO, 2012). As plantas medicinais sempre foram de grande importância para o avanço de estudos na área da química e da medicina moderna, devido a diversos estudos relacionados a essas plantas, ocorreu a descoberta de diversos metabólitos expressivamente ativos, com variadas atividades biológicas (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Metabólitos secundários como terpenoides, alcaloides e fenóis fazem parte da planta. E eles possuem diversas funções biológicas, como defesa contra herbivoria, atrativos para polinizadores, garantem a proteção contra raios ultravioleta (SILVA, 2010).

A Organização Mundial de Saúde estima que muitos países desenvolvidos tem uma considerável parcela da população exercendo a prática de medicina tradicional (World Health Organization, 2009). No Brasil existem diversas espécies de plantas que são utilizadas na prática da medicina tradicional, muitas delas, cultivadas em casa, facilitando sua prática (KUMATE, 1997), diante disso, a fitoterapia é vista como um suporte, sendo bastante praticada (KUMATE, 1997), diante disso, a fitoterapia é vista como um suporte, sendo bastante praticada.

Os metabólitos expressos pelos vegetais que são utilizados pela população, mesmo que sem sua ação seja comprovada, por isso surge o interesse a verificação dos mecanismos de ação destes metabólitos (SILVA et al., 2010a). Nos últimos anos, a busca por plantas com atividades biológicas, como antioxidante e anticâncer, vem aumentando (SILVA et al., 2012).

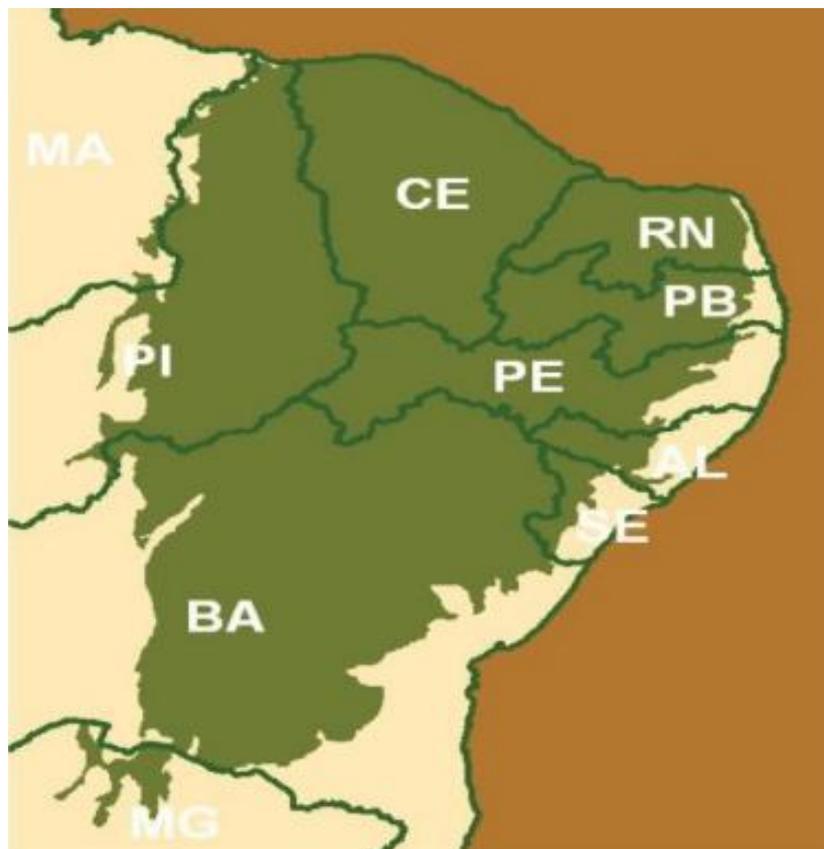
A instrução da população sobre o potencial biotecnológico das espécies de plantas que os circundam, sejam elas medicinais ou não, torna-se ferramenta de conservação e recuperação de áreas degradadas, incentiva o desenvolvimento socioeconômico da população local, devido as atividades de uso da flora, complementando a renda e ampliando as perspectivas das gerações futuras, que poderão usufruir dos mesmos recursos (ROQUE; ROCHA; LOIOLA, 2010).

No semiárido brasileiro existe uma gama de plantas que são utilizadas como alternativa a medicamento (ALBUQUERQUE et al., 2007b). Estudos de plantas da Caatinga evidenciaram alto teor de compostos fenólicos em diversas espécies, sugerindo que parte da atividade terapêutica conhecida pela população está relacionada a presença desses compostos (ALMEIDA et al., 2005).

## 2.2 Caatinga

O Brasil, com território de aproximadamente 8.500.000 km<sup>2</sup> possui notória diversidade de clima, solo, fauna, flora e microbiota, possui posição de vanguarda na bioprospecção de substâncias bioativas, sendo o detentor do maior potencial em biodiversidade do mundo. Além disso, sua marcante diversidade cultural, resultante de seu processo de povoamento, permitiu a exploração de seus recursos naturais, em especial as plantas, de variadas formas para diversos fins (ALBUQUERQUE et al., 2007b)(GIULIETTI et al., 2005).

Figura 1 – Mapa de Distribuição da Vegetação da Caatinga no Brasil



A Caatinga, único ecossistema exclusivamente brasileiro, compreende uma área de aproximadamente 900.000 km<sup>2</sup>, que abrange os estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e Minas Gerais, chegando a ocupar 54% da região Nordeste e 10% das terras brasileiras (Figura 1) (ANDRADE et al., 2005). A Caatinga tem como características o potencial hídrico reduzido no solo, com acentuado período de estação seca, entre sete e dez meses. Sua flora nativa apresenta então caracteres anatômicos, morfológicos e funcionais especializados para a sobrevivência destas plantas às condições adversas de clima e solo (Figura 2) (DRUMOND et al., 2000).

**Figura 2 – Vegetação da Caatinga - Parna do Catimbau**



**Fonte: SILVA, 2012**

Sobrevivência de plantas em ambientes adversos, ocasiona o aumento em sua síntese de produtos do metabolismo secundário. Onde estes metabólitos secundários não estão envolvidos em funções vitais das plantas, entretanto atuam diretamente nos mecanismos de defesa dos vegetais. Silva comprovou que esses metabólitos estão envolvidos nos efeitos biológicos dados as plantas medicinais (SILVA et al., 2012).

### 2.2.1 *Tanaecium cythatum*

Dentre as espécies do gênero dos Tanaeciuns encontra-se a espécie *Tanaecium cyrtanthum*, que tem sua distribuição no Nordeste podendo ser encontrada nos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Alagoas e Sergipe.

Apesar de ainda não haver uma devida descrição sobre estudos de atividades antioxidantes realizados com o *Tanaecium cyrtanthum*, diversas espécies de bigníace-ae tem comprovada atividade antioxidante (SOUZA et al., 2007b).

### 2.2.2 *Stryphnodendron pulcherrimum* (Willd.) Hochr

Pertencente a família Fabaceae, subfamília Mimosoideae, *S. pulcherrimum* planta que varia entre médio e grande porte, com altura entre 8 e 23 metros, geralmente tronco reto, copa aberta e pequena, sementes castanho-escuras, fruto tipo legume, folhas compostas bipinadas, flores de 0,5mm de comprimento, amarelo-esverdeadas a alvo-amareladas (FIGURA 3) (LORENZI, 1998). É a espécie mais bem distribuída do gênero *Stryphnodendron*, conhecida também como favinha, ocorrendo em diversas áreas de Floresta tropical úmida nas partes brasileiras (Acre, Amapá, Amazonas, Mato Grosso, Pará, Roraima e Rondônia) e extrabrasileira (Suriname, Guiana, Guiana Francesa, Venezuela, Colômbia, Peru e Bolívia). De maneira não tão bem distribuída, também é encontrada em áreas de mata seca como na região da Caatinga (principalmente em Sergipe, Alagoas, Pernambuco e Paraíba) (SCALON, 2007).

Apesar dos poucos estudos sobre as espécies do gênero *Stryphnodendron*. A espécie do *S. adstringens* (Mart.) Coville (SANTOS et al., 2002) é bastante conhecida por apresentar alta quantidade de taninos, aos quais são atribuídas as funções antimicrobiana e antioxidante (BARDAL, 2011).

**Figura 3 – *Stryphnodendron pulcherrimum* (Willd.) Hochr**



Fonte: POPVKIN, 2010

### **2.2.3 *Abarema cochliacarpus* (Gomes) Barneby&J.W.Grimes**

*Abarema cochliacarpus* (Gomes) Barneby & J.W.Grimes, conhecida também como “barbatimão”, “babatemão” e “barbatião” é distribuída na Mata Atlântica e na Caatinga, sendo encontrada em diversos estados brasileiros, como Espírito Santo Bahia, Paraíba e Pernambuco (OLIVEIRA et al., 2013). Já tendo sido encontrada em locais com mais de 1.100 m de altura (SANTOS et al., 2002). Esta espécie da família Fabaceae é caracterizada pela inflorescência em capítulos sendo composta por cerca de 19.000 espécies (GIULIETTI et al., 2005). A espécie varia de pequeno a grande porte podendo chegar a 8 metros de altura, possui casca amarronzada na parte externa, folhas compostas, alongamentos globulares com inflorescência de cor amarelada. As cascas são utilizadas popularmente no preparo de infusões para o combate de processos infecciosos, anti-séptico, analgésico e contra lesões na pele, e possui comprovada ação no combate a úlcera gástrica (SILVA, 2006; IGANCI; MORIN, 2012; JOLY, 2002; SANTOS; FERREIRA; ROSSI-ALVA, 2007; SILVA et al., 2010c)

As plantas conhecidas como “barbatimão” são comumente espécies do gênero *Stryphnodendron*, entretanto outras espécies como *Dimorphandra mollis* e *Abarema cochliacarpus* (SILVA, 2006; SILVA et al., 2009) também são conhecidas como “barbati-mão” e são popularmente usado para tratar as mesmas doenças. Em muitos casos, produtos comerciais feitos com as cascas de *Stryphnodendron adstringens* são

adulteradas com estas outras espécies (SANTOS et al., 2002) devido a características botânicas em comum como indumentum dos ramos (IGANCI; MORIN, 2012).

Estudos fitoquímicos detectaram a presença de diversos metabolitos secundários, como catequinas, fenóis e taninos em cascas Abarema C. (SILVA et al., 2009). As catequinas estão ligadas a presença de atividade antioxidante devido ao sequestro de radicais livres (SILVA et al., 2010c).

**Figura 4 – Abarema cochliacarpus (Gomes) Barneby&J.W.Grimes**



Fonte: POPVKIN, 2010

### 2.3 Estresse Oxidativo

Os processos de oxidação formam radicais livres, que são produzidos naturalmente ou por algum defeito direto. Esses radicais que possuem elétron ímpar são encontrados no nitrogênio e oxigênio, devido a isso são chamados de EROs (espécies reativas de oxigênio) ou ERNs (espécie reativa de nitrogênio) (FINKEL, 2003).

EROs e ERNs são produzidas durante o metabolismo celular e podem ser observadas fisiologicamente. Têm papel importante no funcionamento celular, em processos fisiológicos como à fagocitose onde são produzidas a fim de eliminar o organismo agressor. Entretanto, quando o corpo produz esses radicais em excesso, a maquinaria antioxidante que nos previne de danos celulares é ativada (SCHAFER; BUETTNER, S.d) (VASCONCELOS et al., 2007)

Quando se fala em espécies reativas de oxigênio pode-se destacar principalmente dois grupos, os radicalares: hidroxila (HO), superóxido (O<sub>2</sub>), peroxila (ROO) e alcoxila (RO); e os não-radicalares: oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. Dentre as ERN incluem-se o óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), ácido nitroso (HNO<sub>2</sub>), nitritos (NO<sub>2</sub>-), nitratos (NO<sub>3</sub>-) e peroxinitritos (ONOO-) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006) . Alguns dessas espécies podem ter alta reatividade no organismo atacando macromoléculas como os lipídios. Alguns são pouco reativos, mas podem gerar espécies danosas.

Os radicais livres que são derivados de oxigênio fazem parte do grupo mais importante de radicais gerado em sistemas vivos que dentre eles estão os radical superóxido, peróxido de hidrogênio, radical peroxil e etc., (VALKO et al., 2007). No caso do radical HO ele é o mais deletério ao organismo, isso se deve fato de ter uma meia-vida muito curta e dificilmente pode ser seqüestrado in vivo. Estes radicais freqüentemente atacam as moléculas por abstração de hidrogênio e por adição a insaturações.

A produção elevada de radicais livres e o não controle destes pelos sistemas antioxidantes , causa um desequilíbrio chamado de “estresse oxidativo” (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Situação que pode ocasionar oxidação de biomoléculas, causando perda de sua atividade. Esses danos podem ser irreversíveis, levando a apoptose celular (HALLIWELL, 1992).

## 2.4 Plantas e Antioxidantes

Os antioxidantes atuam combatendo a oxidação causada por radicais livres no organismo e atuando na proteção contra agentes oxidantes, como por exemplo, no retardo de processos oxidativos, inibindo os radicais livres, prevenindo diversos tipos de doenças atuando de forma direta no controle dos radicais livres (SHIRAHIGUE, 2008).

O controle dos níveis de radicais livres no organismo ajuda a manter a homeostase corporal, pois apesar dos organismos possuírem enzimas como a superóxido dismutase e catalase que podem ajudar a prevenir os efeitos deletérios causados por radicais livres ajudando aos sistemas antioxidantes, antioxidantes provenientes de

outras fontes, como alimentação, administração tópica ou medicamentosa ajuda no combate ao estresse oxidativo (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; VARGAS; HOELZEL; ROSA,2008).

Entre os compostos que podem estar presentes nas plantas que possuem atividades antioxidantes, estão os carotenóides e polifenóis como flavonóides e taninos. Esses compostos são encontrados em diversas partes da planta, inclusive possuem baixa toxicidade, fator que tem aumentado a demanda deles no mercado (SILVA et al., 2010b).

## **2.5 Compostos fenólicos como antioxidantes**

Antioxidantes podem ser formados de diversas moléculas como vitaminas, minerais, e outros diversos compostos (PEREIRA; CARDOSO, 2012). Os antioxidantes são capazes de reduzir ou inibir a oxidação podendo ser enzimáticos ou não enzimáticos os compostos fenólicos (flavonoides) (HALLIWELL, 1992)(SOUZA et al., 2007a).

Os antioxidantes que possuem núcleo fenólico, como flavonoides e ácidos fenólicos, destacam-se pelo sequestro de espécies reativas de oxigênio (EROS), além de reduzirem e quelarem íons férrico que catalisam a peroxidação lipídica (DELAZAR et al., 2006). O conjunto de metabolitos encontrados em plantas medicinais, fazem parte dos compostos químicos responsáveis pela atividade antioxidante (BESSA et al., ).

Uma substancia fenólica é aquela que possui um ou mais núcleos aromáticos contendo substituintes hidroxilados e seus derivados funcionais (SCHENKEL, 2007). Esses grupos fenólicos são os mais cotados para justificar a atividade antioxidante das plantas (MAESTRI et al., 2006), eles dividem-se em não-flavonóides e flavonóides (SILVA et al., 2010a).

O grupamento dos não-flavonóides ou ácidos fenólicos inclui derivados de ácidos como cinâmicos e benzoicos, onde a atividade antioxidante está ligada a proximidade do grupo carboxila em relação ao fenil. Quanto mais próximo, maior será a atividade antioxidante do grupo hidroxila (SILVA et al., 2010c)

Os compostos fenólicos agem nos radicais livres (RL), tornando-os mais estáveis, pela quebra de sua cadeia de formação (MAESTRI et al.,

2006). Quimicamente os flavonóides podem ser classificados em diversas classes como os flavonóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas, dentre outros (OLDONI, 2007)

Encontrados normalmente em frutas, cereais e vinhos, os flavonoides podem ser usados como suplementos alimentares, exercendo efeitos sobre doenças cardiovasculares, ação anti-inflamatória, aumento do teor de insulina, efeito anti-hipertensivo, anticâncer, neuroprotetor, aumento de funções cognitivas e ação antioxidantes (BOU-DET, 2007; PEREIRA et al., 2009).

Os flavonóides são biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides, e constituem importante classe de polifenóis. Presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários de vegetais, eles representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural.

Essa classe de compostos é amplamente distribuída no reino vegetal, podendo ser encontrados em diversas formas estruturais. Entretanto, a maioria dos representantes dessa classe possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas. Os flavonóides de origem natural apresentam-se, frequentemente, oxigenados e um grande número ocorre conjugado com açúcares (SCHENKEL, 2007).

Diversas funções são atribuídas aos flavonóides nas plantas. Entre elas, podem-se citar a proteção contra a incidência de raios ultravioleta, proteção contra microrganismos patogênicos, ação antioxidante, ação alelopática e inibição enzimática (SIMÕES, 2000; HARBONE; WILLIAMS, 2000; HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002).

O emprego terapêutico dos flavonoides apesar de vasto ainda é empírico, embora alguns resultados indiquem os flavonóides como mutagênicos, em geral, são considerados benéficos (SCHENKEL, 2007). Ensaio biológicos usando flavonóides mostram diversas atividades atribuídos aos representantes da classe, como: atividades antivirais, antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatórias, antitumorais, atividade sobre a permeabilidade capilar e atividade espermicida (SCHENKEL, 2007; PELZER et al., 1998).

(PEREIRA; CARDOSO, 2012) relata que os antioxidantes atuam em diferentes níveis de proteção nos organismos, onde tem a capacidade de impedir a formação e proliferação de RL. Capturando radicais livres, evitando a deterioração de aminoácidos, lipídeos e DNA, evitando o aparecimento de lesões e perda da integridade celular.

Outro mecanismo de proteção dos antioxidante é o reparo de lesões causadas pela ação de RL. Onde ocorre a remoção dos danos causado a molécula, e a correção das membranas celulares danificadas (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Estudos mostram que extratos ricos em flavonóides, apresentam boa atividade antioxidante, sendo capazes de diminuir os efeitos prejudiciais causados pelos radicais livres, prevenindo o surgimento de doenças associadas ao estresse oxidativo (PEREIRA et al., 2009; BOUDET, 2007).

## **2.6 Métodos de avaliação antioxidante in vitro**

A determinação da atividade antioxidante in vitro é classificada em duas categorias: métodos diretos e métodos indiretos. O método direto se baseia pela competição entre uma sonda oxidável e o antioxidante por radicais gerados por uma fonte de radicais livres, e o indireto dá-se pela habilidade do antioxidante em sequestrar radicais livres (COSTA et al., 2010).

Os métodos in vitro podem avaliar um composto puro ou extrato. Dentre os métodos mais utilizados estão: DPPH (2,2-difenil-1-picrihidrazil), ABTS (2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico), Fosfomolibdênio e FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) e poder redutor (BERGAMASCHI, 2010).

O DPPH é caracterizado como um RL instável em virtude da deslocamento do elétron desemparelhado por toda a molécula. Esta deslocamento faz com que o DPPH possua uma coloração vinho, em etanol com absorvância de 517 nm (SHIRAHIGUE, 2008). O ensaio consiste na capacidade antioxidante que uma determinada substância pode ter em sequestrar o radical DPPH, reduzindo-o a hidrazina. Isso ocorre devido à alguma substância antioxidante doar átomos de hidrogênio ao DPPH. A hidrazina ao ser obtida provoca mudança na coloração de vinho para amarelo pálido (BERGAMASCHI, 2010) (KUMARASAMY et al., 2007).

O decaimento da absorvância a uma solução contendo o radical DPPH é visualizado pelo comprimento de onda observado entre 515 a 528 nm, que é ocasionado pela adição do antioxidante. Do ponto de vista metodológico, é um dos métodos mais precisos e reprodutivos na avaliação da atividade antioxidante de extratos vegetais e substâncias puras, tais como flavonóides e terpenóides (KUSKOSKI et al., 2005).

O método do ABTS se caracteriza pela captura do radical livre ABTS (2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolína-6-ácido sulfônico), sendo utilizado na avaliação da atividade antioxidante em plantas, alimentos, e outros, devido a sua aplicabilidade em fase aquosa. O método consiste na descoloração do ABTS, verificando a redução da absorvância vista por comprimento de onda a 734 nm. Para verificação da absorvância, a amostra em questão é comparada com atividade do Trolox, um antioxidante sintético usado como padrão, e os resultados são expressos em TEAC. (capacidade antioxidante equivalente ao Trolox) (BERGAMASCHI, 2010).

O ensaio FRAP baseia-se na capacidade de um agente antioxidante em reduzir o complexo férrico em complexo ferroso. Quando isto ocorre, na presença de 2,4,6-tripiridils-triazina (TPTZ) resulta na deliberação forte de cor, e a absorvância é aumentada, sendo visualizada o aumento na intensidade do azul da amostra. O padrão equiparado é o ácido ascórbico, tendo o resultado da amostra expresso em equivalente de ácido ascórbico (STRATIL; KLEJDUS; KUBAN, 2006).

Os testes realizados in vitro comprovação a atividade antioxidante sendo interessante teste em modelo in vivo.

### **3.OBJETIVOS**

#### **3.1 GERAL**

- Avaliar o potencial antioxidante in vitro de diferentes plantas da caatinga

#### **3.2 Específicos**

- Avaliar a atividade de Sequestro dos radicais DPPH,ABTS nos extratos de Abarema Couchiliacarpos, S.Puclherrimum e T.Cyrthathum.
  - Avaliar a Atividade Antioxidante Total por método de redução do fosfomolibdenio
  - Avaliar o poder de redução de Íons por metodologias de FRAP e Poder Redutor
  - Avaliar a citotoxicidade em linhagens de células tumorais
  - Avaliar Atividade Hemolítica
  - Verificar a composição Fitoquímica dos Extratos
  - Quantificar Fenois e Flavonoides nas amostras
  - Quantificar os compostos fenólicos por HPLC

## Referências

- AGRA, M. de F. et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, scielo, v. 18, p. 472 – 508, 09 2008. ISSN 0102-695X. Disponível em: <<http://www.scielo.br/scieloOrg/php/articleXML.php?lang=en&pid=S0102-695X2008000300023>>.
- ALBUQUERQUE, U. P. D. et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. *Journal of ethnopharmacology*, Elsevier, v. 114, n. 3, p. 325 – 354, 2007.
- ALMEIDA, C. F. C. B. R. et al. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the caatinga(Northeast Brasil). *Journal of Arid Environments*, v. 6, p. 127 – 142, 2005.
- ALMEIDA, M. M. B. et al. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Research International*, Elsevier, v. 44, n. 7, p. 2155 – 2159, 2011.
- ANDRADE, L. et al. Análise da cobertura de duas fitofisionomias de caatinga, com diferentes históricos de uso, no município de São João do Cariri, Estado do Paraíba. *Cerne*, v. 11, n. 3, p. 253 – 262, 2005.
- BARDAL, D. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE BARBATIMÃO *Stryphnodendron adstringens*(MARTIUS) COVILLE EM AGENTES CAUSADORES DA MASTITE. 2011. 181 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) — Universidade Federal de Minas Gerais.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. *Quimica Nova*, v. 29, p. 113 – 123, 2006.
- BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, v. 239, n. 1, p. 70 – 76, 1996.
- BERGAMASCHI, K. Capacidade antioxidante e composição química de resíduos vegetais visando seu aproveitamento. 2010. Dissertação (Mestrado) — Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- BESSA, N. et al. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde - Tocantins. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 15, n. 4, p. supl.1 –, 2013.
- BOMFIM, P. R. de A. Michel Rochefort e o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística na década de 1960/Michel Rochefort and the Brazilian Institute of Geography and Statitics (IBGE) in the 1960s. *Revista Sociedade & Natureza*, v. 27, n. 3, 2016.
- BOUDET, A. Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry*, v. 68, p. 2722 – 2735, 2007.
- COSTA, S. L. et al. Impact of Plant-Derived Flavonoids on Neurodegenerative Diseases. *Neurotoxicity research*, Springer, p. 1 – 12, 2016.

COSTA, T. S. A. et al. Espécies de maior relevância para a região Centro-Oeste. Frutas nativas da região Centro-Oeste. Brasília: Embrapa, p. 15 – 30, 2010.

DELAZAR, A. et al. Chrozophorin: a new acylated flavone glucoside from *Chrozophora tinctoria* (Euphorbiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognsia*, v. 16, p. 286 – 290, 2006.

DPR. Resolução de Diretoria. [S.I.], 2016. Disponível em: <[www.compesa.com.br](http://www.compesa.com.br)>.

DRUMOND, M. A. et al. Estratégias para o uso sustentável da biodiversidade da caatinga. In Seminário para avaliação e identificação de ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade do bioma Caatinga. Embrapa/Cpatsa, UFPE e Conservation International do Brasil, Petrolina. 2000.

FAZOLIN, M. et al. Atividade inseticida do óleo essencial de *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum (Bignoneaceae) sobre *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). *Acta Amazonica, SciELO Brasil*, v. 37, n. 4, p. 599– 604, 2007.

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

FINKEL, T. Oxidant signals and oxidative stress. *Current opinion in Cell Biology*, v. 15, n. 2, p. 247 – 254, 2003.

GIULIETTI, A. M. et al. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. *Megadiversidade*, v. 1, n. 1, p. 52 – 61, 2005.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *Journal of Neurochemistry*, v. 59, n. 5, p. 1609 – 1623, 1992.

HARBONE, B. J.; WILLIAMS, A. C. Advances in flavonoids research since 1992. *Phytochemistry*, v. 55, p. 481 – 504, 2000.

HEIM, E. K.; TAGLIAFERRO, R.; BOBILYA, J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutricional Biochemistry*, v. 13, n. 1, p. 572 – 584, 2002.

IGANCI, J. R. V.; MORIN, M. Abarema (Fabaceae, Mimosideae) in the atlantic domain. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 168, n. 4, p. 473 – 486, 2012.

KUMARASAMY, Y. et al. Screening seeds of some Scottish plants for free-radical scavenging activity. *Phytotherapy Research*, v. 21, p. 615 – 621, 2007.

KUMATE, J. Infectious Diseases: Considerations for the 21st Century. *Archives of Medical Research*, v. 28, p. 155 – 161, 1997.

LEAL, I. R. et al. MEGADIVERSIDADE j Volume 1 j Nº 1 j Julho 2005 Mudando o curso da conservação da biodiversidade na Caatinga do Nordeste do Brasil. *MEGADIVERSIDADE*, v. 1, n. 1, 2005.

LEAL, I. R.; SILVA, J. M. C. da. *Ecologia e conservação da Caatinga*. [S.I.]: Editora Universitária UFPE, 2003.

LOPES, G. C. et al. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrization of cutaneous wounds in rats. *Journal of Ethnopharmacology, Elsevier*, v. 99, n. 2, p. 265 – 272, Junho 2005.

- LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. [S.l.]: Nova Odessa: Plantarum, 1998.
- LUIZE, P. S. et al. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, SciELO Brasil*, v. 41, n. 1, p. 85 – 94, Janeiro/Março 2005.
- MAESTRI, D. M. et al. Natural products as antioxidants phytochemistry. *Advances in Research*, p. 105 – 135, 2006.
- OLDONI, T. L. C. Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *apismellifera*. 2007. Dissertação (Mestrado) — Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- OLIVEIRA, R. F. et al. Evaluation of the hepatotoxicity of *Abarema cochliacarpus* extracts in mice *Mus musculus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 09, Aug 2013.
- PASSOS, D. C.; MESQUITA, P. C. M. D.; BORGES-NOJOSA, D. M. Diversity and seasonal dynamic of a lizard assemblage in a Neotropical semiarid habitat. *Studies on Neotropical Fauna and Environment, Taylor & Francis*, v. 51, n. 1, p. 19 – 28, 2016.
- PELZER, L. et al. Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. II *FARMACO*, v. 53, p. 421 – 424, 1998.
- PEREIRA, D. M. et al. Phenolics: From Chemistry to Biology. *Molecules*, v. 14, p. 2202 – 2211, 2009.
- PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. D. G. Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, v. 3, n. 4, p. 146 – 152, 2012.
- PHAM-HUY, L. A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci*, v. 4, n. 2, p. 89 – 96, Junho 2008
- POPVKIN, A. Inflorescência de *A. cochliacarpus*. 2010. Fotografia colorida. Disponível em .
- POPVKIN, A. Inflorescência de *S. pulcherrimum*. 2010. Fotografia colorida. Disponível em <http://flickr.com>.
- RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, v. 29, n. 4, Jul/Ago 2006.
- RIBEIRO, T. G. et al. Antileishmanial activity of standardized fractions of *Styphnodendron obovatum*(Barbatimão) extract and constituent compounds. *Ethnopharmacology*, v. 165, p. 238 – 242, 2015.
- ROQUE, A. A.; ROCHA, R. M.; LOIOLA, M. I. B. Uso e diversidade de plantas medicinais da caatinga na comunidade rural de laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte(Nordeste do Brasil). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 12, n. 1, p. 31 – 42, 2010.
- SANTOS, A. L. da S. Interação de comunidades rurais com recursos vegetais: o caso dos remanescentes de floresta estacional do Município de Junqueiro (AL-Brasil). Universidade Federal de Pernambuco, 2008.
- SANTOS, S. C. et al. Tannin composition of barbatimão species. *Fitoterapia, Elsevier*, v. 73, n. 4, p. 292 – 299, Julho 2002.

- SANTOS, S. C.; FERREIRA, F. S.; ROSSI-ALVA, J. C. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato de *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby&Grimes. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, n. 2, p. 215 – 219, Jun 2007.
- SCALON, V. R. Revisão taxonômica do gênero *styphnodendron* Mart (leguminosaemi-mosoideae). 2007. Tese (Doutorado) — Intituto de Biociências da Universidade de São Paulo-USP, São Pauo.
- SCHAFFER, F. Q.; BUETTNER, G. R. Redox State and Redos Enviroment Redox state is the ratio of the interconvertible. *Education*, v. 1, p. 1 – 11, S.d.
- SCHENKEL, E. P. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6. ed. [S.I.]: UFRGS, 2007
- SILVA, M. J. D. et al. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos e frações orgânicas de *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (Mimosaceae). *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada*, v. 33, n. 2, p. 267 – 274, 2012.
- SILVA, M. L. C. et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 31, n. 3, p. 669 – 682, 2010.
- SILVA, M. L. C. et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 31, n. 3, p. 669 – 682, Jul/Set 2010.
- SILVA, M. S. da et al. *Abarema cochliocarpos*: Gastroprotective and ulcer-healing activities. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 132, n. 1, p. 134 – 142, 2010.
- SILVA, N. C. et al. Antinociceptive effects of *Abarema cochliocarpos* (BA Gomes) Barneby & JW Grimes (Mimosaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia, SciELO Brasil*, v. 19, n. 1A, p. 46 – 50, Jan/Mar 2009.
- SILVA, N. C. B. Potencial biotecnológico de plantas medicinais: estudo etnofarmacológico em uma comunidade quilombola da Chapada Diamantina-BA. 2006. Tese (Doutorado) — Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- SILVA, N. C. B. et al. Antinoceptive effects of *Abarema cochliocarpos*(B. A. Gomes) Barneby&J. W. Grimes (Mimosaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, n. 1, p. 46 – 50, 2009.
- SOUZA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quimica Nova*, v. 30, n. 2, p. 351 – 355, 2007.
- SOUZA, T. M. et al. Bioprospection of antioxidant and antimicrobial activities in the bark of *Styphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae Mimosoideae). *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada*, v. 28, p. 221 – 226, 2007.
- STRATIL, P.; KLEJDUS, B.; KUBAN, V. Determination of Total Content of Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Vegetables Evaluation of Spectrophotometric Methods. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 54, p. 607 – 616, 2006.
- VARGAS, P. N.; HOELZEL, S. C.; ROSA, C. S. Determinação do teor de polifenóis totais e atividade antioxidante em sucos de uva comerciais. *Alimentos e Nutrição*, v. 19, p. 11 – 15, 2008.
- VASCONCELOS, S. M. L. et al. Reactive oxygen and nitrogen species, antioxidants and markers of oxidative damage in human blood: main analytical methods for their determination. *Quimica Nova*, v. 30, n. 5, p. 1323 – 1338, 2007.

WERNECK, F. P. The diversification of eastern South American open vegetation biomes: historical biogeography and perspectives. *Quaternary Science Reviews*, Elsevier, v. 30, n. 13-14, p. 1630 – 1648, Junho 2011.

World Health Organization. World health statistics. [S.l.], 2009. Disponível em: <<http://www.who.int/whosis/whostat/2009/en/>>.

## 5. ARTIGO A SER SUBMETIDO AO ARABIAN JOURNAL OF CHEMISTRY

### AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTES E HEMOLITICAS DE PLANTAS DA CAATINGA

José Adelson Alves do Nascimento Junior<sup>1</sup>, Luciclaudio Casemiro de Amorim<sup>1</sup>, Barbara Ramos, Bruno S. dos Santos<sup>1</sup>, Tulio Diego da Silva<sup>1</sup>, Patricia M. G. Paiva <sup>1</sup>, Thiago H. Napoleão <sup>1</sup>, Marcia Vanusa da Silva<sup>1</sup>, Maria Tereza dos Santos Correia<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco,50670-420, Recife-PE,Brasil

Autor Correspondente :Maria Tereza dos Santos Correia

Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco,50670-420, Recife-PE,Brasil Fone: (081) 994508770

Email: [mtscorreia@yahoo.com.br](mailto:mtscorreia@yahoo.com.br)

Keywords: Natural products, Caatinga, Antioxidant activity, *Mimosoideae*, *Bignoniaceae*

**Resumo** : A prospecção de substâncias antioxidantes naturais é uma prática que vem crescendo nas últimas décadas devido à descoberta de produtos de origem natural com propriedades terapêuticas e também porque eles representam uma alternativa para o uso de antioxidantes sintéticos. A região do Nordeste do Brasil, onde se localiza boa parte da Caatinga tem sido alvo de diversos estudos etnofarmacológicos, mesmo apresentando a maior parte da sua vegetação seca. Radicais livres são produzidos normalmente pelos organismos vivos mas, quando em excesso podem causar várias patologias como: câncer, o envelhecimento precoce, choque hemorrágico, catarata, disfunções cognitivas, doenças cardiovasculares etc. O organismo é capaz de produzir substâncias antioxidante, como um mecanismo de proteção contra os efeitos deletérios dos radicais livres, Dentro dessas perspectivas esse estudo investigou as atividades antioxidantes o conteúdo fenólico total e teor de flavonoides, e a atividade citotóxica de três plantas da caatinga. A metodologia utilizada foi de ABTS, DPPH, FRAP, Poder Redutor, Flavonoides e fenóis e fitoquímica e HPLC, como também atividade citotóxica dos extratos. As dosagens de fenóis totais e flavonoides dos extratos variaram de 97,13 a 112,39 (mg EAG. g<sup>-1</sup> extrato) e 23,54 a 28,96 (mg EQ. g<sup>-1</sup> extrato), respectivamente. Os valores de  $CI_{50}$  da atividade sequestradora de radicais DPPH variaram de 0,457 a 1,162  $\mu$ g/mL. A  $CI_{50}$  de sequestro de radicais ABTS variou de 244,2 a 281,1 e a porcentagem da capacidade antioxidante total (%CAT) de 11,50

a 24,38 %. A atividade de redução do íon do ferro pelo método de FRAP ficou entre 477,78 e 850,89  $\mu\text{g/mL}$ , e atividade de poder redutor indicou uma absorvância de 1.4 para o extrato SP seguido de 1.1 e 0.89 dos extratos AC e TC onde obtiveram leituras próximas a absorvância do controle quercetina que foi 1.5. A atividade hemolítica de todos os extratos apresentaram hemólise abaixo de 3% o que indica que não obtiveram atividade citotóxica contra células humanas, a avaliação dos ensaios de atividade citotóxica contra células tumorais mostrou que os extratos não apresentam atividade contra células tumorais. Neste estudo pode-se verificar o papel que desempenham os compostos fenólicos na atividade contra os radicais livres que desempenham os extratos utilizados, e que os não foi observado citotoxicidade. Mais estudos são necessários para isolar esses compostos para melhor caracterizá-los, assim como a realização de testes de atividade antioxidante in vivo.

## **6.Introdução**

A presença de espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio se dá em processos metabólicos, como a produção de energia, regulação do crescimento celular. No entanto, estas espécies reativas estão relacionados com efeitos adversos para a saúde tais como danos de peroxidação lipídica e proteína, tecidos de membrana, enzimas, hidratos de carbono e ácidos nucleicos (BARBOSA et al., 2010).

O balanço de radicais livres no organismo é feito pela quantidade de antioxidante presente no organismo, os quais são compostos que possuem capacidade de combater o efeito danoso causado por estas biomoléculas. Desequilíbrio de radicais livres/antioxidantes pode levar à criação de estresse oxidativo, levando a diversas patologia ao ser humano (RAJENDRAN et al., ).

Os antioxidantes desempenham importante papel na prevenção de varias doenças (NGO et al., 2011). Uma grande quantidade de medicamentos derivados de plantas estão correlacionados com a atividade antioxidante (EZHILARASAN et al., 2014). A classe mais bem estudada dos metabolitos secundários expressos pelas plantas são os polifenóis, onde se relata uma alta atividade redutora destes compostos frente a agentes oxidantes (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Onde estudos comprovam que o consumo de alimentos contendo antioxidantes fenólicos é benéfico para a saúde (ALMEIDA et al., 2011).

A indústria alimentícia utiliza de agentes para impedir a oxidação de produtos como carne, frutos e óleos. Diversos compostos são utilizados como como hidroxito-

lueno butilado (BHT), hidroxianisole butilado (BHA) e terc-butil-hidroquinona (TBHQ) (RAMALHO; JORGE, 2006) Contudo há uma preocupação sobre os possíveis efeitos nocivos causados por antioxidantes sintéticos (JUNTACHOTE et al., 2006). Riscos em potencial para a saúde humana pelo desconhecido uso de antioxidantes sintéticos tem provocado o interesse na busca de antioxidantes naturais

Este estudo teve como objetivo realizar uma análise quantitativa da atividade antioxidante bem como avaliar o perfil de cito toxicidade em células HepG2 e Hemácias, bem como verificar o conteúdo de fenóis totais e de flavonóides em extratos metanólicos de folhas de três plantas do ecossistema Caatinga localizado no estado de Pernambuco, Brasil

## **7. Metodologia**

### **7.1 Coleta, Processamento e Obtenção dos Extratos Vegetais**

Folhas do *T.Cyrthanthum*, *A.Couchiliacarpus* e *S.pulcherrimum* foram coletadas no Parque do Catimbau, em Buíque Pernambuco. O material foi levado à estufa de circulação de ar forçado (40-45 C) por um período de três a quatro dias. O material vegetal foi processado em moinho de bancada seguindo extração à frio em mesa agita-dora, seguindo a ordem eluotrópica dos solventes: Ciclohexano, Clorofórmio, acetato de etila e metanol. As amostras foram rotaevaporadas e deixadas em temperatura ambiente para secagem completa do solvente. Das frações obtidas foi utilizada somente a metanólica para o presente estudo.

### **7.2 Sequestro de radicais livres (SRL) pelo método do DPPH**

Neste ensaio a atividade sequestradora de radical livre do extrato, foi medida em termos de doação de hidrogênio usando o radical estável 2,2-difenil1-picrilhidrazil (DPPH·) (BLOIS, 1958). Foi misturado 250 µL da solução de DPPH· (1 mM) em 40 µL de diferentes concentrações do extrato metanólico (3,90; 7,81; 15,625; 31,25; 62,5; 125; 500 µg/mL). Após 25 minutos foi medida a absorbância em 517 nm. Ácido gálico e BHT foram usados como composto de referência e o controle negativo foi o DPPH adicionado a 40 µL de metanol (solvente utilizado para diluir as amostras). A eliminação de radicais de DPPH· foi calculada pela fórmula:

$$\text{Eliminação [DPPH·] (\%)} = x \cdot 100$$

Onde: Abs = Absorbância.

### 7.3 Sequestro do Radical ABTS

A atividade de captura do radical ABTS<sup>•+</sup> foi determinada de acordo com (RE et al., 1999). O radical ABTS<sup>•+</sup> foi produzido pela reação entre uma solução de ABTS<sup>•+</sup> 14 mM e uma solução de persulfato de potássio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) a 4.9 mM, mantida à temperatura ambiente e protegida da luz por 16 h. Antes de ser usada, esta solução foi diluída com etanol para se obter uma absorbância a 734 nm de 0,700 0,020. Para a reação, foram misturados 1 mL da solução de ABTS<sup>•+</sup> e 10 µL do extrato vegetal (concentração 1 mg/mL). A mistura foi homogeneizada e incubada à temperatura ambiente por 6 min. Após a incubação, foram mensuradas as absorbâncias das amostras a 734 nm. A partir das leituras das absorbâncias, foi calculada a porcentagem de inibição do ABTS<sup>•+</sup>, através da fórmula:

$$\% \text{ Redução de ABTS}^{\bullet+} = [(A_c - A_s) / A_c] \times 100$$

Onde A<sub>c</sub> representa a absorbância do controle e A<sub>s</sub> a absorbância das amostras.

### 7.4 Atividade antioxidante total

Os extratos foram diluídos para concentração de 1 mg/mL em metanol. Em seguida, 0,1 mL de cada amostra foi misturada a 1 mL da solução de fosfomolibdênio (ácido sulfúrico 600 mM, fosfato de sódio 28 mM e molibdato de amônio 4 mM) e posteriormente incubados a 95°C por 90 min. As absorbâncias das amostras foram medidas a 695 nm contra um branco (1 mL de solução de fosfomolibdênio e 0,1 mL do metanol) (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999). A atividade antioxidante total foi expressa em relação ao ácido ascórbico(100%), calculada pela fórmula abaixo e comparada com a atividade do BHT (hidroxitolueno butilado) e Ácido Gálico.

### 7.5 Poder redutor

A avaliação do poder de redução dos extratos foi realizada de acordo com a metodologia citada por (YEH; YEN, 1995) com modificações. As amostras dos extratos foram diluídas nas concentrações: 0,1; 0,250; 0,5 mg/mL. Transferiu-se 50 µL da amostra para um tubo e em seguida, foram adicionados: 125 µL de tampão fosfato 0,2 M (pH 6,6) e 125 µL de K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] a 1% (p/v). A mistura foi incubada a 45 °C por 20 min. Foram adicionados 125 µL de ácido tricloroacético a 10% (p/v) à solução, com posterior agitação. Um volume de 125 µL da mistura foi transferido para outro tubo de ensaio, no qual foram adicionados 125 µL de água destilada e 25 µL de FeCl<sub>3</sub> a 0,1% (p/v), sob agitação. A leitura da absorbância foi realizada a 700 nm. A

intensidade na coloração é proporcional ao poder redutor da amostra. As leituras foram realizadas em triplicata e neste teste utilizou-se como 100% de atividade a absorbância do padrão BHT nas concentrações referidas para as amostras (0,1; 0,5; 1,0 e 5,0 mg/mL<sup>1</sup>).

## 7.6 FRAP

Esse método o complexo férrico-tripiridiltiazina ( $\text{Fe}^{\text{III}}$  -TPTZ) é reduzido ao complexo ferroso ( $\text{Fe}^{\text{II}}$  -TPTZ), na presença de um antioxidante em condições ácidas (BENZIE; STRAIN, 1996). Inicialmente, 20  $\mu\text{L}$  do extrato foi misturado com 180  $\mu\text{L}$  do reagente de trabalho do FRAP (25 mL de tampão acetato 0,3 M, 2,5 mL de uma solução de TPTZ 10 mM e 2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mM), incubado a 37°C durante 40 minutos e posteriormente feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 593 nm. O sulfato ferroso é utilizado para fazer uma curva de calibração (concentrações entre 0 e 100 g/mL) onde Y é a absorbância e X a concentração do sulfato ferroso e os resultados são expressos em mg equivalentes de  $\text{FeSO}_4$ /g de extrato.

## 7.7 Atividade citotóxica

A atividade citotóxica dos compostos foi avaliada contra linhagens HeLa através do método do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MOS-MANN, 1983; ALLEY et al., 1988). Foi utilizado nos ensaios o meio de cultura DMEM foi suplementado com 10 % de soro fetal bovino, 1 % de solução de antibiótico (penicilina 1000 UI/mL + estreptomicina 250 mg/mL) e 1% de L-glutamina (200 M). As células foram cultivadas em placas de 96 poços na concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL e incubadas em estufa a 37°C em atmosfera úmida enriquecida com 5 % de  $\text{CO}_2$ , durante 24 h. Em seguida, os compostos foram dissolvidos em DMSO 0,5 % (v/v) para se obter soluções-estoque de 10 mg/mL (extrato) ou 5 mg/mL (composto puro), adicionados aos poços e submetidos a diluições seriadas para se obter as faixas de concentração 0,39–50 g/mL para os extratos orgânicos e 0,195–25 g/mL para os compostos puros. O fármaco doxorubicina (0,009–5 g/mL) foi utilizado como controle positivo e DMSO (0,5 mg/mL) como controle negativo. Após 72 h de incubação foram adicionados em cada poço 25  $\mu\text{L}$  de MTT (5 mg/mL) e após 3 h o meio de cultura com o MTT foi aspirado e 100  $\mu\text{L}$  de DMSO foram adicionados a cada poço para a dissolução dos cristais de formazan. A absorbância dos compostos foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 560 nm.

O percentual de inibição do crescimento celular foi determinado considerando a média da absorbância controle negativo como 100% de proliferação celular. Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas: amostras sem atividade (inibição variando de 1 a 50%), com pouca atividade (inibição variando de 50 a 70%), com moderada atividade (inibição variando de 70 a 90%) e com elevada atividade (inibição variando de 90 a 100%) (RODRIGUES et al., 2014). A concentração que inibe 50% do crescimento celular ( $IC_{50}$ ) foi calculada se amostras promovessem uma inibição maior que 70%, a partir de regressão logarítmica, utilizando o programa GraphPad Prism 5.0.

### **7.8 Atividade hemolítica**

O sangue foi obtido através de auto-coleta dos pesquisadores. O sangue total foi centrifugado (1,500 rpm, 10 min at 4°C) e foi feita a lavagem dos eritrócitos três vezes em PBS pH 7.4. O tubo para o teste recebeu 1.1 mL de uma suspensão de eritrócitos (1%) e 0.4 mL de várias concentrações dos extratos (0.05–0.5 mg/mL) diluídos em DMSO a 20%. Um controle negativo somente com solvente (DMSO 20%) e um positivo com Triton-X(Sigma-Aldrich) (0.1%, p/v) foram realizados. Depois de 60 min de incubação as células foram centrifugadas e o sobrenadante foi retirado e medida a absorbância a 540 nm. A atividade hemolítica foi expressa pela fórmula: Hemólise (%) =  $[(As - Ab) / (Ac - Ab)] \times 100$ , onde, Ab = absorbância no controle negativo, As = absorbância do teste; Ac = absorbância do controle positivo.

### **7.9 Análise fitoquímica**

Os extratos foram avaliados quanto à composição fitoquímica por análise em tubo, Foram pesquisados os seguintes metabolitos: fenóis, taninos, antocianidinas, an-tocianinas, flavonóides, leucoantocianidinas, catequinas, flavonas, flavonóis, flavanonas, flavanóis, xantonas, saponinas, quinonas, esteróides e triterpenóides (MARCO et al., 2007).

### **7.10 Dosagem de fenóis totais**

O conteúdo fenólico total foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu segundo (LI et al., 2008) com algumas modificações. Em cada tubo foi adicionado 1 mL do reagente de Folin diluído 1:10 (v/v) e 0,2 mL da amostra diluída na concentração 1 mg/mL em metanol. Após 3 minutos no escuro, 0,8 mL de carbonato de sódio a 7,5% (p/v) foi adicionado, deixando por mais 120 min no escuro a 25°C. Após esse período

as absorbâncias a 765 nm foram lidas contra um branco (reagentes adicionado ao metanol ao invés da amostra) Uma curva de calibração de ácido gálico (concentrações entre 0 e 100 g/mL ) foi preparada através da representação gráfica da absorbância em função da concentração onde Y é a absorbância e X a concentração dos compostos diante disso foi encontrada a equação linear ( $Y = 0.0121x + 0.032$ ,  $R^2 = 0.9967$ ). A concentração de fenol total na amostra foi determinada a partir da curva de calibração. O teor total de fenol no extrato foi expresso em termos de equivalente de ácido gálico (mg EAG / g de extrato).

### 7.11 Dosagem de flavonoides

A técnica colorimétrica com cloreto de alumínio descrita por (WOISKY; SALATINO, 1998) foi utilizada para estimativa de flavonóides, com algumas modificações. foram dissolvidas em metanol. Em cada tubo foi adicionado 0,5 mL cloreto de alumínio (2 g diluído em 100mL de etano) e em seguida foi adicionado 0,5 mL da amostra. A mistura foi mantida em temperatura ambiente durante 60 min. A absorbância a 420 nm foi então lida. Foi então preparada curva de calibração com diferentes concentrações de quercetina, onde Y é a absorbância e X a concentração de quercetina foi preparada através da representação gráfica da absorbância em função da concentração e foi encontrada a equação linear ( $y = 0.0486x + 0.0417$ ,  $R^2 = 0,997$ ). A concentração de flavonóides foi determinada a partir da curva de calibração. O teor de flavonóides total no extrato foi expresso como equivalentes de quercetina (mg QE / mg de extrato), os extratos foram avaliados na concentração de 1 mg para todos os extratos.

### 7.12 HPLC

A identificação dos compostos fenólicos nas amostras foi determinado através de Cromatografia Líquida de Alta Performance (Agilen 1260 infinity) usando a coluna Zorbax SB (C18), 4,6 x 250 mm, 5  $\mu$ m, com temperatura de 30 °C. A separação cromatográfica foi realizada usando a fase móvel de gradiente: A (água acidificada) e B (acetona), 0-15 min = 92% de A e 8% de B, 16-30 min = 65% de A e 35% de B, com fluxo de 2,4 mL/min, usando detector UV à 280 nm, em um volume de injeção de 5  $\mu$ L. Para preparação das curvas padrões as diluições (0,1 – 100  $\mu$ g/mL) foi preparada dissolvendo os compostos padrões puros (Sigma Aldrich): Ácido caféico, Ácido clorogênico, Ácido gálico, Ácido elágico, Ácido trans-ferúlico, Catequina, Quercitina

e Rutina. A identificação de cada composto foi estabelecida por tempo de retenção e comparando o espectro UV dos picos obtidos com os previamente obtidos pela injeção dos padrões puros.

### 7.13 Análise Estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, e os resultados foram expressos em média e desvio padrão. As análises estatísticas, as concentrações que inibem 50% de atividade ( $CI_{50}$ ) e os gráficos foram executados pelo programa GraphPad PRISMA 5.0.

## 8. Resultados e Discussão

### 8.1 Avaliação da atividade antioxidante

Neste estudo, foram utilizados diversos métodos para avaliação da atividade antioxidante. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 1 e os valores de  $IC_{50}$  estão na Tabela 1. O extrato que apresentou melhor atividade foi o da *S. pulcherrimum*, seguido do extrato da *A. cochiliacarpos* e da *T. cyrthathum*. O método de DPPH, se baseia na capacidade de componentes dos extratos de transferir hidrogênio para o DPPH, um radical livre, lipofílico e estável, ocasionando a mudança da coloração da solução de púrpura para amarelo. A atividade antioxidante de todos os extratos estudados foi mais eficaz do que as apresentadas pelos padrões utilizados (ácido gálico e BHT) no método de DPPH.

O método inibição do ABTS tem habilidade de avaliar a atividade de compostos hidrofílicos e lipofílicos, enquanto o DPPH só pode verificar compostos dissolvidos em meio orgânico (Kukoski et al 2005). No ABTS ocorre um decaimento da absorvância a 734 nm quando o radical é reduzido por algum composto antioxidante capaz de doar elétrons ou átomos (CHRISTODOULEAS et al., 2014). Os resultados obtidos neste ensaio não apresentaram uma diferença grande entre os extratos, se aproximando das leituras do padrão BHT e Trolox (Figura 2). As porcentagens máximas de inibição do radical ABTS foram observadas na concentração de 1000  $\mu\text{g/mL}$ , na seguinte ordem: *A. cochiliacarpos* < *T. cyrtathum* < *S. pulcherrimum*.

A capacidade antioxidante total (CAT) é um ensaio que fundamenta-se na redução do complexo de molibdênio pela ação de uma substância antioxidante, gerando ao fim um fosfato com coloração verde com um máximo de absorção a 695

nm (FLOEGEL et al., 2011). A maior CAT (%) foi exibida pelo extrato de *S. pulcherrimum* (24,38%±2,75), seguida do extrato de *A. cochiliacarpus* (22,56%±1,46), e o extrato de *T. cyrtathum* (11,50%±1,60). Esses resultados são superiores aos padrões utilizados que foram o BHT (8,75%±2,33) e o ácido gálico (5,49%±0,98).

O método FRAP mede a capacidade de redução do complexo formado entre 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) e cloreto férrico hexa-hidrato ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), quando na presença de algum composto antioxidante, havendo um aumento na absorbância devido à formação de íons ferrosos (OU et al., 2002). Os resultados obtidos no ensaio indicaram atividade dos três extratos, com significativa diferença entre a atividade deles. Todos os extratos estudados tiveram atividade muito superior quando comparados com o controle BHT. Neste ensaio, destaca-se o extrato de *S. pulcherrimum* o qual obteve valores mais de 2 vezes o equivalente em sulfato ferroso, em comparação com os resultados obtidos para o BHT.

O poder redutor é descrito como um potente método de análise da atividade antioxidante (CHANDA; DAVE, 2009) sendo um ensaio de oxirredução. Neste ensaio, os compostos com atividade antioxidante convertem o íon férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) para ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ), o que é verificado pelo aumento da absorbância a 700 nm (JAYANTHI; LALITHA, 2011). Os resultados estão apresentados na Figura 3. O maior poder redutor, na concentração de 500 µg/mL, foi obtido no extrato de *S. pulcherrimum* ( $\text{OD}_{700}=1,4 \pm 0,008$ ), seguido pelo extrato de *A. cochiliacarpus* ( $\text{OD}_{700}=1,1 \pm 0,015$ ) e extrato de *T. cyrtathum* ( $\text{OD}_{700}=0,890 \pm 0,017$ ). O extrato da *S. pulcherrimum* apresentou um poder redutor muito próximo do obtido com o padrão utilizado, a quercetina ( $\text{OD}_{700}=1,5 \pm 0,014$ ).

A atividade antioxidante obtida nos extratos metanólicos das três plantas utilizadas comprovam a atividade antioxidante de espécies de plantas da caatinga, onde a extração por solvente metanol foi capaz de extrair antioxidantes, os quais demonstraram atividade antioxidante maiores que antioxidantes sintéticos conhecidos no mercado como BHT.

## 8.2 Avaliação da ação citotóxica e hemolítica

O ensaio de MTT foi utilizado para avaliar a ação sobre o crescimento de células de hepatocarcinoma HepG2. Hepatocarcinoma é o principal tipo de câncer de

fígado e as células HepG2 conseguem manter várias propriedades hepáticas, por isso, representam um excelente modelo celular para estudar a ação dos produtos naturais *in vitro* sobre as funções do fígado, como processos de detoxificação enzimática e metabolização de compostos (SADI et al., 2015).

A Figura 4 mostra o efeito dos extratos em três concentrações sobre a viabilidade das células de carcinoma após 24h. A inibição promovida pelos extratos sobre a proliferação celular foi significativamente mais baixa que o controle doxorrobicina após 24 h, bem como indicam que os extratos não apresentaram atividade citotóxica relevante pois nenhum dos extratos teve atividade melhor que 50% (SUFFNESS; PEZZUTO, 1990).

Os ensaios para determinar a capacidade hemolítica sobre eritrócitos humanos mostraram que nas concentrações de 125 a 500µg/mL os três diferentes extratos causaram porcentagem de hemólise abaixo de 5% (Figura 5). Os resultados mostram claramente que os extratos não causam alto grau de hemólise nas concentrações estudadas para atividade antioxidante. Na busca por novas substâncias que tem promissora atividade farmacológica e que não causem efeitos nocivos para o corpo, ensaios investigando a capacidade dos produtos naturais de causar ação hemolítica, dissolvendo ou aumentando a permeabilidade da membrana celular dos eritrócitos, são amplamente usados (ARAÚJO et al., 2013).

### **8.3 Conteúdo fenóis totais e flavonóides totais**

No estudo, o conteúdo de fenóis totais dos extratos metanólicos das três plantas foram determinados pelo método de Folin-Ciocalteu e os resultados foram expressos como ácido gálico equivalentes por grama de extrato (EAG). O extrato de *S. pulcherrimum* teve o maior conteúdo de fenois totais (112.72± 10,28 mg EAG / g extrato), seguido pelo extrato de *A. cochliacarpos* (110.73± 13.23 mg EAG / g extrato) e *T. cyrthathum* (97.13±9.76 mg EAG / g extrato).

Compostos fenólicos são utilizados pelas plantas nos mecanismos de defesa contra herbivoria ou para atração para polinizadores, proteção UVA, defesa antimicrobi-ana, cicatrização (NACZK; SHAHIDI, 2006; ANITHA; KANIMOZHI, 2012; HARBONE; WILLIAMS, 2000; TAIZ; ZEIGER, 2006). Os compostos fenólicos são conhecidos como componentes altamente efetivos antioxidantes e sequestradores de radicais livres, seus mecanismos de ação incluem: impedimento da oxidação de íons

metálicos, eliminação de qualquer intermédio que possa causar oxidação (incluindo ROS), e inativação de enzimas pró-oxidantes (NACZK; SHAHIDI, 2006). Devido a evidências consideráveis, o aumento do dano oxidativo está associado com o desenvolvimento da maior parte das principais doenças degenerativas relacionadas com o envelhecimento e tem-se especulado que os polifenóis podem ter efeitos protetores contra tais condições (TA-BART et al., 2009). Entretanto, devido a diversidade estrutural e mecanismos de reação, único ensaio antioxidante para compostos fenólicos não reflete com precisão todos os antioxidantes em um sistema misto ou complexo. Assim, o uso de ensaios antioxidantes diferentes pode ajudar a identificar variações na resposta dos extratos de plantas (TABART et al., 2009; DENARDIN et al., 2015).

O método colorimétrico do cloreto de alumínio foi utilizado para determinação do conteúdo de flavonóides totais, que se baseia na reação do cloreto de alumínio com grupos hidroxil ou ceto adjacentes das flavonas ou flavonois, gerando complexos ácido-estáveis, que tem uma absorção máxima em 415 nm (DENARDIN et al., 2015). A maior quantidade de flavonóides foi verificada no extrato de *S. pulcherrimum* (28.96 1.42 mg EQ / g extrato), seguido do extrato de *T. cyrthanthum* (25.35 1.77 mg EQ / g extrato) e do *A. cochliacarpus* (23.54 1.22 mg EQ / g extrato).

Entre os polifenóis a subclasse mais estudada é a dos flavonoides (Gurib et al 2014). O ensaio comprovou a presença desses compostos entre os principais constituintes de *A. couchiliacarpus* (SILVA et al., 2010c) descrevam que espécies do gênero *Styphnodendron* são conhecidas pelo seu alto teor de taninos. O *T. cyrthanthum* não detém de muitos estudos na literatura, porém também apresentou elevado teor de flavonoides, podendo estar diretamente relacionado com sua atividade antioxidante.

Biossíntese e acumulação de fenóis em plantas é considerada como resposta evolutiva das vias bioquímicas por influências adaptativas a fatores ambientais desfavoráveis, como exposição a luz e agem como filtro contra radiação UV (SOUZA et al., 2007a), pluviosidade, temperatura e salinidade. Esses aspectos tornam a região semi-árida da caatinga um ambiente favorável para a pesquisa de plantas com potencial antioxidante (SOUZA et al., 2007a).

#### 8.4 Screening Fitoquímico e Análise HPLC dos principais componentes fenólicos dos extratos das três plantas

A análise fitoquímica dos extratos metanólicos indicou a presença de uma variedade de metabólitos secundários ativos, como saponinas, glicosídeos cardiotônicos, terpenóides e taninos, nos três extratos testados como mostrado na tabela 3, entretanto o grupo dos alcalóides não foi detectado em nenhum dos extratos. A presença de antraquinona foi encontrada apenas no extrato de *T. cyrthathum*.

A quantificação de determinados compostos fenólicos a partir do perfil cromatográfico foi obtido por HPLC. Os principais componentes identificados no extrato de *A. cochliacarpus* foram ácido gálico (32.6µg/mg -  $T_r$  1.81 min), rutina (13.6µg/mg -  $T_r$  8.20 min), catequina (12.8 µg/mg c 4.45 min), ácido trans-ferúlico (15 µg/mg -  $T_r$  8.36 min) e quercetina (36 µg/mg -  $T_r$  13.79 min). No extrato de *S. pulcherrimum*, os maiores componentes foram catequina (3.4 µg/mg -  $T_r$  4.45 min), ácido caféico (70 µg/mg -  $T_r$  5.44 min), rutina (0.7 µg/mg -  $T_r$  8.20 min), ácido elágico (10 µg/mg -  $T_r$  8.42 min) e quercetina (36 µg/mg -  $T_r$  13.79 min). A partir do perfil cromatográfico do extrato de *T. cyrthathum*, identificou-se apenas a presença de rutina (8 µg/mg -  $T_r$  8.20 min).

O perfil preciso de constituintes ativos de espécies do gênero *Styphnodendrum* ainda não é totalmente conhecido. A prospecção fitoquímica qualitativa de *S. rotundifolium* foi realizada, detectando a presença de taninos pirogálico, flavonas, flavonóis, flavonóis, xantonas, chalconas, flavonóis e esteróides como metabólitos secundários em espécie (OLIVEIRA et al., 2011).

No entanto, taninos e flavonóides podem ser considerados dentre as substâncias mais importantes, devido ao ser diretamente ligado a atividades antioxidantes (OLIVEIRA et al., 2011). A análise por HPLC do extrato hidroalcoólico de *S. rotundifolium* revelou a presença de flavonóides (rutina e campferol), ácidos fenólicos (ácido caféico) e catequina (VANDESMET et al., 2015). Da mesma forma, nossos resultados do perfil HPLC de *S. pulcherrimum* foram consistentes com os resultados dos pesquisadores acima, indicando que a presença destes fitoquímicos são comuns no gênero *Styphnodendrum*.

Taninos são metabólicos secundários descritos por estarem envolvidos em diversas atividades biológicas, como anti-câncer (JASSIM; NAJI, 2003; GURIB-FAKIM, 2006; NEUKAM; PASTOR; CORTÉS, 2008) e atividades antioxidantes (CARVALHO,

2006). Todos os extratos apresentaram taninos na sua composição, sugerindo, portanto, um indício da origem da atividade antioxidante observada. Outras espécies do gênero *Styphnodendrum* apresentaram atividade antioxidante associada a taninos, corroborando os dados encontrados (LOPES et al., 2009).

Estudos fitoquímicos prévios realizados com extratos aquosos e metanólicos da casca e caule de *A. cochliacarpus* revelaram a presença de saponinas, catequinas, taninos, fenóis e antraquinonas, porém alcalóides e esteróides/triterpenóides estavam ausentes (SILVA et al., 2009) (SILVA et al., 2010c) evidenciou o alto conteúdo de taninos condensados com catequinas como componentes majoritários nos extratos de extratos metanólicos da casca de *A. cochliacarpus*

Foi observada também a presença de ácido gálico em dois dos extratos analisados. Estudos mostram que dentre todos os ácidos hidrobenczoicos presentes nos produtos naturais, o ácido gálico é o que apresenta maior efetividade na inativação de radicais livres, como ABTS (YEH; YEN, 2003). A presença do ácido t-ferúlico nos os extratos também pode estar relacionada com a atividade antioxidante presente nos extratos testados. Estudos relatam que até mesmo em concentrações muito baixas o ácido ferúlico age como sequestrante de radicais livres (HSIEH; YEN; CHEN, 2005).

As catequinas são abundantes nas cascas das espécies da subfamília Mimosaceae (Santos et al., 2002). Catequinas possuem atividade antioxidante pela eliminação de radicais livres, inibindo fatores de transcrição ativos redox, inibindo enzimas pró-oxidantes, e induzindo enzimas antioxidantes, por isso podem exercer efeitos protetores vasculares através de vários mecanismos, incluindo anti-inflamatório, anti-hipertensivos, anti-trombogênico, e controle lipêmico (KURITA-OCHIAI et al., 2015).

Quercetina e rutina são flavonoides presentes em plantas e alimentos com potencial antioxidante por bloquear a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e proteger contra peroxidação lipídica. Além disso, vários estudos têm investigado suas ações em vias bioquímicas para proteger contra citotoxicidade (COSTA et al., 2016). Também revelaram a presença de ácido caféico e ácido elágico, que fazem parte do grupo dos ácidos fenólicos e exibem uma forte atividade antioxidante in vitro (BOGUCKA-KOCKA et al., 2016).

Desta forma é possível sugerir a associação da atividade antioxidante com os compostos identificados por análise do HPLC. As atividades antioxidantes vistas nos extratos estão ligadas aos metabolitos secundários que podem estar presentes majoritariamente como ocorreu nos extratos SP e AC ou até mesmo um sinergismo entre a mistura de compostos minoritários como o que ocorre no extrato TC.

## **9. CONCLUSÕES**

Resultados obtidos mostraram que os extratos apresentaram potencial atividade antioxidante, equiparando-se aos padrões sintéticos ou em alguns testes os superando, podendo ser consideradas como promissoras fontes de antioxidantes. Portanto, faz-se necessárias investigações aprofundadas que visem identificar compostos purificados de cada extrato para analisar qual ou quais são responsáveis por esta bioatividade. Nossos resultados dão suporte para comprovação científica e utilização medicinal das plantas da caatinga, ajudando para a viabilidade e padronização de um produto biotecnológico a ser aplicado nas indústrias de cosméticos, farmacêutica e alimentos.

## Referências

- Almeida MMB, de Sousa PHM, Arriaga ÂMC, do Prado GM, Magalhães CEDC, Maia GA, et al. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Res Int.* 2011;44:2155–9.
- Alley M.C., Scudiero D.A., Monks A., Hursey M.L., Czerwinski M.J., Fine D.L., Abbott B.J., Mayo J.G., Shoemaker R.H., Boyd M.R., 1988. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Research*, vol 48, pp. 589- 601.
- Anitha, R.; Kanimozhi, S., 2012. Pharmacognostic Evaluation of *Alternanthera Sessilis* (L.) R.Br.ex.DC. *Phcog J* , v. 4, p. 31-34.
- Araújo L.C.C, Aguiar J.S, Napoleão T.H, Mota F.V.B, Barros A.L.S., 2013. Evaluation of Cytotoxic and Anti-Inflammatory Activities of Extracts and Lectins from *Moringa oleifera* Seeds. *PLoS ONE* 8(12): e81973. doi:10.1371/journal.pone.0081973).
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição*, v. 23, n. 4, Jul/Ago 2010.
- Barreiros ALBS, David JM, David JP. Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. *Química Nova.* 2006;29:113-23.
- Benzie IFF, Strain JJ., 1996 The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Anal Bioch.* Volume 239, Issue 1, 15 July 1996, Pages 70–76
- BLOIS, M. S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, v. 181, p. 1199 – 1200, 1958.
- Bogucka-Kocka A. , Zidorn C., Kasprzycka M., Szymczak G., Szewczyk K., 2016. Phenolic acid content, antioxidant and cytotoxic activities of four *Kalanchoe* species. *Saudi J Biol Sci*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.01.037>
- CARVALHO J.E., 2006. Atividade Antiulcerogênica e Anticâncer de Produtos Naturais e de Síntese. *Construindo a História dos Produtos Naturais*, v 7, p 1-18.
- Chanda S, Dave R., 2009. In vitro models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: An overview. *Afr. J. Microbiol. Res.* 3(13):981-996.
- Christodouleas D.C , Fotakis C., Nikokavoura A., Papadopoulos K, Calokerinos A.C., 2014. Modified DPPH and ABTS Assays to Assess the Antioxidant Profile of Untreated Oils. *Food Anal Method*, p. 1-9.
- Costa, S.L , Silva, V.D.A, Souza, C.S, Santos, C.C, Paris, I, Muñoz, P., 2016. Segura-Aguilar, J. Impact of Plant-Derived Flavonoids on Neurodegenerative Diseases. *Neurotox Res.*
- Denardin C.C. , Hirsch G.E , Rocha R.F , Vizzotto, M, Henriques, A.T , Moreira J.C.F , Guma F.T.C.R , Emanuelli T., 2015. Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits, *J Food Drug Anal*, Volume 23, Issue 3, September , Pages 387-398

Ezhilarasan D, Sokal E, Karthikeyan S, Najimi M. Plant derived antioxidants and antifibrotic drugs: past, present and future. *Journal of Coastal Life Medicine*. 2014;2(9):738-45.

FAZOLIN M.,ESTRELA J.L.V ,CATANI V. ,ALÉCIO M.R, LIMA M.S.,2007. Atividade inseticida do óleo essencial de *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum (Bignoneaceae) sobre *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). *Acta Amaz.* [online]. vol.37, n.4

Floegela A., Kimb D, Chung S., Kooa S.I, Chuna O.K., 2011. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure Antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J Food Compo Anal.*24:1043–8.

GURIB-FAKIM, A.,2006. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med*, v 27, p 1-93.

HARBORNE, B. J.; WILLIAMS, A. C. Advances in flavonoids research since 1992. *Phytochemistry*. v. 55, p. 481-504, 2000

Hsieh CL, Yen GC, Chen HY.,2005. Antioxidant activities of phenolic acids on ultraviolet radiation-induced erythrocyte and low density lipoprotein oxidation. *J Agr Food Chem*, v. 53, p. 6151-6155.

JUNTACHOTE, T. et al. The antioxidative properties of Holy basil and Galangal in cooked ground pork. v. 3, p. 446 – 456, 2007

JASSIM, S.A.A.; NAJI, M.A.,2003. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *J Appl Microbiol*, v 95, p 412–427

JAYANTHI AND P. LALITHA.,2011. REDUCING POWER OF THE SOLVENT EXTRACTS OF *EICHHORNIA CRASSIPES* (MART.) SOLMS. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*; Vol 3, Suppl 3.

Kurita-Ochiai, Tomoko, Jia, Ru, Cai, Yu, Yohei Yamaguchi and Masafumi Yamamoto.,2015. Periodontal Disease-Induced Atherosclerosis and Oxidative Stress. *Antioxidants* 4(3), 577-590; doi:[10.3390/antiox4030577](https://doi.org/10.3390/antiox4030577)

Lopes G.C ; Sanches A.C.C; Toledo C.E.M ; Isler, A.C ; Mello,J.C.P.,2009. Determinação quantitativa de taninos em três espécies de *Stryphnodendron* por cromatografia líquida de alta eficiência *Braz J Pharma Sci* vol. 45, n. 1, jan./mar.

MARCO, C.A.; INECO, R.; MATTOS, S. H.; BORGES, N.S.S.; NAGAO, E. O.,2007. Características do óleo essencial de capim-citronela em função de espaçamento, altura e época de corte. *Hort Bras*, v.25, p.429-32.

Mosmann, T.,1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, vol. 65, n. 1-2, pp. 55–63.

Nacz M, Shahidi F.,2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *J Pharma Biomed Anal.*41:1523–42

Ngo D-H, Wijesekara I, Vo T-S, Van Ta Q, Kim S-K. Marine food-derived functional ingredients as potential antioxidants in the food industry: An overview. *Food Research International*. 2011;44(2):523-9

Neukam K., Pastor,N. , Cortés, F.,2008. .Tea flavanols inhibit cell growth and DNA topoisomerase II activity and induce endoreduplication in cultured Chinese hamster cells. *Mutat Res*, v 654, p 8–12.

- Oliveira, D.R., Brito, F.E., Bento, E.B., Matias, E.F.F., Sousa, A.C.A., Costa, J.G.M., Coutinho, H.D.M., Kerntopf, M.R., Menezes, I.R.A., 2011. Antibacterial and modulatory effect of *Stryphnodendron rotundifolium*. *Pharm. Biol.* 49, 1265–1270.
- Ou B, Huang D, Hampsch-Woodill M, Flanagan J.A, Deemer E.K., 2002. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *J Agr Food Chem*, v. 50, n. 11, p. 3122-3128.
- Pietro P, Pineda M, Aguilar M., 1999. Spectrophotometric quantification of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal Bioch.* Volume 269, Issue 2, 1 May .Pages 337–341
- RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, v. 29, n. 4, Jul/Ago 2006.
- Rajendran P, Nandakumar N, Rengarajan T, Palaniswami R, Gnanadhas EN, Lakshminarasiah U, et al. Antioxidants and human diseases. *Clin Chim Acta.* 2014;436:332–47.
- RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 26, p. 1231 – 1237, 1999.
- Rodrigues F.A, Bomfim Ida S, Cavalcanti B.C, Pessoa C, Goncalves R.S, Wardell J.L, Wardell S.M, de Souza M.V., 2014. Mefloquine–Oxazolidine Derivatives: A New Class of Anticancer Agents. *Chem Biol & Drug Des*, vol. 83, pp. 126–131.
- Sadi G, Emsen B, Kaya A, Kocabaş A, Çınar S, Kartal Dİ., 2015. Cytotoxicity of some edible mushrooms extracts over liver hepatocellular carcinoma cells in conjunction with their antioxidant and antibacterial properties. *Pharmacogn Mag.* 11(Suppl 1):S6-S18
- Silva, N.C.B., Esquibel, M.A., Alves, I.M., Velozo, E.S., Almeida, M.Z., Santos, J.E.S., Campos-Buzzi, F., Meira, A.V., Cechinel-Filho, V., 2009. Antinociceptive effects of *Abarema cochliacarpus* (B.A. Gomes) Barneby & J.W. Grimes (Mimosaceae). *Braz J Pharma* 19, 46–50.
- Silva M.S, Sánchez-Fidalgo S, Talero E, Cárdeno A, da Silva M.A, Villegas W, Souza Brito A.R, de La Lastra C.A., 2010. Anti-inflammatory intestinal activity of *Abarema cochliacarpus* (Gomes) Barneby & Grimes in TNBS colitis model. *J Ethnopharmacol* 128 (2010) 467–475
- SILVA, L. A. F.; EURIDES, D.; PAULA, J. R.; LIMA, C. R. O.; MOURA, M. I., Caracterização dos metabólitos secundários do barbatimão. *Manual do Barbatimão*. Goiânia: Kelps, 2010. cap.7, p.61-68.B
- SILVA, M. L. C, Costa, R.S , Santana, A.S , Koblitz, M.G.B, . Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. *Ciências Agrárias, Londrina*, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010. C
- Souza, T.M., Severi, J.A., Silva, V.Y.A., Santos, E., Pietro, R.C.L., 2007. Bioprospection of antioxidant and antimicrobial activities in the bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae–Mimosoideae). *Rev Cienc Farm Basc Apli* 28, 221–226.
- Stratil P, Klejdus B, Kuban V., 2006. Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables – evaluation of spectrophotometric methods. *J Agric Food Chem* 54:607–616

Suffiness, M., Pezzuto, J., 1990. Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettmann, K. (Ed.), *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity*. Academic Press, London, pp. 71–133

Tabart J, Kevers C, Pincemail J, Defraigne J, Dommès J.,2009. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chem.*113:1226;1233.

Vandesmet V.C.S, Felipe C.F.B, Kerntopf M.R, Rolón M.,Vega C., Coronel C., Barbosa A.G.R, Coutinho H.D.M, Menezesa I.R.A.,2015. The use of herbs against neglected diseases: Evaluation of in vitro leishmanicidal and trypanocidal activity of *Stryphnodendron rotundifolium* Mart. *Saudi J Biol Sci* .<http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.03.001>

Woisky [RG](#) & Salatino [A](#). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control.,1998. *J Apic Res.* [Volume 37](#), [Issue 2](#), pages 99-105..

YEH, C. T.; YEN, G. C.,2003. Effects of phenolics acids on human phenolsulfotransferases in relation to their antioxidant activity. *J Agr Food Chem*, v. 51, p. 1474-1479.

Yen, G. C.; Chen, H. Y.; *J. Agric. Food Chem.* 1995, 67, 415

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 3. ed. [S.I.]: Artmed, 2006.

Figura 5 – Gráfico de sequestro de radical livre por método de DPPH

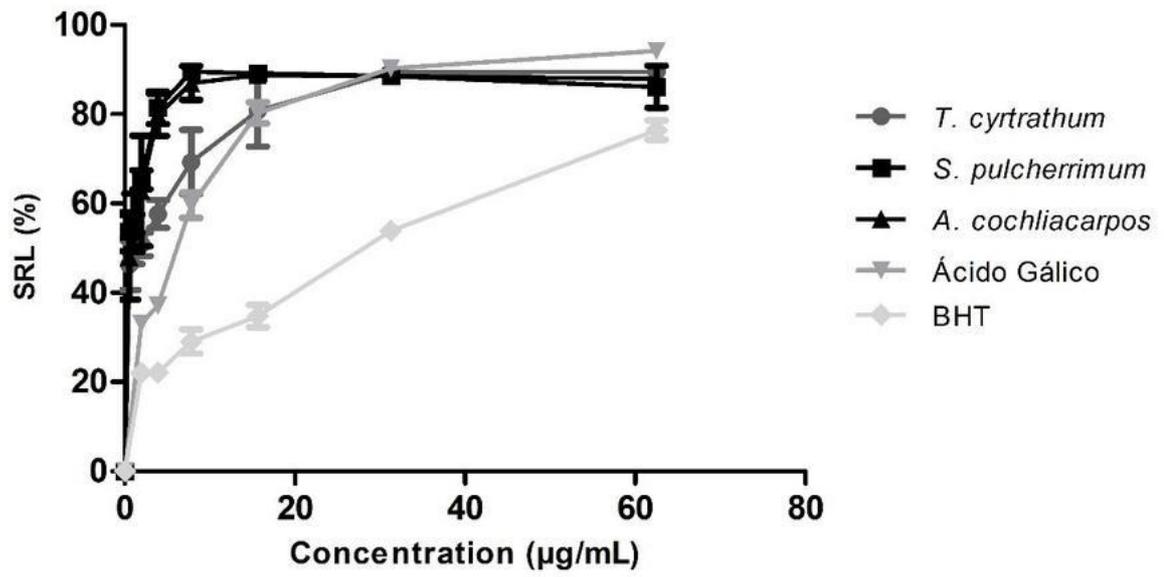


Figura 6 – Gráfico de redução do radical ABTS

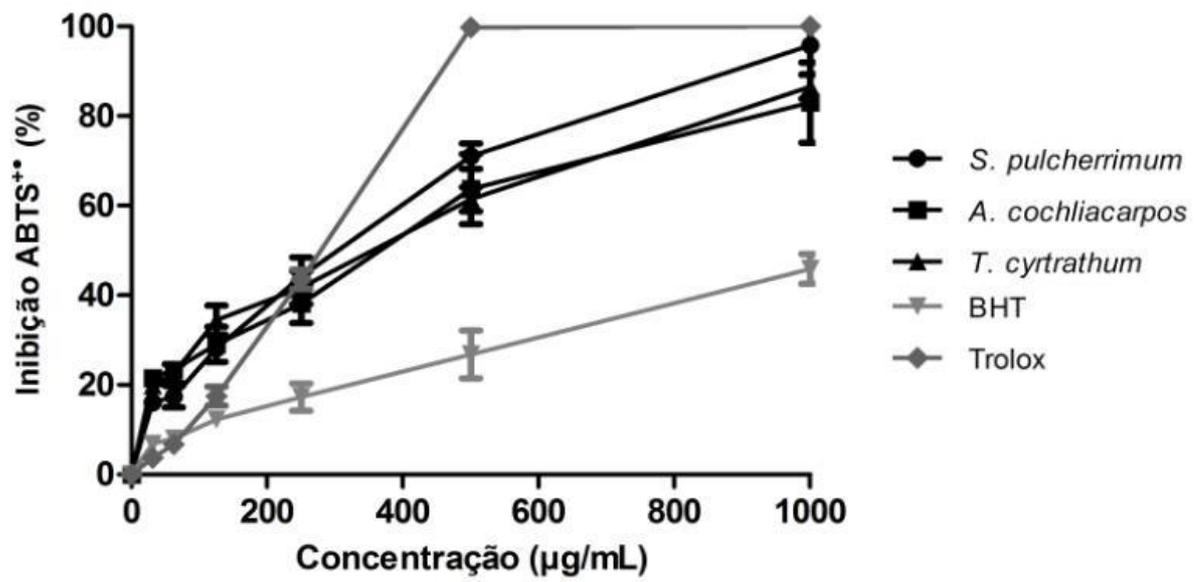


Figura 7 – Absorbâncias do teste de Poder Redutor

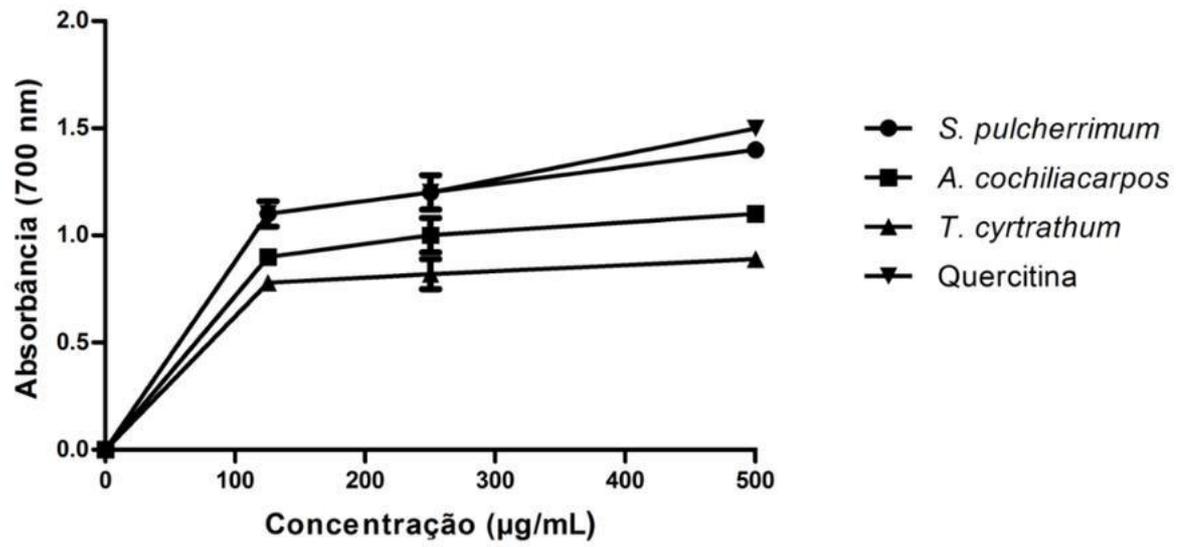


Figura 8 – Gráfico de Atividade Hemolítica

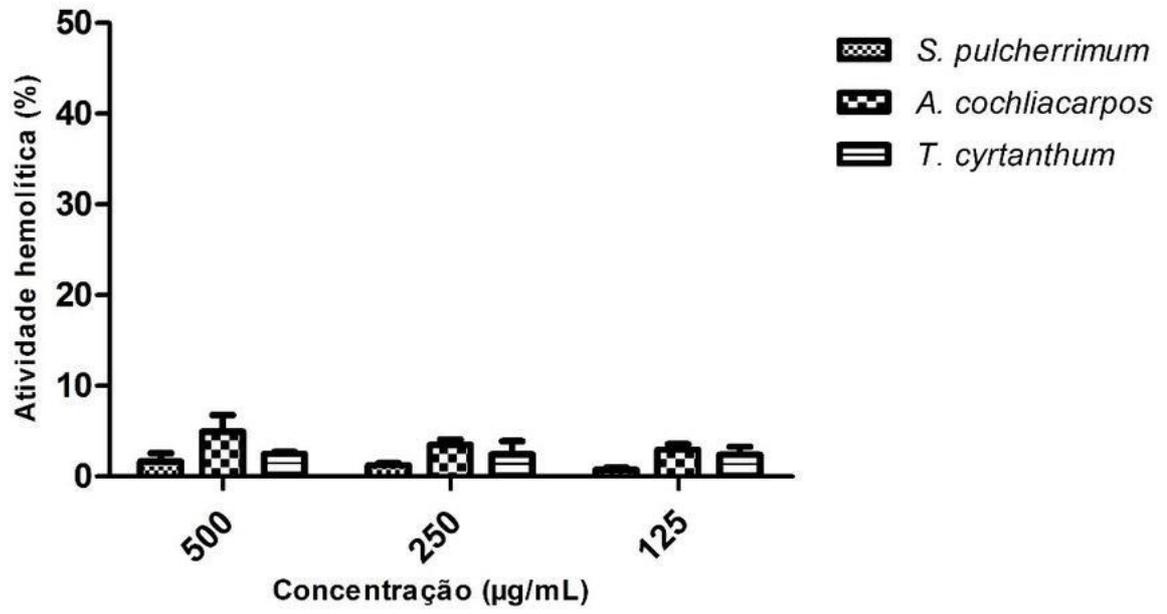
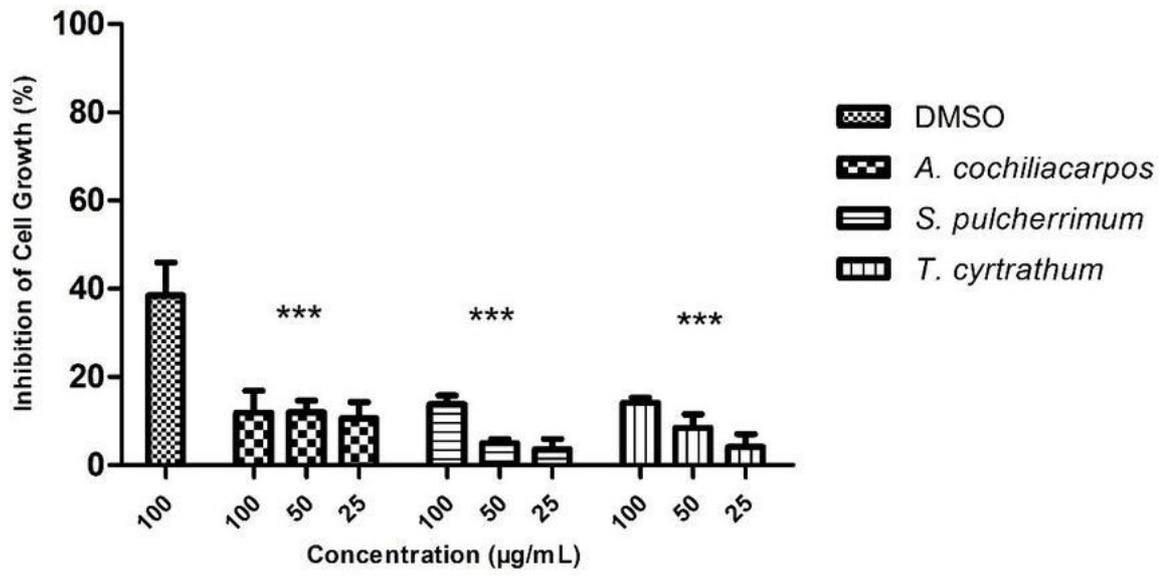


Figura 9 – Gráfico da Atividade Citotóxica por método de MTT



**Tabela 1 – Atividade antioxidante dos extratos metanólicos de *S. pulcherrimum*, *A. Cochiliacarpus* e *T. Cyrthathum* pelos métodos in vitro de DPPH , ABTS e FRAP.**

| Método                      | SP            | AC          | TC            | ÁCIDO GÁLICO      | BHT          |
|-----------------------------|---------------|-------------|---------------|-------------------|--------------|
| DPPH((IC50 - µg/mL)         | 0.457 ±0,03   | 0.596 0,04  | 1,162 ± 0,07  | 8,654 ± 7,90      | 35,04 ± 2,2  |
| ABTS (IC50 - µg/mL)         | 244.2 ±2.2    | 281,1 3,5   | 258,1 ±5,60   | 250 ±7,2 (Trolox) | 1366 ± 89,0  |
| FRAP (mg EFeSO4 / g extrato | 850,89 ± 17.4 | 489,87±20,1 | 477,78 ± 19,2 | –                 | 329,8 ± 49,1 |

Resultados apresentados em média e desvio padrão. SP - *S. pulcherrimum*, AC - *A. cochiliacarpus*, TC - *T. cyrthathum* e BHT – Butil-hidroxi-tuoleno

**Tabela 2 – Tabela com as absorvâncias dos extratos de S.pulcherrimum e A.cochliacarpos e T.Cyrthathum , para a avaliação de RP**

| Extratos/Concentrações | 500µg        | 250µg        | 125µg         |
|------------------------|--------------|--------------|---------------|
| S. Pulcherrimum        | 1.4 ± 0.020  | 1.1 ± 0.1    | 1.050 ± 0.038 |
| A. Couchiliacarpos     | 1.1 ± 0.034  | 1.0 ± 0.052  | 0.9 ± 0.054   |
| T. Cyrthathum          | 0.89 ± 0.022 | 0.820± 0.019 | 0.780 ± 0.039 |
| Quercitina(P)          | 1.5 ± 0.043  | 1.2 ± 0.06   | 1.1 ± 0.02    |

Resultados apresentados em média e desvio padrão. SP - S. pulcheferrium, AC - A. cochiliacarpos, TC - T. cyrthathum e Quercitina(P)

**Tabela 3 – Classes de metabólitos secundários avaliadas nos extratos vegetais**

| Metabolitos Secundarios | T. cyrthathum | S. pulcherrimum | A. cochiliacarpos |
|-------------------------|---------------|-----------------|-------------------|
| Alcaloids               | -             | -               | -                 |
| Saponina                | +             | +               | +                 |
| Glicose Cardiaca        | +             | +               | +                 |
| Terpenoide              | +             | +               | +                 |
| Pholabatannis           | +             | -               | +                 |
| Taninos                 | +             | +               | +                 |
| Antraquinonas           | +             | -               | -                 |

Resultados expressos em presença (+) e ausência (-) do metabólito.