UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

BIOPROSPECÇÃO DE COMPOSTOS NATURAIS DA CAATINGA CAPAZES DE AUMENTAR A LONGEVIDADE E A RESISTÊNCIA AO ESTRESSE EM *Tenebrio molitor*

TIAGO FONSECA SILVA

ORIENTADOR: Prof[a] Dr[a] Maria Tereza dos Santos Correia

CO-ORIENTADOR: Prof[o] Dr. Luís Cláudio Nascimento da Silva

Prof[a] Dr[a] Márcia Vanusa da Silva

RECIFE – PE

2017

TIAGO FONSECA SILVA

BIOPROSPECÇÃO DE COMPOSTOS NATURAIS DA CAATINGA CAPAZES DE AUMENTAR A LONGEVIDADE E A RESISTÊNCIA AO ESTRESSE EM *Tenebrio molitor*

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

ORIENTADOR: Prof[a] Dr[a] Maria Tereza dos Santos Correia

CO-ORIENTADOR: Prof[o] Dr. Luís Cláudio Nascimento da Silva

Prof[a] Dr[a] Márcia Vanusa da Silva

RECIFE – PE

2017

Catalogação na Fonte:
Bibliotecária Elaine Cristina Barroso, CRB-4/1728

Silva, Tiago Fonseca

Bioprospecção de compostos naturais da Caatinga capazes de aumentar a longevidade e a resistência ao estresse em *Tenebrio molitor* / / Tiago Fonseca Silva. – Recife: O Autor, 2017.

66 f.: il., fig, tab.

Orientadora: Maria Tereza dos Santos Correia
Coorientadores: Luís Cláudio Nascimento da Silva e Márcia Vanusa da Silva
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Bioquímica e Fisiologia, 2017.

Inclui referências, apêndices e anexos

1. Plantas medicinais 2. Caatinga 3. Antioxidantes I. Correia, Maria Tereza dos Santos (orient.) II.Silva, Luís Cláudio Nascimento da (coorient.) III. Silva, Márcia Vanusa da (coorient.) IV. Título

615.321 *CDD (22.ed.)* *UFPE/CCB-2017-306*

TIAGO FONSECA SILVA

BIOPROSPECÇÃO DE COMPOSTOS NATURAIS DA CAATINGA CAPAZES DE AUMENTAR A LONGEVIDADE E A RESISTÊNCIA AO ESTRESSE EM *Tenebrio molitor*

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: Data: 22 / 02 / 17

PROF[a] DR[a] MARIA TEREZA DOS SANTOS CORREIA

ORIENTADORA

PROF[°] DR[a] MARIA DAS GRAÇAS CARNEIRO DA CUNHA

Titular Interno 1

PROF[°] DR RAFAEL DE FREITAS E SILVA

Titular Externo 1

PROF[°] DR LUÍS CLÁUDIO NASCIMENTO DA SILVA

Titular Externo 2

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, sabemos que sem Ele nada podemos fazer.

Aos meus pais, Eliel e Vilma, meu irmão Leo, por estarem sempre presentes.

À minha esposa, Mariana Barreto Fonseca, pela paciência e incentivo em todo o processo.

À minha orientadora, Prof. Drª Maria Tereza dos Santos Correia e aos meus co-orientadores: Profº Dr. Luís Cláudio Nascimento da Silva e à Prof. Drª Márcia Vanusa da Silva, pela paciência em orientar e ajudar no desenvolvimento deste estudo.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco - FACEPE, pelo apoio financeiro do projeto.

Ao Departamento de Bioquímica – UFPE, em especial ao Profº Dr. Nicácio Henrique da Silva por permitir o desenvolvimento do meu projeto no Laboratório de Produtos Naturais.

Aos meus amigos do: Laboratório de Produtos Naturais e de Biologia Molecular. Em especial a Ana Paula, Paula Fernanda, Cibele Bessa e Juciara Tenório, pelos trabalhos desenvolvidos, pela força dada e pela ajuda nos experimentos, com orações, pensamentos positivos e palavras incentivadoras.

BIOPROSPECÇÃO DE COMPOSTOS NATURAIS DA CAATINGA CAPAZES DE AUMENTAR A LONGEVIDADE E A RESISTÊNCIA AO ESTRESSE EM *Tenebrio molitor*

RESUMO

Em condições fisiológicas normais há um equilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (EROS) e os antioxidantes. As EROS são agentes estressores que causam sérios danos celulares, com isso podem antecipar ou intensificar o envelhecimento das células. Assim, é importante a busca de novas fontes de moléculas antioxidantes. *Buchenavia tetraphylla* (Combretaceae) é uma espécie neotropical, sendo uma planta etnomedicinal utilizada por comunidades tradicionais da região Nordeste do Brasil. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de extratos orgânicos de folhas de *B. tetraphylla*. Para a obtenção dos extratos foram utilizados diferentes solvente orgânicos em série eluotrópica, gerando os extratos hexânico (CHX), clorofórmico (CLO), de acetato de etila (ACE) e metanólico (MeOH). A atividade antioxidante *in vitro* dos extratos foi investigada utilizando metodologias como os ensaios ABTS e DPPH. Os conteúdos de compostos fenólicos e flavonóides também foram determinados. Foi também analisado a ação hemolítica. Em todos os ensaios citados acima, o extrato metanólico apresentou o melhor resultado. Diante desse resultado foi realizado o fracionamento deste extrato (utilizando coluna de sephadex), onde foram obtidas 09 frações denominadas de A à I. Foram realizados nestas frações os mesmos ensaios citados acima onde observamos que os melhores resultados foram obtidos com as frações D e C. Posteriormente, foi analisado a capacidade protetora do extrato/frações *in vivo* contra o estresse oxidativo induzido por *Escherichia coli* em larvas de *Tenebrio molitor*. Neste ensaio, os melhores resultados foram observados para a fração D e o extrato, os quais foram capazes de aumentar significantemente a sobrevivência das larvas. Portanto, estes resultados estimulam novas pesquisas sobre aspectos farmacológicos e citotóxicos dos extratos e frações de *B. tetraphylla* a fim de apoiar a sua aplicação como agente antioxidante.

Palavra-chave: Caatinga. Produtos naturais. Combretaceae. atividades antioxidante. EROS.

BIOPROSPECTION OF CAATING NATURAL COMPOUNDS ABLE TO INCREASE LONGEVITY AND RESISTANCE TO STRESS IN *Tenebrio molitor*

ABSTRACT

Under normal physiological conditions there is a balance between reactive oxygen species (ROS) and antioxidants. ROS are stress agents that cause serious cellular damage, so they can anticipate or intensify the aging of cells. Thus, it is important the search for new sources of antioxidant molecules. *Buchenavia tetraphylla* (Combretaceae) is a neotropical species, which is an ethnomedicinal plant used by traditional communities of the Northeast region of Brazil. This study aimed to evaluate the *in vitro* and *in vivo* antioxidant activities of organic extracts of leaves of *B. tetraphylla.* In order to obtain the extracts, it was employed different organic solvents in an eluotropic series, generating the hexane extract (CHX), chloroform extract (CLO), ethyl acetate extract (ACE) and methanol extract (MeOH). The *in vitro* antioxidant activity of each extract was investigated using ABTS and DPPH assays. The phenolic compounds and flavonoids contents were also determined. Hemolytic activity was also analyzed. In all the tests mentioned above, the methanolic extract presented the best result. Thus, we performed the fractionation of this extract (using a sephadex column), where we obtained 9 fractions denominated A to I. The same tests mentioned above were performed in these fractions, where we observed that the best results were obtained with the fractions D and C. Afterwards, we analyzed the *in vivo* protective capacity of the methanolic extract and fractions D and C against the oxidative stress induced by *Escherichia coli* in *Tenebrio molitor* larvae. The extracts and fraction D had the best activities as they significantly increased the insect survival. Thus, these results stimulate new research on pharmacological and cytotoxic aspects of extracts and fractions of *B. tetraphylla* in order to support their application as an antioxidant agent.

Keyword: Caatinga. Natural products. Combretaceae. antioxidant activities. EROS.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Mapa do Brasil com a localização do domínio Caatinga..... 17

Figura 2. Folha e fruto da *Buchenavia tetraphylla*..... 18

Figura 3. Estrutura básica dos flavonóides..... 20

Figura 4. Fontes Endógenas e Exógenas produtoras de espécies reativas..... 21

Figura 5. Fases do desenvolvimento morfológico do *Tenebrio molitor*..... 24

ARTIGO

Figura 1. Resultado da dosagem de compostos fenólicos (concentração de 1000 µg/mL) e flavonóides dos extratos bruto e frações do extrato metanólico da *Buchenavia tetraphylla*. (A e C) Dosagem de compostos fenólicos dos extratos e frações; (B e D) Dosagem de flavonóides dos extratos e frações..... 54

Figura 2. Atividade antioxidante pelo método de sequestro de radicais livres do DPPH dos extratos bruto da *Buchenavia tetraphylla* e Trolox. . (A) Extrato Hexanico; (B) Extrato Clorofórmico; (C) Extrato Acetato de Etila; (D) Extrato Metanólico; (E) Trolox..... 55

Figura 3. Atividade antioxidante pelo método de sequestro de radicais livres do DPPH das frações do extrato metanólico (A á I) da *Buchenavia tetraphylla*. (A) Fração A; (B) Fração B; (C) Fração C; (D) Fração D; (E) Fração E; (F) Fração F; (G) Fração G; (H) Fração H; (I) Fração I; (J) Trolox..... 56

Figura 4. Atividade antioxidante pelo método de sequestro de radicais livres do ABTS

(em 6 minutos) dos extratos bruto e frações do extrato metanólico (concentração de 1000 µg/mL) da *Buchenavia tetraphylla*. (A) Extratos bruto; (B) Frações no extrato metanólico..... 57

Figura 5. Atividade hemolítica dos extratos bruto da *Buchenavia tetraphylla*. (A) Extrato Hexanico; (B) Extrato Clorofórmico; (C) Extrato Acetato de Etila; (D) Extrato Metanólico..... 58

Figura 6. Atividade hemolítica das frações metanólico da *Buchenavia tetraphylla*. (A) Fração A; (B) Fração B; (C) Fração C; (D) Fração D; (E) Fração E; (F) Fração F; (G) Fração G; (H) Fração H; (I) Fração I..... 59

Figura 7. Avaliação de sobrevida do *Tenebrio molitor* com o extrato bruto metanólico pelo estresse causado pela *Escherichia coli* inativa..... 60

Figura 8. Avaliação da infecção por *Escherichia coli* inativa em *T. molito* tratados com extrato metanólico da folha de *B. tetraphylla*. 1) Seleção das larvas de cor clara e apresentando a mesma morfologia, sem marcas acinzentadas, amarronzada ou escura; 2) Foi inoculada injetando no 4º segmento anelar, no sentido da calda a cabeça, na porção ventral; 3) Em 15, 30, 45 e 60 horas foi observado os vivos e os mortos, retirando sempre os mortos; 4) A melanização escura, manchas escuras, apresentam um estresse ocorrido..... 61

Figura 9. Avaliação de sobrevida do *Tenebrio molitor* com as frações C e D extrato bruto metanólico pelo estresse causado pela *Escherichia coli* inativa..... 62

Figura 10. Avaliação da infecção por *Escherichia coli* inativa em *T. molito* tratados com frações C e D do extrato metanólico da folha de *B. tetraphylla*. 1) Seleção das larvas de cor clara e apresentando a mesma morfologia, sem marcas acinzentadas, amarronzada

ou escura; 2) Foi inoculada injetando no 4º segmento anelar, no sentido da calda a cabeça, na porção ventral; 3) Em 15, 30, 45 e 60 horas foi observado os vivos e os mortos, retirando sempre os mortos; 4) A melanização escura, manchas escuras, apresentam um estresse ocorrido.....

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1. Classificação dos compostos fenólicos..... 18

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 12

2 OBJETIVOS..... 14

2.1 OBJETIVOS GERAL..... 14

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICO..... 14

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 15

3.1 PLANTAS MEDICINAIS..... 15

3.2 CAATINGA..... 15

3.3 FAMÍLIA COMBRETACEAE..... 16

3.4 *BUCHENAVIA TETRAPHYLLA*..... 18

3.5 COMPOSTOS ANTIOXIDANTES..... 18

3.6 ESTRESSE OXIDATIVO..... 20

3.6.1 Formação de EROS..... 21

3.6.2 Mecanismo enzimáticos e não enzimáticos..... 22

3.7 TENEBRIO MOLITOR E DESENVOLVIMENTO DE NOVAS DROGAS..... 23

4 ARTIGO..... 27

5 CONCLUSÃO..... 39

REFERÊNCIAS..... 45

APÊNDICE 1..... 64

APÊNDICE 2..... 66

ANEXO..... 68

1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento e suas desordens associadas são um dos maiores desafios a saúde humana. É reconhecido que a idade é o principal fator de risco para as doenças crônicas e, devido ao aumento da idade da população mundial, é necessário o desenvolvimento de novas soluções para reduzir os efeitos deletérios do envelhecimento e, portanto prolongar o tempo de vida saudável (JOHNSON, 2013).

De acordo com o Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (Ipea) em parceria Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) a população brasileira atingirá seu ápice em 2030 com cerca de 206,8 milhões de habitantes. Essa população será formada predominantemente por idosos de 60 anos ou mais. Outra projeção do IBGE indica que em 2055 a população de idosos será maior que a de crianças e jovens com até 29 anos (IBGE, 2014; Ipea, 2010).

Diversos agentes estressores são reconhecidos por antecipar ou intensificar o envelhecimento, como por exemplo, as espécies reativas de oxigênio (EROS). Esses compostos são produzidos fisiologicamente pela célula e desempenham funções cruciais para a manutenção da homeostase. Contudo, quando em excesso, seja por aumento na produção ou por falha nos mecanismos de remoção, as EROS causam sérios danos celulares que podem desencadear diversas doenças, como o envelhecimento precoce e o câncer, e por fim provocar a morte (VALKO, *et al* 2007). Retardar ou reduzir o aparecimento de várias doenças de fim de vida poderia ter um benefício muito maior do que tratamentos direcionados a cada doença específica (MILLER, 2002).

A caatinga é um bioma exclusivo brasileiro localizado majoritariamente na região do semiárido nordestino, ocupando uma área de mais de 900 mil km² com variada constituição de fauna, flora e microbiota (NASCIMENTO, *et al* 2013). Nosso grupo têm demonstrado o potencial biotecnológico de plantas provenientes da Caatinga, com especial foco nas ações antimicrobiana (DA SILVA, *et al* 2013; ARANDA-SOUZA, *et al* 2012) e antioxidante (DA SILVA, *et al* 2011).

Diversos modelos experimentais têm sido utilizados para avaliar a ação antioxidante de novos compostos, dentre eles estão aqueles que usam insetos como *Tenebrio molitor* (cascidunho amarelo). Estes animais têm sistemas fisiológicos conservados como os mecanismos relacionados a imunidade inata (produção de espécies reativas e peptídeos

antimicrobianos, fagocitose, etc.). No entanto, *T. molitor*, como outros organismos, é susceptível aos danos oxidativos gerados pelo excesso de EROS, como ocorre na inflamação. Quando em excesso, as EROS podem interagir comprometendo funções diversas em tecidos e órgãos com isso danificando carboidratos, proteínas, lipídeos e ácidos nucléicos.

No Brasil, larvas de *T. molitor* são amplamente utilizadas e comercializadas como ração animal (aves e répteis) devido a sua facilidade de manuseio e curto ciclo de vida (HAN, *et al* 2016). Estas características têm favorecido o uso deste inseto como modelo alternativo para estudos *in vivo* de patogenicidade e de toxicidade (McGONIGLE, *et al* 2016). Neste trabalho foi avaliado o potencial antioxidante dos extratos brutos e frações do extrato bruto metanólico da *Buchenavia tetraphylla*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade de extratos de plantas endêmicas da caatinga de incrementar a longevidade e a resistência aos estresses oxidativo em *Tenebrio molitor*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter e avaliar o potencial dos extratos orgânicos de *Buchenavia tetraphylla*;
- Fracionar o extrato metanólico da *B. tetraphylla*;
- Analisar a atividade antioxidante dos extratos e frações de *B. tetraphylla*;
- Analisar a proteção do extrato metanólico e frações contra o estresse oxidativo causado por *Escherichia coli* inativada em larvas de *Tenebrio molitor*.

3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

3.1 PLANTAS MEDICINAIS

Há milhares de anos vem se descobrindo que as plantas medicinais têm desempenhado um papel fundamental na saúde da população em diversas culturas. O uso de plantas medicinais tem alcançado seus objetivos pela medicina tradicional usada mundialmente e tem apresentado sua importância principalmente nos países em desenvolvimento até os dias de hoje. Da biodiversidade podemos extrair e/ou produzir alimentos, cosméticos e novos materiais. Desde os tempos da civilização humana dependemos diretamente de plantas medicinais com suas propriedades terapêuticas que incluem produtos minerais, animais e vegetais como fonte de nutrientes, no tratamento de doenças, na construção de moradias e na confecção de vestimentas (SCHIAVON, 2015; FILHO, 2014; SILVA, *et al* 2012; AGRA, *et al* 2008).

No Brasil, o uso de plantas medicinais tem sido utilizado como recurso terapêutico muito importante para o tratamento de patologias. A Organização Mundial de Saúde (OMS) avalia que muitas pessoas da população no mundo fazem uso de plantas medicinais como recurso natural para a saúde. Esse uso frequente é principalmente em comunidades que têm dificuldade de acesso ao medicamento alopático, favorecendo o hábito do uso de plantas medicinais (LEITÃO, *et al* 2013; BITU, *et al* 2015; COSTA, *et al* 2012; AMENI, *et al* 2015). Diante disso o uso de plantas para fins terapêuticos é tradição na medicina popular nas regiões brasileiras, por está razão o consumo é significativo quando se fala de medicamentos fitoterápicos. Desta forma, o uso de planta para fins de pesquisa tem despertado interesse pelo conhecimento de seus metabólitos secundários. Eles são de extrema importância para o desenvolvimento de um medicamento (SCHIAVON, 2015; MININEL, 2015).

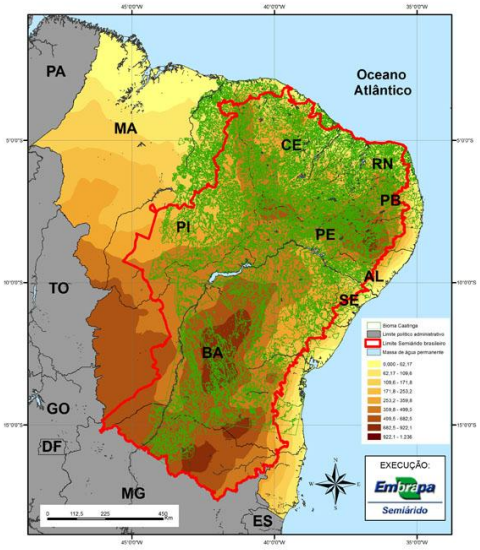
As plantas possuem compostos bioativos importantes para o desenvolvimento de um fármaco, que são chamados de compostos bioativos. Os compostos bioativos são resultados de influência física, química e biológica encontrados na natureza, esses compostos são responsáveis pelos efeitos medicinais ou tóxicos das plantas. Possuem também uma elevada diversidade molecular devido aos processos de síntese química (FILHO, 2014; ALVES, *et al* 2008; SHER, 2009).

3.2 CAATINGA

As florestas tropicais e subtropicais ocupam 40% do globo terrestre, entre as quais 42% corresponde pelas florestas secas, onde está inclusa a caatinga. O domínio da caatinga que se localiza no Nordeste do Brasil, é conhecida por ser um local seco ocasionado pela má distribuição de chuvas na região (MOREIRA, *et al* 2006; ALBUQUERQUE, *et al* 2005).

É um domínio brasileiro que ocupa 11% do território do Brasil e 60% da região nordestina, chegando a medir aproximadamente 900 mil km2 de dimensão territorial, que abrange os estados de Minas Gerais, Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Ceará e Piauí (**Figura 1**). Possui uma vasta diversificação em sua vegetação e é uma flora pouco pesquisada e que possui várias espécies de árvores e arbustos. Estima-se que esse domínio possui cerca de 159 famílias, 1.141 gêneros e 4.547 espécies vegetais. Dessas, 318 espécies são consideradas endêmicas (MOREIRA, *et al* 2006; FILHO, 2014).

Figura 1: Mapa do Brasil com a localização do domínio Caatinga



Fonte:http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/figura2biomacaatinga_000ge18nk0h02wx5ok0ylax2lmiwl2jd.jpg.

3.3 FAMÍLIA COMBRETACEAE

A família botânica denominada de Combretaceae está inserida na classe das Myrtales, que consiste em 20 gêneros e aproximadamente 400 espécies de árvores, arbustos ou lianas, às vezes com troncos eretos e monopodiais sustentando uma séria de ramos horizontais e simpodiais. Predominantemente ocorrem em áreas tropicais e subtropicais e estão largamente nas regiões da Ásia, África ocidental e região nordeste do Brasil (SOUSA, 2010; GLÓRIA, 2014; LINSINGEN, *et al* 2009).

SILVA, *et al* (2005), descreve essa família da seguinte forma:

> **Árvores, arbustos ou subarbustos** geralmente escandentes. Folhas opostas ou alternas, simples, inteiras, pecioladas, sem estípulas, com indumento de tricomas combretáceo-compartimentados, escamiformes ou glândulas pedunculadas. **Inflorescências** em espigas, panículas de espigas, racemos ou panículas, terminais ou axilares, às vezes capitadas. Brácteas muitas vezes presentes. **Flores** actinomorfas ou zigomorfas, frequentemente hermafroditas, raramente diclinas, tetrâmeras ou pentâmeras; hipanto dividido em duas partes, a inferior envolvendo o ovário e a superior em tubo curto ou alongado, terminando nos lobos do cálices. Lobos do cálice 4 ou 5, às vezes pouco desenvolvidos. Pétalas 4,5 ou ausentes pequenas ou conspícuas, inseridas entre os lobos do cálice. Estames geralmente 8 ou 10, inseridos em 2 verticilos, exsertos, às vezes com filetes curtos, anteras versáteis ou adnatas aos filetes, rimosas. Disco nectarífero bem desenvolvido ou nulo. Ovário ínfero ou semi-ínfero (*Strephnonema*), unilocular, 2-6 óvulos pêndulos. **Fruto** indeiscente, seco ou carnoso, às vezes 2-5 alado. Sementes sem endosperma, cotilédones convolutos ou plicados.

Dos 20 gêneros da família Combretaceae, cinco gêneros são nativos do Brasil: *Buchenavia, Combretum, Conocarpus, Terminalia e Thiloa*. Muitas espécies pertencentes a estes gêneros são utilizadas tradicionalmente para tratar dores abdominais, conjuntivite, úlceras gástricas, hemorragias, doenças de pele, câncer, infecções bacterianas, febre, dores de cabeça e doenças venérias. Diante disso, há interesse em realizar estudos científicos para comprovar que extratos e compostos isolados desta família apresentam fortes atividades biológicas, tais como: antimicrobiana, anti-inflamatória, ansiolítica, antioxidante, citotóxica e antiprofilerativa (MININEL, 2015; SOUSA, 2010; BESSONG, *et al* 2005; GLÓRIA, 2014).

Pesquisas desenvolvidas com a espécies do gênero *Buchenavia* vêm aumentando e já se descobriu, por meio de isolamento e identificação de compostos, que possuem propriedades biológicas conhecidas, tais como taninos, terpenos, flavonóides, carboidratos, triterpenos, entre outros. Estes compostos são os responsáveis por apresentarem propriedades biológicas comprovadas por essas pesquisas. Estudos recentes envolvendo espécies do gênero

Buchenavia têm evidenciado propriedades antimicrobianas e antioxidantes referentes aos extratos e também aos compostos isolados (OLIVEIRA, *et al* 2012; FILHO, 2014).

3.4 *BUCHENAVIA TETRAPHYLLA*

Buchenavia tetraphylla é conhecida popularmente no Brasil como "Tanimbuca", utilizada por grupos indígenas e tradicionais comunidades da região Nordeste do Brasil e está relacionada como uma planta etnomedicinal. Essa espécie apresenta ramos dispersos e totalmente horizontais, é uma grande árvore de tronco reto e folhagem esparsa, com folhas pequenas verdes e amarelas possuindo galhos pequenos e eretos (**Figura 2**). Em pesquisas realizadas com extrato das folhas desta planta foi comprovada um potencial antimicrobiano em leveduras (OLIVEIRA, *et al* 2012; Weaver, 1991; FILHO, 2014).

Figura 2. Folha e fruto da *Buchenavia tetraphylla*.

Fonte:http://biogeodb.stri.si.edu/bioinformatics/dfmfiles/files/c/19239/19239.JPG

3.5 COMPOSTOS ANTIOXIDANTES

Os antioxidantes são substâncias que interagem com os radicais livres, bloqueando o processo oxidativo e desta forma retarda ou inibi as EROS e contudo, o equilíbrio entre os radicais livres e o sistema de defesa antioxidante são essenciais para a contribuição de uma maior longevidade. O organismo desenvolveu mecanismos de defesa para evitar os danos

caudados pelos processos oxidativos. Esses classificados em dois mecanismos de defesa que podem bloquear ou retardar danos causados pelos radicais livres: enzimáticos e não-enzimáticos. Os enzimáticos são aqueles presentes em nosso organismo e são ativados por estímulos e os não-enzimáticos são adquiridos pela dieta (FILHO, 2014; VARGAS, *et al* 2008; RENZ, 2003).

A ação dos antioxidantes pode ser acompanhado por variados mecanismos, desde a remoção de oxigênio, sequestro dos metais catalisadores da formação de radicais livres, aumento de produção de antioxidante endógenos ou mesmo a interação de mais de um mecanismo (RENZ, 2003).

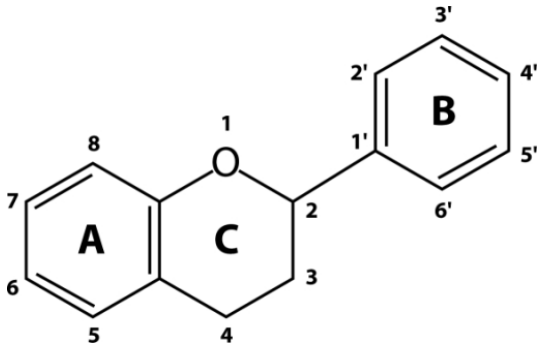
Os compostos fenólicos possuem características antioxidantes por terem função química e apresentar propriedades redutoras. Essas substâncias pertencem a uma classe de compostos que inclui uma grande diversidade de estruturas, simples e complexas, que possuem pelos menos um anel aromático no qual, ao menos, um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila (**Tabela 1**). Esta classe abrange as xantonas, flavonóides, lignanas, antraquinonas, taninos, cumarinas, dentre outras (SIMÕES, *et al* 2001).

TABELA 1. Classificação dos compostos fenólicos.

ESQUELETO BÁSICO	CLASSE DE COMPOSTOS FENÓLICOS
C6-C1-C6	Xantonas
C6-C3-C6	Flavonóides
(C6-C3)2	Lignanas
C6-C2-C6	Antraquinonas
(C6-C1)n	Taninos
C6-C3	Cumarinas

Os flavonóides representam um dos metabolitos secundários mais importantes entre compostos fenólicos de plantas medicinais (**Figura 3**). Encontram-se flavonóides em diversas formas estruturais e funções como, proteção contra os raios ultravioleta, antioxidantes, antimicrobiana. As ações antioxidantes que os flavonóides contribuem são de reduzir os níveis de radicais livres e proteção das células contra os fenômenos da peroxidação das membranas lipídicas neutralizando o estresse oxidativo (SIMÕES, 2001; RODRIGUES, 2016).

Figura 3. Estrutura básica dos flavonoides.



Fonte: https://openi.nlm.nih.gov/imgs/512/324/3203913/PMC3203913_ITX-4-114-g001.png

3.6 ESTRESSE OXIDATIVO

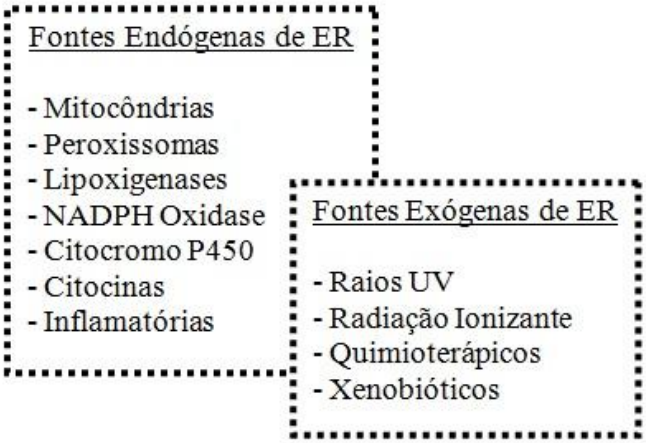
O estresse oxidativo é um desequilíbrio metabólico entre os sistemas pró e antioxidante do organismo, que é causado pelas EROS – espécies reativas de oxigênio. As EROS são moléculas altamente reativas por terem um par de elétrons não pareados na última camada, com isso tornam-se potentes agentes oxidantes. As EROS, como o radical hidroxila (OH•), peróxido de hidrogênio (H2O2) e ânion superóxido (O2•-), são resultantes do metabolismo celular normal e tem um papel importante no funcionamento e sinalização celular (OLIVEIRA, 2012; PEDROSA, 2013; MACHIELA, *et al* 2016).

No entanto, devido a sua reatividade, em altas concentrações podem comprometer funções diversas de tecidos e órgãos danificando carboidratos, proteínas, lipídeos e ácidos nucléicos, isso contribui para o desenvolvimento de várias patologias, como câncer, envelhecimento, diabetes, doenças cardiovasculares e outras doenças degenerativas em humanos (MACHIELA, *et al* 2016; RUIZ, *et al* 2016).

Normalmente ocorre a produção de EROS em nosso organismo como uma forma de preservação de várias funções fisiológicas. Isso acontece para manter seu funcionamento normal, com isso o nosso organismo utiliza reações de óxido-redução em alguma ou várias etapas do seu processo (**Figura 4**). Por outro lado, o nosso organismo produz enzimas e moléculas que neutralizam essas EROS produzidas em excesso, mantendo a homeostase redox, chamada de regulação redox. Em condições normais, o sistema antioxidante dos

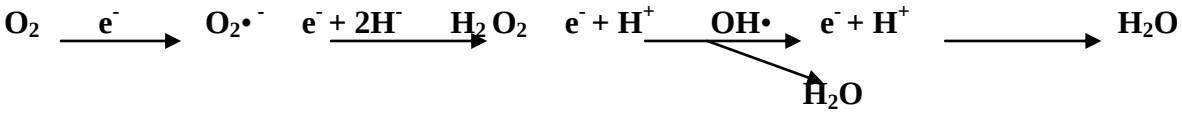
organismos aeróbios é capaz de inibir os efeitos nocivos das EROS (MACHIELA, *et al* 2016; OLIVEIRA, 2012).

Figura 4. Fontes Endógenas e Exógenas produtoras de espécies reativas.

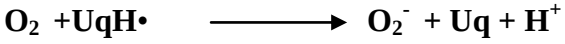


3.6.1 Formação de Espécies Reativas de Oxigênio - EROS

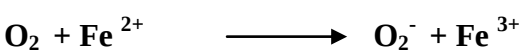
De acordo com sua configuração eletrônica, o oxigênio recebe um elétron de cada vez tornando-o compostos reativos. Os radicais superóxido (O2•-) são os primeiros a se formarem reduzindo o oxigênio até a água e formando também uma hidroxila (HO•), sendo transformado a parti dele outros EROS. A hidroxila é uma dos oxidantes mais potentes, pode passar pela membrana e reagir com moléculas como lipídeos insaturados e DNA (RENZ, 2003).



Outras transformações de EROS podem ser formadas na mitocôndria, como a oxidação da semiquinona a partir da ubiquinona. Pode observar na equação abaixo:



Reações de formações EROS no retículo endoplasmático a partir da citocromo P_{450} e a partir da flavoproteína NADPH-Citocromo P_{450} redutase:



Reações de formação de EROS no citosol pela enzima xantina oxidase (RENZ, 2003):

$$O_2 + \text{xantina} \longrightarrow O_2^- + \text{ácido úrico}$$

3.6.2. Mecanismos de defesa antioxidante enzimáticos e não enzimáticos

O sistema antioxidante classifica-se em enzimático e não enzimático. O enzimático são substâncias que neutralizam os radicais livres, reduzindo-os pela adição de um elétron do íon hidrogênio, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GPX) (MICHIELA, *et al* 2016).

A superóxido dismutase (SOD) transforma dois ânions radicais superóxido em um peróxido de hidrogênio. Não penetra nas células e possui uma meia vida curta e sua ação está na destruição do O_2^-. Dependendo do metal associado à SOD pode ocorrer de três formas: Fe em bactérias, Cu e Zn no citoplasma de eucariontes e Mn na matriz mitocondrial (RENZ, 2003; BEZERRA, *et al* 2015; NAHAR, *et al* 2016).

$$\text{SOD} - Cu^{2+} + O_2^- \longrightarrow \text{SOD-}Cu^{+} + O_2$$

$$\text{SOD} - Cu^{2+} + O_2^- + 2H^+ \longrightarrow \text{SOD-}Cu^{2+} + H_2O_2$$

A catalase é outro antioxidante enzimático, que tem a capacidade de transformar o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Está localizado nos peroxissomas e possui ação de dismutação de H_2O_2. Em alguns órgãos como: coração, pulmão e o cérebro, onde possuem pouco peroxissomas, tem uma ação diminuída da catalase. Quando os radicais livres atingem a circulação sanguínea ocorre a ação antioxidante desta enzima, através da catalase eritrocitária (RENZ, 2003; BEZERRA, *et al* 2015; MICHELI, *et al* 2016).

$$2\,H_2O_2 \xrightarrow{\text{Catalase}} O_2 + 2H_2O$$

A glutation peroxidase (GPx) está localizada no citosol e na matriz mitocondrial. Igualmente a catalase é doador de elétrons. Sua ação ocorre na dismutação de H_2O_2 (RENZ, 2003; BEZERRA, *et al* 2015).

O sistema não enzimático é formado por muitas substâncias, entre elas a GSH, principal composto antioxidante endógeno e intracelular, além das vitaminas tocoferóis, β-caroteno e ascorbato. A vitamina C (ascorbato), por ser hidrossolúvel, possui ação maior no plasma sanguíneo, já a vitamina E (tocoferol) tem maior ação na membrana celular, por ser lipossolúvel. Os carotenóides, β-caroteno precursores da vitamina A, agem como sequestrantes de lipoperóxidos na circulação junto com as lipoproteínas absorvidas na

superfície intestinal (RENZ, 2003; BEZERRA, *et al* 2015; MACHIELA, *et al* 2016; DUARTE, *et al* 2016).

Reações do ácido ascórbico através do ascorbato (RENZ, 2003):

$$AH^- + \bullet OH \longrightarrow H_2O + A\bullet^-$$

$$AH^- + O_2^{-}\bullet + H^+ \longrightarrow H_2O_2 + A\bullet^-$$

Reações da vitamina E (tocoferol) (RENZ, 2003):

$$\alpha\text{-}TOH + RO_2\bullet \longrightarrow \alpha\text{-}TO\bullet + RO_2H$$

O ácido úrico e proteínas de transporte de metais de transição, como a transferrina (responsável pelo transporte do ferro) e ceruloplasmina (transporte do cobre e oxidação do ferro para ser captado pela transferrina), tem ação antioxidante por possui capacidade de seqüestrar radicais livres dos uratos (RENZ, 2003; MACHIELA, *et al* 2016; RUIZ, *et al* 2016).

3.7 *TENEBRIO MOLITOR* E DESENVOLVIMENTO DE NOVAS DROGAS

O estudo com insetos teve um grande desenvolvimento no ínicio do século XX por ser o grupo que contêm mais de 70% das espécies. O *Tenebrio molitor* pertence à família denominada de Tenebrionidae, são geralmente encontrados em regiões desertas e em lugares secos, se alimentam de grãos de cereais e farinhas. Aproximadamente 15.000 famílias e 2.900 espécies descritas. (LIMA, 1955; BETON, 2009).

Segundo LIMA, 1955 as larvas e o inseto são descritos da seguinte forma:

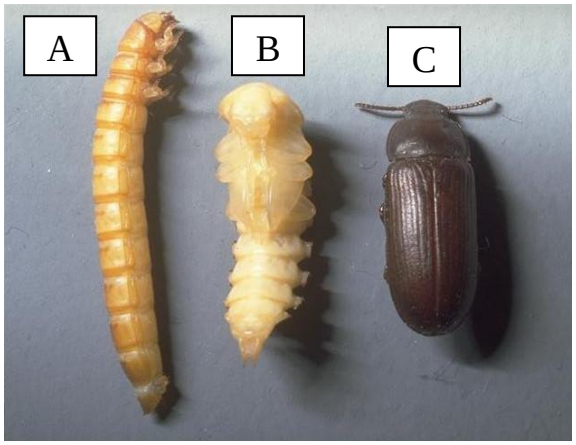
> **Larvas:** Alongadas, subcilíndricas ou algo deprimidas, via de regra de tegumento fortemente esclerosado, glabras e brilhantes, providas de pernas curtas. Distinguem-se, porém, dos verdadeiros “vermes arame” pela estrutura do segmento anal, em geral simples.
>
> **Inseto:** Besouros de aspecto, côr e tamanho variáveis, porém, via de regra, de cor uniforme, negra, parda ou cinérea; exosqueleto relaticamente espesso e duro, fosco ou brilhante, diversamente esculturado, porém, quasi sempre desprovido de pilosidade. Podem ter de alguns milímetros a alguns centrimentros de comprimento. Cabeça relativamente pequena, quase sempre mais estreita que o protorax, provida de antenas geralmente mais curtas ou pouco mais longas que a cabeça e o torax reunidos, de 11 ou, mais raramente, 10 segmentos, filiformes ou moniliformes, raramente serradas, com os

> segmentos distais gradualmente dilatado-se até o ápice sem serem, todavia, de tipo claviforme, exceto em alguns gêneros. Pernas geralmente de tipo ambulatório; em algumas espécies distintamente fossoriais; tarsos simples.

As fêmeas colocam em média 500 a 100 ovos durante a primeira postura. Da fase embrionária à fase larval (estágio de eclosão), ocorre surgimento da larva com periodo de 10 a 15 dias. Da fase larval à fase de pupa (estágio larval) efetuam 5 a 7 mudanças de pele, este periodo dura em torno de 60 dias. A fase de pupa até a fase adulta (estágio de metamorfose) dura aproximadamente 3 semanas ou 21 dias para completar o seu desenvolvimento. Os ovos medem cerca de 1,8mm, as larvas de 2 à 30mm, a pupa uns 16mm e o adulto macho vária de 10 – 15 mm e a fêmea de 10 a 18 mm (**Figura 5**).

Figura 5. Fases do desenvolvimento morfológico do *Tenebrio molitor*;

A: Fase larval, B: Fase de pupa e C: Besouro



Fonte: httpwww.agrolink.com.bragromidiasproblemasgTenebrio_molitor7.jpg

T. molitor têm sido utilizado como modelo experimental para avaliar diversas atividades como: antimicrobiana (MOREY, *et al* 2016), citotoxicidade (VAN DER VALK; MEIJDEN, 2014), atividade inseticida (WANG, *et al* 2015). Pesquisas analisaram o funcionamento do intestino do inseto, atuando em duas linhas principais de estudo: (i) pesquisa por inibidores, direcionado nas enzimas digestivas; (ii) superfície intestinal, na busca de alguma substância que afetem, em sentido geral, o sistema absortivo (BETON, 2009; HAN *et al* 2016).

Estudos relacionados com a atividade antimicrobiana avaliam a sobrevivência das larvas infectadas após a inoculação do composto a ser estudado. Também podem ser avaliados os mecanismos relacionados à imunidade inata do inseto (produção de espécies reativas e peptídeos antimicrobianos, fagocitose, etc) (DE SOUZA, *et al* 2015). *T. molitor* é susceptível a patógenos como *Escherichia coli* (SEO, *et al* 2016) e *Staphylococcus aureus* (MCGONIGLE, *et al* 2016), que são capazes de persistir dentro do inseto infectado, e provocar alterações em tecidos, hemolinfa, e fagócitos. O sistema imune deste inseto já possui algumas vias de sinalização conhecidas, como a via Toll, a cascata profenoloxidase e a via de autofagia (SEO, *et al* 2016). Estas características têm favorecido o uso deste inseto como modelo alternativo de infecção para estudos de patogenicidade, e de atividade antimicrobiana e antivirulência *in vivo* (HAN, *et al* 2016; McGONIGLE, *et al* 2016).

Como outros organismos, *T. molitor* também possui um sistema de defesa antioxidante, responsável pela neutralização de espécies reativas em excesso. Este sistema é compostos por diversas enzimas antioxidantes e desintoxicantes como superoxide dismutases (SODs), peroxidases (PODs), catalases (CATs), bem como tirosinase (TYR), acetilcolinesterase (AChE), carboxilesterase (CarE), and glutatione S-transferase (GSTs) (LI, *et al* 2016) Estudos prévios demonstraram um aumento da produção de espécies reativas em resposta a infecção de larvas de *T. molitor* (ZHU, *et al* 2014; LI, *et al* 2016). Como discutido anteriormente, a produção exarcebada de espécie reativas é deletéria para os organismos, levando a danos moleculares que culminam na indução de vias de morte celular. A capacidade de *T. molitor* de produzir espécies reativas em resposta à infecção faz deste inseto um modelo potencial para o estudo de substâncias com caráter antioxidante. Neste caso, um agente com potencial atividade antioxidante *in vitro* deve ser inoculado na larva submetida ao estresse oxidativo (induzida por um patógeno ou algum componente microbiano). A ação protetora do agente é evidenciada pelo aumento da sobrevivência das larvas tratadas em comparação a larvas não tratadas. Esta abordagem utilizando larvas poderia trazer mais informações que aquelas tradicionalmente utilizadas para a prospecção antioxidante, baseadas na interação química de compostos e sem relevância biológica (DA SILVA, *et al* 2016). Por se tratar de um organismo multicelular, esta plataforma também apresenta vantagens em relação àquelas que utilizam células. Em adição, esta plataforma também avaliaria a toxicidade do agente antioxidante. Estudos antioxidantes utilizando organismos são bem estabelecidos para outros invertebrados, como o *Caenorhabitis elegans* (ZHANG, *et al* 2016; WANG, *et al* 2016), no entanto, ao nosso conhecimento, estes estudos ainda não foram realizados utilizando *T.*

molitor. O uso deste inseto oferece algumas vantagens, em relação ao *C. elegans*, como facilidade de manuseio e a possibilidade da inoculação direta do agente antioxidante na larva.

4 ARTIGO 1

Avaliação da ação antioxidante *in vitro* e *in vivo* de extratos e frações de *Buchenavia tetraphylla* (AUBL.) R.A. Howard.

Avaliação da ação antioxidante *in vitro* e *in vivo* de extratos e frações de *Buchenavia tetraphylla* (AUBL.) R.A. Howard.

Tiago Fonseca Silva[1], José Robson Neves Cavalcanti Filho[1], Natalia Medeiros dos Santos[1,2], Clovis Macêdo Bezerra Filho[1], Ana Paula Sant'Anna da Silva[1], Vera Lúcia de Menezes Lima[1], Nicácio Henrique da Silva[1], Márcia Vanusa da Silva[1], Luis Cláudio Nascimento da Silva[3§], Maria Tereza dos Santos Correia[1§]

[1] Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

[2] Residente do Programa de Saúde da Família, Universidade de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

[3] Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária, Universidade CEUMA, São Luís, MA, Brasil.

[§] Estes autores contribuíram igualmente para realização deste trabalho.

RESUMO: O objetivo deste estudo foi avaliar as atividades antioxidante, hemolítica de extrato orgânico e 9 frações do extrato metanólico de folhas de *Buchenavia tetraphylla*. A atividade antioxidante, foi determinada pelos métodos de sequestros de radicais livres (DPPH e ABTS), dosagem de compostos fenólicos e flavonóides.O extrato metanólicoapresentouos melhores resultados em todas as metodologias. Foram obtidos os seguintes resultados: 123,03 µg EAG /µg e 108,90 µg EQ/µg. Já nos sequestros dos radicais livres em DPPH e ABTS obtivemos 83,73% e 98,80%, respectivamente. Nas frações, os melhores resultados foram para os compostos fenólicos a fração D com 168,99 µg EAG /µg e para flavonóides foi a fração C 68,26 µg EQ/µg.A fração que demonstrou o melhor resultado foi a D, 13,55 % á 83,54%, no ABTS teve um sequestro de 75,31% em 6 minutos. Em relação a atividade hemolítica, o extrato metanólicotestado apresentou 0,16% até 0,48% de hemólise. Na fração C, obteve-se um resultado entre 0,03% até 0,36% de hemólise. Posteriormente foi analisado o extrato e as frações D e C metanólica em *Tenebrio molitor* para avaliar a atividade antioxidante causada por infecção de *Eschechiria coli*.Observou-se que a fração D teve um resultado satisfatório, em 60 horas houve uma sobrevivência de 80%, já no controle (só

bactéria) em 60 horas houve uma sobrevivência de 10% do *Tenebrio molitor*. Assim, estes resultados estimulam novas pesquisas sobre aspectos farmacológicos e citotóxicos dos extratos e frações de *B. tetraphylla* a fim de apoiar a sua aplicação como agente antioxidante.

Palavras-chave: Recursos naturais, Caatinga, Combracetaceae, atividade antioxidante, *Tenebrio molitor*.

ABSTRACT: The objective of this study was to evaluate the antioxidant, hemolytic activities of organic extract and 9 fractions of the methanolic extract of leaves of Buchenavia tetraphylla. The antioxidant activity was determined by the methods of free radical sequestration (DPPH and ABTS), dosage of phenolic compounds and flavonoids. The crude extract, where we obtained the best result in all the methodologies was with the methanolic extract. Where we obtained the following results: 123,03 μg EAG / μg and 108,90 μg EQ / μg. In the fractions, for phenolic compounds was D with 168.99 μg EAG / μg and for flavonoids was C 68.26 μg EQ / μg. In the abductions of free radicals in DPPH and ABTS we obtained 83.73% and 98.80%, respectively. The fraction that showed the best result was D, 13.55% to 83.54%, in ABTS it had a seizure of 75.31% in 6 minutes. In relation to the hemolytic activity of the same extract and fractions tested above, it was observed in the extract 0.16% up to 0.48% hemolysis. The fraction C, we obtained a result between 0.03% and 0.36%. Later, we analyzed the extract and the methanolic D and C fractions in *Tenebrio molitor* to evaluate the antioxidant activity caused by *Eschechiria coli* infection, where we observed that the D fraction had a satisfactory result. In 60 hours, there was a survival of 80%, in the control (bacterial only) in 60 hours there was a survival of 10% of the *Tenebrio molitor*. Thus, these results stimulate new research on the pharmacological and cytotoxic aspects of extracts and fractions of B. tetraphylla In order to support its application as an antioxidant agent.

Keywords: Natural resources, Caatinga, Combracetaceae, antioxidant activity, Tenebrio molitor.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, uma quantidade substancial de evidência tem indicado o papel chave dos radicais livres e outros antioxidantes como grandes responsáveis pelo envelhecimento e pelas doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais [1]. Assim, torna-se essencial o equilíbrio entre os radicais livres e o sistema de defesa antioxidante. O organismo possui duas formas de defesa contra os danos causados pelos radicais livres [2]. Uma delas é a utilização de compostos antioxidantes obtidos na dieta e a outra, um sistema de enzimas celulares como a superóxido dismutase e catalase que protegem o organismo contra os efeitos deletérios dos radicais livres. Devido aos efeitos colaterais dos antioxidantes sintéticos, vem aumentando significativamente o interesse em encontrar antioxidantes naturais para utilização em medicamentos e alimentos [3].

As plantas medicinais vêm sendo utilizadas há muito tempo com finalidade terapêutica, em suas diferentes formas farmacêuticas (chás, infusões, in natura), no tratamento e prevenção de doenças [4,5,6]. Nosso grupo tem demonstrado o potencial biotecnológico de diversas espécies da Caatinga (bioma exclusivo do Brasil) [7,8,9]. Uma delas é a *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) R. A. Howard (Combretaceae: Combretoideae), que possui um amplo espectro de atividade antimicrobiana [10]. Esta planta é uma espécie neotropical que se encontra distribuída desde a ilha de Cuba (América Central) ao estado do Rio de Janeiro, no sudeste brasileiro (América do Sul) [11]. No Brasil, esta planta é popularmente conhecida como “tanimbuca” e está relacionada como uma planta etnomedicinal utilizada por comunidades tradicionais na região do Nordeste brasileiro [12,13]. Agra et al. [14] relatam que as plantas da família Combretaceae têm sido cada vez mais utilizadas em tratamentos medicinais de doenças relacionadas como o estresse oxidativo, como enterite aguda, colite, inflamações em geral, malária, tuberculose e câncer, entre outros. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antioxidante de produtos derivados de *B. tetraphylla* utilizando modelos *in vitro* (químicos e baseado em células) e *in vivo* (utilizando larvas de *Tenebrio molitor*).

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta e Armazenamento da planta

Folhas de *B. tetraphylla* foram coletadas em novembro de 2013, no Parque Nacional do Catimbau (Pernambuco, Brasil). As amostras foram processadas conforme as técnicas taxonômicas, identificadas pelo Dr. Alexandre G. Silva (Instituto Nacional do Semiárido, Campina Grande, Brasil) e depositadas no Herbário IPA, do Instituto Agronômico de Pernambuco. As folhas de *B. tetraphylla* foram submetidas à secagem em temperatura ambiente e em seguida, moídas para padronização do tamanho de partículas do pó da planta através de moinho de facas Macsalab mil (Model 200 LAB). Este material foi armazenado em um recipiente fechado e escuro até ser utilizado.

Obtenção do extrato

O material (25g da folha triturada) foi transferido para um Erlenrmeyer (250 mL) ao qual foram adicionados 100 mL do primeiro solvente (ciclohexano; CHX), sendo deixado em agitação por 72 horas numa mesa agitadora sob rotação de 125 rpm a 25 ºC. Após 72 horas, a amostra foi filtrada e o liquido extraído foi rotaevaporado sob rotação (45 rpm) a 50 ºC. O resíduo de folhas restante foi submetido à nova extração com 100 mL de clorofórmio (CLO) e o processo acima foi inteiramente repetido. Em seguida o resíduo de folha foi submetido à extração com acetato de etila (ACT), e finalmente com metanol (MET).

Fracionamento do extrato metanólico

O extrato metanólico (2g) foi fracionado em coluna de Sephadex LH-20 como fase estacionária, utilizando-se metanol puro e uma mistura de metanol e clorofórmio (1:1 v/v) como eluentes.As frações obtidas (=120, volume de 7 mL cada) foram analisadas por Cromatografia em camada delgada (CCD) através de visualização em luz ultravioleta, e aquelas que apresentaram perfis fitoquímicos semelhantes foram reunidas, resultando em 9 frações diferentes, denominadas de A à I.

Dosagem de Compostos Fenólicos

A dosagem de compostos fenólicos presente nos extratos brutos e frações de *B. tetraphylla* foi realizada utilizando o reagente Folin-Ciocalteu [15]com algumas modificações). Amostras (200 µL – concentração de 1000 µg/mL) foram introduzidas em tubos de ensaio e 1,0 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (1: 1 v/v), após 3 minutos foram adicionados 800 µL de carbonato de sódio (20%). A mistura foi incubada à temperatura ambiente, ao abrigo da luz e em repouso durante 2 horas. A absorbância da mistura foi medida a 765 nm (GeneQuant 1300, GE Healthcare). A quantidade de fenóis totais foi calculada em µg/mL de Equivalentes de ácido gálico (EAG), utilizando uma curva de calibração obtida com a solução padrão de ácido gálico ($y = 0,0043X + 0,0153$; $R^2 = 0,9932$).

Dosagem de Flavonóides

A dosagem de flavonóides presente nas amostras de *B. tetraphylla* foi realizada pela metodologia com algumas modificações [16]. Foi utilizado 100µL das amostras (concentração de 1000 µg/mL) que foram misturadas com 100 µL da solução reagente (2g de Cloreto de Alumínio diluído em solução de etanol a 2%). A mistura foi incubada durante 60 min à temperatura ambiente e ao abrigo de luz. A absorbância foi medida à 420 nm. A quantidade de flavonóides foi calculada em µg/mL de Equivalente de quercetina (EQ), utilizando uma curva de calibração construída com solução padrão de quercetina ($y = 0,004X + 0,0121$;$R^2 = 0,993$).

Ensaios antioxidantes *in vitro*

Ensaio DPPH

A atividade sequestradora de radicais livres dos extratos/frações foi analisada usando o radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo; Sigma-Aldrich) [17]. Uma alíquota de 250 µL de solução de DPPH (1 mM) foi adicionado à 40 µL de diferentes concentrações da amostra (31,25 – 1000 µg/mL) e homogeinizado. Após 30 minutos, a absorbância foi medida a 517 nm. O trolox foi utilizado como o composto controle. A atividade sequestradora de radicais livres foi calculada usando a seguinte fórmula:

[DPPH] (%) = (Ac - As) / Ac × 100

Onde: Ac = controle de absorção; As = Absorbância da Amostra

Ensaio ABTS

A atividade sequestradora de radical livre da amostra foi analisada usando o radical ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) [18]. Foi utilizado 20 µL da amostra e 2 mL da solução do reagente ABTS (30 mg do ABTS, 379,4 mg de persulfato de Potássio e 0,137 mL de solução de persulfato). E realizado leitura por espectrofotômetro (734 nm) após 6, 15, 30, 45, 60 e 120 minutos.

Inibição (%) = (Ac - Aa)/ Ac × 100

Onde, Ac (absorbância do controle) e Aa (absorbância da amostra).

Ensaios com sangue humano

O sangue (5-10 mL) foi obtido a partir de voluntários saudáveis, não-fumantes, por punção venosa, após consentimento informado por escrito. Eritrócitos humanos partir de sangue citratado foram imediatamente isolados por centrifugação a 1500 rpm por 10 min. Após a remoção do plasma, os eritrócitos foram lavados três vezes com tampão fosfato-salina (PBS; pH 7,4) e depois uma suspensão de eritrócitos a 1% foi preparada como mesmo tampão.

Atividade Hemolítica

A atividade hemolítica foi realizada seguindo a metodologia de Oliveira *et al* (2012) [19].Uma alíquota de 1,1 mL de suspensão de eritrócitos foi homogeneizada a 0,4 mL das amostras em várias concentrações (125 – 1000 µg/mL). O controle negativo e controle positivo receberam 0,4 mL de tampão fosfato-salina e de Triton X-100, respectivamente. Após 60 minutos de incubação à temperatura ambiente, as células foram centrifugadas e o

sobrenadante foi usado para medir a absorbância da hemoglobina liberada a 540 nm. O valor médio foi calculado a partir dos ensaios em quadruplicata. A atividade hemolítica foi expressa em relação à ação do Triton X-100 e calculada pela seguinte fórmula:

Atividade hemolítica (%) = $[(A_a - A_b).100]/(A_c - A_b)$

Sendo, A_a - absorbância da amostra, A_b - absorbância do controle negativo (fosfato-salina) e A_c - absorbância do controle positivo (Triton X-100).

Avaliação antioxidante in vivo

Larvas de *T. molitor* com aproximadamente 100 mg foram randomizadas em grupos de no mínimo 10 indivíduos. Foram injetados com uma Seringa de Hamilton 10 µL de extrato metanólico ou das frações C e D nas concentrações (100 µg/mL e 200 µg/mL). Paralelamente, foi preparada uma suspensão de *Escherichia coli* OP50 com densidade ótica a 600 nm de 0,7. Esta suspensão foi inativada a 100 °C por 10 minutos e posterior diluída em série na proporção de 1:2 (v/v). Após 1 hora da inoculação de cada extrato/fração, foram adicionados 10 µL da suspensão microbiana.

A viabilidade das larvas foi avaliada após 15, 30, 45 e 60 horas pela ausência de movimento. Larvas inoculadas com o microrganismo e tratadas com PBS foram utilizadas com controle negativo, enquanto larvas não infectadas foram o controle positivo.

RESULTADOS

Dosagem de Compostos Fenólicos e Flavonóides

Inicialmente, foram comparados os teores de compostos fenólicos e flavonoides nos diferentes extratos de *B. tetraphylla*. O extrato metanólico apresentou maiores concentrações de ambas as classes de compostos 123,03 µg EAG / µg e 108,90 µg EQ/ µg, para compostos fenólicos e flavonoides, respectivamente (**Figura 1A e 1B**). Os demais extratos apresentaram, hexanico 9,45 µg EAG / µg e 10,03 µg EQ/ µg, extrato clorofórmio 14,28 µg EAG / µg e 108,90 µg EQ/ µg e extrato de acetato de etila 116,65 µg EAG / µg e 24,92 µg EQ/ µg.

Os altos teores de compostos fenólicos e flavonoides no extrato metanólico (aliado com a maior atividade antimicrobiana, como mostrado a seguir) encorajaram a realizar o fracionamento deste extrato utilizando coluna de Sephadex LH-20. Foram obtidas 9 frações (A a I), das quais os conteúdos de compostos fenólicos e flavonoides também foram determinados. Dentre as frações, o maior conteúdo fenólico foi detectado na fração D (168,99 µg EAG/ µg), seguida das frações: (A) 49,45; (B) 107,20; (C) 156,02; (E) 49,83; (F) 72,88; (G)127,62; (H) 55,62; (I) 110,15 µg EAG/ µg.

Em relação ao conteúdo de flavonoides, a fração C apresentou os valores mais elevados (68,26 µg EQ/ µg), seguida das frações: (A) 16,80; (B) 12,65; (D) 56,01; (E) 14,01; (F) 4,29; (G)45,27; (H) 0,86; (I) 39,29 µg EQ/ µg (**Figura 1C e 1D**).

Extratos e frações de folha de Buchenavia tetraphylla possuem atividade antioxidante in vitro

Em seguida, foi avaliado o potencial antioxidante dos extratos e frações utilizando os métodos de sequestro de radicais livres DPPH e ABTS. No ensaio com DPPH (**Figuras 2 e 3**) foram testadas diferentes concentrações de cada extrato/fração. Em relação aos extratos, a maior atividade antioxidante *in vitro* foi para o extrato metanólico, mais de 50% do radical DPPH foi inibido na concentração de 62,5 µg/mL, seguida do extrato de acetato de etila. Ambos os extratos apresentaram inibição dose-dependente (**Figuras 2C e 2D**). Os extratos CLO e CHX não apresentaram ação dose-dependente, e não inibiram mais de 30% do radical (**Figuras 2A e 2B**). Em relação às frações do extrato metanólico (**Figura 3**), a fração C inibiu mais de 50% do radical DPPH a partir da concentração de 62,5 µg/mL (**Figura 3C**), enquanto que as frações D e I só apresentaram este resultado nas concentrações de 125,5 µg/mL (**Figura 3D**) e 250 µg/mL (**Figura 3I**), respectivamente.

A ação antioxidante dos extratos também foi avaliada *in vitro* pelo método de sequestro do radical ABTS. Neste ensaio foram testadas todas as amostras na concentração de 1000 µg/mL e após 6 minutos de tratamento a inibição do radical foi medida. Dentre os extratos, foi observada uma maior inibição do extrato metanólico, aproximadamente 100% de inibição ($p<0,05$), seguido do extrato de acetato de etila (aproximadamente 50% de inibição) (**Figura 4A**). Por outro lado, as frações do extrato metanólico B, C, D, F e I inibiram

aproximadamente 80% do radical, não sendo observadas diferenças estatísticas entre elas (**Figura 4B**).

Extratos e frações de folhas de Buchenavia tetraphylla não possuem ação hemolítica

Com intuito de confirmar a atividade antioxidante dos extratos e frações foi empregado um modelo baseado na hemólise de eritrócitos humanos. Inicialmente, determinamos se os extratos/frações por si não induziriam efeitos tóxicos nos eritrócitos. Como mostrado nas **figuras 5D e 6**, o extrato metanólico e as frações apresentaram atividade hemolítica significativa, mesmo nas concentrações mais elevadas.

Extratos e frações de folhas de Buchenavia tetraphylla protegem larvas de Tenebrio molitor contra o estresse induzido por Escherichia coli

Diante dos resultados apresentados nas atividades acima, decidimos avaliar a ação do extrato metanólico e de suas frações mais ativas (C e D) em um modelo de estresse *in vivo* utilizando larvas de *T. molitor*. Neste ensaio o estresse foi induzido utilizando a linha de *E. coli* OP50 inativada por calor. O tratamento térmico foi empregado para garantir que a morte das larvas não fosse induzida pelo crescimento da bactéria nas larvas e sim por um estresse causado pelos componentes presentes na bactéria. Neste caso, não avaliamos a ação antimicrobiana do extrato/frações e sim a capacidade destes de inibir as vias de estresses induzidas pela presença da bactéria. Em adição, utilizamos a linhagem *E. coli* OP50 conhecida por ser uma linhagem pouco patogênica. Neste sentido, o estresse seria causada principalmente por componentes bacterianos, como o lipopolissacarídeo (LPS). A inoculação da bactéria nas larvas foi capaz de induzir a morte de 50% das larvas após 15 horas e de 90% após 30 horas (**figura 7**). As larvas apresentaram pontos de mielinização típicos da indução de estresse neste organismo (**figura 8**). O tratamento com o extrato metanólico a 100 µg/mL capaz de inibir a morte das larvas, sendo observadas taxas de sobrevivência de 100% (15horas) 70% (30horas) e 50% (45horas e 60horas), enquanto que a concentração de 200 µg/mL não apresentou ação protetora significativa (**Figura 8**).

Os resultados obtidos com a fração D foram ainda mais significativos (**Figura 9**). Na concentração de 200 µg/mL as taxas de viabilidade foram 90% após 45 horas e 80% após 60 horas (**Figura 9**). Resultados similares foram obtidos com a concentração de 100 µg/mL da fração D, onde a viabilidade se manteve em 80% após 45 horas e 70% após 60 horas. Em relação a fração C, a melhor ação protetora foi observada para a dose de 100 µg/mL (**Figura 9**). Neste caso, os índices de sobrevivência se mantiveram em 70% até a 45horas, e depois foi de 60% (60 horas). No caso da dose de 200 µg/mL, 80% das larvas permaneceram viáveis após 15horas de tratamento, este índice decresceu para 50% e 40% chegando a 30% após 60horas.

DISCUSSÃO

Em estudos foi demostrado que em extratos aquosos e hidroalcoolico de sementes e folhas de *Abelmoschus moschatus* o teor de compostos fenólicos variaram em 3,74 à 13,84 mg EAG / g e os flavonoides entre de 0,10 à 6,00 mg de EQ / g de extrato. Diante disso, para a dosagem de compostos fenolicos e flavonoides foi demostrado uma inferioridade em relação ao extrato bruto metanólico e frações da *Buchenavia tetraphylla*. Estudos relacionam que extratos que apresentam compostos fenólicos e flavonoides provavelmente teram atividade antioxidante, desta forma tem sua importancia á efeitos biólogicos e com isso a um interesse no campo medicianl em pesquisar sobre esse tipo de compostos [20].

Para avaliar atividade antioxidante pode ser realizado ensaio como DPPH e ABTS, que vão avaliar os sequestros de radicais livres presentes nestes reagentes. Alguns autores confirmar que o método ABTS é mais confiável que o método DPPH, por ter reações rápidas a agentes lipófilos e possuir fácil solubilidade a solventes aquosos e orgânicos em comparação com DPPH. São baseados na mesma capacidade de sequestros de radicais livres. A única diferença, entre as metodologias, é devido a sua solubilidade em compostos antioxidantes diferentes. O mecanismo envolvido para avaliar a atividade antioxidante de plantas do DPPH e ABTS são semelhantes, pois agem na transferência de átomo de hidrogênio e de elétron [21,22,23].

Em um estudo da mesma família da *B. tetraphylla*, família Combretaceae, foi apresentado os mesmos resultados utilizando o método de DPPH para avaliar a atividade antioxidante com plantas. O extrato metanólico de *B. tetraphylla* apresentou melhor resultado

de 83,73%, aproximado com o resultado do trolox de 98,93% em 1000 µg/mL. Já na fração do extrato metanólico a que apresentou melhor resultado foi a D (83,54%) de sequestros de radicais livres [24]. Em outro estudo avaliando o sequestro de radicais livres no reagente ABTS,também foi utilizando plantas da mesma família Combretaceae, demonstrou os seguintes resultados: *T. chebula* (4.52), *T. belerica* (1.01) e *E. officinalis* (4.10) expressos em percentagem de inibição [25].

A presença de flavonóides e taninos em *Eugenia uniflora* como um potencial atividade antioxidante [26]. Desta forma, podemos relacionar a atividade antioxidante no extrato metanólico de *B. tetraphylla*. Como descrito na literatura em estudo de outras famílias com os mesmos metabolitos secundários [27,28,29].

A atividade hemolítica pode ser avaliada por diversas técnicas, consistindo na dissolução de eritrócitos, membranas celulares, aumento da permeabilidade de membranas e lise celular. Estes métodos avaliam a ruptura de membrana e a morte celular, ou seja, consistem na verificação de possíveis danos de substâncias presentes nos extratos sobre as células do sistema hematopoiético em especial os eritrócitos que quando lisados liberam hemoglobina ao meio [30].

Foi relacionado presença de flavonóides nos extratos estudados com uma baixa citotóxidade. Desta forma pode se criar parâmetro importantes que podem respaldar uma avaliação de toxicidade em determinadas espécie vegetal, com isso garantindo a segurança de seu uso [31,19,32].

Em pesquisa mostrou a presença do flavonóide nos extratos das plantas investigadas, apresentando uma baixa citotóxica [33]. Assim, esta atividade pode ser considerada um parâmetro de citotoxidade importante que somado a outros critérios de toxicidade podem respaldar a avaliação de segurança do uso de determinada espécie vegetal [19,34]. Sabe-se que muitas plantas medicinais utilizadas pela população na forma de chás e infusões não são suficientemente estudadas quanto à presença de substâncias citotóxicas que podem causar efeitos adversos e conseqüentemente danos à saúde [35].

Estudos relacionados com a atividade antimicrobiana avaliam a sobrevivência das larvas infectadas após a inoculação do composto a ser estudado. Também podem ser avaliados os mecanismos relacionados à imunidade inata do inseto (produção de espécies reativas e peptídeos antimicrobianos, fagocitose, etc) [35]. *T. molitor* é susceptível a patógenos como *Escherichia coli* [36] e *Staphylococcus aureus* [37], que são capazes de persistir dentro do

inseto infectado, e provocar alterações em tecidos, hemolinfa, e fagócitos. O sistema imune deste inseto já possui algumas vias de sinalização conhecidas, como a via Toll, a cascata profenoloxidase e a via de autofagia [36]. Estas características têm favorecido o uso deste inseto como modelo alternativo de infecção para estudos de patogenicidade, e de atividade antimicrobiana e antivirulência *in vivo* [37,38].

Como outros organismos, *T. molitor* também possui um sistema de defesa antioxidante, responsável pela neutralização de espécies reativas em excesso. Este sistema é compostos por diversas enzimas antioxidantes e desintoxicantes como superoxide dismutases (SODs), peroxidases (PODs), catalases (CATs), bem como tirosinase (TYR), acetilcolinesterase (AChE), carboxilesterase (CarE), and glutatione S-transferase (GSTs) [34] Estudos prévios demonstraram um aumento da produção de espécies reativas em resposta a infecção de larvas de *T. molitor* [34,39]. Como discutido anteriormente, a produção exarcebada de espécie reativas é deletéria para os organismos, levando a danos moleculares que culminam na indução de vias de morte celular. A capacidade de *T. molitor* de produzir espécies reativas em resposta à infecção faz deste inseto um modelo potencial para o estudo de substâncias com caráter antioxidante. Neste caso, um agente com potencial atividade antioxidante *in vitro* deve ser inoculado na larva submetida ao estresse oxidativo (induzida por um patógeno ou algum componente microbiano). A ação protetora do agente é evidenciada pelo aumento da sobrevivência das larvas tratadas em comparação a larvas não tratadas. Esta abordagem utilizando larvas poderia trazer mais informações que aquelas tradicionalmente utilizadas para a prospecção antioxidante, baseadas na interação química de compostos e sem relevância biológica [40]. Por se tratar de um organismo multicelular, esta plataforma também apresenta vantagens em relação àquelas que utilizam células. Em adição, esta plataforma também avaliaria a toxicidade do agente antioxidante. Estudos antioxidantes utilizando organismos são bem estabelecidos para outros invertebrados, como o *Caenorhabitis elegans* [41,42], no entanto, ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo utilizando *T. molitor*. O uso deste inseto oferece algumas vantagens, em relação ao *C. elegans*, como facilidade de manuseio e a possibilidade da inoculação direta do agente antioxidante na larva.

5 CONCLUSÃO

Em conclusão, este trabalho mostrou que *B. tetraphylla* é uma grande fonte de agentes antioxidantes. Demonstrando também que o extrato e suas frações, não apresentaram toxicidade contra eritrócitos humanos. Esse estudo também contribui para pesquisas posteriores de plantas medicinais.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às agências brasileiras (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) pelo apoio financeiro concedido para realização deste trabalho.

REFÊRENCIAS

[1] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int. J. Biochem. Cell Biol., v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007**.**

[2] Cotinguibaa GG, Silva JRN, Azevedo RRS, Rocha TJM, Santos AF. Methods of the antioxidant defense: a literature review. Unopar cient ciênc biol saúde. 2013;15(3):231-7.

[3] Botterweck AAM, Verhegen H, Goldbohm RA, Kleinjans J, Van den brandt PA (2000). Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands Cohort Study. Food Chem. Toxicol. 38:599-605.

[4] Brasil. Ministério da Saúde. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos.Brasília, DF, 2006b.

[5] Di Stasi LC. Plantas medicinais: verdades e mentiras: o que os usuários e os profissionais de saúde precisam saber. São Paulo: Ed. UNESP, 2007.

[6] Carvalho ACB, Silveira D. Drogas vegetais: uma antiga nova forma de utilização de plantas medicinais. Brasília Med. 2010;48(2):219-237.

[7] Jandú JJB, Da Silva LCN, Silva MV, CORREIA MTS. Antimicrobial activity and synergistic effects of an ethyl acetate fraction from methanol extract of Myracrodruon urundeuva bark. Journal of Medicinal Plant Research, v. 9, p. 641-646, 2015.

[8] Da Silva LCN, Silva-Júnior CA, Souza RM, Macedo AJ, Silva MV, Correita, MTS. Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrina, Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. Food Chem. Toxicol. 2011. 49:2222-2228.

[9] Trentin DS, Giordani RB, Zimmer KR, Silva AG, Silva MS, Correira MTS, Baumvol IJR, Macedo AJ. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. Journal Ethnopharmacol. 2011. 137:327-35.

[10] Oliveira YLC, Silva LCN, Silva AG, Macedo AJ, Araújo JM, Correia MTS, Silva MV. Antimicrobial Activity and Phytochemical Secreening of *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) R. A. Howard (Combretaceae: Combretoideae). **The Scientific World Journal.** Volume 2012.

[11] Weaver PL. "*Buchenavia tetraphylla* (Vahl.) Eichler: Granadillo," Tech. Rep. SO-ITF-SM-43, Department of Agriculture, Southern Forest Experiment Station, New Orleans, 1991.

[12] Agra MF, Baracho GS, Silva KN, Basílio IJLD, Coelho VPM. Medicinal and poisonous diversity of the flora of "Cariri Paraibano", Brazilian journal of pharmacognosy, 111, 383-395. 2007A.

[13] Agra MF, Silva KN, Basílio IJLD, Freitas PF, Barbosa-Filho JM. Survey of medicinal plants used in the region northeast of Brazil. Brazilian jornal of Pharmacognosy, 18, 472-508. 2008.

[14] Agra MF, Freitas PF, Barbosa-Filho JM. 17 Synopsis of the plants know as medicinal and poisonous in northeast of Brazil. Brazilian journal of pharmacognosy, 114-140. 2007.

[15] Singleton VL, Rossi JAJr. Colorimetry of total phelics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Amer. J. Enol. Viticult. 16:144-58, 1965.

[16] Woisky RG, Salatino A. Analysis os propolis: some parameters ond prodecore for chemical fuality control. Journal Apicultural Research, 1998.

[17] Blois MS. Antioxidante Determinations by the use of a stable free radical. Nature 181, 1199-1200 (26 April 1958).

[18] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Eavns C. Antioxidant activity applyning na improved ABTS radical cátion decolorization assay. Free Radical Biology & Medicine, Vol. 26, Nos. 9/10, pp. 1231-1237, 1999.

[19] Oliveira YLC, Silva LC, Silva AG, Macedo AJ, Araújo JM, Correia MTS, Silva MV. Antimicrobial Activity and Phytochemical Screening of Buchenavia tetraphylla (Aubl.) R. A. Howard(Combretaceae: Combretoideae). The Scientific World Journal.Volume 2012.

[20] Gul MZ, Bhakshu LM, Ahmad F, Kondapi AK, Qureshi IA, Ghazi IA. Evaluation of *Abelmoschus moschatus* extracts for antioxidant, free radical scavenging, antimicrobial and antiproliferative activities using *in vitro* assays. BMC Complementary and Alternative Medicina. 2011, 11:64.

[21] Iqbal S, Younas U, Sirajuddin, Chan K W, Sarfraz RA, Uddin MK. Proximate composition and antioxidant potencial of leaves from three varieties of mulberry (*Morus* sp.): A comparative Study. International Journal of Molecular Sciences. 2012, 13, 6651-6664.

[22] Brito CAK, Siqueira PB, Souza JC, Bolini HMA. *In vitro* antioxidant capacity, phenolic, ascorbic acid and lycopene content of grava (*Psidium guajava* L.) juices and nectars. B.CEPPA. Curitiba, v. 27, n. 2, p. 175-182, jul./dez. 2009.

[23] Kasote DM, Katyare SS, Hegde MV, Bae H. Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications. International Journal of Biological Sciences. 2015; 11(8): 982-991.

[24] Ayres MCC, Chaves MH. Constituintes químicos e atividade antioxidante de extratos das folhas de *Terminalia fagifolia* mart. et zucc. Quim. Nova, vol. 32, no. 6, 1509-1512, 2009.

[25] Hazra B, Sarkat R, Biswas S, Mandal N. Comparative study of the antioxidant and reactive oxygen species scavenging properties in the extracts of the fruits of *Terminalia chebula*, *Terminalia belerica* and *Emblica officinalis*. BMC Complementary and Alternative Medicine. 2010, 10:20.

[26] Figueirôa EO, Silva LCN, Melo CML, Neves JKAL, Silva NH, Pereira VRA, Correia, MTS. Evaluation of antioxidant, immunomodulatory, and Cytotoxic action of fractions from *Eugenia uniflora* L. and *Eugenia malaccensis* L.:correlation with polyphenol and flavanoid content. The ScientificWorld Journal. 2013.

[27] Mello JCP, Santos SC, Simões CM, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3ed. PORTO ALEGRE: ED.UFGRS/ED.UFSC, 2001. CAP. 24, P.517-543.

[28] Muschietti LV, Martino VS, Yunes RA, Cechinel, FILHO V. ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS FLAVONÓIDES NATURAIS. Química de produtos naturais, novos

fármacos e a moderna farmacognosia. 2 ed. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 2009. P.189-218.

[29] Rocha WS, Lopes RM, Silva DBD, Vieira RF, Silva JPD, Costa TDSA . Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. Revista Brasileira de fruticultura, V. 33, N. 4, P. 1215-1221, 2011.

[30] Miyazaki CMS, Hirota BCK, Lima CP, Verdam MCS, Paula CS, Chaves SC, Nunes PMP, Miguel MD, Miguel OG. Coumarin isolation and comparative study of biological activities of Pterocaulon alopecuroides DC and Pterocaulon lorentzii Malme. International Journal of Phytomedicine, v. 5, p. 298-301, 2013.

[31] Violante IMP. Avaliação do potencial antimicrobiano e citotóxico de espécies vegetais do cerrado da região centro-oeste. Dissertação do programa de saúde e desenvolvimento da região centro-oeste. Universidade federal de mato grosso do sul. Campo Grande, 2008.

[32] Jandú JJB, Silva LCN, Pereira APC, Souza RM, Silva Junior CA, Figueiredo RCBQ, Araújo JM, Correia MTS, Silva MV. *Myracrodruon urundeuva* bark: an antimicrobial, antioxidant and non-cytotoxic agente**.** Journal of Medicinal Plants Research. Vol. 7(8), pp. 413-418, 25 February, 2013.

[33] Bagatini MD, Silva ACF, Tedesco SB. Uso do sistema teste de Allium cepa como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 17, n. 3, p. 444-447, 2007.

[34] Li X, Liu Q, Lewis EE, Tarasco E. Activity changes of antioxidant and detoxifying enzymes in Tenebrio molitor (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae infected by the entomopathogenic nematode Heterorhabditis beicherriana (Rhabditida: Heterorhabditidae). *Parasitology research*, *115*(12), 4485-4494, 2016.

[35] De Souza PC, Morey AT, Castanheira GM, Bocate KP, Panagio LA, Ito FA, Almeida, RS. Tenebrio molitor (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host to study fungal infections. Journal of microbiological methods, 118, 182-186, 2015.

[36] Seo GW, Jo YH, Seong JH, Park KB, Patnaik BB, Tindwa H, Han YS. The Silencing of a 14-3-3ε Homolog in Tenebrio molitor Leads to Increased Antimicrobial Activity in Hemocyte and Reduces Larval Survivability. *Genes*, *7*(8), 53, 2016.

[37] Mcgonigle JE, Purves J, Rolff J. Intracellular survival of Staphylococcus aureus during persistent infection in the insect Tenebrio molitos. Developmental & Comparative Immunology, Volume 59, June 2016, pages 34-38.

[38] Han SR, Lee BS, Junq KJ, Yu HJ, Yun EY, Hwang JS, Moon KS. Safety assessment of freeze-dried powdered *Tenebrio molitor* larvae (yellow mealworm) as novel food source: Evaluation of 90-day toxicity in Sprague-Dawley rats. Regulatory Toxicology and Pharmacology. Volume 77, June 2016, pages 206-212.

[39] Zhu JY, Ze SZ, Stanley DW, Yang B. Parasitization by Scleroderma guani influences expression of superoxide dismutase genes in Tenebrio molitor. Archives of insect biochemistry and physiology, 87(1), 40-52, 2014.

[40] Da Silva, LCN, Filho, CMB, Paula RAD, Silva CSS, De Souza LIO, Silva MVD, Figueiredo RCBQD. In vitro cell-based assays for evaluation of antioxidant potential of plant-derived products. Free radical research, 50(8), 801-812, 2016.

[41] Zhang J, Shi R, Li H, Xiang Y, Xiao L, Hu M, Huang Z. Antioxidant and neuroprotective effects of Dictyophora indusiata polysaccharide in Caenorhabditis elegans. *Journal of Ethnopharmacology*, *192*, 413-422, 2016.

[42]Wang Q, Huang Y, Qin C, Liang M, Mao X, Li S, Huang Z. Bioactive peptides from Angelica sinensis protein hydrolyzate delay senescence in Caenorhabditis elegans through antioxidant activities. Oxidative medicine and cellular longevity, 2016.

REFERÊNCIAS

AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FREITAS, P. F.; FILHO, J. M. B. Survey of medicinal plant sused in the region Northeast of Brazil. **Revista de farmacognosia**, 18(3):472-508, Jul./Set. 2008.

ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. C.; SILVA, A. C. O. Use of plant resources in a seasonal dry Forest (Northeastern Brazil). **Acta bot. bras.** 19(1): 27-38. 2005.

ALVES, E. O.; MOTA, J. H.; SOARES, T. S.; VIEIRA, M. C. Crescimentos e distribuição espacial de *Cronton urucurana* Baill em Dourados. **Revista Caatinga**, v.21, n. 1 p. 83-88, 2008.

AMENI, A. Z.; LATORRE, O. A.; TORRES, L. M. B.; GÓRNIAK, S. L. Toxicity study about a medicinal plant Casearia sylvestris: A contribution to the Brasilizn Unified Health System (SUS). **Journal of Ethnopharmacology.** 175 (2015) 9-13.

ARANDA-SOUZA, M. Â.; SOUZA, R. M.; JÚNIOR, C. A. S.; SILVA, L. C. N.; PEREIRA, D. S. T.; SILVA, M. V.; CORREIA, M. T. S. Antioxidant potential and total phenolic content of leaf extracts from *Parkinsonia aculeata* L. cultivated in Brazilian Natural product research biome. Curr. Top. Phytochem, v. 11, p. 95-101, 2012.

BETON, Daniela. **RESSALVA. Estrutura e função das cisteína proteinases intestinais do besouro *Tenebrio molitor*.** Tese (Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)). Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo 2009.

BEZERRA, B. M. O.; EVANGELISTA, J. N. B.; PINHEIRO, D. C. S. N. Impacts of oxidative stress in swine: Challenges and Perspectives. A reviuew. **Brazilian Journal of Hygiene and Animal Sanity.** V.9, n.4 (2015) 699-715.

BITU, V. C. N.; BITU, V. C. N.; MATIAS, E. F. F.; LIMA, W. P.; PORTELO, A. C.; COUTINHO, H. D. M.; MENEZES, I. R. A. Ethnopharmacological study of plants sold for therapeutic purposes in public markets in Northeast Brazil. . **Journal of Ethnopharmacology.** 172 (2015) 265-272.

COSTA, G. F. M.; NOCCHI, S. R.; CEOLE, L. F.; MELLO, J. C. P.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. D.; TEMPONI, L. G.; NAKAMURA, T. U. Antimicrobial activity of plants used as medicinals on na indigenous reserve in Rio das Cobras, Paraná, Brasil. **Journal of Ethnopharmacology.** 143 (2012) 631-638.

DAMBORSKY, M. P.; SANDRIGO, Y. T.; BAR, M. E.; OSCHEROV, E. **Ciclo de vida de *Tenebrio molitor* (Coleoptera, Tenebrionidae) en Condiciones Expecimentales.** Catédra de Artrópodos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura. UNNE. 9 de Julio 1449-(3400) Corrientes – Argentina.

DA SILVA, L.C.N.; SANDES, J. M.; PAIVA, M. M.; ARAÚJO, J. M.; FIGUEIREDO R. C. B. Q.; SILVA, M. V.; CORREIA, M. T. S. Anti-*Staphylococcus aureus* action of three Caatinga fruits evaluated by electron microscopy. **Nat. Prod. Res**., v. 27, n. 16, p. 1492-1496, 2013.

DA SILVA, L.C.N.; JÚNIOR, C. A. S.; SOUZA, R. M.; MACEDO, A. J.; SILVA, M. V.; CORREIA, M. T. S. Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrine, Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. **Food Chem. Toxicol**., v. 49, n. 9, p. 2222-2228, 2011.

DA SILVA, L.C.N.; FILHO, C. M. B; PAULA, R. A. D.; SILVA, C. S. S; DE SOUZA, L. I. O; SILVA, M. V. D.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. D. In vitro cell-based assays for evaluation of antioxidant potential of plant-derived products. **Free radical research**, 50(8), 801-812, 2016.

DE SOUZA, P. C.; MOREY, A. T.; CASTANHEIRA, G. M.; BOCATE, K. P.; PANAGIO, L. A.; ITO, F. A.; ALMEIDA, R. S. Tenebrio molitor (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host to study fungal infections. **Journal of microbiological methods**, 118, 182-186, 2015.

DUARTE, W. F. R.; JIN, J.; KUROBE, T.; TEH, S. J. Effects of prolonged exposure to low pH on enzymatic and non-enzymatic antioxidants in Japanese Medaka (*Oryzias latipes*). **Science of the Total Environment**. 568 (2016) 26-32.

FILHO, José Robson Neves Cavalcanti. **Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de óleos essenciais extraídos de *Buchenavia tetraphylla*.** Dissertação (Título de mestre pelo programa de Pós-graduação do Centro de Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pernambuco, Recife 2014.

GLÓRIA, Elanne Costa. **Caracterização físico-química de frutos de Mirindiba (*Buchenavia tomentosa)* Eichler, do cerrado Tocantinense.** Dissertação (Título de mestre pelo programa de Pós-graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Tocantins, Gurupi 2014.

HAN, S. R.; LEE B.S.; JUNQ K.J.; YU, H.J.; YUN, E.Y.; HWANG, J.S.; MOON, K.S. Safety assessment of freeze-dried powdered *Tenebrio molitor* larvae (yellow mealworm) as novel food source: Evaluation of 90-day toxicity in Sprague-Dawley rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. Volume 77, June 2016, pages 206-212.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estátistica. Reportagem: IBGE afirma que Brasil sera um país de idoso em 2030. 2014. Acesso: http://www.revistabrazilcomz.com/ibge-afirma-que-brasil-sera-um-pais-de-idosos-em-2030/

IPEA – Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. Reportagem: População brasileira deve atingir pico em 2030. 2010. Acesso: http://g1.globo.com/brasil/noticia/2010/10/populacao-brasileira-deve-atingir-pico-em-2030-diz-ipea.html

JOHNSON, S. C.; RABINOVITCH, P. S.; KAEBERLEIN, M. mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. **Nature**, v. 493, n. 7432, p. 338-345, 2013.

LEITÃO, F.; LEITÃO, S. G.; ALMEIDA, M. Z.; CANTOS, J.; COELHO, T.; SILVA, P. E. A. Medicinal plants from open-air markets in the State of Rio de Janeiro, Brazil as a potential source of new antimycobacterial agents. **Journal of Ethnopharmacology.** 149 (2013) 513-521.

LI, X.; LIU, Q.; LEWIS, E. E.; TARASCO, E. Activity changes of antioxidant and detoxifying enzymes in Tenebrio molitor (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae infected by the entomopathogenic nematode Heterorhabditis beicherriana (Rhabditida: Heterorhabditidae). ***Parasitology research***, *115*(12), 4485-4494, 2016.

LIMA, A. da C. **Insetos do Brasil.** 9° TOMO. Capítulo XXIX. Coleópteros 3ª parte. Escola Nacional de agronomia série didática, Nº 11 – 1955.

LINSINGEN, L. V.; CERVI, A. C.; GUIMARÃES, O. Sinopse taxonômica da família Combretaceae R. Brown na Região Sul do Brasil. **Acta bot. bras.** 23(3): 738-750. 2009.

MACHIELA, E.; DUES, D. J.; SENCHUK, M. M.; RAAMSDONK, J. M. V. Oxidative stress is increased in *C. elegans* models of Huntington's disease but does not contribute to polyglutamine toxicity phenotypes. **Neurobiology of Disease.** 96 (2016) 1-11.

MCGONIGLE, J. E.; PURVES, J.; ROLFF, J. Intracellular survival of Staphylococcus aureus during persistent infection in the insect Tenebrio molitos. **Developmental & Comparative Immunology**, Volume 59, June 2016, pages 34-38.

MICHELI, L.; CERRETANI, D.; COLLODEL, G.; MENCHIARI, A.; MOLTONI, L.; FIASCHI, A. I.; MORETTI, E. Evaluation of enzymatic and non-enzymatic antioxidants in seminal plasma of men with genitourinary infections, varicocele and idiopathic infertility. **Andrology – American Society of Andrology and European Academy of Andrology**, 2016, 4, 456-464.

MILLER, R. A. Extending life: scientific prospects and political obstacles. Milbank Q., v. 80, n. 1, p. 155-174, 2002.

MININEL, Francisco José. **RESSALVA. Estudo Fitoquímico de extratos polares e infusão das folhas *Terminalia catappa* L. (COMBRETACEAE) e avaliação das suas atividades antiulcerogênica e mutagênica.** Tese (Título de Doutor em Química). Universidade Estadual Paulista, Araraquara 2015.

MOREIRA, J. N.; LIRA, M. A.; SANTOS, M. V. F.; FERREIRA, M. A.; ARAÚJO, G. G. L.; FERREIRA, R. L. C. SILVA, G. C. Caracteriação da vegetação de Caatinga e da dieta de novilhos no Sertão de Pernambuco. **Pesq. Agropec. Brás**., Brasília, v.41, n.11, p.1643-1651, Nov. 2006.

MOREY, A. T.; DE SOUZA, F. C.; SANTOS, J. P.; PEREIRA, C. A.; CARDOSO, J. D.; DE ALMEIDA, R. S. C.; YAMAUCHI, L. M. Antifungal Activity of Condensed Tannins from Stryphnodendron adstringens: Effect on Candida tropicalis Growth and Adhesion Properties. **Current pharmaceutical biotechnology**, 17(4), 365-375.), (2016).

NAHAR, K.; RAHMAN, M.; HASANUZZAMAN, M.; ALAM, M. M.; RAHMAN, A.; SUZUKI, T.; FUJITA, M. Physiological and biochemical mechanisms of spermine-induced cadmium stress tolerance in mung bean (*Vigna radiate* L.) seedlings. **Environ Sci Pollut Res.** (2016) 23:21206-21218.

NASCIMENTO, V. T.; LUCENA, R. F. P.; MACIEL, M. I. S.; ALBUQUERQUE, U. P. Knowledge and Use of Wild Food Plants in Areas of Dry Seasonal Forests in Brazil. Ecol**. Food Nutr**., v. 52, n.4, p. 317-343, 2013.

OLIVEIRA, Fabiana Maciel de. **Perfil sérico de estresse oxidativo, antioxidantes e micronutrientes em pacientes com Hanseníase.** Dissertação (Título de mestre pelo Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara 2012.

OLIVEIRA, Y. L. C.; SILVA, L. C. N.; SILVA, A. G.; MACEDO, A. J.; ARAÚJO, J. M.; CORREIA, M. T. S.; SILVA, M. V. Antimicrobial Activity and Phytochemical Secreening of *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) R. A. Howard (Combretaceae: Combretoideae). **The Scientific World Journal.** Volume 2012.

PEDROSA, Alano Martins. **Estudo de citotoxicidade, inflamação e estresse oxidativo em neutrófilos de pacientes com anemia falciforme: Influência do tratamento com hidroxiuréia.** Dissertação (Título de mestre pelo Programa de Pós-graduação de Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza 2013.

RENZ, Sandro Volnei. **Oxidação e Antioxidantes.** Seminário apresentado da disciplina Bioquímica do tecido animal, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS. 2003.

RODRIGUES, Patrícia Siqueira de Melo. **Avaliação das atividade antimicrobiana, antioxidante e antineoplásica dos extratos etanólicos da casca e folhas da *Terminalia fagifolia* Mart. Et Zucc (Combretaceae).** Dissertação (Título de mestre pelo Programa de Pós-graduação em Ciências do Ambiente). Universidade Federal de Tocantins, Palmas 2016.

RUIZ, V. R.; BARZEGARI, A.; ZULUAGA, M.; VAHED, S. Z.; SAADAT, Y. R.; LETOURNEUR, D.; GUEGUEN, V.; DJAVID, G. P. Potential of aqueous extract of saffron

(*Crocus sativus* L.) in blocking the oxidantive stress by modulation of signal transduction in human vascular endothelial cells. **Journal of Functional Foods.** 26 (2016) 123-134.

SCHIAVON, Diane Bender Almeida. **Resgate etnobotânico de plantas medicinais e validação da sua atividade antibacteriana.** Tese (Título de Doutor pelo Programa de Pós-graduação em Veterinária – Área de concentração: Sanidade Animal). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas 2015.

SEO, G. W.; JO, Y. H.; SEONG, J. H.; PARK, K. B.; PATNAIK, B. B.; TINDWA, H.; HAN, Y. S. The Silencing of a 14-3-3ε Homolog in Tenebrio molitor Leads to Increased Antimicrobial Activity in Hemocyte and Reduces Larval Survivability. ***Genes***, *7*(8), 53, 2016.

SHER, A. Antimicrobial activity of Natural products from Medicinal Plants. **Gomal Journal of Medical Sciencies**, v.7, n.1 p. 72-78, 2009.

SILVA, M. I. G.; MELO, C. T. V.; VASCONCELOS, L. F.; CARVALHO, A. M. R.; SOUSA, F. C. F. Bioactivity and potential therapeutic benefits of some medicinal plants from the Caatinga (semi-arid) vegetation of Northeast Brazil: a review of the literature. **Brazilian Journal of Pharmacognosy.** 22(1): 193-207, Jan./Feb. 2012.

SILVA, N. M. F.; VALENTE, M. C. Flora da reversa Ducke, Amazonas, Brasil: Combretaceae. **Rodriguésia – Revista do Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. 56 (86): 131-140, 2005.

SIMÕES, Claúdia Maria Oliveira; SCHENKEL, Eloir Paulo; GOSMANN, Grace; MELLO, Jão Carlos Palazzo; MENTZ, Lilian Auler; PETROVICK, Pedro Ros. **Farmacognosia da planta ao medicamento.** 3ª edição. Editora da Universidade Federal de Santa Catarina e Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2001

SOUSA, Thiciana da Silva. **Contribuição ao conhecimento químico de *Combretum fruticosum stuntz* (Combretaceae).** Dissertação (Título de mestre pelo programa de Pós-graduação de química – Área de concentração em Química Orgânica). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza 2010.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN. M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int. J. Biochem. Cell Biol**., v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007**.**

VAN DER VALK, T.; VAN DER MEIJDEN, A. Toxicity of scorpion venom in chick embryo and mealworm assay depending on the use of the soluble fraction versus the whole venom. ***Toxicon***, *88*, 38-43.), 2014.

ZHANG, J.; SHI, R.; LI, H.; XIANG, Y.; XIAO, L.; HU, M., HUANG, Z. Antioxidant and neuroprotective effects of Dictyophora indusiata polysaccharide in Caenorhabditis elegans. ***Journal of Ethnopharmacology***, *192*, 413-422, 2016.

ZHU, J. Y.; ZE, S. Z.; STANLEY, D. W.; YANG, B. Parasitization by Scleroderma guani influences expression of superoxide dismutase genes in Tenebrio molitor. **Archives of insect biochemistry and physiology**, 87(1), 40-52, 2014.

WANG, X.; et al. The effect of chemical composition and bioactivity of several essential oils on Tenebrio molitor (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Insect Science**, v. 15, n. 1, p. 116, 2015.).

WANG, Q.; HUANG, Y.; QIN, C.; LIANG, M.; MAO, X.; LI, S.; HUANG, Z. Bioactive peptides from Angelica sinensis protein hydrolyzate delay senescence in Caenorhabditis elegans through antioxidant activities. **Oxidative medicine and cellular longevity**, 2016.

WEAVER, P. L. *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) R. Howard. Granadillo. New Orleans, LA: U.S. **Departament of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station.** 7p. 1991.

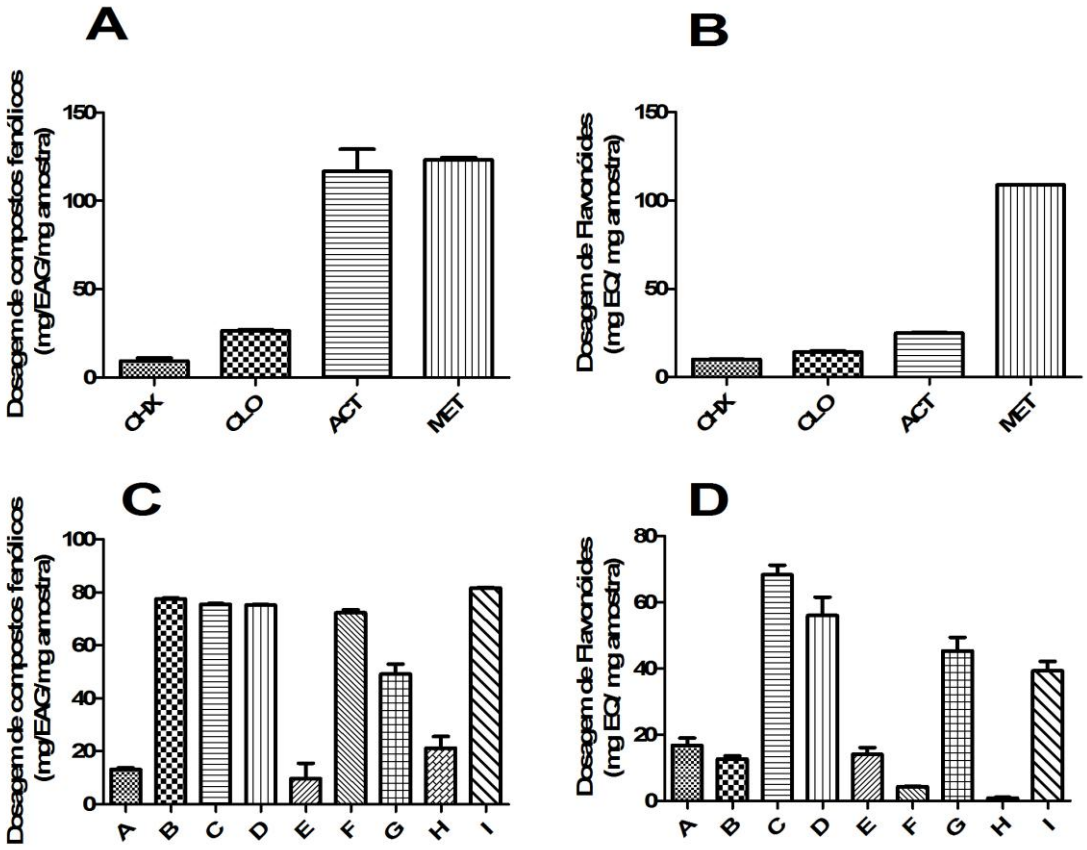


FIGURA 1. Conteúdo de compostos fenólicos (concentração de 1000 µg/mL) e flavonóides dos extratos bruto e frações do extrato metanólico obtidos de folhas *Buchenavia tetraphylla*. (A e C) Dosagem de compostos fenólicos dos extratos e frações A à I; (B e D) Dosagem de flavonóides dos extratos e frações A á I. CHX: extrato ciclohexânico; CLO: extrato clorofórmico; ACT = extrato de acetato de etila; MET: extrato metanólico. Nas figuras 1B e 1D, as frações do extrato metanólico foram denominadas de A a I.

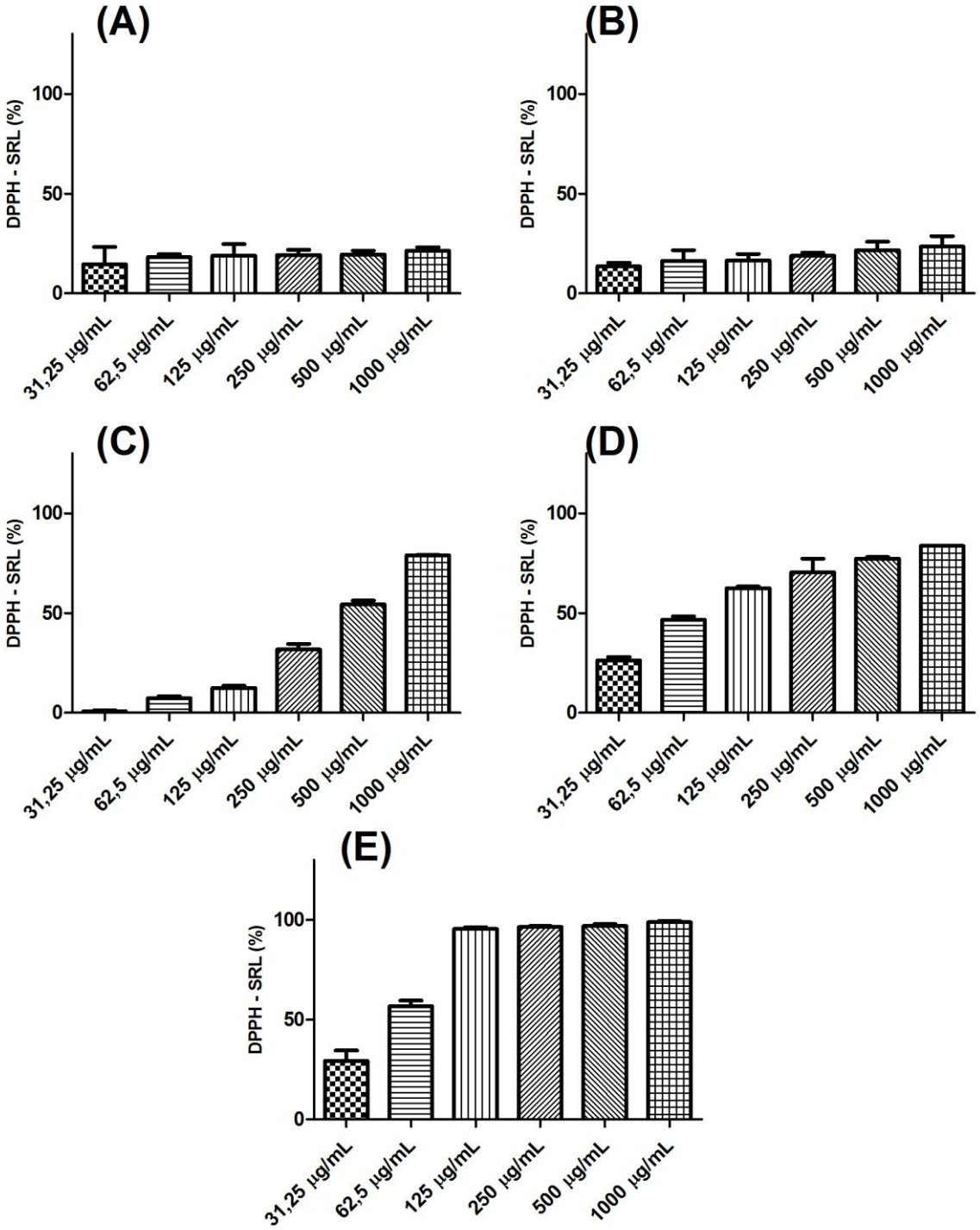


FIGURA 2. Atividade antioxidante pelo método de sequestro de radicais livres do DPPH dos extratos bruto da *Buchenavia tetraphylla* e Trolox. (A) Extrato Hexanico; (B) Extrato Clorofórmico; (C) Extrato Acetato de Etila; (D) Extrato Metanólico; (E) Trolox. CHX: extrato ciclohexânico; CLO: extrato clorofórmico; ACT: extrato de acetato de etila; MET: extrato metanólico.

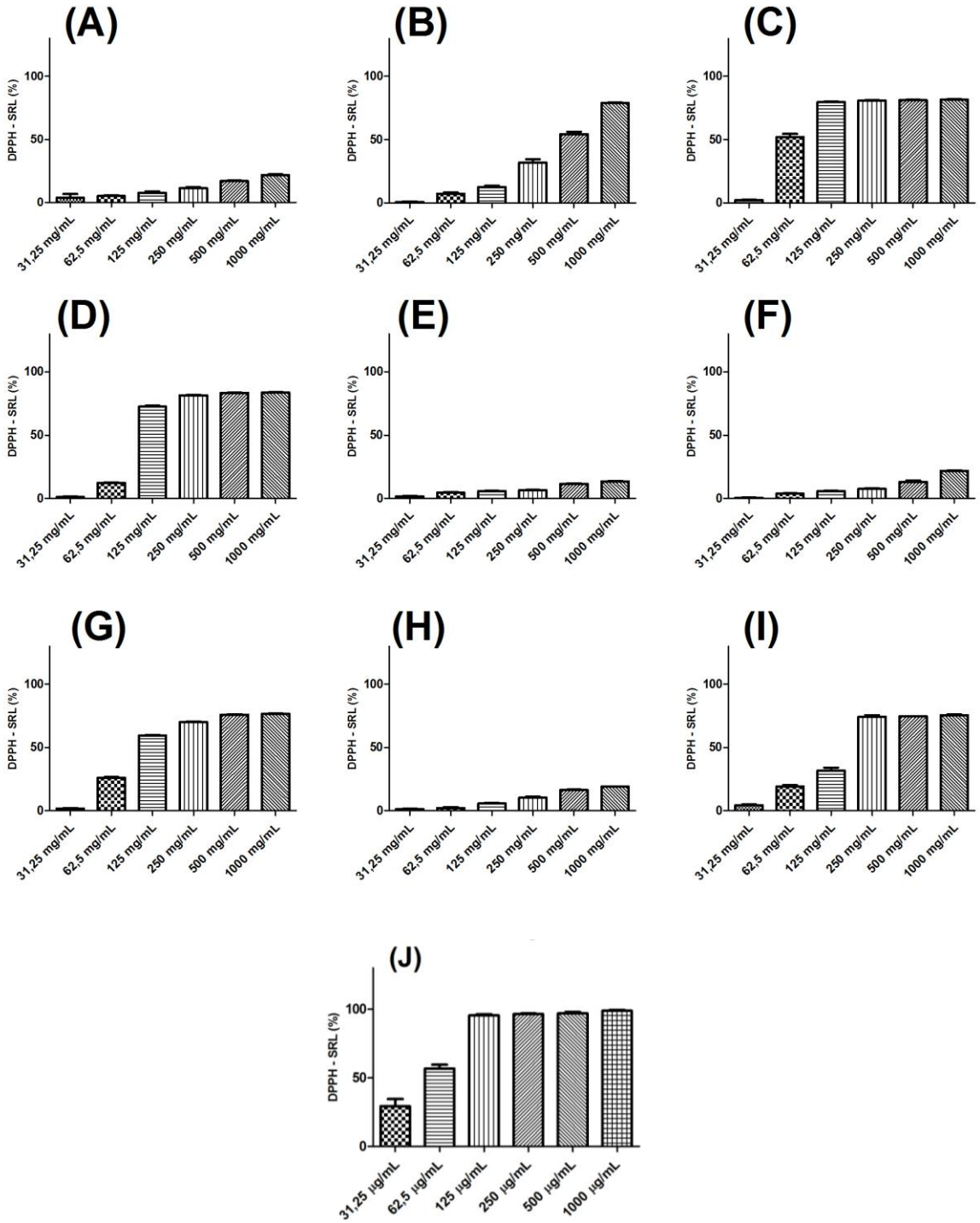


FIGURA 3. Atividade antioxidante pelo método de sequestro de radicais livres do DPPH das frações do extrato metanólico (A a I) da *Buchenavia tetraphylla*. (A) Fração A; (B) Fração B; (C) Fração C; (D) Fração D; (E) Fração E; (F) Fração F; (G) Fração G; (H) Fração H; (I) Fração I; (J) Trolox.

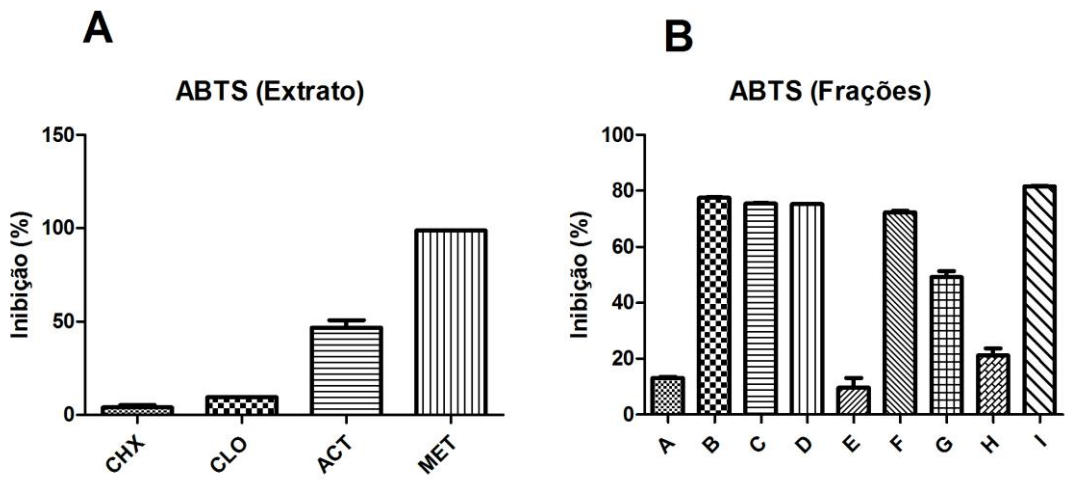


FIGURA 4. Atividade antioxidante pelo método de sequestro de radicais livres do ABTS (em 6 minutos) dos extratos bruto e frações do extrato metanólico (concentração de 1000 µg/mL) da *Buchenavia tetraphylla*. (A) Extratos brutos; (B) Frações do extrato metanólico. CHX: extrato ciclohexânico; CLO: extrato clorofórmico; ACT = extrato de acetato de etila; MET: extrato metanólico. Na figura 4B, as frações do extrato metanólico foram denominadas de A a I.

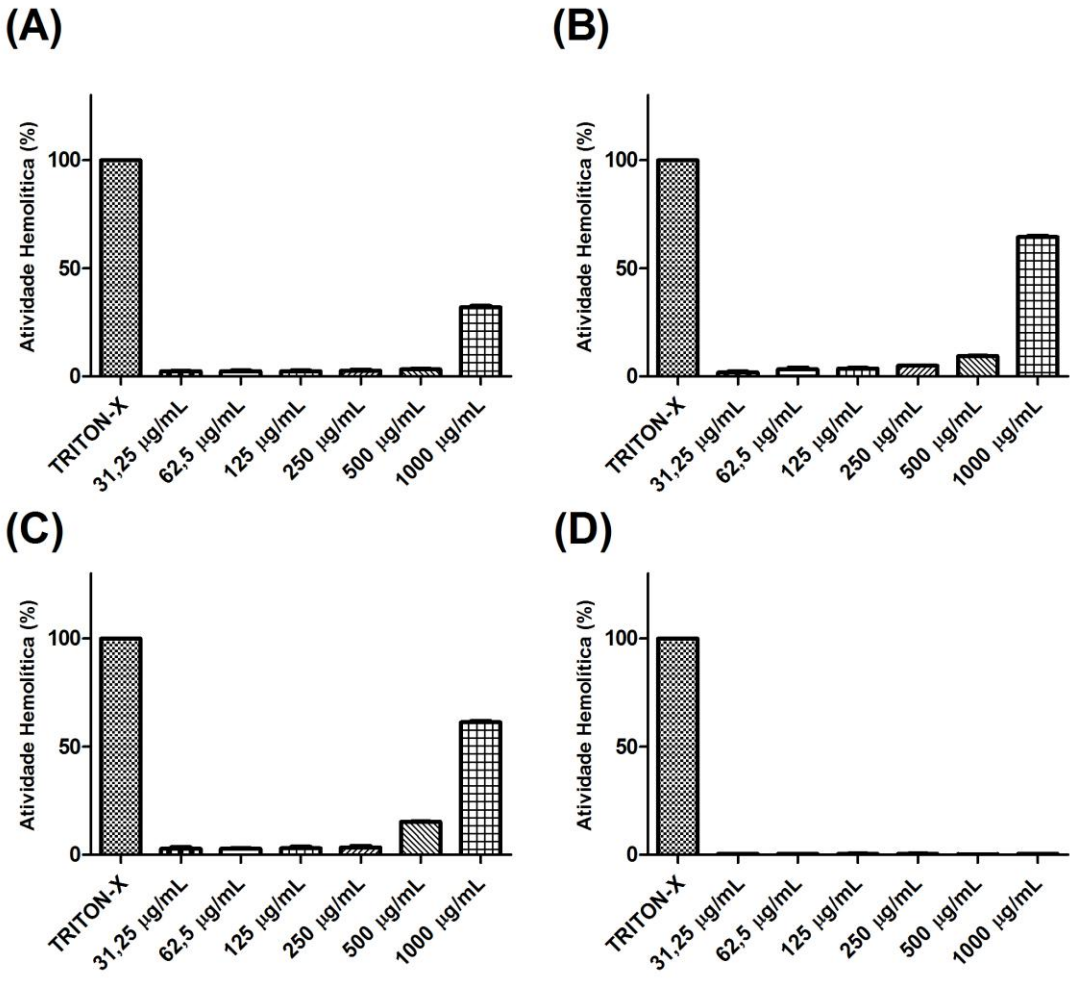


FIGURA 5. Atividade hemolítica dos extratos bruto da *Buchenavia tetraphylla*. (A) Extrato Hexanico; (B) Extrato Clorofórmico; (C) Extrato Acetato de Etila; (D) Extrato Metanólico.

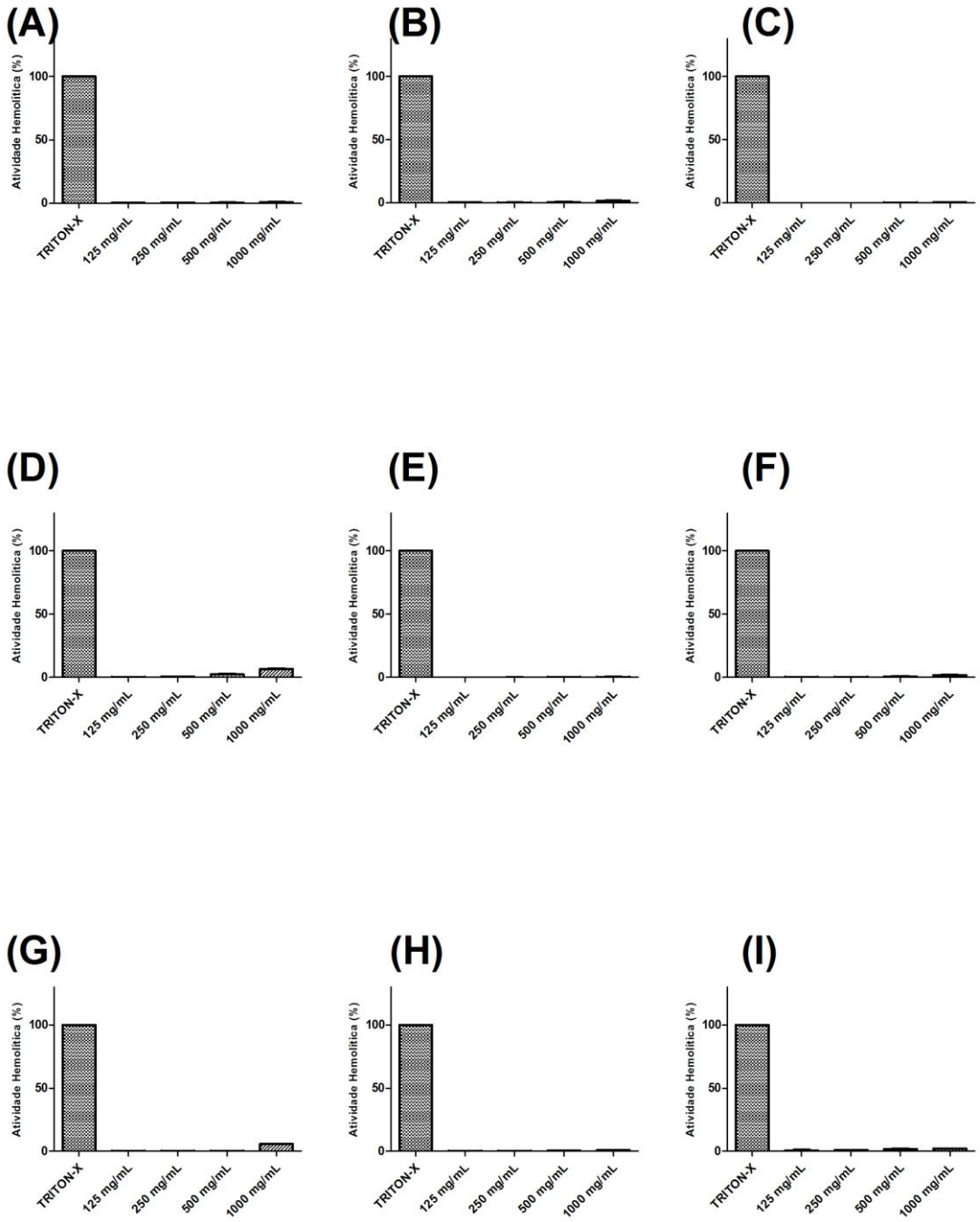


FIGURA 6. Atividade hemolítica das frações metanólico da *Buchenavia tetraphylla*. (A) Fração A; (B) Fração B; (C) Fração C; (D) Fração D; (E) Fração E; (F) Fração F; (G) Fração G; (H) Fração H; (I) Fração I.

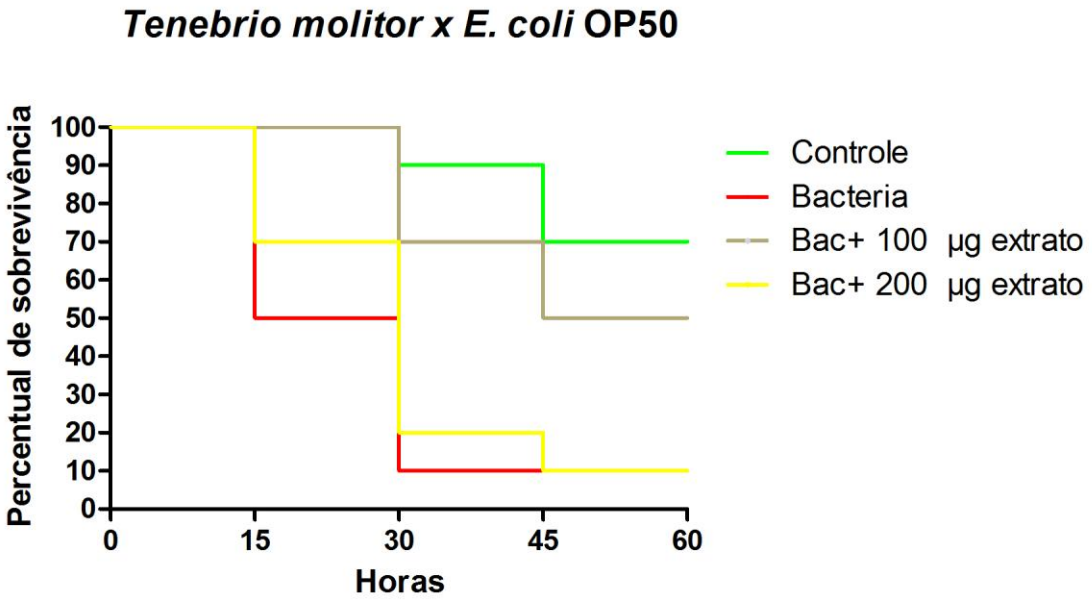


Figura 7. Avaliação de sobrevida do *Tenebrio molitor* com o extrato bruto metanólico pelo estresse causado pela *Escherichia coli* inativa.

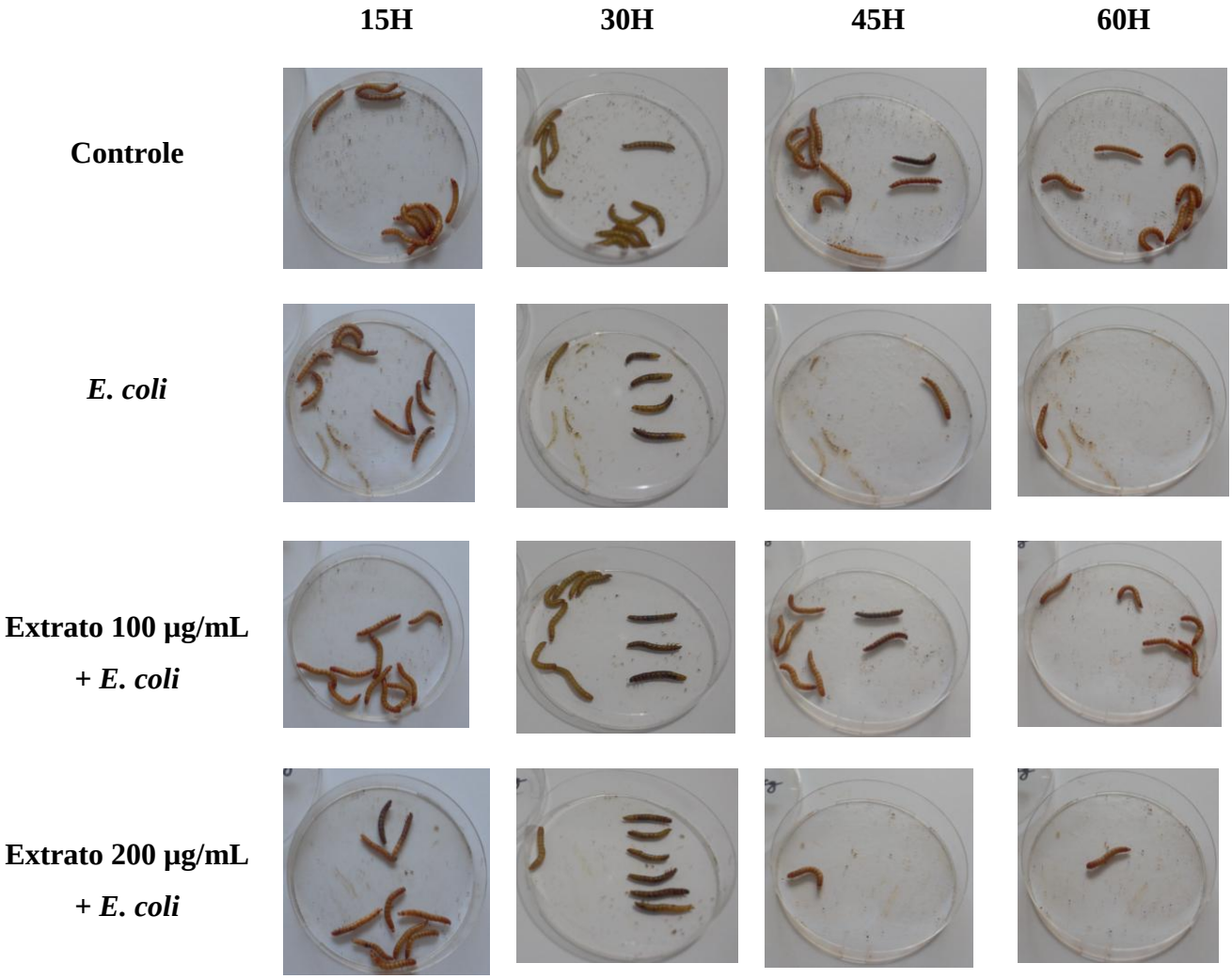


Figura 8. Avaliação da infecção por *Escherichia coli* inativa em *T. molito* tratados com extrato metanólico da folha de *B. tetraphylla*. 1) Seleção das larvas de cor clara e apresentando a mesma morfologia, sem marcas acinzentadas, amarronzada ou escura; 2) Foi inoculada injetando no 4º segmento anelar, no sentido da calda a cabeça, na porção ventral; 3) Em 15, 30, 45 e 60 horas foi observado os vivos e os mortos, retirando sempre os mortos; 4) A melanização escura, manchas escuras, apresentam um estresse ocorrido.

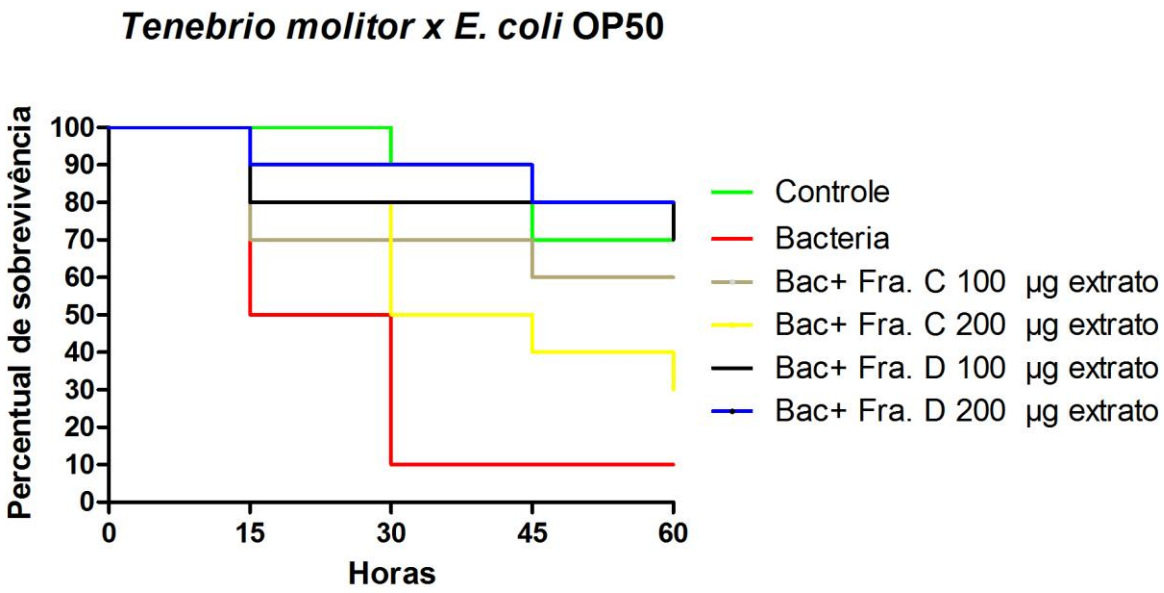


Figura 9. Avaliação de sobrevida do *Tenebrio molitor* com as frações C e D extrato bruto metanólico pelo estresse causado pela *Escherichia coli* inativa.

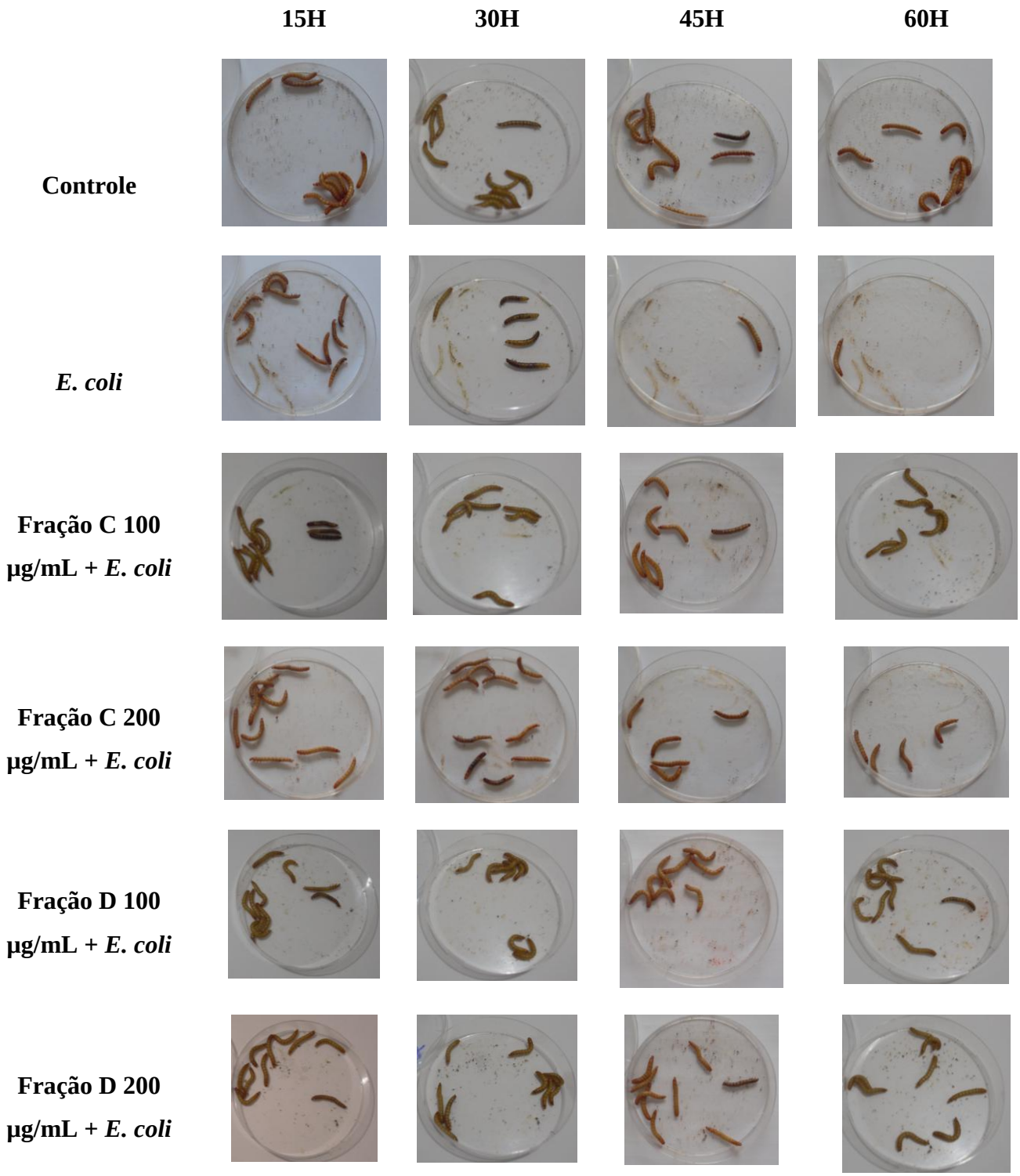


Figura 10. Avaliação da infecção por *Escherichia coli* inativa em *T. molito* tratados com frações C e D do extrato metanólico da folha de *B. tetraphylla*. 1) Seleção das larvas de cor clara e apresentando a mesma morfologia, sem marcas acinzentadas, amarronzada ou escura; 2) Foi inoculada injetando no 4º segmento anelar, no sentido da calda a cabeça, na porção ventral; 3) Em 15, 30, 45 e 60 horas foi observado os vivos e os mortos, retirando sempre os mortos; 4) A melanização escura, manchas escuras, apresentam um estresse ocorrido.

APENDICE 1

VI International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology - BioMicroWorld2015.

Microbes in the spotlight: recent progress in the understanding of beneficial and harmful microorganisms. Barcelona, Spain, p. 260 , 263 , 04 Ago. 2016 .

ISBN-10: 1627346120

ISBN-13: 9781627346122

Editor: A. Méndez-Vilas

Publisher: BrownWalker Press

Publication date: 2016

Biological activities of methanolic extract of *Buchenavia tetraphylla*

J.R.N. Cavalcanti Filho[*,1,2], K.P.M. Silva[2], L.M. Cruz[1], T.F. Silva[1], B.S. Santos[1], F.V.F. Arruda [2], M.C.V. Vicalvi-Costa[2], N.B. Gusmão[2], M.V. Silva[1], L.C.N. Silva[3] and M.T.S. Correia[1].

[1]Departament of Biochemistry, Federal University of Pernambuco, 50670-420 Recife, Pernambuco, Brazil

[2]Departament of Antibiotics, Biological Sciences Center, Federal University of Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rêgo, S/n Cidade Universitária, 50670-420 Recife, PE, Brazil

[3]Functional Genomic, Departament of Biology, Faculty of Science, University of Copenhagem. Oleo Maales Vej 5, 2200, Copenhague, Denmark

[*]Corresponding author: e-mail: robsonncavalcanti@gmail.com; Phone: +55997930302

The aim of this study was to evaluate the antimicrobial and antivirulence activities of the methanolic extract from leaves of *Buchenavia tetraphylla* against *Candida albicans*. The antimicrobial activity was assayed through determination of minimum inhibitory and

microbicide concentrations (MIC and MMC) by broth microdilution method (using 10 strains of *C. albicans*). The antivirulence properties were evaluated by traditional antibiofilm and anti-hyphae assays. The MIC values ranged from 0.078125 mg/mL to 1.25mg/mL; and CMM of 0.15625 mg/mL to 2.5 mg/mL. At sub-inhibitory concentrations (MIC/2 and MIC/4), a strong reduction in the biofilm formation was observed. Finally, the extract was able to totally inhibit the hyphae formation of two strains (UFPEDA1007 and F08). Thus, these results provide new insights into the biotechnological potential of *B. tetraphylla*, encouraging future researches regarding the identification of active (s) compound (s), and determinations of action mechanisms and pharmacological aspects. All these actions will support the use of *B. tetraphylla* derived compounds as antimicrobial agents.

Keywords: Combretaceae; Caatinga; antimicrobial; antivirulence

APENDICE 2

Planta Med 2016; 82(S 01): S1-S381
DOI: 10.1055/s-0036-1596611

ABSTRACTS

Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York

New insights into anti-S. aureus action of Buchenavia tetraphylla and Libidibia ferrea: inhibition of DNA replication

LC Nascimento da Silva[1, 2], J Robson Neves Cavalcanti Filho[3], C Macedo Bezerra Filho[3], T Fonseca da Silva[3], M Vanusa da Silva[3], MT dos Santos Correia[3], A Løbner-Olesen[1]

[1]Department of Biology, University of Copenhagen, Ole Maaløes Vej 5 2200 Copenhagen, Denmark

[2]Post-Graduate Program in Parasite Biology, University of CEUMA, Rua Josué Montello 1 65.075 – 120, São Luís, Brazil

[3]Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rêgo 50670 – 420, Recife, Brazil

Further Information

DNA replication is an essential process carried out by protein machinery with β-clamp (DnaN) playing a crucial role, which make it an attractive target for potential new antibiotics with high therapeutic index [1]. This work evaluated the ability of 30 extracts from 22 plants to prevent the dimerization of β-sliding clamp (DnaN) of *S. aureus*. The antimicrobial activity was evaluated against strain *S. aureus* 8325 – 4. DnaN-DnaN interaction was performed using a Bacterial two-hybrid system (BTH) and confirmed using *S. aureus* 8325 – 4 derivative strain overexpressing DnaN and flow cytometry [1]. The effects of SOS response was

evaluated using a *S. aureus* strain with integrated *recA:lacZ* reporter [1]. The combinatory effects with drugs (ciprofloxacin, ampicilin and chloramphenicol) and the mutagenic potential were also determined. The initial antimicrobial screening revealed that eight extracts were able to inhibit *S. aureus*, but only three extracts inhibited the in vivo interaction of DnaN-DnaN: methanolic (BTME) and ethyl acetate (BTEE)extracts from *Buchenavia tetraphylla* leaves, and aqueous extract from *Libidibia ferrea* fruits (LFAE). The antimicrobial activity of these two plants has been reported by our group [2,3]. Overexpression of DnaN in *S. aureus* resulted in resistance towards all these plant extracts. The active extracts induced an increase in cell mass without increase their DNA content, as expected for DNA replication inhibitors. LFAE and BTME showed synergistic and additive effects with chlorampenicol, respectively; and noninteractive effects with the other drugs. BTEE showed additive effects with all tested drugs. The extracts had mutagenic frequencies smaller than ciprofloxacin. This work provides more details about the anti-*S. aureus* actions of *B. tetraphylla* and *L. ferrea* which have DNA replication as potential target. The purification and structural characterization of active compounds from all these plants are the next step of our research.

Acknowledgements: Program Science without borders CAPES/Brazil.

Keywords: DnaN, Caatinga, natural products.

References:

[1] *Kjelstrup S, Hansen PMP, Thomsen LE, Hansen PR, Løbner-Olesen A.* Cyclic peptide inhibitors of the β-sliding clamp in *Staphylococcus aureus*. PloS one 2013; 8: e72273.

[2] *Oliveira YLC, Nascimento da Silva LC, Silva AG, Macedo AJ, Araújo JMD, Correia MTS, Silva MV.* Antimicrobial activity and phytochemical screening of *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) RA Howard (Combretaceae: Combretoideae). Sci World J 2012; 2012: 849302.

[3] *Silva LCN, Sandes JM, Paiva MM, Araújo JM, Figueiredo RCBQ, Silva MV, Correia MTS.* Anti-*Staphylococcus aureus* action of three Caatinga fruits evaluated by electron microscopy. Nat Prod Res 2013; 27: 1492 – 1496.

ANEXO

Normas da Revista

Free Radicals Research

Fator de Impacto: 2.949

Qualis CAPES: B1

Avaliação por pares

A Taylor & Francis está comprometida com a integridade da revisão por pares e com os mais altos padrões de revisão. Uma vez que o seu papel foi avaliado para a adequação pelo editor, será então duplo-cego peer-reviewed por independentes, anônimos peritos árbitros. Saiba mais sobre o que esperar durante a revisão pelos pares e leia nossa orientação sobre ética editorial.

Preparando seu trabalho

Todos os autores que se submetam à medicina, à biomedicina, às ciências da saúde, revistas de saúde aliadas e de saúde pública devem estar em conformidade com os Requisitos Uniformes para Manuscritos Submetidos a Revistas Biomédicas , preparado pelo Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas (ICMJE).

Estrutura

Seu trabalho deve ser compilado na seguinte ordem: página de rosto; abstrato; palavras-chave; Texto principal; Reconhecimentos; Declaração de declaração de juros; referências; Tabela (s) com legenda (s) (em páginas individuais); Figuras; Figura legendas (como uma lista).

Revisões: O corpo de um artigo de revisão deve ser uma revisão abrangente, baseada em evidências eruditas da literatura, acompanhada de análise crítica e levando a conclusões razoáveis. Sempre que adequado, devem ser fornecidos pormenores da metodologia de pesquisa bibliográfica, ou seja, as bases de dados pesquisadas, os termos de pesquisa e as datas de inclusão, bem como quaisquer critérios de selectividade impostos. Sempre que possível, use recursos primários, evitando "Dados em Arquivo", "Cartaz" ou outras referências não publicadas.

Contagem de palavras

Inclua uma contagem de palavras para o seu trabalho. Não existem limites de palavras para esta revista.

Diretrizes de estilo

Consulte estas diretrizes de estilo ao preparar seu artigo, em vez de artigos publicados ou uma cópia de amostra.

Por favor, use ortografia americana consistentemente em todo o seu manuscrito.

Por favor, use aspas duplas, exceto onde "uma cotação é" dentro de "uma citação". Observe que as citações longas devem ser recuadas sem aspas.

Formatação e modelos

Os artigos podem ser submetidos em qualquer formato padrão, incluindo Word e LaTeX. As figuras devem ser guardadas separadamente do texto. Para ajudá-lo na preparação do seu trabalho, fornecemos modelos de formatação.

Os modelos do Word estão disponíveis para este diário. Guarde o modelo no disco rígido, pronto para uso.

Um modelo LaTeX está disponível para esta revista. Guarde o modelo no disco rígido, pronto para uso.

Se não conseguir utilizar os modelos através dos links (ou se tiver outras consultas de modelo), contacte authortemplate@tandf.co.uk

Referências

Use este guia de referência ao preparar o seu trabalho. Um estilo de saída EndNote também está disponível para ajudá-lo.

Lista de verificação: o que incluir

1. **Detalhes do autor**. Certifique-se de que todos os requisitos do ICJME (Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas) sejam incluídos como autores do seu trabalho. Inclua os nomes completos dos autores, afiliações, endereços postais, números de telefone e endereços de e-mail na página de rosto. Onde estiver disponível, inclua também ORCiDs e identificadores de mídia social (Facebook, Twitter ou LinkedIn). Um autor terá de ser identificado como o autor correspondente, com o seu endereço de e-mail normalmente exibido no artigo PDF (dependendo da revista) e do artigo on-line. As afiliações dos autores são as afiliações onde a pesquisa foi conduzida. Se qualquer um dos co-autores nomeados mover a filiação durante o processo de revisão pelos pares, a nova afiliação pode ser dada como uma nota de rodapé. Por favor, note que nenhuma alteração à afiliação pode ser feita após o seu papel ser aceito. Leia mais sobre autoria.

2. Um **resumo** não estruturado de não mais de 250 palavras, resumindo o núcleo central de conhecimento que é o foco do artigo. Ele deve ser escrito em um estilo informativo permitindo o seu uso, sem revisão, por serviços de abstração, dar detalhes essenciais dos resultados da pesquisa sem mais referência a Leia dicas sobre como escrever o seu resumo.

3. **Resumo gráfico** . Esta é uma imagem para dar aos leitores uma idéia clara do conteúdo de seu artigo. Deve ter uma largura máxima de 525 pixels. Se a imagem for mais estreita que 525 pixels, coloque-a sobre um fundo branco de 525 pixels de largura para garantir que as dimensões sejam mantidas. Salve o resumo gráfico como .jpg, .png ou .gif. Por favor, não incorporá-lo no arquivo manuscrito, mas salvá-lo como um arquivo separado, denominado GaphicalAbstract1.

4. Você pode optar por incluir um **resumo de vídeo** com seu artigo. Descubra como estes podem ajudar o seu trabalho a atingir um público mais amplo, eo que pensar quando filmar.

5. Cinco **palavras-chave** . As palavras-chave ajudarão indexadores na indexação cruzada de seu artigo. Leia tornando seu artigo mais descoberto , incluindo informações sobre como escolher um título e otimização de mecanismo de busca.

6. **Detalhes de financiamento** . Forneça todos os detalhes exigidos pelos seus órgãos de financiamento e concessão de subvenções , como se segue: *Para* subvenções de *agência única* : Este trabalho foi apoiado pela [agência de financiamento] sob Grant [número xxxx].

Para subvenções múltiplas *agência* : Este trabalho foi apoiado pela [agência de financiamento] sob concessão [número xxxx]; [Agência de financiamento] em Grant [número xxxx]; E [agência de financiamento] sob concessão [número xxxx].

7. **Declaração de divulgação** . Isto é para reconhecer qualquer interesse financeiro ou benefício que surgiu a partir das aplicações diretas de sua pesquisa. Orientação adicional sobre o que é um conflito de interesses e como divulgá-lo.

8. **Informações de geolocalização.** Submeter uma seção de informações de geolocalização, como um parágrafo separado antes de seus agradecimentos, significa que podemos indexar a área de estudo do seu papel com precisão no banco de dados da literatura geográfica do JournalMap e tornar seu artigo mais acessível a outras pessoas. Mais informações.

9. **Material on-line suplementar.** Material suplementar pode ser um vídeo, conjunto de dados, conjunto de arquivos, arquivo de som ou qualquer coisa que suporte (e é pertinente) para o seu papel. Nós publicamos o material suplementar em linha através de Figshare. Saiba mais sobre material suplementar e como enviá-lo com seu artigo.

10. **Figuras.** As figuras devem ser de alta qualidade (1200 dpi para arte de linha, 600 dpi para tons de cinza e 300 dpi para cores). As figuras devem ser salvas como arquivos TIFF, PostScript ou EPS.

11. **Tabelas.** As tabelas devem apresentar novas informações em vez de duplicar o que está no texto. Os leitores devem ser capazes de interpretar a tabela sem referência ao texto. Forneça arquivos editáveis.

12. **Equações** . Se você estiver enviando seu manuscrito como um documento do Word, verifique se as equações são editáveis. Mais informações sobre símbolos matemáticos e equações.

13. **Unidades.** Utilize unidades SI (não itálico).

Usando material de terceiros em seu trabalho

Você deve obter a permissão necessária para reutilizar material de terceiros em seu artigo. O uso de curtos extratos de texto e alguns outros tipos de material é geralmente permitido, de forma limitada, para fins de crítica e revisão sem obter permissão formal. Se você deseja incluir qualquer material em seu papel para o qual você não possui direitos autorais e que não

está coberto por este acordo informal, você precisará obter permissão por escrito do proprietário dos direitos autorais antes da submissão. Mais informações sobre como solicitar permissão para reproduzir trabalhos sob copyright.

Declaração de divulgação

Inclua uma declaração de divulgação de juros, usando o subtítulo "Divulgação de juros". Se você não tem nenhum interesse para declarar, por favor, indique isso (sugestão de redação: *Os autores relatam nenhum conflito de interesse*). Para todos os documentos financiados pelo NIH / Wellcome, o (s) número (s) de concessão deve (m) ser incluído (s) na divulgação da declaração de juros. Leia mais sobre declarar conflitos de interesse.

Registro de Ensaios Clínicos

Para serem publicados numa revista Taylor & Francis, todos os ensaios clínicos devem ter sido registados num repositório público no início do processo de investigação (antes da inscrição do doente). Os números de registo de ensaio devem ser incluídos no resumo, com detalhes completos na secção de métodos. O registro deve ser acessível ao público (sem custo adicional), aberto a todos os potenciais inscritos e gerido por uma organização sem fins lucrativos. Para obter uma lista de registos que satisfazem estes requisitos, visite a Plataforma Internacional de Registos de Ensaios Clínicos da OMS (ICTRP). O registro de todos os ensaios clínicos facilita o compartilhamento de informações entre clínicos, pesquisadores e pacientes, aumenta a confiança do público na pesquisa e está de acordo com as diretrizes do ICMJE.

Cumprimento da ética da experimentação

Certifique-se de que todas as pesquisas relatadas nos trabalhos apresentados foram conduzidas de maneira ética e responsável e estão em total conformidade com todos os códigos relevantes de experimentação e legislação. Todos os artigos que relatam experiências *in vivo* ou ensaios clínicos em seres humanos ou animais devem incluir uma declaração escrita na seção Métodos. Isso deve explicar que todo o trabalho foi conduzido com a aprovação formal do comitê humano local ou de comitês de cuidado animal (institucional e nacional) e que os ensaios clínicos foram registrados conforme a legislação exige. Os autores que não possuam

comitês de avaliação ética formal devem incluir uma declaração de que seu estudo segue os princípios da Declaração de Helsinque.

Consentimento

Todos os autores devem seguir os requisitos do ICMJE sobre privacidade e consentimento informado de pacientes e participantes do estudo. Confirme que qualquer paciente, usuário do serviço ou participante (ou o pai ou o tutor legal dessa pessoa) em qualquer pesquisa, experimento ou ensaio clínico descrito no seu trabalho deu consentimento por escrito à inclusão de material pertencente a si, que reconhece que Não podem ser identificados através do papel; E que você os anonimizou completamente. Quando alguém está falecido, por favor, certifique-se de ter consentimento por escrito da família ou propriedade. Os autores podem usar este Formulário de Consentimento do Paciente , que deve ser preenchido, salvo e enviado ao periódico se solicitado.

Saúde e segurança

Confirme que todos os procedimentos obrigatórios de saúde e segurança do laboratório foram cumpridos no decurso da realização de qualquer trabalho experimental relatado no seu trabalho. Certifique-se de que seu papel contém todos os avisos apropriados sobre quaisquer perigos que possam estar envolvidos na realização dos experimentos ou procedimentos que você descreveu ou que possam estar envolvidos em instruções, materiais ou fórmulas.

Inclua todas as precauções de segurança relevantes; E cite qualquer padrão aceito ou código de prática. Autores que trabalham em ciências animais podem achar útil consultar a Associação Internacional de Conselheiros Veterinários Consenso Autor Orientações sobre Ética Animal e Bem-estar e Diretrizes para o Tratamento de Animais em Pesquisa Comportamental e Ensino . Quando um produto ainda não foi aprovado por um órgão regulador apropriado para o uso descrito em seu trabalho, especifique isto, ou que o produto ainda está em investigação.

Enviando seu artigo

Este periódico usa Esta revista usa o ScholarOne para gerenciar o processo de revisão por pares. Se você não enviou um artigo para esta revista antes, você precisará criar uma conta no

centro de submissão. Por favor, leia as orientações acima e, em seguida, envie seu trabalho no Author Center, onde você vai encontrar guias de usuário e um helpdesk.

Se você está enviando em LaTeX, por favor, converta os arquivos para PDF de antemão (você também precisará carregar seus arquivos fonte LaTeX com o PDF).

Por favor, note que a *Free Radical Research* usa Crossref ™ para exibir documentos para material não original. Ao enviar seu artigo para a *Free Radical Research*, você está concordando com verificações de originalidade durante os processos de revisão e produção de pares.

Após a aceitação, recomendamos que você mantenha uma cópia do seu Manuscrito Aceito. Saiba mais sobre como compartilhar seu trabalho.

Taxas de publicação

Não existem taxas de envio ou encargos de página para esta revista.

As figuras de cores serão reproduzidas em cores no seu artigo on-line gratuitamente. Se for necessário que as figuras sejam reproduzidas em cores na versão impressa, será aplicada uma taxa.

As taxas para os números de cor impressos são £ 250 por figura (US $ 395 dólares, US $ 385 dólares australianos, € 315). Para mais de 4 cores, os números 5 e acima serão cobrados em £ 50 por figura (US $ 80 dólares americanos, US $ 75 dólares australianos, € 63). Dependendo da sua localização, estas taxas podem estar sujeitas a impostos locais.

Opções de direitos autorais

O Copyright permite que você proteja seu material original e impede que outros usem seu trabalho sem sua permissão. Taylor & Francis oferece uma série de diferentes opções de licença e reutilização, incluindo licenças Creative Commons ao publicar o acesso aberto. Leia mais sobre acordos de publicação.

Cumprimento das agências de financiamento

Depositaremos todos os documentos do National Institutes of Health ou Wellcome Trust em PubMedCentral em nome dos autores, atendendo aos requisitos de suas políticas de acesso

aberto (OA). Se isso se aplica a você, informe nossa equipe de produção quando receber suas provas de artigos, para que possamos fazer isso por você. Verifique aqui os mandatos das políticas de OA dos financiadores. Saiba mais sobre como compartilhar seu trabalho.

Acesso livre

Esta revista dá aos autores a opção de publicar o acesso aberto através do nosso programa de publicação Open Select , tornando-o gratuito para acessar on-line imediatamente na publicação. Muitos financiadores mandam publicar seu acesso aberto à pesquisa; Você pode verificar políticas e mandatos do financiador de acesso aberto aqui.

Taylor & Francis Open Select dá a você, sua instituição ou financiador a opção de pagar uma taxa de publicação de artigos (APC) para tornar um artigo de acesso aberto. Entre em contato com openaccess@tandf.co.uk se você quiser saber mais ou vá ao nosso site de Serviços de Autor.

Para obter mais informações sobre opções de licença, períodos de embargo e APCs para esta revista, vá aqui.

Manuscritos Aceitos Online (AMO)

Esta revista publica manuscritos on-line o mais rápido possível, como um PDF do documento final, aceito (mas não editado e não corrigido). Isso é claramente identificado como um manuscrito não editado e é referido como o Manuscrito Aceito Online (AMO). Nenhuma alteração será feita no conteúdo do artigo original para a versão AMO, mas, após a edição de cópia, composição e revisão da prova resultante, será publicada a versão final corrigida (a Versão do Registro [VoR]), Substituindo a versão AMO.

O VoR é a versão do artigo que aparecerá em um número da revista. Ambos a versão AMO e VoR podem ser citados usando o mesmo DOI (identificador de objeto digital). Para garantir uma publicação rápida, pedimos que você devolva seu contrato de publicação assinado o mais rápido possível e retorne as correções dentro de 48 horas após receber suas provas.

Minhas obras autorizadas

Na publicação, você poderá visualizar, baixar e verificar as métricas de seu artigo (downloads, citações e dados Altmetric) por meio de Meus trabalhos criados no Taylor & Francis Online. Este é o lugar onde você pode acessar todos os artigos que você publicou conosco, bem como o seu link eprints livre , para que você possa rapidamente e facilmente compartilhar seu trabalho com amigos e colegas.

Estamos empenhados em promover e aumentar a visibilidade do seu artigo. Aqui estão algumas dicas e idéias sobre como você pode trabalhar conosco para promover sua pesquisa.

Artigo reimpressões

Para obter informações sobre reimpressões, entre em contato com a equipe Taylor & Francis Author Services em reprints@tandf.co.uk . Para solicitar uma cópia do problema que contém o seu artigo, entre em contato com nossa equipe de Atendimento ao Cliente em Adhoc@tandf.co.uk.

Consultas

Se você tiver alguma dúvida, por favor visite nosso site de serviços de autor ou entre em contato conosco em authorqueries@tandf.co.uk.