

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE PLANTAS DA FLORA
PERNAMBUCANA**

JOÃO DA ROCHA LINS NETO

ORIENTADORA: MARIA TEREZA DOS SANTOS CORREIA
CO-ORIENTADORA: MÁRCIA VANUSA DA SILVA

RECIFE
2015

JOÃO DA ROCHA LINS NETO

POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE PLANTAS DA FLORA
PERNAMBUCANA

ORIENTADORA: MARIA TEREZA DOS SANTOS CORREIA
CO-ORIENTADORA: MÁRCIA VANUSA DA SILVA

RECIFE
2015

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Lins Neto, João da Rocha

Potencial antioxidante de plantas da flora pernambucana/ João da Rocha Lins Neto– Recife: O Autor, 2015.

74 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Maria Tereza dos Santos Correia

Coorientadora: Márcia Vanusa da Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Bioquímica e Fisiologia, 2015.

Inclui

- 1. Fitoquímicos 2. Antioxidantes 3. Plantas I. Correia, Maria Tereza dos Santos (orientadora) II. Silva, Márcia Vanusa da (coorientadora) III. Título**

572.2

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015- 227

João da Rocha Lins Neto

Potencial antioxidante de plantas da flora Pernambucana

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

Aprovado por:

Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia - Presidente

Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva

Prof. Dr. Alexandre Gomes da Silva

Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual

Data: 24 / 02 / 2015

Dedico esta obra à minha família, amigos e a você leitor.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus pelo dom da vida, a saúde e a oportunidade de estar escrevendo neste exato momento essa lista de agradecimentos às pessoas que me deram suporte ao longo de minha caminhada na elaboração desta dissertação.

Meus agradecimentos mais do que especiais para as Professoras Maria Tereza dos Santos Correia e Márcia Vanusa da Silva, as quais foram as 2 pessoas mais importantes do meu mestrado por terem acreditado em mim em primeiro lugar e proporcionado condições para meu ingresso no programa de pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Gostaria de agradecer ao pessoal do laboratório de Bioquímica de Proteínas pela companhia e aprendizado durante meu primeiro ano de mestrado, com destaque para o mestre Carlos Eduardo por ter sido meu guia e praticamente um irmão nas etapas iniciais de minha pesquisa; ao Prof. Thiago Henrique Napoleão que sempre esteve por perto me auxiliando em inúmeros momentos, e ao Prof. Emmanuel Viana Pontual pelos diversos conselhos.

Sou bastante grato à equipe do laboratório de Biologia Molecular que me recebeu de braços abertos e foram bastante prestativos durante meu segundo ano de mestrado, em especial para a doutoranda Priscilla Andrade pelo companheirismo e orientações, ao doutorando Clóvis Macêdo e ao Dr. Alexandre Gomes da Silva pelas orientações prestadas nas etapas finais do meu mestrado. Meus sinceros agradecimentos também a Amanda Araújo do laboratório de Produtos Naturais.

Gostaria também de agradecer o apoio indireto de familiares e amigos, e ao suporte financeiro da Capes/CNPq.

“Se avexe não,
toda caminhada começa no primeiro passo”
Accioly Neto, cantor e compositor pernambucano (1950-2000)

RESUMO

O Brasil é considerado o país com a maior biodiversidade do mundo, nele as formações vegetais do Bioma Caatinga e Mata Atlântica representam fontes potenciais para a prospecção de biomoléculas de interesse científico. Entre essas biomoléculas encontram-se aquelas com atividade antioxidante, substâncias que são capazes de neutralizar ou reparar a ação dos radicais livres e dessa forma combatendo o estresse oxidativo. Vários antioxidantes sintéticos estão presentes no mercado, porém estudos vêm demonstrando a possibilidade de efeitos tóxicos desses produtos sintéticos, fato que gerou estímulo para a busca de antioxidantes naturais. O presente trabalho visou investigar a atividade antioxidante de extratos de folhas de 5 espécies vegetais encontradas no Bioma Caatinga e Mata Atlântica, a saber: *Abarema cochliacarpus* (AC), *Croton nummularius* (CN), *Myroxylon Peruiferum* (MP), *Stryphnodendron pulcherrimum* (SP) e *Tanaecium xanthophyllum* (TX) por 3 metodologias *in vitro*: ensaio do DPPH, ABTS e fosfomolibdênio (capacidade antioxidante total - CAT). Adicionalmente foi realizada uma investigação fitoquímica dos extratos por cromatografia em camada delgada (CCD) bem como dosagem do teor de fenóis e flavonoides totais com o intuito de apontar os possíveis compostos ativos responsáveis por tal atividade. A análise do perfil fitoquímico evidenciou a presença de saponinas, fenilpropanoides e flavonoides em todas os extratos, enquanto que terpenoides e proantocianidinas foram encontrados em AC, alcaloides em CN, cumarinas em MP, proantocianidinas e mono-sesquiterpenoides em SP. As dosagens de fenóis e flavonóides totais dos extratos variaram de 28,84 a 120,39 (mg EAG. g⁻¹ extrato) e 3,84 a 10,52 (mg EQ. g⁻¹ extrato), respectivamente. Os valores de CI₅₀ da atividade sequestradora de radicais DPPH variaram de 31,62 a 87,84 µg/mL. A porcentagem de sequestro de radicais ABTS variou de 20,92 a 75,69 % e a porcentagem da capacidade antioxidante total (%CAT) de 15,13 a 43,71 %. Foi evidenciado também uma correlação positiva entre o conteúdo de fenóis totais e atividade antioxidante pelos ensaios do radical ABTS ($\rho = 0,926$; $R^2 = 0,858$) e CAT ($\rho = 0,933$; $R^2 = 0,872$), o que indica o papel chave dos compostos fenólicos na atividade antioxidante dos extratos estudados. Mais estudos são requeridos no sentido de se isolar esses compostos para melhor caracterizá-los, assim como a realização de testes de atividade antioxidante *in vivo*.

Palavras-chave: *Abarema cochliacarpus*, *Croton nummularius*, *Myroxylon Peruiferum*, *Stryphnodendron pulcherrimum*, *Tanaecium xanthophyllum*, DPPH, ABTS, teor de fenóis, teor de flavonoides.

ABSTRACT

Brazil is considered the most biodiverse country in the world. Its vegetation areas from the Caatinga and Atlantic forest biomes represent potential sources for scanning biomolecules of scientific interest. Among these biomolecules are those endowed with antioxidant activity, substances capable to neutralize or repair the action of free radicals and thus fighting against oxidative stress. Several synthetic antioxidants are out there in the market, but studies have shown the possible toxic effects of these synthetic products, which became a stimulus for the search of natural antioxidants. This study aims to investigate the antioxidant activity of leaf extracts from 5 plant species found in the Caatinga and Atlantic forest biomes, namely: *Abarema cochliacarpus* (AC), *Croton nummularius* (CN), *Myroxylon Peruiferum* (MP), *Stryphnodendron pulcherrimum* (SP) e *Tanaecium xanthophyllum* (TX) by 3 *in vitro* methodologies: DPPH, ABTS radical scavenging activities and phosphomolybdenum method (total antioxidant capacity – TAC). Additionally a phytochemical screening of the extracts by thin layer chromatography (TLC) was conducted as well as measurement of total phenolic and flavonoid content in order to point out the possible active compounds responsible for such activity. The phytochemical screening analysis revealed the presence of saponins, flavonoids and phenylpropanoids in all plant extracts. However, terpenoids and proanthocyanidins were found in CA, alkaloids in CN, coumarins in MP, proanthocyanidins and mono-sesquiterpenoids in SP. Total phenolic and flavonoid content of the extracts ranged from 28.84 to 120.39 (mg GAE. g⁻¹ extract) and 3.84 to 10.52 (QE mg. g⁻¹ extract), respectively. The IC₅₀ values of DPPH radical scavenging activity ranged from 31.62 to 87.84 µg/mL. The percentage ABTS radical scavenging activity ranged from 20.92 to 75.69 % and the percentage total antioxidant capacity (%TAC) ranged from 15.13 to 43.71 %. It was also demonstrated a positive correlation between total phenolic content and ABTS radical scavenging activity ($\rho = 0.926$, $R^2 = 0.858$) and TAC ($\rho = 0.933$, $R^2 = 0.872$), which denotes the key role of phenolic compounds in the antioxidant activity of the extracts studied. Further studies are required in order to isolate these compounds to characterize them better as well as assessment of their antioxidant activity *in vivo*.

Keywords: *Abarema cochliacarpus*, *Croton nummularius*, *Myroxylon Peruiferum*, *Stryphnodendron pulcherrimum*, *Tanaecium xanthophyllum*, DPPH, ABTS, Phenolic content, Flavonoid content.

LISTA DE FIGURAS

Fundamentação teórica

Figura 1-	Plantas encontradas na flora Pernambucana	24
	A: <i>Abarema cochliacarpus</i> ; B: <i>Myroxylon peruiferum</i> ; C: <i>Stryphnodendron pulcherrimum</i> ; D: <i>Croton nummularius</i> ; E: <i>Tanaecium xanthophyllum</i>	

Artigo

Figure 1	Correlation between total phenolic content and antioxidant assays	69
Figure 2	Correlation between total flavonoid content and antioxidant assays	70

LISTA DE TABELAS

Artigo

Table 1 -	Phytochemical screening of plant extracts by thin layer chromatography	71
Table 2 -	Total phenolic content (mg GAE . g ⁻¹) and flavonoid content (mg QE . g ⁻¹)	72
Table 3 -	Effect of methanolic extracts on different antioxidant models	73

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS: 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6- sulfônico

AGES: Produtos finais da glicação avançada (Advanced glycation end products)

ALES: Produtos finais da peroxidação lipídica avançada (Advanced lipid peroxidation end products)

BHA: Butil-hidroxi-anisol

BHT: Butil-hidroxi-tolueno

DPPH: α -difenil- β -picril-hidrazila

ERE: Espécies reativas de enxofre

ERN: Espécies reativas de nitrogênio

ERO: Espécies reativas de oxigênio

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

MMA: Ministério do Meio Ambiente

NOSs: Óxido nítrico sintases específicas (Nitric oxide synthase specific)

OMS: Organização Mundial de Saúde

RE: Retículo endoplasmático

RCS: Espécies reativas de grupo carbonil (Reactive carbonyl species)

RHS: Espécies reativas de halogênio (Reactive halogen species)

UC: Unidades de conservação

8-HdG: 8-hidroxi-desoxiguanosina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
2.1 CAATINGA.....	15
2.2 MATA ATLÂNTICA.....	16
2.3 PLANTAS ENCONTRADAS NA FLORA PERNAMBUCANA	19
2.3.1 <i>Abarema cochliacarpus</i> (Gomes) Barneby & J. W. Grimes.....	19
2.3.2 <i>Myroxylon peruiferum</i> L. f.....	20
2.3.3 <i>Stryphnodendron pulcherrimum</i> (Willd.) Hochr.....	21
2.3.4 <i>Croton nummularius</i> Baill.....	21
2.3.5 <i>Tanaecium xanthophyllum</i> (DC.) L.G. Lohmann.....	23
2.4 ESTRESSE OXIDATIVO.....	25
2.4.1 Espécies reativas de oxigênio (ERO).....	26
2.4.2 Espécies reativas de nitrogênio (ERN).....	28
2.4.3 Outras espécies reativas.....	29
2.4.4 Dano oxidativo ao DNA, lipídios e proteínas.....	30
2.4.5 Antioxidantes.....	32
2.4.5.1 Principais antioxidantes enzimáticos.....	33
2.4.5.2 Principais antioxidantes não-enzimáticos.....	34
2.5 METABOLISMO SECUNDÁRIO.....	35
3 OBJETIVOS.....	39
3.1 GERAL.....	39
3.2 ESPECÍFICOS.....	39
4 REFERÊNCIAS.....	40
5 ARTIGO.....	52
6 CONCLUSÕES.....	74

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas com finalidade terapêutica confunde-se com a própria história da humanidade. Evidências relatam essa atividade pelas sociedades desde a antiguidade, como a obra chinesa Pen Ts'ao de Shen Nung por volta de 2800 A.C., e registros de filósofos da Grécia antiga sobre a propriedade medicinal de diversas plantas (CUNHA; SILVA; ROQUE, 2008; ELDIN; DUNFORD, 2001).

A medicina natural atravessou os séculos chegando até os dias atuais como prática amplamente exercida em todo o mundo, variando de acordo com as características sociais, culturais, econômicas, ambientais de cada região do globo (DEVIIENNE; RADDI; POZETTI, 2004).

De acordo com a organização mundial de saúde (2002), 80% da população mundial faz uso de vegetais com finalidade medicinal, destacando-se sobretudo os países em desenvolvimento, contudo sua prática está se tornando cada vez mais popular em países desenvolvidos. Nas últimas décadas tem se aumentado o interesse no uso de plantas medicinais de um modo geral. A OMS através da publicação de boletins e normas incentiva o uso, produção e desenvolvimento de medicamentos à base da flora disponível em cada região (BRASIL, 2009; OMS, 2002).

O Brasil possui uma das maiores biodiversidades do mundo, a qual confere um grande potencial no que diz respeito ao desenvolvimento científico sobre o uso medicinal de plantas e da mesma forma que em outros países em desenvolvimento, apresenta uma ampla prática de medicina tradicional, sobretudo nas camadas mais populares e nas regiões sob forte influência de culturas indígena e africana (FRUEHAUF, 2000). Muita pesquisa científica precisa ser feita no sentido de confirmar as propriedades terapêuticas dessas plantas, bem como verificar a dosagem ideal, efeitos toxicológicos, reações adversas, elucidação dos princípios ativos; para que ao final se obtenha um tratamento eficaz, seguro e de qualidade (AGRA et al., 2008).

A Caatinga e a Mata Atlântica são biomas que possuem uma rica diversidade de espécies em sua flora e dessa forma representam fontes promissoras para a descoberta de moléculas biologicamente ativas (ALVAREZ; KIILL, 2014; RIBEIRO et al., 2009).

Dentre essas moléculas de interesse tem-se os polifenóis, os quais constituem o maior grupo de compostos bioativos de origem vegetal (ARTS; HOLLMAN, 2005). Entre as ações fisiológicas exercidos pelos polifenóis encontram-se a prevenção de doenças neurodegenerativas, cardiovasculares, câncer, entre outras doenças degenerativas associadas com o envelhecimento, principalmente em função de uma elevada capacidade antioxidante destes compostos (SCALBERT; JOHNSON; SALTMARSH, 2005). Apesar de vários compostos antioxidantes naturais serem conhecidos e outros tantos serem sintetizados pela indústria alimentícia; é crescente a busca por antioxidantes naturais em plantas devido ao grande potencial biotecnológico e aplicações terapêuticas, e também pela falta de compreensão sobre supostos efeitos danosos à saúde dos antioxidantes sintéticos (ALVES; KUBOTA, 2005).

O presente trabalho visa investigar o potencial antioxidante por ensaios *in vitro* de folhas de plantas naturais da Caatinga ou da Mata Atlântica situadas no Estado de Pernambuco, com o objetivo de fornecer subsídios para um posterior isolamento de biomoléculas de interesse assim como ensaios de atividade antioxidante *in vivo*.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CAATINGA

A Caatinga é um bioma exclusivamente brasileiro, ocupa cerca de 11% do território nacional abrangendo os estados do Piauí, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Maranhão, Ceará, Alagoas, Sergipe, Bahia e Minas Gerais (MMA, 2015). O nome Caatinga vem do tupi e significa “mata branca”, tal termo designa uma característica de vários representantes de sua flora, os quais perdem suas folhas durante os períodos de seca e a cor verde do cenário de outrora dá lugar aos troncos e ramos esbranquiçados (PRADO, 2003).

A definição de Caatinga é complexa e controversa pois apesar de vários estudos já terem sido feitos, não existe um sistema de classificação ideal que abranja toda a variedade de formações vegetais encontradas na maior parte da área do clima semiárido brasileiro. Analisando as definições e delimitações já feitas sobre a Caatinga, é possível identificar algumas características básicas da vegetação: 1 - Uma vegetação localizada numa área mais ou menos contínua, submetida a um clima semiárido, bordejadas por áreas de clima mais úmido; 2 - Apresenta plantas com adaptações à deficiência hídrica (caducifolia, acúleos, espinhos, herbáceas anuais, suculência, predominância de arbustos e árvores de pequeno porte); 3 - Vegetação com espécies endêmicas a esta área de clima semiárido e de outras espécies que ocorrem nessa área e também em outras áreas de clima seco mais distantes, mas não ocorrem nas áreas bordeadas, de clima mais úmido que fazem limite com o semiárido (RODAL; SAMPAIO, 2002).

Nas últimas décadas alguns pesquisadores voltaram sua atenção à Caatinga e verificaram uma rica biodiversidade, heterogeneidade de vegetações e documentaram diversas espécies vegetais, entre elas um número considerável de espécies endêmicas; e dessa forma mudando a visão simplista que se tinha da Caatinga como uma região inóspita, resultado da degradação de outras vegetações como a Mata Atlântica (GIULIETTI et al., 2004).

Considerando-se a Caatinga no seu sentido mais amplo de bioma, dados recentes mostram que sua flora é representada por mais de 5000 espécies, das quais 991 são endêmicas e destas a família *Leguminosae* detém o maior número de endemismo, respondendo por cerca de 150 espécies (LISTA DE ESPÉCIES DA FLORA DO BRASIL, 2015); outras famílias importantes são *Convolvulaceae*, *Euphorbiaceae*, *Malpighiaceae*, *Poaceae* e *Cactaceae* (GIULIETTI; CONCEIÇÃO; QUEIROZ, 2006). A diversidade de vegetação da Caatinga pode

ser em parte explicada pela variabilidade de disposição hídrica e de solo, criando ambientes muito distintos: de aquáticos a rupestres, de Matas altas a Campos abertos, considerando também encraves de Matas úmidas e Cerrados (SAMPAIO, 2010).

Atualmente a Caatinga encontra-se bastante devastada por atividades antrópicas, merecendo destaque o extrativismo predatório (principalmente para a produção de lenha), agricultura e pecuária (SOUZA, 2006). Quase toda a vegetação das áreas mais úmidas (vales, pés de serra úmidos, brejos de altitude) deram lugar a plantações ou abertura de pastos. É estimado que cerca de 15% da região compreendida pela Caatinga encontra-se em processo de desertificação (SCHOBER, 2002). Em vista desse cenário preocupante torna-se necessário o estabelecimento de medidas preventivas para a preservação da diversidade biológica do bioma Caatinga; com esse intuito foram construídas unidades de conservação ao longo do território da Caatinga, todavia apenas 6,4% do bioma estão nominalmente protegidos, e a área protegida sob proteção integral perfaz somente 1,3% da área de Caatinga, muito abaixo das metas do ministério do meio ambiente e da conservação da diversidade biológica (MACIEL, 2010).

2.2 MATA ATLÂNTICA

A Mata Atlântica representa um bioma composto por uma série de fitofisionomias distintas e ecossistemas associados constituindo um mosaico vegetacional. De acordo com a lei 11.428/2006: “...Consideram-se integrantes do Bioma Mata Atlântica as seguintes formações florestais nativas e os ecossistemas associados, com as respectivas delimitações estabelecidas em Mapa do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, conforme regulamento: Floresta Ombrófila Densa; Floresta Ombrófila Mista; também denominada de Mata de Araucárias; Floresta Ombrófila Aberta; Floresta Estacional Semidecidual, Floresta Estacional Decidual; bem como os manguezais, as vegetações de restingas; campos de altitude; brejos interioranos e encraves florestais do Nordeste”.

O bioma é majoritariamente pertencente ao território brasileiro, contudo pode ser encontrado na Argentina e Paraguai. (SILVA; SANTOS; MORAES, 2014). No Brasil estende-se praticamente por toda a costa brasileira, desde regiões litorâneas até planaltos e serras interioranas do Rio Grande do Norte ao Rio Grande do Sul. Sua área dita como central ou principal localiza-se nas grandes Serras do Mar e da Mantiqueira, compreendendo os estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro e Espírito Santo (RIBEIRO et al., 2013; RIZZINI, 1997).

Diferente da maioria das florestas tropicais, a Mata Atlântica possui um conjunto de variáveis geográficas e climáticas que a tornam singular, tais como: amplitude latitudinal de 27 graus; variação longitudinal de aproximadamente 17 graus; variações de altitude desde o nível do mar até 2890 metros; e diferenças de pluviosidade, variando de locais sub-úmidos, com estações secas no nordeste brasileiro até áreas hiper-úmidas, acima de 3.600 mm anuais, na Serra do Mar (LEME; SIQUEIRA-FILHO, 2006; SILVA; CASTELETTI, 2005). Tais características são em grande parte responsáveis pela grande biodiversidade e excepcional número de endemismos do bioma (LAGOS; MULLER, 2007). São registradas para este bioma 16.661 táxons distribuídos em 2070 gêneros e 215 famílias (LISTA DE ESPÉCIES DA FLORA DO BRASIL, 2015).

Desde os tempos da colonização europeia no século XVI com a exploração do pau-brasil, passando pelos sucessivos ciclos econômicos na criação de gado, plantações de cana de açúcar e café, mineração do ouro e diamantes, a industrialização, a exportação de madeira e, mais recentemente, o plantio de soja e fumo e o plantio florestal de espécies exóticas, a Mata Atlântica vem sendo destruída por ações antrópicas sobretudo as que se sucederam no século XX (MMA, 2010).

Hoje o bioma encontra-se dividido em numerosos fragmentos correspondendo a apenas cerca de 11,7 % da área original pré-colonial (RIBEIRO et al., 2009), valendo salientar que muitos desses fragmentos correspondem a paisagens antropizadas ou de florestas secundárias, restando uma quantidade pequena de fragmentos de vegetação nativa bem conservadas (CUNHA et al., 2013). No Nordeste do Brasil essa situação ainda é mais agravante, estima-se que resta apenas 2% da área original (RANTA et al. 1998).

A destruição extensiva do bioma vem acarretando o risco de extinção de muitas espécies e a consequente diminuição da biodiversidade, apesar disso os remanescentes de Mata Atlântica apresentam proeminente grau de resiliência, pois ainda mantém uma grande biodiversidade, atentando-se ao fato que considerável parcela desta não se encontra documentada pela ciência (COSTA et al., 2012; PINTO; BRITO, 2005).

A combinação de alta riqueza de espécies e elevado número de endemismo, aliado ao avançado estágio de degradação, fez com que o bioma fosse considerado um dos 34 hotspots mundiais, regiões do globo que detêm mais de 50% da biodiversidade do planeta e que juntas correspondem a apenas 2,3 % da superfície terrestre, sendo áreas importantes e prioritárias para

práticas de proteção, preservação e recuperação da natureza (LAURANCE, 2009; RIBEIRO et al., 2011).

Para se ter uma noção mais clara da importância deste bioma, vale-se notar que os remanescentes de Mata Atlântica proveem serviços ambientais importantes para cerca de 120 milhões de pessoas (70% da população brasileira) que nela habitam, entre eles proteção de escarpas e encostas das serras, manutenção da fertilidade do solo, regulação do fluxo e qualidade dos mananciais hídricos, contribuição ao equilíbrio climático, belezas cênicas, a biodiversidade e por abrigar um rico patrimônio histórico e cultural (CUNHA et al., 2013; GUEDES; SEEHUSEN, 2011). Na Mata Atlântica nascem diversos rios que abastecem as cidades e metrópoles brasileiras (VARJABEDIAN, 2010).

De fato, a preservação das florestas em todo o mundo é de suma importância para o controle do aumento da temperatura global, a disponibilidade de água e alimentos, bem como a prestação de serviços ecológicos e em última análise para a sobrevivência da humanidade (MMA, 2010). Atualmente cerca de 9% dos remanescentes de Mata Atlântica encontram-se nominalmente protegidos em unidades de conservação (UC) de proteção integral ou de uso sustentável, porém deve-se considerar que este valor não corresponde somente a áreas com remanescentes de vegetação, uma vez que algumas UC incluem áreas com tipo antrópicos de cobertura do solo e até zonas urbanas (CUNHA et al., 2013).

Apesar de fundamentais a preservação das espécies e manutenção dos serviços ecossistêmicos é consenso que essas unidades de conservação por si só não são suficientes para manter a conservação e restauração do bioma (TABARELLI et al., 2010).

2.3 PLANTAS ENCONTRADAS NA FLORA PERNAMBUCANA

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

Abarema cochliacarpus é uma espécie da família Leguminosae, uma das maiores dentre as dicotiledôneas, a qual comporta cerca de 900 gêneros e 19. 000 espécies, subfamília Mimosoideae (GIULIETTI; QUEIROZ, 2006; JOLY, 2002).

Planta arbórea frondosa de pequeno a médio porte, atingindo até 8 metros de altura, sementes brancas acinzentadas, folhas compostas, fruto seco tipo legume contorcido e flores reunidas em inflorescências globosas (FIGURA 1-A) (IGANCI; MORIM, 2012; JOLY, 2002; SANTOS et al., 2007).

Endêmica do Brasil, principalmente nos estados da Paraíba, Bahia e Espírito Santo, cresce especialmente em florestas tropicais, mas pode ser encontrada em outros locais como na Caatinga, Cerrado e em Campos Rupestres e em locais de altitude de até 1100 metros (COLA; SILVA, 2009; SILVA, M. et al., 2010a). Devido ao desmatamento de seu ambiente natural, atualmente está na lista de plantas vulneráveis à extinção (IUCN, 2009).

O decocto da casca da planta é usado pela medicina popular como curativo de feridas, anti-séptico, analgésico, contra dermatoses, leucorréia, inflamação e úlcera gástrica (ARAÚJO et al., 2002; SANTOS et al., 2007; SILVA, M. et al., 2010a).

Estudos fitoquímicos primários relataram a presença de saponinas, catequinas, taninos, fenóis e antraquinonas (SILVA et al., 2009). As saponinas exibem várias propriedades biológicas entre as quais ação antimicrobiana. As catequinas que são compostos particularmente abundantes em espécies da família Mimosaceae, mostram evidências de atividade antioxidante e capacidade de combate aos radicais livres (SILVA, M. et al., 2010b). Alguns estudos foram feitos demonstrando a atividade antimicrobiana desta planta (ARAÚJO et al., 2002; JESUS et al., 2010).

2.3.2 *Myroxylon peruiferum* L. f.

Myroxylon peruiferum é uma planta da família Fabaceae (Faboideae), espécie arbórea com larga distribuição na América Latina, desde o sul do México até o norte da Argentina (MATHIAS et al., 2000). No Brasil encontra-se em grande parte do território nacional, sendo característica da floresta latifoliada semidecídua, ocorrendo no interior da mata densa e em formações secundárias (LORENZI, 1998). A espécie aparece no interior do estado de São Paulo, em Minas Gerais, Espírito Santo, sul de Goiás, norte do Paraná e Pantanal mato-grossense (SEBBENN et al., 1998). É também encontrada em áreas ribeirinhas dentro da Caatinga bem como em regiões de transição de Mata Atlântica com Cerrado (CARVALHO; BERNACCI; COELHO, 2013; LACERDA et al., 2010). É uma árvore decídua de grande porte com altura que pode chegar aos 35 metros, 4 m² de diâmetro da copa, tronco liso e reto, período de frutificação de agosto a dezembro, frutos aromáticos, período de floração de setembro a novembro, com flores brancas (FIGURA 1-B) (CARVALHO, 2006).

Sua madeira é pesada, de cerne castanho escurecendo para o castanho avermelhado, com cheiro característico, agradável e balsâmico, de ótima qualidade para construção civil, também usada na marcenaria em geral e perfumaria (LORENZI, 1998). Também da madeira é extraído um exsudado conhecido como bálsamo do Peru ou Tolu; usado na medicina popular contra tosse, bronquite, diabetes e sedativo em caso de problemas urinários (RIZZINI; MORS, 1995). Este bálsamo é uma mistura de ácidos livres, principalmente cinâmico e benzóico, terpenos, álcoois, e fenilpropanóides. Isoflavonas, flavonas, isoflavonóides entre outros podem ser extraídos do tronco da madeira (MATHIAS et al., 2000).

Algumas isoflavonas isolados de folhas e galhos de *Myroxylon peruiferum* mostraram atividade contra *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium* e *M. Kansasii* (CARVALHO et al., 2008). Há também relatos de atividade de extratos contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Shigella Sonnei* (GONÇALVES; ALVES-FILHO; MENEZES, 2005; OHSAKI et al. 1999).

2.3.3 *Stryphnodendron pulcherrimum* (Willd.) Hochr

Espécie pertencente à família Fabaceae, subfamília Mimosoideae, é uma árvore de médio a grande porte, altura de 8 a 23 metros, tronco geralmente reto, copa pequena e aberta, sementes castanho-escuras, fruto tipo legume nucóide, folhas compostas bipinadas, flores de 0,5mm de comprimento, amarelo-esverdeadas a alvo-amareladas (FIGURA 1-C) (LORENZI, 1998).

É a espécie mais amplamente distribuída do gênero *Stryphnodendron*, ocorrendo em áreas de Floresta tropical úmida na região amazônica brasileira (Acre, Amapá, Amazonas, Mato Grosso, Pará, Roraima e Rondônia) e extrabrasileira (Suriname, Guiana, Guiana Francesa, Venezuela, Colômbia, Peru e Bolívia). De maneira disjunta também é encontrada em áreas de Restinga, Mata seca (transição Mata Atlântica, Cerrado e Caatinga) e Mata Atlântica do nordeste brasileiro: na Bahia, Maranhão, Sergipe, Alagoas, Pernambuco e Paraíba (SCALON, 2007). Possui como nomes populares: baginha ou baguinha (Acre); favinha (Alagoas, Paraíba e Pernambuco); muanza, munzê, taimbapé, tamanqueira (Bahia); timborana (Pará) entre outros (SCALON, 2007).

Há poucos estudos relativos a esta espécie, Castilho et al. (2013) realizaram experimentos de atividade biológica de partes aéreas da planta contra a bactéria *Enterococcus faecalis*, eles verificaram que extratos particionados em água exibiam maior atividade bactericida que os macerados em clorofórmio e butanol. Uma espécie do gênero *Stryphnodendron*, conhecida pelo nome “barbatimão”, a saber: *S. adstringens* (Mart.) Coville (SANTOS et al., 2002) é bastante conhecida por apresentar alto teor de taninos, aos quais é atribuído as funções adstringente e antimicrobiana (LIMA et al., 2010). Esta última planta também é bastante utilizada na medicina popular contra várias afecções como leucorréia, hemorragias, diarreia, hemorroidas, feridas, conjuntivite, inflamação da garganta e úlcera gástrica (SILVA, L. et al., 2010).

2.3.4 *Croton nummularius* Baill.

O gênero *Croton* pertence à família Euphorbiaceae, a qual é uma das mais complexas e diversificadas da ordem Malpighiales que possui cerca de 246 gêneros e 6300 espécies (BERRY et al., 2005). No Brasil a família está representada por 63 gêneros e 918 espécies presentes em vários tipos de vegetações (SECCO et al., 2012).

Croton L. possui distribuição pantropical e é o segundo maior gênero da família, com cerca de 1200 espécies distribuídas predominantemente no continente americano, dentre as quais 316 ocorrem no Brasil, sendo 252 endêmicas (BERRY et al., 2005; CORDEIRO et al. 2015). O gênero *Croton* por ter um elevado número de espécies, grande diversidade morfológica e ampla distribuição geográfica, pode ser considerado um grupo de taxonomia bastante complexa (RIINA; BERRY; VAN-EE, 2009); no Brasil é considerado o grupo mais estudado da família Euphorbiaceae (SECCO et al., 2012).

Os representantes de *croton* podem variar de árvores, arbustos, subarbustos, e uma pequena porcentagem de ervas ou trepadeiras; várias de suas espécies são pioneiras, tal característica se deve em parte à produção massiva de flores e frutos durante a maior parte do ano, o que torna muitas de suas espécies bons candidatos para a restauração de áreas degradadas (LIMA; PIRANI, 2008).

É válido mencionar que o grupo dos *crotons* possui forte potencial econômico, principalmente para a indústria farmacêutica, por conta dos diversos metabólitos secundários, como terpenoides, flavonoides e alcaloides (PAYO et al., 2001). Várias espécies de *Croton* apresentam um látex vermelho, o qual em algumas espécies, contém antocianidinas e alcaloides (SALATINO, A.; SALATINO, M.; NEGRI, 2007).

Muitas espécies de *Croton* são importantes na medicina popular na África, Ásia e América do Sul no tratamento de várias doenças, as quais incluem diarreia, constipação intestinal, outros problemas digestivos, câncer, diabetes, febre, feridas externas, hipercolesterolemia, inflamação, hipertensão, malária, vermes intestinais, úlceras, dor e obesidade (SALATINO, A.; SALATINO, M.; NEGRI, 2007).

Croton nummularius é uma planta semi-arbustiva, 0,4 a 0,6 metros de altura (FIGURA 1-D), monóica, com ramos acinzentados; folhas alternas, persistentes, não foliáceas e lanceoladas; possui flores estaminadas e pistiladas; sementes oblongas, discretamente rugosas e castanhas (SILVA; SALES; CARNEIRO-TORRES, 2009). Refere-se a uma espécie característica das formações Rupestres e Campos gerais da Cadeia do Espinhaço (Bahia e Minas Gerais) e de Pernambuco (CARNEIRO-TORRES, 2009). Em Pernambuco pode ser encontrada no vale do Ipanema, dentro das áreas mais elevadas e planas do complexo da serra da Chapada de São José, onde cresce a mais de 800 metros de altitude e floresce e frutifica de fevereiro a maio. Trata-se de um táxon bem delimitado, com características morfofisiológicas distintas que

as permitem distinguir de outras espécies do gênero (SILVA; SALES; CARNEIRO-TORRES, 2009).

2.3.5 *Tanaecium xanthophyllum* (DC.) L.G. Lohmann

Espécie pertencente à família Bignoniaceae, contando com cerca de 827 espécies distribuídas em 82 gêneros (LOHMANN, 2006). No Brasil é representada por 406 espécies (193 endêmicas) distribuídas entre 33 gêneros (LOHMANN, 2015). Este táxon reúne espécies pantropicais, principalmente em florestas neotropicais, com poucos indivíduos em regiões temperadas (JUDD et al., 1999). O Brasil é considerado o centro de diversidade da família e também apresenta alguns táxons endêmicos, ocorrendo em diversos tipos de vegetação, do Cerrado passando pela Caatinga, até Florestas perenifólias úmidas (SILVA-CASTRO; QUEIROZ, 2003; SOUZA; LORENZI, 2008).

Dentre os gêneros da tribo Bignonieae está o *Tanaecium*, o qual atualmente pode ser considerado um clado muito pouco estudado cientificamente, com uma quantidade pequena de trabalhos disponíveis sobre espécies constituintes deste gênero (FAZOLIN et al., 2007; PIMENTEL et al., 2010). Nenhum artigo científico sobre a espécie *Tanaecium xanthophyllum* foi encontrada durante a revisão de literatura realizada para este trabalho (FIGURA 1-E).

Figura 1 – Plantas encontradas na flora Pernambucana
A: *Abarema cochliacarpus*; B: *Myroxylon peruiferum*;
C: *Stryphnodendron pulcherrimum*; D: *Croton nummularius*;
E: *Tanaecium xanthophyllum*



Fontes – A: POPVKIN, 2010; B: QUEIROZ, 2012; C: POPVKIN, 2010; D: INSTITUTO SMITHSONIAN, 1987; E: FOSTER, 2005

2.4 ESTRESSE OXIDATIVO

Estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a ocorrência de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (ERO/ERN) e a capacidade do organismo de contrapor a ação destes por sistemas de proteção antioxidante (PERSSON; POPESCU; CEDAZO-MINGUEZ, 2014).

O estresse oxidativo pode emergir de um aumento da geração de ERO/ERN ou da diminuição da capacidade antioxidante protetora, sendo caracterizada por uma competência reduzida dos sistemas endógenos de lutar contra o ataque oxidativo direcionado a biomoléculas alvo. Sua severidade está associada com várias patologias como doenças cardiovasculares, câncer e envelhecimento (LOPEZ-ALARCONA; DENICOLA, 2013). O dano induzido por radicais livres no estresse oxidativo tem sido implicado na patogênese e fisiopatologia de muitas doenças crônicas como condições neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer), enfisemas, doenças cardiovasculares e inflamatórias, catarata e câncer (MAULIK et al., 2013; TODA, 2011).

Espécies reativas de oxigênio (ERO) são considerados os principais agentes responsáveis por reações oxidativas deletérias. Espécies contendo nitrogênio também foram distinguidas, sendo chamadas espécies reativas de nitrogênio (ERN), derivadas do radical óxido nítrico (NO[•]). Além disso ERO e ERN não são vistas apenas como espécies que provocam dano, elas também estão envolvidas em processos metabólicos como produção de energia, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular, fagocitose e síntese de moléculas biológicas importantes (LOPEZ-ALARCONA; DENICOLA, 2013; LUSHCHAK, 2014). Além de ERO e ERN outras espécies reativas contendo ferro, cobre, enxofre também foram relatadas, e todas elas em conjunto contribuem em maior ou menor grau para o estresse oxidativo (LUSHCHAK, 2014).

Radicais livres são compostos orgânicos ou inorgânicos com 1 ou mais elétrons não pareados, quimicamente instáveis e bastante reativos (SINDHI et al., 2013). A incidência de radicais livres endógenos e exógenos não pode ser impedida, que é devida tanto por processos metabólicos normais que ocorrem a todo momento da vida, quanto pela ação de oxidantes do meio ambiente (POLJSK et al., 2011). Radicais livres são gerados por processos aeróbicos como a respiração celular; processos infecciosos envolvendo ativação fagocítica; durante atividade física intensa; ou pela ação de poluentes e toxinas, como fumaça de cigarro, álcool, radiações ionizantes e ultra-violeta, pesticidas e ozônio (LOBO et al., 2010).

2.4.1 Espécies reativas de oxigênio (ERO)

As espécies reativas de oxigênio são representadas por ambas as espécies radicais e não radicalares, tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), e radicais hidroxil ($\text{OH}^\bullet$) (LUSHCHAK, 2014).

Oxigênio molecular (O_2) também referido como dioxigênio, apesar de ser um elemento fundamental à produção de energia de células aeróbias, possui uma configuração eletrônica singular com 2 elétrons desemparelhados e consequentemente pode ser considerado um radical (HERMES-LIMA, 2004).

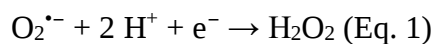
Ao entrar na maquinaria celular mitocondrial nem todo o oxigênio consumido é reduzido a H_2O , uma pequena porcentagem ($< 10\%$) se reduz parcialmente pelo recebimento de elétrons que escapam da cadeia transportadora de elétrons dos complexos II e III, formando o radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) (LUSHCHAK, 2014).

Esta é a principal forma de produção deste radical em células, porém ele também pode ser gerado pela ativação do oxigênio molecular por irradiação física e pela atuação de oxidases. O radical superóxido então formado é reconhecido por ser a espécie reativa de oxigênio (ERO) “primária” e posteriormente pode interagir com outras moléculas para produzir ERO “secundárias” (VALKO et al., 2007).

A forma protonada do superóxido, o radical hidroperoxil ($\text{HOO}^\bullet$), é um agente com maior capacidade tanto oxidante como redutora, porém em pH fisiológico (7,4) ele se dissocia (pK_a : 4,80) resultando em $\text{O}_2^{\bullet-}$ (DROSE; BRANDT, 2012).

O radical superóxido distingue-se por ser um nucleófilo ativo, capaz de atacar centros carregados positivamente e também por ser um agente oxidante que pode reagir com doadores de hidrogênios (ex. ascorbato e tocoferol) (PISOSCHI; POP, 2015).

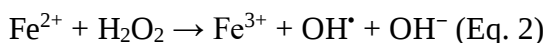
Os radicais $\text{O}_2^{\bullet-}$ podem espontaneamente ou enzimaticamente sofrer redução pelo ganho de um elétron e concomitante recebimento de 2 prótons, para produzir peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Equação 1).



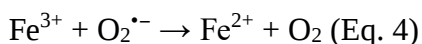
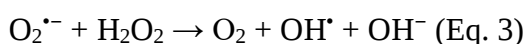
A ação direta de H_2O_2 envolve o ataque a certos grupos estruturais de proteínas com liberação de íons ferro, inativação de enzimas, e oxidação de diversas moléculas (ANJEM;

IMLAY, 2012). H_2O_2 pode ser metabolizado pela catalase, uma enzima contendo heme responsável por converter peróxido de hidrogênio à água (GANDHI, ABRAMOV, 2012).

O H_2O_2 que não é capturado pela catalase pode por sua vez reagir com íons ferro ou outros metais gerando radicais hidroxil ($\text{OH}^\bullet$), processo conhecido como reação de Fenton (Equação 2) (PEÑA et al., 2012).



O radical hidroxil ($\text{OH}^\bullet$) compreende a forma neutra do íon hidroxil (OH^-), possui uma alta reatividade fazendo dele um radical bastante perigoso com um tempo de meia vida *in vivo* muito curto de aproximadamente 10^{-9} segundos. Desta forma quando produzido *in vivo* o $\text{OH}^\bullet$ reage perto do seu local de formação (PASTOR et al., 2000). Tem sido demonstrado que em condições de estresse, uma concentração excessiva de radicais superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) provoca a liberação de ferro na forma livre e o aumento da disponibilidade de íons ferro na presença de H_2O_2 poderá participar na reação de Fenton (Equação 2), produzindo o altamente reativo radical hidroxil. Além disso o radical superóxido participa da reação de Haber-Weiss (Equação 3), que combina a reação de Fenton e a redução de Fe^{3+} por superóxido, produzindo Fe^{2+} e oxigênio (Equação 4) (KANTI-DAS; WATI; FATIMA-SHAD, 2015).



$\text{OH}^\bullet$ é relatado como o mais poderoso radical oxidante que pode interagir no local de sua geração com a maioria das moléculas orgânicas e inorgânicas (DNA, aminoácidos, proteínas, lipídios, açúcares e metais). Estas reações são caracterizadas por uma alta taxa devido a reatividade e o curto tempo de vida dos radicais hidroxil, e envolvem abstração de hidrogênio, adição, e transferência de elétrons (PISOSCHI; POP, 2015).

Outras espécies adicionais derivadas do oxigênio que podem ser formados em sistemas vivos são oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), ozônio (O_3), hidroperóxidos orgânicos (ROOH), e radicais alcóxil ($\text{RO}^\bullet$) e peróxil ($\text{ROO}^\bullet$) (HALLIWELL, 2012; XING, 2012).

Em termos gerais a maioria das ERO provem do metabolismo mitocondrial, contudo quantidades menores são produzidas pela cadeia transportadora de elétrons localizadas no retículo endoplasmático (RE) e membranas plasmática e nuclear. A produção de ERO no RE está intimamente relacionada com a operação do sistema de hidroxilação representada por enzimas da família do citocromo p450 (LUSHCHAK, 2014).

Outras fontes relevantes de produção de ERO são as atividades desempenhadas por diversas oxidases, como as enzimas xantina oxidase e NADPH oxidase; e a auto-oxidação de pequenas moléculas de origem endógena e exógena. A epinefrina e norepinefrina são um bom exemplo de moléculas endógenas submetidas a auto-oxidação acoplado com geração de ERO, enquanto que alguns xenobióticos, principalmente compostos homo e heterocíclicos, estão claramente relacionados com este tipo de geração de ERO (MICHAIL et al., 2013; RENAUD; RUTTER; WINN, 2012; SALLER et al., 2012).

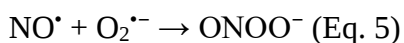
2.4.2 Espécies reativas de nitrogênio (ERN)

O óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$) é uma molécula pequena que possui um elétron desemparelhado no orbital antiligante $2\pi^*_y$ e é por isso considerado um radical. $\text{NO}^\bullet$ é gerado em tecidos biológicos por enzimas óxido nítrico sintases específicas (NOSs) as quais metabolizam arginina em citrulina com a formação de $\text{NO}^\bullet$ (BILD et al., 2013).

Óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$) é um abundante radical que age como uma importante molécula de sinalização celular em uma grande variedade de processos biológicos, incluindo mecanismos de defesa, regulação imune, relaxamento do músculo liso, regulação da pressão sanguínea e neurotransmissão (BILD et al., 2013; MARTINEZ-RUIZ; CADENAS; LAMAS, 2011).

$\text{NO}^\bullet$ possui tempo de meia vida de poucos segundos em meio aquoso, no entanto sua estabilidade aumenta (meia vida $> 15\text{s}$) quando o ambiente possui uma baixa concentração de oxigênio. Por ser solúvel em ambiente aquoso e bastante lipofílico, $\text{NO}^\bullet$ é uma molécula que rapidamente se difunde através do citoplasma e membranas plasmáticas. Em meio extracelular $\text{NO}^\bullet$ geralmente reage com água e oxigênio para formar íons nitrato e nitrito (SILVA; CERCHIARO; HONÓRIO, 2011).

Células do sistema imune produzem grandes quantidades de ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$) durante a explosão oxidativa desencadeada por processos inflamatórios. Em tais condições ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e ($\text{NO}^\bullet$) podem reagir entre si para gerar quantidades significativas de um radical oxidativamente muito mais forte, o peroxinitrito (ONOO^-) (Equação 5), que é um potente agente oxidante e nitrosilante, que pode causar fragmentação do DNA, oxidação lipídica e nitração protéica dentre outros processos danosos (FERRER-SUETA; RADI, 2009; RADI, 2013).



A reação de formação do peroxinitrito possui uma das maiores constantes de velocidade para reações envolvendo $\text{NO}^\bullet$, $7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Deste modo a toxicidade de $\text{NO}^\bullet$ é comumente relacionada por sua habilidade de se combinar com ânions superóxido (RADI, 2013). O ONOO^- pode reagir como grupos heme, centros ferro-enzofre e tióis. Adicionalmente o peroxinitrito pode se decompor produzindo radicais hidroxil, independentemente da presença de metais de transição (Equação 6) (FERRER-SUETA; RADI, 2009; RADI, 2013).



Outras espécies reativas relevantes derivadas de $\text{NO}^\bullet$ são dióxido de nitrogênio ($\text{NO}_2^\bullet$), s-nitrosotióis (RSNO), cloreto de nitrila (NO_2Cl) e complexos metálicos com nitrogênio (AHSAN, 2013; MARTINEZ-RUIZ; CADENAS; LAMAS, 2011).

2.4.3 Outras espécies reativas

Por meio da observação de substâncias oxidantes e estresse oxidativo, verificou-se que os danos causados por ERO e ERN podem originar ou se correlacionar com outras espécies reativas, que igualmente estão envolvidas em processos danosos à célula (LUSHCHAK, 2014).

Espécies reativas de grupo carbonil (Reactive carbonyl species -RCS) são compostos gerados pela peroxidação lipídica induzida por estresse oxidativo e compreendem uma gama de espécies, entre eles: hidroxi-alquenais (4-hidroxi-2-nonenal e 4-hidroxi-2-hexenal), glioxal, metilglioxal e malondialdeído (NEGRE-SALVAYRE et al., 2008; TAGLIAZUCCHI, 2015).

Tais radicais são capazes de reagir com proteínas celulares e tissulares para formar complexos conhecidos genericamente como produtos finais da peroxidação lipídica avançada (ALES), os quais induzem disfunção proteica e alteração da resposta celular (TAGLIAZUCCHI, 2015).

Alguns RCS (glioxal e metilglioxal) podem derivar da condensação de açúcares com proteínas e recebem, de maneira análoga ao ALES, a denominação de produtos finais da glicação avançada (AGES) (KARIMI et al., 2011).

Na seara de compostos que contêm carbono é clara também a influência do monóxido de carbono (CO) e dióxido de carbono (CO_2) no estresse oxidativo, pois foram relatadas a influência destas espécies de carbono em vias metabólicas implicadas tanto na indução como no sequestro de ERO e de ERN (BILD et al., 2013; VESELA; WILHELM, 2002). Como no exemplo da potencial reação de peroxinitrito (ONOO^-) com CO_2 gerando radicais carbonato

($\text{CO}_3^{\bullet-}$) e dióxido de nitrogênio ($\text{NO}_2^{\bullet}$), os quais por sua vez podem atacar outras biomoléculas (RADI, 2013).

Outra classe de radicais derivados de ERO e ERN são as espécies reativas de enxofre (ERE), as quais podem ser definidas como “compostos de enxofre redox-reativos formados sob condições de estresse oxidativo que podem ser capazes de iniciar reações oxidativas” (BRANNAN, 2010). Contudo foi constatado que muitas moléculas que contêm enxofre, as quais podem ser vistas como ERE, existem independentemente na célula ou são sintetizadas sob condições não oxidativas (BLOCK, 2010).

As espécies reativas de enxofre englobam óxido-dissulfetos, ácidos sulfénicos e radicais tióis. Em condições fisiológicas as ERE exercem importante papel na regulação do estado redox, sinalização e metabolismo celular. Todavia condições de estresse oxidativo podem induzir uma produção excessiva de ERE com efeitos deletérios para a célula (GRUHLKE; SLUSARENKO, 2012).

Por fim é válido mencionar a produção de uma outra classe de compostos reativos gerados por heme peroxidases através da ativação de leucócitos numa resposta imune. Entre essas enzimas, merece destaque a mieloperoxidase que catalisa a oxidação de íons-haleto cloreto (Cl^-), brometo (Br^-), e do pseudo-haleto tiocianato (SCN^-) em ácido hipocloroso (HClO), ácido hipobromoso (HBrO) e ácido hipotiocianoso (HOSCN), respectivamente (RONSEIN et al., 2014).

Estes oxidantes gerados pela mieloperoxidase são designados genericamente de espécies reativas de halogênio (reactive halogen species-RHS). Os RHS desempenham um papel chave na mediação da morte de células bacterianas, dessa forma defendendo o organismo contra infecção. Apesar disso estes RHS também vêm sido implicados na mediação de dano oxidativo ao tecido e disfunção celular, que podem iniciar ou acelerar quadros patológicos (RAYNER; LOVE; HAWKINS, 2014).

2.4.4 Dano oxidativo ao DNA, lipídios e proteínas

De uma forma generalizada as espécies reativas são produzidas em quantidades moderadas e desempenham diversos papéis fisiológicos, como sinalização celular, regulação do estado redox da célula e defesa imune. Porém sua produção em excesso está implicada na mediação de dano as estruturas celulares, ácidos nucleicos, lipídios e proteínas. De fato, as

espécies reativas de oxigênio modulam a função de todas as classes de biomoléculas (SENA, CHANDEL, 2012; VALKO et al., 2007).

Sob estas circunstâncias, a oxidação do DNA é prejudicial na perspectiva de um impacto negativo sobre a transcrição e replicação de genes significantes. A molécula mais estudada como marcadora da oxidação do DNA é a 8-hidroxi-desoxiguanosina (8-HdG), que emerge da oxidação do nucleosídeo guanosina por $\text{OH}^{\bullet}$ (JIA, LIU; WANG, 2015).

A oxidação de lipídios provoca dano potencial as membranas celulares. Os ácidos graxos insaturados são bastante sensíveis a oxidação e prontamente sofrem peroxidação pelo ataque de $\text{OH}^{\bullet}$ (SINGH; KAPOOR; BHATNAGAR, 2015). A peroxidação de gorduras insaturadas leva a formação de isoprostanos e seus níveis são considerados por refletirem de modo preciso o estresse oxidativo (PRATICO, 2010). O ataque oxidativo sobre lipídios também resultam em aldeídos reativos, como malondialdeído e 4-hidroxi-nonenal. Este último pode se ligar a proteínas e prejudicar suas funções (CSALA et al., 2015).

A oxidação de proteínas pode resultar em danos nas cadeias laterais, fragmentação da estrutura primária, desdobramento ou dobramento irregular da proteína, resultando na perda de atividade (CHONDROGIANNI et al., 2014). Todos os aminoácidos são suscetíveis de sofrer oxidação, sendo cisteína e metionina prontamente oxidáveis (ALDERSON et al., 2006).

2.4.5 Antioxidantes

O conceito de antioxidantes biológicos refere-se a qualquer composto, que quando presente em uma concentração mais baixa comparado ao substrato oxidável, é capaz de atrasar ou prevenir a oxidação do substrato. As funções dos antioxidantes estão implicadas em diminuir o estresse oxidativo, mutações de DNA, transformações malignas, dentre outros parâmetros de dano celular (GODIC et al., 2014).

Os primeiros sistemas de defesa antioxidante identificados contra o dano oxidativo, foram aqueles responsáveis pela prevenção da ocorrência de espécies reativas, e aqueles que bloqueiam ou capturam os radicais que são formados. Estes sistemas, presentes tanto em compartimentos hidrofóbicos das membranas celulares quanto em ambientes aquosos, podem ser enzimáticos como não-enzimáticos (PISOSCHI; POP, 2015).

Outro importante sistema antioxidante da célula é representado por processos reparativos, os quais removem moléculas danificadas antes que a agregação delas torne possível uma alteração do metabolismo celular (VALKO et al., 2007).

A intervenção dos sistemas reparativos consistem na reparação de dano oxidativo aos ácidos nucleicos por enzimas específicas (POLJSK; SUPUT; MILISAV, 2013); remoção de proteínas oxidadas por sistemas proteolíticos; e o reparo de lipídios oxidados por fosfolipases, peroxidases e acil-transferases (CHONDROGIANNI et al., 2014; SINGH; KAPOOR; BHATNAGAR, 2015).

Tem sido estimado que sob condições fisiológicas o balanço entre compostos prooxidantes e antioxidantes moderadamente favorece os primeiros, dessa forma incitando um leve estresse oxidativo, requerendo por conseguinte a intervenção dos sistemas antioxidantes do organismo (LUSHCHAK, 2014). Sob este aspecto, a questão do estresse oxidativo se torna mais delicada com a idade, quando antioxidantes endógenos e sistemas reparativos não conseguem contra-atacá-lo eficazmente (LIOCHEV, 2013).

O balanço Redox da célula é assegurado por complexos sistemas de defesa antioxidante endógenos, que inclui enzimas antioxidantes como superóxido desmutase, catalase, glutathione peroxidase; e compostos não-enzimáticos como glutathione, proteínas (ferritina, transferrina, ceruloplasmina, entre outras) e sequestradores de baixo peso molecular, como ácido úrico, coenzima Q e ácido lipóico (POLJSK; SUPUT; MILISAV, 2013).

Tem sido relatado que antioxidantes exógenos presentes em frutas e vegetais auxiliam a atividade do supracitado sistema de defesa antioxidante endógeno. Antioxidantes como vitamina C e E, carotenoides e compostos fenólicos (estilbenos, ácidos fenólicos e flavonóides) são considerados os principais antioxidantes exógenos (PISOSCHI; POP, 2015).

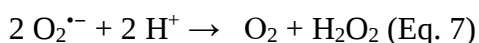
Estudos clínicos mostram que uma dieta rica em frutas, vegetais, grão integrais, legumes e ômega-3 desempenham um papel preventivo em relação a ocorrência de doenças relacionadas com estresse oxidativo (BROWN et al., 2015; WILLETT, 2006).

Outra fonte exógena de antioxidantes é constituída por suplementos alimentares, como provedores de nutrientes tais como vitaminas, fibras, minerais, ácidos graxos ou aminoácidos, que estão ou faltando ou não encontrados em quantidades necessárias na dieta. Suplementos alimentares podem abranger uma série de antioxidantes, como vitamina A (retinoides, carotenos), vitaminas C e E (tocoferóis), licopeno, luteína, ubiquinona, glutathione, polifenóis (flavonóides e não-flavonóides), resveratrol e N-acetilcisteína (POLJSAK; SUPUT; MILISAV, 2013).

2.4.5.1 Principais antioxidantes enzimáticos

Superóxido dismutases

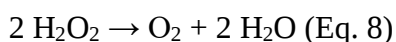
Superóxido dismutases fazem parte do sistema de defesa contra dano oxidativo, atuando na canalização do radical superóxido em H_2O_2 (Equação 7).



3 tipos de superóxido dismutases podem ser encontrados em mamíferos: superóxido dismutase contendo cobre-zinco (SOD 1), presente no citosol; superóxido dismutase contendo manganês (SOD 2), localizada na matrix mitocondrial; e superóxido dismutase extracelular (SOD 3) (ZELKO; MARIANI; FOLZ; 2002).

Catalase

Catalase representa a enzima envolvida na depleção redutiva de H_2O_2 em água (Equação 8).



Ela é expressa na maioria das células, órgãos e tecidos, e em concentrações elevadas no fígado e eritrócitos (SUNG et al., 2013).

Outros antioxidantes enzimáticos incluindo peroxirredoxina, tioredoxina redutase e glutathione peroxidase, principalmente no meio intracelular, são também responsáveis pela inativação de H_2O_2 , assim como de peróxidos orgânicos ($\text{ROO}^{\bullet}$) (SUNG et al., 2013).

Glutathione peroxidase

Glutathione peroxidase é uma enzima que contém selênio e que catalisa tanto a redução de H_2O_2 quanto de hidroperóxidos orgânicos (ROOH) a água ou álcoois correspondentes (ROH) (Equação 9). Glutathione reduzida (GSH) funciona como um efetivo doador de elétrons no processo, à medida que grupos tióis livres (RSH) são oxidados por pontes dissulfeto (S-S) (ALBERTO, NASCIMENTO, BRAGA, 2010).



2.4.5.2 Principais antioxidantes não-enzimáticos

Grupamentos tióis (RSH)

Tióis são tampões antioxidantes essenciais pela notável interação com quase todos os oxidantes fisiológicos. Sua capacidade de manter o estado redox homeostático do meio intracelular e do tecido é baseado no acoplamento redox tiol/dissulfeto como no caso da glutathione e tioredoxinas (possuidoras de sítios ditiol-dissulfetos ativos), e outras proteínas que possuem resíduos de cisteína (SUNG et al., 2013). Glutathione, um tiol antioxidante muito importante da célula, pode neutralizar peróxido de hidrogênio, ânions hidroxil e oxidantes clorados (AOYAMA; NAKAKI, 2015).

Ácido úrico

O Ácido úrico é um agente antioxidante capaz de sequestrar radicais resultantes de processos deletérios e é considerado também um efetivo sequestrador de oxigênio singleto, radicais peroxil e hidroxil, e protetor da membrana de eritrócitos contra a peroxidação lipídica (SAUTIN; JOHNSON, 2008).

Proteínas ligadoras de metal

Várias proteínas que servem como marcadores de inflamação tais como transferrina, ferritina, lactoferrina, ceruloplasmina e até albumina têm sido confirmadas como antioxidantes não enzimáticos que agem sequestrando íons de metais de transição, responsáveis pela geração da maioria dos radicais de espécies reativas de oxigênio (SUNG et al., 2013). A atividade do

tipo ferro-oxidativa das proteínas supracitadas (consistindo em catalisar a oxidação de íons ferro) resulta na inibição da peroxidação lipídica dependente de ferro (SEQUEIRA; RAO, A. V.; RAO, A., 2012).

2.5. METABOLISMO SECUNDÁRIO

O metabolismo pode ser sumarizado como o conjunto de transformações químicas de síntese e processamento de moléculas que ocorrem nos sistemas vivos, através do qual um composto principal é modificado por reações em série onde o produto de uma reação é o substrato da reação seguinte, constituindo as vias metabólicas. O produto final ou intermediários metabólicos de uma via pode se relacionar com uma outra via metabólica; em um trabalho conjunto para a manutenção da homeostase da célula. Nesta intrincada rede de reações, nem todos os compostos produzidos estão necessariamente envolvidos em processos vitais de crescimento, desenvolvimento e reprodução dos organismos e são denominados de metabólitos secundários, pois de outra forma estariam inclusos na classe dos metabólitos primários (EVANS, 2002; HUSSAIN et al., 2012).

Ainda é obscuro à comunidade científica o papel fisiológico de uma grande parte dos metabólitos secundários de plantas, todavia é conhecido que alguns são responsáveis por características como odor, pungência e cor dos vegetais. Contudo é cada vez mais crescente a opinião de que produtos do metabolismo secundário são biossintetizados para promover a sobrevivência do indivíduo que os produz. Muitos metabólitos secundários protegem os vegetais do ataque de herbivoria e patógenos (LEICACH; CHLUDIL, 2014).

Vale-se salientar ainda a existência de implicações ecológicas de metabólicos secundários em interações planta-planta, e também em inter-relações entre plantas e animais (KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012; SCHULER, 2011).

Outra terminologia bastante correlacionada com metabólitos secundários são os compostos de estresse, estes são definidos como biomoléculas que se acumulam na planta num nível acima do normal devido a alguma forma de injúria ou distúrbio do metabolismo sofrido pela planta; eles podem ser produtos tanto do metabolismo primário quanto do secundário. Uma série de fatores ambientais e biológicos podem promover a síntese de compostos de estresse e estes incluem ferimento mecânico da planta, exposição a baixas temperaturas, desidratação, irradiação ultravioleta, tratamento com químicos e infecção microbiana (SZABADOS et al., 2011).

Os metabólitos secundários quimicamente podem ser agrupados em 3 grandes grupos: Compostos polifenólicos, Terpenos e Alcalóides. Os compostos polifenólicos constituem um dos grupos de compostos mais abundantes em plantas, exercendo funções como pigmentação, proteção contra os raios ultravioleta, ação antioxidante, ação alelopática, defesa contra-ataques microbiológicos e predadores (NACZK; SHAHIDI, 2006). São substâncias que contêm pelo menos um grupo hidroxila ligado a um anel benzênico (fenol), e que podem conter outros substituintes na sua estrutura, como açúcares ou ácidos orgânicos. Mais de 8000 compostos fenólicos já foram encontrados em plantas, os quais podem ser divididos em 10 diferentes classes de acordo com sua estrutura química (DAI; MUMPER, 2010).

Dentre essas a maior e mais diversificada são os flavonoides, os quais são polifenóis com uma estrutura comum de difenilpropano, consistindo em 2 anéis aromáticos unidos por 3 carbonos (CAMMERER, 2012). Por sua vez, os flavonóides também subdividem-se em 6 classes: flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas e flavanois (catequinas e proantocianidinas) (MANACH et al., 2004).

Os flavonoides na planta se encontram geralmente conjugados com carboidratos, e a forma aglicona, sem resíduos de açúcar, é menos freqüente. Pelo menos oito monossacarídeos ou combinações desses (di e trissacarídeos) podem se ligar a diferentes grupamentos hidroxila das agliconas, resultando em uma grande quantidade de flavonoides diferentes (ERLUND, 2004). Esses compostos estão presentes em muitas plantas medicinais utilizadas pela população para o tratamento de diversas patologias, usadas de modo empírico (SCHENKEL; GOSMAN; ATHAYDE, 2007).

Várias ações fisiológicas exercidas pelos polifenóis foram relacionados com a prevenção de doenças neurodegenerativas, cardiovasculares, câncer, entre outras, sobretudo em função da sua elevada capacidade antioxidante (LEICACH; CHLUDIL, 2014).

Os terpenos compreendem uma diversificada classe de substâncias naturais que ocorrem em todas as plantas e são produzidos a partir do ácido mevalônico (SINGH; SHARMA, 2015). São formados pela união de blocos de 5 carbonos denominados isoprenos, e dessa forma podem ser referidos como isoprenóides de fórmula química geral $(C_5H_8)_n$. O grupo dos terpenos pode ser classificado de acordo com o número de isoprenos que o constituem, a saber: hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30) e carotenos (C40) (ASHOUR; WINK; GERSHENZON, 2010).

Os hemiterpenos são os compostos com apenas 1 unidade terpenóica, seu representante mais conhecido é o isopreno (LANGE; AHKAMI, 2013). Os monoterpenos são compostos de 2 unidades de isopreno, encontrados em óleos essenciais, voláteis, e alguns deles são utilizados nas indústrias de perfume e alimentos (HUANG et al., 2010).

Os sesquiterpenos constituem a maior classe dos terpenóides, são encontrados em óleos essenciais e hormônios vegetais (CHAPPELL; COATES, 2010). Os diterpenos constituem um grupamento de compostos não voláteis, possuem uma gama de atividades diferentes que incluem hormônios, ácidos resínicos e agentes anticancerígenos (LANZOTTI, 2013).

Os triterpenos formam o componente de resinas e látex de plantas; são encontrados nessa classe os esteróides, moléculas componente de membranas e precursores de hormônios esteroides, e também as saponinas, substâncias anfipáticas (possuem uma parte hidrossolúvel e outra lipossolúvel) que desempenham em plantas um importante papel na defesa contra insetos e microorganismos (THIMMAPPA et al., 2014).

Os carotenos formam pigmentos responsáveis pela coloração amarela, laranja, vermelha e púrpura, apresentando função essencial na pigmentação de flores e frutos e na fotossíntese (WONDRACEK et al., 2011). Os politerpenóides são polímeros formados por mais de 8 unidades isoprenóides, ou seja mais de 40 carbonos, um exemplo típico são os longos polímeros da borracha (GARCIA; CARRIL, 2009).

Os alcalóides são compostos orgânicos cíclicos que possuem 1 ou mais átomos de nitrogênio, excluindo aminoácidos, hormônios, ácidos nucleicos e peptídios (KUETE, 2014). São derivados de aminoácidos aromáticos (triptofano e tirosina), os quais são derivados do ácido chiquímico, e também de aminoácidos alifáticos como a ornitina e a lisina. Outros precursores que também podem originar alcaloides são ácido mevalônico, ácido antranílico, terpenos e esteroides (WANSI et al., 2013).

Devido a presença do átomo de nitrogênio, esses compostos possuem caráter básico, do qual deriva seu nome (alcaloide = semelhante a uma base). Podem ser agrupados em 3 grupos: Alcalóides verdadeiros, os que possuem anel heterocíclico com 1 átomo de nitrogênio e sua biossíntese se dá através de um aminoácido; Protoalcalóides, subtipo cujo átomo de nitrogênio não pertence ao anel heterocíclico e se origina de um aminoácido; e Pseudoalcalóides, são derivados de terpenos ou esteroides e não de aminoácidos (SCHENKEL; GOSMAN; ATHAYDE, 2007).

Em plantas os alcaloides desempenham funções de proteção contra patógenos e herbívoros, acredita-se que a co-evolução planta-herbívoros possivelmente foi um fator determinante para os fortes efeitos fisiológicos de vários compostos desta classe em animais; tanto de caráter benéfico quanto tóxico (CARQUEIJEIRO et al., 2013; KUETE, 2014). Como no exemplo dos alcaloides pirrolidizínicos, os quais são retratados como hepatotóxicos, carcinogênicos, teratogênicos e pneumotóxicos (WIEDENFELD, 2011).

Muitos alcaloides são protótipos para a elaboração de fármacos, e muitos deles são utilizados na terapêutica, puros ou em associação, e também na forma de derivados. Entre outras atividades farmacológicas encontram-se atividade antidiurética (ajmalicina), hipotensiva (reserpina, iombina), alucinógena (mescalina), antimalárica (quinina), antitussígena (codeína e noscapina), miorelaxante (tubocurarina), entre outras (CUSHNIE T.; CUSHNIE B.; LAMB, 2014; ZHANG et al., 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Avaliar o potencial antioxidante de plantas encontradas nas formações vegetais da Caatinga e Mata Atlântica de Pernambuco por ensaios *in vitro*.

3.2 Específicos

- Obter extratos metanólicos de folhas de cinco espécies encontradas na flora de Pernambuco;
- Realizar um perfil fitoquímico dos extratos dessas plantas;
- Determinar o teor de fenóis e flavonoides totais;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos de folhas dessas plantas por três metodologias *in vitro*: DPPH, ABTS e Fosfomolibdênio.

4 REFERÊNCIAS

- AGRA, M. F. et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Rev. bras. Farmacogn.**, João Pessoa, v. 18, n. 3, set. 2008.
- AHSAN, H. 3-Nitrotyrosine: A biomarker of nitrogen free radical species modified proteins in systemic autoimmunogenic conditions. **Human immunol.**, v. 74, n. 10, p. 1392–9, out. 2013.
- ALBERTO, E. E.; NASCIMENTO, V.; BRAGA, A. L. Catalytic application of selenium and tellurium compounds as glutathione peroxidase enzyme mimetics. **J. Braz. Chem. Soc.**, São Paulo, v. 21, n. 11, p. 2032-2041, 2010.
- ALDERSON, N. L. et al. S-(2-succinyl) cysteine: a novel chemical modification of tissue proteins by a krebs cycle intermediate. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 450, p. 1-8, 2006.
- ALVAREZ, I. A.; KIILL, L. H. P. Arborização, floricultura e paisagismo com plantas da Caatinga. **Abrates**, Brasília, v. 24, n. 3, p. 63-67, dez. 2014.
- ALVES, E.; KUBOTA, E. H. Conteúdo de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante de amostras de própolis comerciais. **Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada**. v. 34, n.1, p. 37-41, 2005.
- ANJEM, A.; IMLAY, J. A. Mononuclear iron enzymes are primary targets of hydrogen peroxide stress. **J. Biol. Chem.**, v. 287, n. 19, p. 15544–15556, 2012.
- AOYAMA, K.; NAKAKI, T. Disorders of glutathione metabolism. In: ROSENBERG, R. N.; PASCUAL, J. M. (Ed.). **Rosenberg's Molecular and Genetic Basis of Neurological and Psychiatric Disease**. [s.l.]: Elsevier, 2015. Cap. 61, p. 687–694.
- ARAÚJO, C. W. G. et al. Antimicrobial activity of *Pithecolobium avaremotemo* bark. **Fitoterapia**, v. 73, n. 7-8, p. 698-700, 2002.
- ARTS, I. C.; HOLLMAN, P. C. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, n. 1, p. 317S-325S, Jan, 2005.
- ASHOUR, M.; WINK, M.; GERSHENZON, J. Biochemistry of terpenoids: monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes. In: WINK, M. (Ed.). **Annual plant reviews: biochemistry of plant secondary metabolism**. 2 ed. v. 40. New York: Wiley, 2010.
- BERRY, P. E. et al. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotonaeae (Euphorbiaceae sensu stricto) using ITS and TRNL-TRNF DNA sequence data. **American journal of botany**, v. 92, n. 9, p. 1520–34, set. 2005.
- BILD, W. et al. The interdependence of the reactive species of oxygen, nitrogen, and carbon. **J. Phys. Biochem.**, v. 69, p. 147-154, 2013.
- BLOCK, E. **Garlic and other alliums-the lore and the science**. 1 ed. Cambridge: RCS publishing, 2010, 480 p.
- BRANNAN, R. G. Reactive sulfur species act as prooxidants in liposomal and skeletal muscle model systems. **J. Agric. Food Chem.**, v. 58, p. 3767-3771, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília, DF, 2009. 72 p. Disponível em <http://www.saude.gov.br/bvs>.

BRASIL. Lei nº 11.428, de 22 de dezembro de 2006. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder executivo, Brasília, DF, 26 dez. 2006. Seção 1, p. 1.

BROWN, E. M. et al. Whole Plant Foods and Colon Cancer Risk. In: TUOHY, K.; DEL-RIO, D. (Ed.). **Diet-microbe interactions in the gut**. 1º ed. EUA: Elsevier, 2015, 247 p.

CAMMERER, M. A. **Efeitos de uma dieta rica em flavonoides sobre o estresse oxidativo, inflamação e perfil lipídico em pacientes submetidos à angioplastia coronária com implante de stent: ensaio clínico randomizado**. 2012. 100 f. Tese (Doutorado em ciências da saúde). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de medicina, Porto Alegre, 2012.

CARNEIRO-TORRES, D.S. **Diversidade de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no bioma Caatinga**. 2009. 387 f. Tese (Doutorado em botânica)- Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana (Bahia), 2009.

CARQUEJEIRO, I. et al. Vacuolar Transport of the Medicinal Alkaloids from *Catharanthus roseus* is mediated by a Proton-Driven Antiport. **Plant Physiol.** v. 162, p. 1486-1496, jul. 2013.

CARVALHO, M. B.; BERNACCI, L. C.; COELHO, R. M. Floristic and phytosociology in a physiognomic gradient of riverine forest in Cerrado, Campinas, SP. **Biota Neotrop.**, Campinas, v. 13, n. 3, Set. 2013.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. v. 2, 627 p.

CARVALHO, T.A. et al. **Potencial Bactericida de Extratos e Substâncias Isoladas de *Myroxylon Peruiferum* (Cabreúva) Frente à Micobactérias do Trato Respiratório**. In: Congresso de Iniciação Científica, 16. 2008. Sorocaba, UFSCAR.

CASTILHO, A. L. et al. New trends in dentistry: plant extracts against *Enterococcus faecalis*. The efficacy compared to chlorhexidine. **Braz. oral res.**, São Paulo, v. 27, n. 2, abr. 2013.

CHAPPELL, J.; COATES, R. M. Sesquiterpenes. In: MANDER, L.; LIU, H. W. (Ed.). **Comprehensive Natural Products II**. 1 ed., v. 1, [s.l.] Elsevier, 2010. cap. 16, p. 609–641.

CHONDROGIANNI, N. et al. Protein damage, repair and proteolysis. **Molec. Aspec. Med.**, v. 35, p. 1–71, 2014

COLA, M. P. A.; SILVA, N. C. B. **Desenvolvimento de calos de *Abarema cochliacarpus* sob concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP)**. In: Encontro latino americano de iniciação científica, 13.e. Encontro latino americano de pós-graduação, 9., Porto Alegre-ES, 2009.

CORDEIRO, I. et al. *Croton* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB17497>>. Acesso em: 04 Fev. 2015.

COSTA, J. B. P. et al. Reduced availability of large seeds constrains Atlantic forest regeneration. **Acta Oecolog.**, v. 39, p. 61–66, fev. 2012.

CSALA, M.; KARDON, T.; LEGEZA, B.; LIZÁK, B.; MANDL, J.; MARGITTAI, É.; PUSKÁS, F.; SZÁRAZ, P.; SZELÉNYI, P.; BÁNHEGYI, G. On the role of 4-hydroxynonenal in health and disease. **Bioch. et Biophys. Acta**, v. 1852, p. 826–838, 2015.

CUNHA, A. A. et al. Espécies, ecossistemas, paisagens e serviços ambientais: uma estratégia espacial integradora para orientar os esforços de conservação e recuperação da biodiversidade na Mata Atlântica. In: Cunha, A.A.; Guedes, F. B (Ed.). **Mapeamentos para a conservação e recuperação da biodiversidade na Mata Atlântica**: em busca de uma estratégia espacial integradora para orientar ações aplicadas. Brasília: MMA, 2013. Cap 1, p. 11-30.

CUNHA, A. P. M. A.; SILVA, A. P.; ROQUE, O. R. **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia**. 3. ed.[S.l]: Fundação Calouste Gulbenkian, 2008. 162p.

CUSHNIE, T. P. T.; CUSHNIE, B.; LAMB, A. J. Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. **International journal of antimicrobial agents**, v. 44, n. 5, p. 377–386, nov. 2014.

DAI, J.; MUMPER R. J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties, **Molecules**, v. 15, n. 10, p. 7313-7352, 2010.

DEVIIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G.; POZETTI, G. L. Das plantas medicinais aos fitofármacos. **Rev. bras. pl. med.**, Botucatu, v. 6, n. 3, p. 11-14, 2004.

DROSE, S; BRANDT, U. Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. **Adv. Exp. Med. Bio.** v. 748, p. 145-169, 2012.

ELDIN, S.; DUNFORD, A. **Fitoterapia**: na atenção primária à saúde. São Paulo: Manole, 2001.

ERLUND, I. Review of the flavonoids quercetin, hesperitin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. **Nutrition Research**. Oxford, v. 24, p. 851-874, 2004.

EVANS, W. C. **Trease and Evans' pharmacognosy**. 15^a ed. Elsevier Health Sciences, 2002. 585 p.

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

FERRER-SUETA, G.; RADI, R.; Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals. **Acs Chem. Biol.** v. 4, n. 3, p. 161-177, 2009.

FOSTER. **Folhas de *T. xanthophyllum***. 2005. Fotografia colorida. Disponível em <<http://fm2.fieldmuseum.org/plantguides/view.asp?checkbox=1314>>.

FRUEHAUF, S. P. **Plantas medicinais da mata atlântica**: manejo sustentado e amostragem. São Paulo: Annablume, 2000. 216p.

GANDHI, S.; ABRAMOV, A. Y. Mechanisms of oxidative stress in neurodegeneration. **Oxid. Med. Cell. Longev.** v. 2012, 11 p., 2012.

- GARCIA, A. A.; CARRIL, E. P. U. Metabolismo secundario de plantas. **Reduca Biol. Ser. Fisiol. Veget.**, v.2, n. 3, p. 119-145, 2009.
- GIULIETTI, A. M.; QUEIROZ, L. P. **Plantas da Caatinga**: perfil botânico, fitoquímica e atividade biológica. Recife: Associação plantas do Nordeste, 2006. 496 p.
- GIULIETTI, A. M.; CONCEICAO, A.; QUEIROZ, L. P. **Diversidade e caracterização das fanerógamas do semi-árido brasileiro**. Recife: Associacao Plantas do Nordeste, 2006. 488 p.
- GIULIETTI, A.M., et al. Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga. In: SILVA, J.M.C.; TABARELLI, M.; FONSECA, M.T.; LINS, L.V. (orgs.). **Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação...** Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2004. p. 48-90.
- GODIC, A.; POLJSK, B.; ADAMIC, M.; DAHMANE, R. The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. **Oxid. Med. Cell. Longev.** v. 2014, 6 p. 2014.
- GONÇALVES, A.L.; ALVES-FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arq. Inst. Biol.** v. 72, p. 353-358, 2005.
- GRUHLKE, M. C. H.; SLUSARENKO, A. J. The biology of reactive sulfur species (RSS). **Plant Physiol. Biochem.** v. 59, p. 98-107, 2012.
- GUEDES, F. B.; SEEHUSEN, S. E. **Pagamentos por serviços ambientais na Mata Atlântica: lições aprendidas e desafios**. Brasília: MMA, 2011. 276 p.
- HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutr. Reviews**, v. 70, n. 5, p. 257-265, 2012.
- HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: STOREY, K. B. **Functional metabolism: regulation and adaptation**. [s.l]: wiley-liss, Hoboken. p 319-368, 2004.
- HUANG, M. et al. Variation of herbivore-induced volatile terpene among Arabidopsis ecotypes depends on allelic differences and subcellular targeting of two terpene synthases TPS02 and TPS03. **Plant Physiol.**, v. 153, p. 1293–1310, 2010.
- HUSSAIN, M.S. et al. Current approaches toward production of secondary plant metabolites. **J. Pharm. Bioallied Sci.**, v. 4, n. 1, p. 10-20, 2012.
- IGANCI, J. R. V.; MORIM, M. P. *Abarema* (Fabaceae-Mimosoideae) in the atlantic domain, Brazil. **Bot. J. Linnean Soc.**, Londres, v. 168, n. 4, p. 473-486, abr. 2012.
- INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE AND NATURAL RESOURCES (IUCN). **IUCN Red List of Threatened Species**. 2009. Disponível em <<http://www.redlist.org>>. Acesso em 8 fev. 2015.
- INSTITUTO SMITHSONIAN. **Exsicata de C. nummularius**. Departament of botany, 1987. Fotografia colorida. Disponível em <<http://eol.org/pages/1146819/overview>>.
- JESUS, R. P. F. S. et al. Ação antibacteriana e antiaderente de *Pithecellobium cochliocarpum* (gomez) macbr sobre microrganismos orais. **Odontol. Clín.-Cient.**, Recife, v. 9, n. 4, p.331-335, out./dez., 2010.

JIA, L.-P.; LIU, J.-F.; WANG, H.-S. Electrochemical performance and detection of 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine at single-stranded DNA functionalized graphene modified glassy carbon electrode. **Biosen. bioelectron.**, v. 67, p. 139–45, maio 2015

JOLY, A. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 13. ed. São Paulo: Companhia editorial nacional, 2002. 778 p.

JUDD, S. W. et al. **Plant Systematics: A Phylogenetic Approach**. Sunderland: Sinauer, 1999, 283 p.

KANTI-DAS, T.; WATI, M. R.; FATIMA-SHAD, K. Oxidative Stress Gated by Fenton and Haber Weiss Reactions and Its Association With Alzheimer's Disease. **Arch. Neurosc.**, v. 2, n. 2, p. 1–8, 2015.

KARIMI, J. et al. Relationship between advanced glycation end products and increased lipid peroxidation in semen of diabetic men. **Diab. Res. Clin. Pract.**, v. 91, n. 1, p. 61–6, jan. 2011.

KUETE, V. Health effects of alkaloids from african medicinal plants. In: KUETE, V. (Ed.). **Toxicological Survey of African Medicinal Plants**. [s.l]: Elsevier, 2014. cap. 21, p. 611-633.

KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. **Chem. Biol.**, v. 19, n. 7, p. 792–8, 27 jul. 2012.

LACERDA, A. V. et al. Flora arbustiva-arbórea de três áreas ribeirinhas no semiárido paraibano, Brasil. **Biota Neotrop.**, Campinas, v. 10, n. 4, Dez. 2010.

LANGE, B. M.; AHKAMI, A. Metabolic engineering of plant monoterpene, sesquiterpene and diterpenes - current status and future opportunities. **Plant. Biotechnol. J.**, v. 11, p. 169-196, 2013.

LANZOTTI, V. Diterpenes for therapeutic use. In: RAMAWAT, K. G.; MERILLON, J. M. (Ed.). **Natural Products**. [s.l]: Springer, 2013. p. 3173-3191.

LAURANCE, W. F. Conserving the hottest of the hotspots. **Biolog. Conserv.**, v. 142, n. 6, p. 1137, 2009.

LEICACH, S. R.; CHLUDIL, H. D. Plant Secondary Metabolites: Structure–Activity Relationships in Human Health Prevention and Treatment of Common Diseases. In: RAHMAN, A. U. (Ed.). **Studies in Natural Products Chemistry**. Grã-Bretanha: Elsevier., v. 42, p. 267–304. 2014. Cap. 9.

LEME, E. M. C.; SIQUEIRA-FILHO, J. A. A Mata Atlântica - aspectos gerais. In: SIQUEIRA-FILHO, J. A. & LEME, E. M. C. (eds.). **Fragmentos de Mata Atlântica do Nordeste - Biodiversidade, conservação e suas bromélias**. Rio de Janeiro: Andréa Jakobsson Estúdio, 2006. p. 47-79.

LIMA, C. R. O. et al. Caracterização dos metabólitos secundários do barbatimão. In: SILVA, L. A. F.; EURIDES, D.; PAULA, J. R.; LIMA, C. R. O.; MOURA, M. I. **Manual do Barbatimão**. Goiânia: Kelps, 2010. cap.7, p.61-68.

- LIMA, L. R.; PIRANI, J. R. Revisão taxonômica de Croton sect. Lamprocroton (Müll. Arg.) Pax (Euphorbiaceae s.s.). **Biota Neotrop.**, Campinas, v. 8, n. 2, Jun, 2008.
- LIOCHEV, S. I. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. **Free rad. Biol. Med.**, v. 60, p. 1–4, jul. 2013.
- LISTA DE ESPÉCIES DA FLORA DO BRASIL. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 10 Mai. 2015.
- LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacog. Rev.**, v. 4, n.8, p. 118–126, 2010.
- LOHMANN, L.G. Untangling the phylogeny of neotropical lianas (Bignoniaceae, Bignoniaceae). **American Journal of Botany**, v. 93, p. 304–318, 2006.
- LOHMANN, L.G. *Bignoniaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB112305>>. Acesso em: 14 Mai. 2015.
- LOPEZ-ALARCONA, C.; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidante capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. **Anal. Chim. Acta.**, v. 763, p. 1-10, fev. 2013.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2.ed., Nova Odessa: Plantarum, v.1, 1998. 352p.
- LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 164–175, dez. 2014.
- MACIEL, B. A. Unidades de conservação no bioma Caatinga. In: GARIGLIO, M.A.; SAMPAIO, E. V. S. B.; CESTARO, L. A.; KAGEYAMA, P. (Org.). **Uso sustentável e conservação dos recursos florestais da Caatinga**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente. 2010, p. 76-81.
- MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am. J.Clin. Nutr.**, v. 79 , n. 5 , p. 727–747, maio, 2004.
- MARTÍNEZ-RUIZ, A.; CADENAS, S.; LAMAS, S. Nitric oxide signaling: classical, less classical, and nonclassical mechanisms. **Free rad. Biol. Med.**, v. 51, n. 1, p. 17–29, 1 jul. 2011.
- MAULIK, N. et al. Antioxidants in longevity and medicine. **Oxid. Med. Cell. Longev.**, v. 2013, 3 p., 2013.
- MATHIAS, L. et al. A new pentacyclic triterpene isolated from Myroxylon balsamum (syn. Myroxylon peruiferum). **J. Braz. Chem. Soc.**, São Paulo , v. 11, n. 2, abr., 2000.
- MICHAIL, K. et al. Scavenging of free-radical metabolites of aniline xenobiotics and drugs by amino acid derivatives: toxicological implications of radical-transfer reactions. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 26, p. 1872-1883, 2013.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). Secretaria de Biodiversidade e Florestas. Núcleo Mata Atlântica e Pampa. CAMPANILI, M.; SCHAFFER, W. B. (Org.). **Mata Atlântica**: patrimônio nacional dos brasileiros. 2ª ed. Brasília, DF: MMA, 2010, 408 p.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). Secretaria de biodiversidade e florestas. Diretoria de conservação da biodiversidade. **Caatinga**. Brasília, DF, 2015. Disponível em <<http://www.mma.gov.br/biomas/caatinga>>.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 41, n. 5, p. 1523–42, 28 ago. 2006.

NEGRE-SALVAYRE, A. et al. Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. **Brit. J. Pharmacol.**, v. 153, p. 6-20, 2008.

OHSAKI, A. et al. Microanalysis of a selective potent anti-*Helicobacter pylori* compound in a Brazilian Medicinal Plant, *Myroxylon peruiferum* and the activity of analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 9, n. 8, p. 1109-1112, 1999.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Tradicional medicine strategy 2002-2005.**: Geneva, 2002. Disponível em <<http://www.who.int/medicines/publications/traditionalpolicy/en/>>.

PASTOR, N. et al. A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. **J. Mol. Biol.**, v. 304, p. 55-68, 2000.

PAYO, H.A. et al. Tamizaje fitoquímico preliminar de espécies del género *Croton* L. **Revista Cubana de Farmácia**, v.35, p.203-06, 2001.

PEÑA, R. C. et al. Hydrogen peroxide monitoring in Fenton reaction by using a ruthenium oxide hexacyanoferrate/multiwalled carbon nanotubes modified electrode. **J. Electroanal. Chem.**, v. 686, p. 1–6, out. 2012.

PERSSON, T.; POPESCU, B. O.; CEDAZO-MINGUEZ, A. Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidante therapy fail. **Oxid. Med. Cell. Longev.**, v. 2014, 11 p., 2014.

PIMENTEL, F. A. et al. Ação fungitóxica do óleo essencial de *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. e K. Shum sobre o *Aspergillus flavus* isolado da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*). **Acta Amaz.**, Manaus, v. 40, n. 1, p. 213-220, Mar. 2010.

PINTO, L. P.; BRITO, C. W. **Dinâmica da perda da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira: uma introdução**. Belo horizonte: SOS Mata Atlântica/Conservação Internacional do Brasil, 2005.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **Eur. Med. Chem.**, v. 97, p. 55–74, abr., 2015.

POLJSAK, B. et al. Oxidation-antioxidation-reduction processes in the cell: impacts of enviromental pollution. In: JEROME, N. (Ed.). **Encyclopedia of Environmental Health**. [s.l.]: Elsevier, 2011, p. 300-306.

POLJSAK, B.; SUPUT, D.; MILISAV, I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. **Oxid. Med. Cell Longev.**, v. 2013, 11 p., 2013.

- POPVKIN, A. **Inflorescência de *A. cochliacarpus***. 2010. Fotografia colorida. Disponível em <http://www.flickr.com/photos/plants_of_russian_in_brazil/5110371206/sizes/m/>.
- POPVKIN, A. **Inflorescência de *S. pulcherrimum***. 2010. Fotografia colorida. Disponível em <http://flickr.com>.
- PRADO, D. E. As Caatingas da América do Sul. In: LEAL, I. R., TABARELLI, M., SILVA, J. M. C. (Org.). **Ecologia e conservação da Caatinga**. Recife: Ed. Universitária da UFPE, 2003. cap. 1, p. 3-73.
- PRATICO, D. The neurobiology of isoprostanes and Alzheimer's disease. **Bioch. et Biophys. Acta**, v. 1801, n. 8, p. 930–933, 2010.
- QUEIROZ, R. **Flor de *M. peruiferum***. 2012. Fotografia colorida. Disponível em <http://rubens-plantasdobrasil.blogspot.com.br/2012/08/myroxylon-peruiferum-l-f.html>.
- RADI, R. Peroxynitrite, a Stealthy Biological Oxidant. **J. Biol. Chem.** V. 288, n. 37, p. 26464-26472, set. 2013.
- RANTA, P. et al. The fragmented Atlantic rain forest of Brazil: size, shape and distribution of forest fragments. **Biodiversity and Conservation**, v. 7, p. 385–403, 1998.
- RAYNER, B. S.; LOVE, D. T.; HAWKINS, C. L. Comparative reactivity of myeloperoxidase-derived oxidants with mammalian cells. **Free Rad. Biol. Med.** v. 71, p. 240-255, 2014.
- RENAUD, H. J.; RUTTER, A.; WINN L. M. Assessment of xenobiotic biotransformation including reactive oxygen species generation in the embryo using benzene as an example. **Methods. Mol. Biol.** v. 889, p. 253-263, 2012.
- RIBEIRO, M. C. et al. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed ? Implications for conservation. **Biolog. Conserv.**, v. 142, n. 6, p. 1141-1153, 2009.
- RIBEIRO, M. C. et al. The Brazilian Atlantic Forest: A Shrinking Biodiversity Hotspot. In: ZACHOS, F. E.; HABEL, J. C. (Ed.). **Biodiversity Hotspots: Distribution and Protection of Conservation Priority Areas**. [s.l]: Springer, 2011. cap. 21.
- RIBEIRO, S. C. et al. Regeneração natural em áreas desmatadas e dominadas por *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. Na Serra da Mantiqueira. **Cerne, Lavras**, v. 19, n. 1, p. 65-76, 2013.
- RIINA, R.; BERRY, P. E.; VAN-EE, B. W. Molecular phylogenetics of the dragon's blood Croton section *Cyclostigma* (Euphorbiaceae), a polyphyletic assemblage unraveled. **Systematic Botany**, v.34, n.2, p. 360-374, 2009.
- RIZZINI, C.T. **Tratado de fitogeografia do Brasil**: Aspectos ecológicos, sociológicos e florísticos. 2ª ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural Edições, 1997.
- RIZZINI, C. T.; MORS, W. B. **Botânica Econômica Brasileira**. 2º ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 1995. 156 p.
- RODAL, M. J. N.; SAMPAIO, E. V. S. B. A. Vegetacao do bioma Caatinga. In: SAMPAIO, E. V. S. B.; GIULIETTI, A. M.; VIRGINIO, J.; GAMARRA-ROJAS, C. F. L. (Ed.). **Vegetação e flora da Caatinga**. Recife: PNE/CNIP, 2002. p. 11-24.

- RONSEIN, G. E.; WINTERBOURN, C. C.; DI-MASCIO, P.; KETTLE, A. J. Cross-linking methionine and amine residues with reactive halogen species. **Free Rad. Biol. Med.**, v.70, p. 278-287, 2014.
- SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; NEGRI, G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of Croton species (Euphorbiaceae). **J. Braz. Chem. Soc.**, São Paulo, v. 18, n. 1, 2007.
- SAMPAIO, E. V. S. B. Características e potencialidades. In: GARIGLIO, M.A.; SAMPAIO, E. V. S. B.; CESTARO, L. A.; KAGEYAMA, P. (Org.). **Uso sustentável e conservação dos recursos florestais da Caatinga**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente. 2010, p. 29-48.
- SALLER, S. et al. Norepinephrine, active norepinephrine transporter, and norepinephrine-metabolism are involved in the generation of reactive oxygen species in human ovarian granulosa cells. **Endocr.**, v. 153, p. 1472-1483, 2012.
- SAUTIN, Y. Y.; JOHNSON, R. J. Uric acid: the oxidant-antioxidant paradox. **Nucleos. Nucleot. Nucl.**, v 27, p. 608-619, 2008.
- SANTOS, S. C. et al. Tannin composition of barbatimão species. **Fitoterapia**, Milano, v.73, p. 292-299, 2002.
- SANTOS, S. C. et al. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato de *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes. **Rev. bras. Farmacogn.**, João Pessoa, v. 17, n. 2, p. 215-219, Jun., 2007.
- SCALBERT, A.; JOHNSON, I. T.; SALTMARSH, M. Polyphenols: antioxidants and beyond. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, n. 1, p. 215-217, jan. 2005.
- SCALON, V. R. **Revisão taxonômica do gênero stryphnodendron Mart.** (leguminosae-mimosoideae). 2007. 264f. Tese (Doutorado em Botânica)- Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo-USP, São Paulo, 2007.
- SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. PortoAlegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. p. 711-740.
- SCHOBBER, J. Caatinga: preservação e uso racional do único bioma exclusivamente nacional. In: *Notícias do Brasil. Ciência e Cultura*, v.54, n.2, p.6-7, 2002.
- SCHULER, M. A. P450s in plant-insect interactions. **Biochim. Bioph. Acta**, v. 1814, n. 1, p. 36–45, jan. 2011.
- SEBBENN et al. Parâmetros genéticos na conservação da cabreúva - *Myroxylon peruiferum* L.F. Allemão. **Scientia forestalis**. n. 53, p. 31-38, jun., 1998.
- SECCO, R. S. et al. An overview of recent taxonomic studies on Euphorbiaceae s.l. in Brazil. **Rodriguésia**, v. 63, n. 1, p. 227–242, mar, 2012.
- SENA, L. A.; CHANDEL, N. S. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. **Mol. Cell**, v. 48, n. 2, p. 158–166, 2012.

- SEQUEIRA, S.; RAO, A. V.; RAO, A. Increased oxidative stress and altered antioxidants status in patients with chronic allergic rhinitis. *Adv. Biosci. Biotechnol.*, v. 3, p. 951-956, 2012.
- SILVA, D. C.; CERCHIARO, G.; HONÓRIO, K. M. Relações patofisiológicas entre estresse oxidativo e arteriosclerose. **Quim. Nova**, v. 34, n. 2, p. 300–305, 2011
- SILVA, J. M. C.; CASTELETTI, C. H. M. Estado da biodiversidade da Mata Atlântica brasileira. In: GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I. G. (eds.). **Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas**. São Paulo/Belo Horizonte: Fundação SOS Mata Atlântica/Conservação Internacional, 2005. p. 43-59.
- SILVA, L. G.; SANTOS, S.; MORAES, F. Fragmentação da Mata Atlântica de interior: análise de paisagem do corredor verde sul-americano e florestas do alto Paraná. **Bol. geogr.**, Maringá, v. 32, n. 3, p. 61-68, set.-dez., 2014.
- SILVA-CASTRO, M. M.; QUEIROZ, L. P. A família Bignoniaceae na Região de Catolés, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Sitientibus. Série Ciências Biológicas**, v. 3, n. 1-2, p. 3-21, 2003.
- SILVA, N. C. B. et al. Antinociceptive effects of *Abarema cochliacarpus* (B.A. Gomes) Barneby & J.W.Grimes (*Mimosaceae*). **Rev. Bras. Farmacogn.**, João Pessoa, v. 19, n. 1a, p. 46-50, 2009.
- SILVA, J. S.; SALES, M. F.; CARNEIRO-TORRES, D. S. O gênero *Croton* (Euphorbiaceae) na microrregião do Vale do Ipanema, Pernambuco, Brasil. **Rodriguésia**, v. 60, n.4, p. 879-901, 2009.
- SILVA, M. S. et al. *Abarema cochliacarpus*: Gastroprotective and ulcer-healing activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 132, n. 1, p. 134-142, 2010a.
- SILVA, M. S. et al. Anti-inflammatory intestinal activity of *Abarema cochliacarpus* (Gomes) Barneby & Grimes in TNBS colitis model. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 2, p. 467-475, 2010b.
- SILVA, L. A. F. et al. Uso popular do barbatimão. In: SILVA, L. A. F.; EURIDES, D.; PAULA, J. R.; LIMA, C. R. O.; MOURA, M. I. **Manual do Barbatimão**. Goiânia: Kelps, 2010. cap. 9, p.79-85.
- SINDHI, V. et al. Potential applications of antioxidants – A review. **Journal of Pharmacy Research**, v. 7, n. 9, p. 828–835, set. 2013.
- SINGH, B.; SHARMA, R. A. Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. **3 Biotch.**, v. 5, n. 2, p. 129-151, abr., 2015.
- SINGH, M.; KAPOOR, A.; BHATNAGAR, A. Oxidative and reductive metabolism of lipid-peroxidation derived carbonyls. **Chem. Biol. Interact.**, v. 234, p. 261–273, jan. 2015.
- SOUZA, M. J. N. A problemática ambiental: cenários para o Bioma Caatinga no Nordeste do Brasil. In: SILVA, J. B.; LIMA, L. C.; DANTAS, E. W. C. (Org.). **Panorama da geografia brasileira**. São Paulo: Annablume, 2006. v. 2, p. 119-133.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 640 p.

SUNG, C. C. et al. Oxidative stress and nucleic acid oxidation in patients with chronic kidney disease. **Oxid. Med. Cell Longev.** v. 2013, 15 p. 2013.

SZABADOS, L. et al. Plants in extreme environments: Importance of protective compounds in stress tolerance. In: TURKAN, I. (Ed.). **Plant Responses to Drought and Salinity Stress - Developments in a Post-Genomic Era**. [s.l.]: Elsevier, 2011. v. 57, cap. 4. p. 105–150.

TABARELLI, M. et al. Prospects for biodiversity conservation in the atlantic forest: Lessons from aging human-modified landscapes. **Biolog. Conserv.** v. 143, p. 2328-2340, 2010.

TAGLIAZUCCHI, D. Coffee in Health and Disease Prevention. In: PREEDY, V. (Ed.). **Coffee in health and disease prevention**. Londres: Elsevier, 2015. Cap. 95, p. 859–867.

THIMMAPPA, R. et al. Triterpene biosynthesis in plants. **Annu. Rev. Plant Biol.** v. 65, p. 225-257, 2014.

TODA, S. Polyphenol content and antioxidant effects in herb teas. **Chin. Med.**, v. 2, p. 29-31, 2011.

VALKO, M.; LEIBFRTZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Inter. Jour. Biochem. cell biol.**, v. 39, n. 1, p. 44–84, jan. 2007.

VARJABEDIAN, R. Lei da Mata Atlântica: Retrocesso ambiental. **Estud. Av.**, São Paulo, v. 24, n. 68, p. 147-160, 2010.

VESELA, A.; WILHELM, J. The role of carbon dioxide in free radical reactions of the organism. **Physiol. Res.** v. 51, p. 335-339, 2002.

WANSI, J. D. et al. Alkaloids from the medicinal plants of Africa. In: KUETE, V. (Ed.). **Medicinal plant research in Africa**. Oxford: Elsevier, 2013. cap. 14, p. 557-605.

WIEDENFELD, H. Plants containing pyrrolizidine alkaloids: toxicity and problems. **Food Addit. Contam. Part A.** v. 28, n. 3, p. 282-292, 2011.

WILLETT, W. C. The Mediterranean diet: science and practice. **Public Health Nutr.**, v. 9, n. 1a, p. 105-110, fev. 2006.

WONDRACEK, D. C. et al. Composição de carotenoides em passifloras do cerrado. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 33, n. 4, p. 1222-1228, Dez. 2011.

XING, M. Oxidative stress: a new risk factor for thyroid cancer. **Endocr. Relat. Cancer**, v. 19, n. 1, p. 7–11, fev. 2012.

ZELKO, I. N.; MARIANI, T. J.; FOLZ, R. J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 33, n. 3, p. 337–349, ago. 2002.

ZHANG, L. HUA, Z.; SONG, Y.; FENG, C. Monoterpenoid indole alkaloids from *Alstonia rupestris* with cytotoxic, antibacterial and antifungal activities. **Fitoterapia**, v. 97, p. 142–7, set. 2014.

Antioxidant activity and total phenolic content of some plants from Brazilian flora

João da Rocha Lins Neto ^{a,*}, Priscilla Andrade de Moura^{a,1}, Amanda Dias de Araújo Uchôa^{a,1},
Clovis Macedo Bezerra Filho^{a,1}, Rafael Matos Ximenes^{b,2}, Marcia Vanusa da Silva^{a,1}, Maria
Tereza dos Santos Correia^{a,1}

^a Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rêgo, s/n Cidade Universitária, Recife, PE, 50670-420 Pernambuco, Brazil.

^b Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rêgo, s/n Cidade Universitária, Recife, PE, 50670-420 Pernambuco, Brazil.

* Corresponding author. Tel.: +558121268540; fax: +558121268576.

Email addresses:

netocefet@hotmail.com (Neto JRL), pri-moura88@hotmail.com (de Moura PA),
amandabiologa1@gmail.com (Uchôa ADA), clovisfilho@gmail.com (Filho CMB),
ximenesrm@gmail.com (Ximenes RM), marciavanusa@yahoo.com.br (da Silva MV),
mtscorreia@gmail.com (Correia TS).

¹ Tel.: +558121268540; fax: +558121268576.

² Tel.: +558121268347; fax: +558121268348.

Abstract

Background: The prospection of natural antioxidant substances is a practice that has been growing in recent decades due to the discovery of phytochemicals with biological and therapeutic properties and also because they represent an alternative to the use of potentially harmful synthetic antioxidants in food and cosmetics industry. The present study investigates the total phenolic and flavonoid content as well as the antioxidant activity of five plants from Brazil's flora.

Methods: Methanolic leaf extracts of *Abarema cochliacarpus* (AC), *Croton nummularius* (CN), *Myroxylon Peruiferum* (MP), *Stryphnodendron pulcherrimum* (SP) e *Tanaecium xanthophyllum* (TX) were prepared and it has been assessed their phytochemical profile, total phenolic, flavonoid content and antioxidant activities.

Results: The phenolic content of the extracts ranged from 28.84 to 120.39 (mg GAE. g⁻¹ extract) and the flavonoid content from 3.84 to 10.52 (mg QE. g⁻¹ extract). The IC₅₀ values for the DPPH radical scavenging assay were in the order of AC (31.62 ± 2.28); SP (35.47 ± 2.48); MP (37.26 ± 1.54); TX (43.77 ± 2.10); CN (87.84 ± 1.74). The percentage ABTS radical scavenging activity was higher for AC (75.69 ± 3.88%); followed by SP (69.65 ± 5.60%); CN (33.66 ± 1.67%); TX (30.83 ± 2.65%) and MP (20.92 ± 3.41%). The total antioxidant capacity (%TAC) of AC, SP, MP, TX, CN extracts were 43.71 ± 1.66%; 41.91 ± 1.91%; 15.55 ± 0.87%; 21.75 ± 1.66%; 15.13 ± 1.52%, respectively. The extracts showed a positive correlation between phenolic content and DPPH ($p = 0,926$) and total antioxidant capacity ($p = 0,933$) assays.

Conclusion: Among all plants investigated, AC and SP extracts showed strong antioxidant activities and may be regarded as a natural antioxidant source against oxidative stress.

Keywords: *Abarema cochliacarpus*, *Croton nummularius*, *Myroxylon Peruiferum*, *Stryphnodendron pulcherrimum*, *Tanaecium xanthophyllum*, DPPH, ABTS, Total phenolic content, Antioxidant activity.

Background

Oxidation and reduction of molecules are essential for life they represent normal phenomena that occur in cell metabolism. Among substances involved in oxidation-reduction reactions of molecules there are free radicals, which are organic or inorganic compounds having one or more unpaired electrons on their valance shell, they are chemically unstable and very reactive [1].

In organism, reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) are involved in metabolic processes such as energy production, regulation of cell growth, intercellular signaling, phagocytosis and synthesis of important biological molecules. However, those reactive species may be related to adverse health effects such as lipid peroxidation and damage to protein, membrane tissues, enzymes, carbohydrates and nucleic acids [2,3].

The amount of free radicals in the body is counterbalanced by the availability of antioxidants, which are compounds capable of either preventing formation of free radicals or by reacting with them directly. The imbalance of free radicals/antioxidants in favor of free radicals can lead to establishment of oxidative stress, a situation characterized by biomolecule impairment and consequently to human health peril [4]. Antioxidants are believed to play an important role in the prevention of several diseases [5]. The therapeutic effects of various natural plant-derived medicines are correlated with their antioxidant activity [6].

Among molecules produced by plants the polyphenols are one of the most widely studied classes whose remarkable antioxidant capacity is credited primarily due to their reducing properties and chemical structure [7]. Studies indicate that consumption of fruits and

vegetables containing phenolic antioxidants and other phytochemicals is advantageous for health [8].

Antioxidants are applied in food industry as agents that prevent autoxidation of meat, fruit and oils, where several compounds are produced for this purpose such as butylated hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxyanisole (BHA) and tert-butylhydroquinone (TBHQ) [9]. However, there is growing concern over the possible carcinogenic effects of synthetic antioxidants in foods [10]. Yet, the potential health risks by the use of synthetic antioxidants have triggered the interest in the search for natural antioxidants [11].

This study aimed to (i) conduct a quantitative analyses of antioxidant activity as well as the total phenol and flavonoid contents in methanolic leaf extracts of five plants from the Caatinga and Atlantic forest biomes located in Pernambuco state, Brazil and (ii) to correlate the total phenolic and flavonoid content with the antioxidant activities of the extracts.

Methods

Chemicals and Reagents

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis- (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS), gallic acid, Folin-ciocalteu's reagent, quercetin, and trolox were purchased from Sigma- Aldrich. Sodium phosphate, ammonium molybdate were from Vetec (Brazil). Ascorbic acid from Anidrol (Brazil), sulfuric acid from Cinética (Brazil) and potassium persulfate from labsynth (Brazil), silica gel TLC plates from Macherey-Nagel. All the chemicals including solvents were of analytical grade.

Collection of Plant Material

The plant species *Abarema cochliacarpus* (AC), *Stryphnodendron pulcherrimum* (SP), were collected at Reserva Ecológica de Camaçari, and *Croton nummularius* (CN), *Myroxylon*

Peruiferum (MP) e *Tanaecium xanthophyllum* (TX) at Parque Nacional do Catimbau, both in Pernambuco state, Brazil. Voucher specimen were deposited at the herbarium of Instituto de Pesquisas Agronômicas de Pernambuco (IPA-PE).

Methanolic Extract Preparation

Plant material was dried at 25 ± 5 °C and grinded. The leave powder of each plant was extracted with methanol (10% w / v) at 3000 rpm for 24 hours. This extraction has been performed 3 times, and supernatants of each extraction were filtered, combined and concentrated by rotary evaporation.

Phytochemical profile

The phytochemical screening of the plant extracts were performed by Thin Layer Chromatography (TLC) according to Matos [12]. 10 uL aliquots of the extracts were applied on silica gel chromatography plates, using elution systems and suitable developers to investigate the presence of saponins, flavonoids, cinnamic derivatives, phenylpropanoids, triterpenoids, steroids, mono- and sesquiterpenes, alkaloids, proanthocyanidins, leucoanthocyanidins, coumarins and quinones.

Estimation of total phenolic content

The total phenolic content were determined by Folin-Ciocalteu method [13] with minor modifications. 200 uL aliquots of plant extracts at 1 mg / ml were mixed with 1 ml of Folin Ciocalteu reagent (1: 1 v / v) and 2.5 ml of 20% Na_2CO_3 were added. The mixtures were incubated for 30 min at room temperature and protected from light for subsequent reading of absorbance against a blank solution consisted of methanol plus all reagents without extracts. They were read in a 765 nm spectrophotometer and the total phenolic content was calculated using gallic acid as reference in the range of 25-500 mg/ml. The results were expressed in mg of gallic acid equivalents per extract gram (mg GAE. g^{-1} extract).

Estimation of total flavonoid content

The flavonoid contents were measured by aluminum chloride colorimetric method [14].

Briefly, 500 uL of samples (1 mg/ml) were added to 500 uL of 2% methanolic AlCl_3 . After 1 hour incubation at room temperature, the absorbance was measured against a blank of methanol and aluminum chloride in a spectrophotometer at 420 nm. Flavonoid content were estimated using a quercetin standard curve (0.98-7.81 mg) and the results were expressed as mg of quercetin equivalent per extract gram (mg QE. g^{-1} extract).

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging activity

The DPPH free radical scavenging activity of the extracts was performed according to Brand-Williams et al. [15] with some modifications. A methanolic DPPH stock solution (200 uM) was further diluted in methanol to obtain a UV-VIS absorbance between 0.6-0.7 at 517 nm, obtaining the DPPH working solution. Different concentrations of the extracts were mixed with DPPH solution and after 30 min incubation in darkness the absorbances were read at the same wavelength mentioned above. In the first step the percentage DPPH radical scavenging activity was calculated by the following formula:

$$\% \text{ DPPH scavenging activity: } \frac{\text{absorbance (control)} - \text{absorbance (sample)}}{\text{absorbance (control)}} \times 100$$

Then it was plotted a graph of DPPH scavenging activity against different concentrations of extracts to calculate the IC_{50} , which denotes the sample concentration required to decrease the initial DPPH radical concentration by 50%. Trolox was used as standard. The measurements were triplicated and their scavenging activities were calculated based on the percentage of DPPH scavenged.

2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) ABTS radical scavenging assay

ABTS radical scavenging assay was carried out according to Re et al. [16] with minor modifications. Briefly, a radical ABTS stock solution was prepared by dissolving ABTS (7 mM) with potassium persulphate ($K_2S_2O_8$, 2.45 mM). The mixture was left to stand for 16 hours (time required for the formation of the radical) in the dark at room temperature before use. To perform the assay the previously made solution was diluted in ethanol to obtain an absorbance of 0.70 ± 0.02 at 734 nm, thereby obtaining the ABTS radical working solution. 30 μ L plant extracts (1 mg / ml) were mixed with the working solution and left to rest for 6 min before measuring the absorbance at 734 nm against a blank (working solution plus methanol) and trolox was applied as standard. The percentage of ABTS radical scavenging activity was calculated according to the following formula:

$$\% \text{ ABTS scavenging activity : } \frac{\text{absorbance (control)} - \text{absorbance (sample)}}{\text{absorbance (controle)}} \times 100$$

Evaluation of total antioxidant capacity

The total antioxidant capacity (TAC) was based on the method of Prieto et al. [17]. 0.1 ml of the extracts (1 mg/ml) were combined with 1 ml of the reagent solution (0.6 M sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate, and 4 mM ammonium molybdate). The tubes containing the solutions were incubated at 95 ° C for 90 minutes, then were cooled to room temperature and the absorbance of each sample were measured at 695 nm against a blank (1 ml of reagent plus 0.1 ml of methanol). Antioxidant activity was expressed in relation with ascorbic acid (%) according to the formula:

$$\% \text{ TAC: } \frac{\text{Absorbance (sample)} - \text{absorbance (control)}}{\text{absorbance (ascorbic acid)} - \text{absorbance (control)}} \times 100$$

Statistical analysis

Assays were performed in triplicate and results are shown as mean $\pm$ standard deviation.

Linear regression analysis and Pearson's correlation coefficient were calculated using Microsoft excel Windows 2013.

Results and discussion

The phytochemical screening of AC, CN, MP and TX showed the presence of different types of secondary metabolites, namely saponins, phenylpropanoids and flavonoids (Table 1). These phytochemicals were present in all extract tested. However, AC showed the presence of terpenoids and proanthocyanidins. CN showed the presence of alkaloids, MP showed the presence of coumarins and SP showed the presence of mono and sesquiterpenoids and proanthocyanidins (Table 1).

Phenolic compounds are considered important natural antioxidants and represent one of the most abundant compounds in plants in which they display several functions such as pigmentation, protection against ultraviolet rays, allelopathic action, defense against microbial attack and predators [18]. The total phenol content of plant extracts was higher for AC extract (120.39 ± 2.82 mg GAE. g^{-1}), followed by SP (86.67 ± 0.83 mg GAE. g^{-1}) (Table 2). Phenolic compounds exhibit their antioxidant activity by various mechanisms such as donation of hydrogen atoms to free radicals and through connection to transition metal ions resulting in more stable forms [19]. Various physiological actions performed by polyphenols were related to the prevention of neurodegenerative and cardiovascular diseases, cancer, among others, mainly because of their high antioxidant capacity [20].

Among the polyphenol compounds, the most studied subclass are the flavonoids which in plants are commonly found conjugated to sugars [21]. The total flavonoid content were quantified by the aluminum chloride method and expressed as quercetin equivalents (QE) per gram of substrate in which MP had the highest concentration among the five extracts (10.51 ± 0.55 mg QE. g⁻¹) (Table 2).

Silva et al. [22] reported the presence of polyphenolic compounds highlighting catechins (flavonoids) among the main constituents in methanol extracts of *Abarema cochliocarpos* bark. Mathias et al. [23] reported the isolation of various phenolic compounds among them flavonoids from the bark of *Miroxylon peruiferum*. Some species of *Stryphnodendron* genus are known for their high polyphenol content of tannins [24]. Payo Hill et al. [25] mentioned the presence of terpenes, flavonoids and alkaloids from several *Croton* genre species. As for *Tanaecium xanthophyllum*, there are only few reports in the literature for these species and no phytochemical assessment were found.

The antioxidant activity of the extracts by DPPH, ABTS and total antioxidant capacity (TAC) methods are outlined in Table 3. IC₅₀ values for DPPH scavenging activity were smaller for AC (31.62 ± 2.28 µg / mL) and SP (35.47 ± 2.48 µg / mL) followed by MP (37.26 ± 1.54 µg / mL) (Table 3). The ABTS radical scavenging activity was higher for AC ($75.69 \pm 3.88\%$); followed by SP ($69.65 \pm 5.60\%$) (Table 3). AC and SP extracts obtained the highest antioxidant activities in both DPPH and ABTS assays.

DPPH and ABTS radical scavenging assays are methods based on the sequestration of these radicals by proton donor substance, the reaction is followed by a measurable change in absorbance spectrophotometry [26]. Both DPPH and ABTS assays are widely used to assess the antioxidant capacity of natural products [27]. The total antioxidant capacity (TAC) is a spectrophotometric assay based on the reduction of Mo(VI) to Mo(V) by the action of an

antioxidant substance with the subsequent formation of a green phosphate / Mo(V) complex with a maximum absorption at 695 nm [17].

The total antioxidant capacity (%TAC) of the extracts were higher in AC ($43.71 \pm 1.66\%$) and SP ($41.91 \pm 1.91\%$) (Table 3). In the same manner of DPPH and ABTS assays, again AC and SP had the highest total antioxidant activity, in addition they were also the ones that showed the highest total phenolic content among the studied plants (Table 2).

The total phenolic and flavonoid contents of the extracts were compared with the values of their respective antioxidant activities by using the Pearson coefficient (ρ) and coefficient of determination (R^2), where it can be found a positive correlation between total phenols and ABTS radical scavenging activity ($\rho = 0.926$, $R^2 = 0.858$) as well as phenolic compounds and TAC ($\rho = 0.933$, $R^2 = 0.872$) (Figure 1). Studies have suggested that there is a positive correlation between phenolic content and antioxidant activity in plants [28].

Flavonoid content of the extracts showed no significant correlation with the antioxidant activities (Figure 2). These results suggest the importance of phenolic compounds that are not from the flavonoid subclass on the antioxidant activity of these extracts as well as a potential influence of other bioactive molecules that may be included in the extracts such as tocopherols, saponins, polysaccharides, ascorbic acid and polysaccharides [29]. For example it has been evidenced the presence of saponins in the extracts (Table 1).

Conclusion

Based on the results obtained in the present study, it is concluded that the methanolic leaf extracts of *Abarema cochliacarpus* and *Stryphnodendron pulcherrimum* exhibit considerable antioxidant radical scavenging activity on all tested assays and they possess substantial amounts of phenolic compounds. Thus, these 2 plants can be considered a good source of antioxidants which might be beneficial for combating oxidative stress. A positive correlation

is found between total phenolic content and ABTS radical scavenging activity as well as total antioxidant capacity assays of the plant extracts, thus indicating the key role that phenolic compounds may exert on the antioxidant activity of these plants. Hence more studies are required to isolate and identify these bioactive compounds responsible for such activities as to assess their antioxidant activity *in vivo*.

List of abbreviations

GAE: Gallic acid equivalent; QE: Quercetin equivalent; BHT: Butylated hydroxytoluene; BHA: Butylated hydroxyanisole; TBHQ: Tert-butylhydroquinone; TLC: Thin layer chromatography; DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; ABTS: 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate); TAC: Total antioxidant capacity; ROS: reactive oxygen species; RNS: Reactive nitrogen species; AC: *Abarema cochliacarpus*; CN: *Croton nummularius*; MP: *Myroxylon Peruiferum*, SP: *Stryphnodendron pulcherrimum*; TX: *Tanaecium xanthophyllum*.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author's contributions

JRLN: The corresponding author, participated in all experiments of the study and wrote the manuscript; PAM: Carried out total antioxidant capacity and ABTS radical scavenging experiments and helped with acquisition and interpretation of data; ADAU: Carried out phenolic and flavonoid content experiments and helped with acquisition of data; CMBF: Carried out DPPH radical scavenging activity assay and has been involved with interpretation of data; RMX: Carried out the phytochemical screening and helped with acquisition of data; MVS: Designed the study, provided plant material and acquisition of data; MTSC: Conceived

the study, participated in its design and concept, has been involved in drafting the manuscript and has given final approval of the version to be published.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the financial support from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco).

References

1. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact.* 2014;224:164–75.
2. Bild W, Ciobica A, Padurariu M, Bild V. The interdependence of the reactive species of oxygen, nitrogen, and carbon. *J Physiol Biochem.* 2013;69:147–54.
3. Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S et al. Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. *BioMed Research International.* 2014;2014:19. doi:10.1155/2014/761264.
4. Rajendran P, Nandakumar N, Rengarajan T, Palaniswami R, Gnanadhas EN, Lakshminarasiah U, et al. Antioxidants and human diseases. *Clin Chim Acta.* 2014;436:332–47.
5. Ngo D-H, Wijesekara I, Vo T-S, Van Ta Q, Kim S-K. Marine food-derived functional ingredients as potential antioxidants in the food industry: An overview. *Food Research International.* 2011;44(2):523-9.
6. Ezhilarasan D, Sokal E, Karthikeyan S, Najimi M. Plant derived antioxidants and antifibrotic drugs: past, present and future. *Journal of Coastal Life Medicine.* 2014;2(9):738-45.
7. Barreiros ALBS, David JM, David JP. Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. *Química Nova.* 2006;29:113-23.
8. Almeida MMB, de Sousa PHM, Arriaga ÂMC, do Prado GM, Magalhães CEDC, Maia GA, et al. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Res Int.* 2011;44:2155–9.

9. Karpińska-Tymoszczyk M. The effect of antioxidants, packaging type and frozen storage time on the quality of cooked turkey meatballs. *Food Chem.* 2014;148:276–83.
10. Juntachote T, Berghofer E, Bauer F, Siebenhandl S. The application of response surface methodology to the production of phenolic extracts of lemon grass, galangal, holy basil and rosemary. *International Journal of Food Science & Technology.* 2006;41(2):121-33.
11. Mohamed HMH, Mansour HA, Farag MDE-DH. The use of natural herbal extracts for improving the lipid stability and sensory characteristics of irradiated ground beef. *Meat Sci.* 2011;87:33–9.
12. Matos FJA. *Introdução à fitoquímica experimental.* 3rd ed. Fortaleza: Edições UFC; 2009.
13. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture.* 1965;16(3):144-58.
14. Woisky RG, Salatino A. Analysis of propolis : some parameters and procedures for chemical quality control. *J Apic Res.* 1998;37:99–105.
15. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol.* 1995;28:25–30.
16. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999;26:1231–7.
17. Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem.* 1999;269:337–41.

18. Naczek M, Shahidi F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006;41:1523–42.
19. Kumar S, Sandhir R, Ojha S. Evaluation of antioxidant activity and total phenol in different varieties of *Lantana camara* leaves. *BMC Research Notes*. 2014;7(1):560.
20. Wootton-Beard PC, Moran A, Ryan L. Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods. *Food Res Int.* 2011;44:217–24.
21. Wang Z-H, Ma X-C, Li G-Y, Niu C, Ma Y-P, Kasimu R, et al. Four new phenolic glucosides from *Curculigo orchoides* Gaertn. *Phytochem Lett.* 2014;9:153–7.
22. Silva MS, Sánchez-Fidalgo S, Talero E, Cárdeno A, da Silva MA, Villegas W, et al. Anti-inflammatory intestinal activity of *Abarema cochliacarpus* (Gomes) Barneby & Grimes in TNBS colitis model. *J. Ethnopharmacol.* 2010;128:467–75.
23. Mathias L, Vieira IJC, Braz-Filho R, Rodrigues Filho E. A new pentacyclic triterpene isolated from *Myroxylon balsamum* (syn. *Myroxylon peruiferum*). *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2000;11:195-8.
24. Lima CRO, Souza LA, Helou JB, Almeida-Silva J, Caetano LB. Caracterização dos metabólitos secundários do barbatimão. In: Silva LAF, EURIDES D, Paula JR, Lima CRO, Moura MI, editors. *Manual do barbatimão*. Goiânia: Kelps; 2010. p. 61-68.
25. Payo Hill A, Dominicis ME, Mayor J, Oquendo M, Sarduy R. Tamizaje fitoquímico preliminar de especies del género *Croton* L. *Revista Cubana de Farmacia*. 2001;35:203-6.

26. Floegel A, Kim D-O, Chung S-J, Koo SI, Chun OK. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J Food Compos Anal.* 2011;24:1043–8.
27. Schaich KM, Tian X, Xie J. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *J Funct Foods.* 2015;14:111–25.
28. Amzad Hossain M, Shah MD. A study on the total phenols content and antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of endemic plant *Merremia borneensis*. *Arab J Chem.* 2015;8:66–71.
29. Ananthi S, Raghavendran HRB, Sunil AG, Gayathri V, Ramakrishnan G, Vasanthi HR. In vitro antioxidant and in vivo anti-inflammatory potential of crude polysaccharide from *Turbinaria ornata* (Marine Brown Alga). *Food Chem Toxicol.* 2010;48:187–92.

Figure 1 Correlation between total phenolic content and antioxidant assays

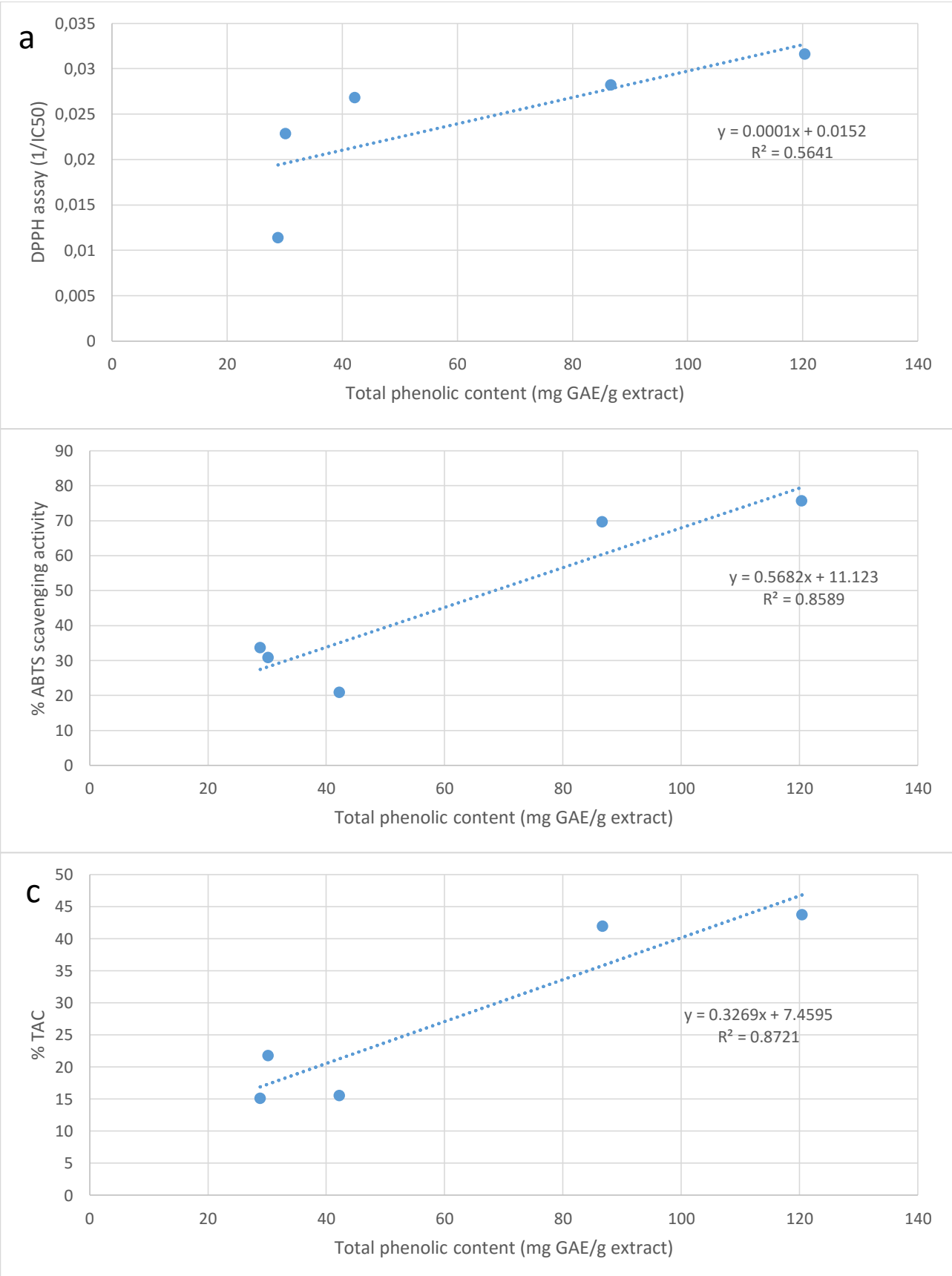


Figure 1 Correlation between total phenolic content and (a) DPPH radical scavenging activity of the extracts, $\rho = 0.751$ and $R^2 = 0.564$. (b) ABTS scavenging activity of the extracts, $\rho = 0.926$ and $R^2 = 0.858$ (c) Total antioxidant capacity of the extracts, $\rho = 0.933$ and $R^2 = 0.872$.

Figure 2 Correlation between total flavonoid content and antioxidant assays

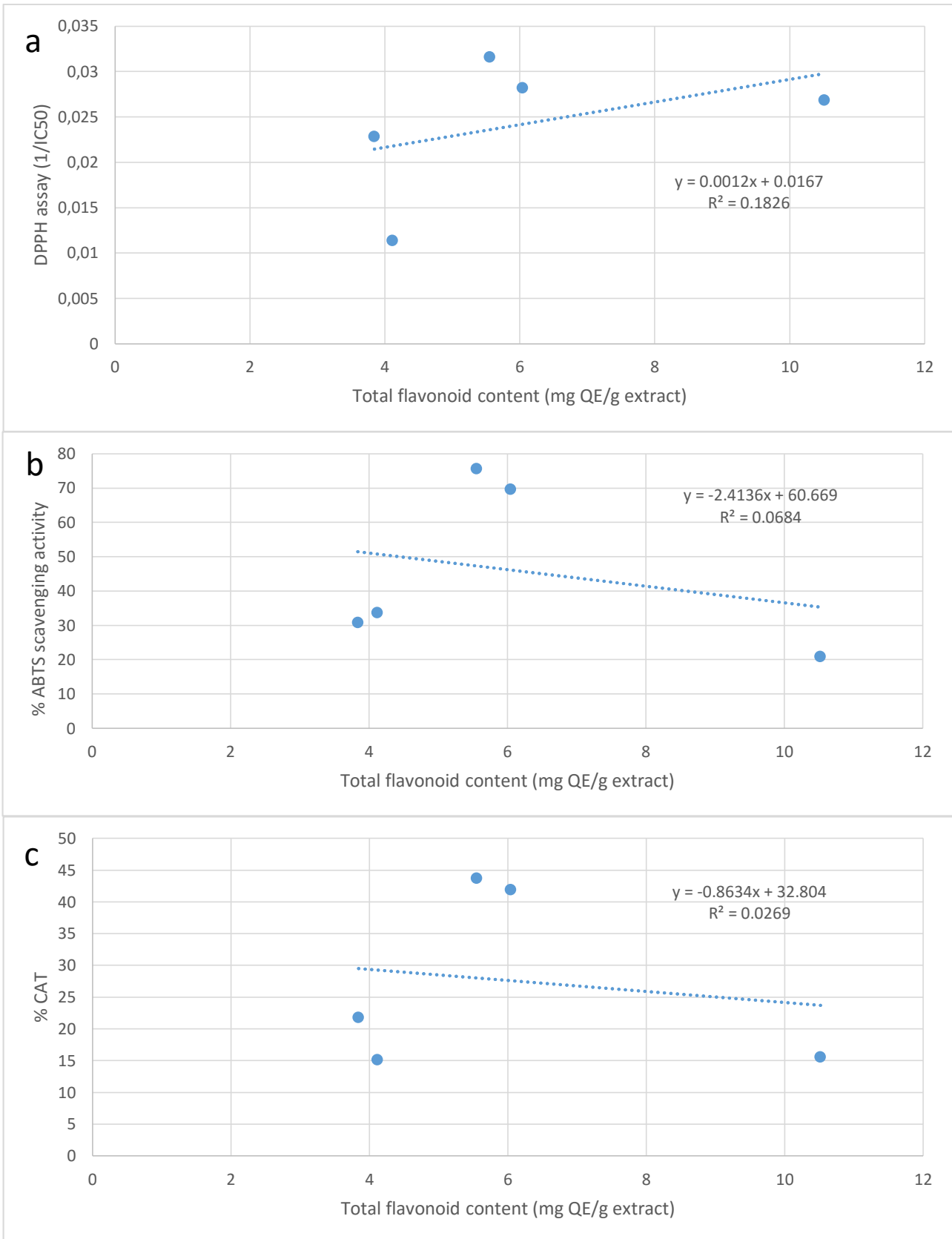


Figure 2 Correlation between total flavonoid content and (a) DPPH radical scavenging of the extracts, $\rho = 0.427$ and $R^2 = 0.182$. (b) ABTS scavenging activity of the extracts, $\rho = -0.261$ and $R^2 = 0.068$. (c)= Total antioxidant capacity of the extracts, $\rho = -0.163$ and $R^2 = 0.026$.

Table 1 Phytochemical screening of plant extracts by thin layer chromatography

Secondary metabolite Class	AC	CN	MP	SP	TX
Saponins	+++	+	+++	+++	+
Flavonoids	++	+	+	+	+
Phenylpropanoids	++	++	+	+	+
Triterpenes and steroids	*	-	-	-	-
Mono and sesquiterpenes	+	-	*	*	-
Alkaloids	-	+	-	-	-
Proanthocianidins and leucoanthocianidins	+(1)	-	-	+(1)	-
Coumarins	-	-	+	-	-
Quinones	-	-	-	-	-

Note: (1) Condensed proanthocianidins (polymers), monomers and dimers absent.

* Only traces detectable

Table 2 Total phenolic content (mg GAE . g⁻¹) and flavonoid content (mg QE . g⁻¹)

Sample	Phenolic content (mg GAE . g⁻¹)	Flavonoid content (mg QE . g⁻¹)
AC	120.39 ± 2.82	5.55 ± 0.13
SP	86.67 ± 0.84	6.04 ± 0.18
MP	42.18 ± 3.57	10.52 ± 0.55
TX	30.16 ± 1.41	3.84 ± 0.03
CN	28.84 ± 1.17	4.11 ± 0.14

Results are expressed as mean ± SD (n=3). Gallic acid equivalent (GAE) and Quercetin equivalent (QE).

Table 3 Effect of methanolic extracts on different antioxidant models

Extracts	DPPH IC₅₀ ⁽¹⁾	% ABTS⁺ ⁽²⁾	% TAC ⁽³⁾
AC	31.62 ± 2.28	75.69 ± 3.88	43.71 ± 1.66
SP	35.47 ± 2.48	69.65 ± 5.60	41.91 ± 1.91
MP	37.26 ± 1.54	20.92 ± 3.41	15.55 ± 0.87
TX	43.77 ± 2.10	30.83 ± 2.65	21.75 ± 1.66
CN	87.84 ± 1.74	33.66 ± 1.67	15.13 ± 1.52
Trolox	7.97 ± 3.15	85.92 ± 2.65 ⁽⁴⁾	—

(1): DPPH radical scavenging activity IC₅₀ value (µg/mL)

(2): Percentage ABTS⁺ radical scavenging activity.

(3): Percentage total antioxidant capacity expressed in relation to ascorbic acid.

(4): Trolox 2000 µM.

Results are expressed as mean ± SD (n=3)

6 CONCLUSÕES

- Dentre os extratos metanólicos de folha das plantas testadas, *Abarema cochliacarpus* e *Stryphnodendron pulcherrimum* obtiveram relevante atividade antioxidante frente aos ensaios do DPPH, ABTS e capacidade antioxidante total (CAT);
- Os extratos de metanólicos de folhas de *Abarema cochliacarpus* e *Stryphnodendron pulcherrimum* apresentaram alta concentração de compostos fenólicos;
- Folhas de *Abarema cochliacarpus* e *Stryphnodendron pulcherrimum* parecem ser uma importante fonte de antioxidantes naturais, as quais podem exercer efeito benéfico sobre o estresse oxidativo;
- Houve uma correlação positiva entre o conteúdo de compostos fenólicos dos extratos e suas respectivas atividades antioxidantes pelos ensaios do ABTS e capacidade antioxidante total, indicando desta forma o papel chave que os compostos fenólicos exercem na atividade antioxidante desses extratos.