



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
MESTRADO EM PATOLOGIA TROPICAL**

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE TÉCNICAS PARA
AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES ANTIOXIDANTES DE
ESPÉCIES DE PLANTAS DA AMAZÔNIA**

FABIANO DE SOUSA VARGAS

**MANAUS
2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
MESTRADO EM PATOLOGIA TROPICAL**

FABIANO DE SOUSA VARGAS

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE TÉCNICAS PARA
AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES ANTIOXIDANTES DE
ESPÉCIES DE PLANTAS DA AMAZÔNIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Patologia Tropical da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Profº Dr. Emerson Silva Lima

**MANAUS
2008**

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Vargas, Fabiano de Sousa

V297e Estudo comparativo entre técnicas para avaliação de
atividades antioxidantes de espécies de plantas da Amazônia /
Fabiano de Sousa Vargas. - Manaus: UFAM, 2008.
103 f.; il.

Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical) —
Universidade Federal do Amazonas, 2008.

Orientador: Prof^o. Emersom Silva Lima, D.Sc.

1. Antioxidantes 2. Plantas – Amazônia - Utilização 3.
Plantas medicinais - Amazônia I. Lima, Emerson Silva II.
Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU 633.88(811.3)(043.3)

FABIANO DE SOUSA VARGAS

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE TÉCNICAS PARA
AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES ANTIOXIDANTES DE
ESPÉCIES DE PLANTAS DA AMAZÔNIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado
em Patologia Tropical da Universidade Federal do
Amazonas, como requisito para a obtenção do título
de Mestre.

Aprovada em 29 de julho de 2008.

BANCA EXAMINADORA

Profº. Dr. Emerson Silva Lima Presidente.
Universidade Federal do Amazonas

Profº. Dr. Adrian Martin Pohlit, Membro.
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Profª. Dr. Maria Meneses Pereira, Membro.
Universidade Federal do Amazonas

"Dedico este trabalho a minha querida família, pois ela foi a maior incentivadora para a realização deste trabalho..."

AGRADECIMENTOS

- A Deus, pela saúde que me permitiu realizar este trabalho e todas as outras façanhas.
- Aos meus pais e minha querida irmã, por todo o apoio e pelos conselhos fundamentais que me mantiveram na linha.
- A minha esposa Gisele por todo o apoio e credito dados a mim, mesmo nas horas mais difíceis.
- A minha filha, Isadora, pelo seu sorriso único que me acorda pelas manhãs.
- Ao meu orientador, Doutor Emerson Silva Lima, pela forma singular em compartilhar todo seu conhecimento com quem busca o saber e por sua imensurável capacidade para pesquisa.
- A todos os amigos e funcionários do Laboratório de Estresse Oxidativo e Aterogênese da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas pelo convívio harmonioso e espírito de grupo.
- Aos professores e colegas do programa de Mestrado em Patologia Tropical que contribuíram muito para o meu aprimoramento intelectual e pelas novas e maravilhosas amizades adquiridas.
- À UFAM e CNPq que financiaram e forneceram a estrutura para a realização deste estudo.

*"Quando o Senhor está no
comando tudo dá certo, Glória a
Deus..."*

Ana Maria Cavalcante de Souza

RESUMO

Tem sido crescente a busca por novas substâncias antioxidantes, principalmente aquelas derivadas de plantas. Neste sentido, o estabelecimento de protocolos para caracterizar atividades antioxidantes de extratos vegetais tem ganhado importância na exploração do potencial biotecnológico da biodiversidade amazônica. O presente trabalho teve como objetivo principal comparar metodologias utilizadas na caracterização de atividades antioxidantes de extratos de plantas amazônicas, a fim de elaborar um protocolo baseado em ensaios químicos e biológicos. A atividade antioxidante de extratos de folhas ou cascas de sete espécies de plantas amazônicas foi avaliada por cinco metodologias diferentes. As espécies estudadas foram *Byrsonima japurensis* A. Juss. (Malpighiaceae), *Calycophyllum spruceanum* Benth. (Rubiaceae), *Derris floribunda* Benth. (Fabaceae), *Maytenus guianensis* Klotzch. (Celastraceae), *Passiflora nitida* Kunth L. (Passifloraceae), *Petiveria alliacea* L. (Phytolacaceae) e a *Ptychopetalum olacoides* Benth. (Olacaceae). Inicialmente, foram obtidos extratos secos por maceração a frio, utilizando-se etanol e água como solventes, e secagem em rotaevaporador seguida de liofilização. Para caracterização da atividade antioxidante dos extratos foram realizados os ensaios químicos de varredura dos radicais 1,1-difenil-2-(2,4,6-trinitrofenil)hidrazila (DPPH[•]), 2,2'-azinobis (3-etilfenil-tiazolina-6-sulfonato) (ABTS⁺), ânion radical superóxido (AVS), oxigênio singlete (¹Δ_gO₂). Também foi feito o método para caracterização de polifenóis totais nas amostras para comparação entre os ensaios. Os extratos foram avaliados em diferentes concentrações para cada método e a concentração capaz de inibir 50% (CI₅₀) a oxidação do radical foi calculada através de regressão linear simples. Os testes foram correlacionados entre si. Foram realizados também ensaios biológicos por meio de modelos de estresse oxidativo com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. E com a amostra que apresentou maior atividade antioxidante em todos os ensaios, realizou-se o ensaio de indução do estresse em ratos da espécie Wistar. Para efeito de comparação com os resultados obtidos, foram utilizados padrões com efeitos antioxidantes conhecidos, tais como: ácido ascórbico, ácido gálico, DABCO[®], TROLOX[®], quercertina, BHA, BHT, α-Tocoferol e β-Caroteno. Nos testes de varredura de radicais, as espécies *C. spruceanum* e de *M. guianensis* foram as que apresentaram melhores resultados. O extrato etanólico da espécie *C. spruceanum* apresentou CI₅₀ = 7,5±0,9, 5,03±0,1, 18,19±3,0 e 92,43±24,8 µg/mL nos ensaios de DPPH, ABTS, AVS e oxigênio singlete, respectivamente. Foi observada correlação positiva entre os testes antioxidantes realizados nos ensaios químicos, sendo o teste com DPPH[•] o único que se correlacionou com todos os demais testes. O método utilizando a *S. cerevisiae* não se mostrou adequado, visto que a maioria dos extratos apresentou atividade antifúngica o que inviabilizou o uso do mesmo. No teste com rato Wistar a espécie *C. spruceanum* foi capaz de alterar os níveis séricos e teciduais de marcadores do estresse oxidativo como MDA (malondialdeído) e GPx (glutathiona peroxidase). Foi possível conhecer o potencial antioxidante através de cinco diferentes testes *in vitro* de extratos de sete espécies de plantas até então pouco exploradas quanto a este potencial. A partir da realização deste trabalho, foi possível organizar um protocolo experimental para estudo do potencial antioxidante de extratos vegetais utilizando ensaios químicos e biológicos.

Uni termos: DPPH, ABTS, Superóxido, Oxigênio Singlete, Polifenóis totais, MDA, GPx, *Saccharomyces cerevisiae* e Ratos Wistar.

ABSTRACT

It has been increasing the search for new substances antioxidants, particularly those derived from plants. In this sense, the establishment of protocols to characterize antioxidant activity of plant extracts has gained importance in exploiting the potential of biotechnology Amazonian biodiversity. This study aimed to compare main methodologies used to characterize the antioxidant activity of extracts of plants Amazon to develop a protocol based on tests in vitro and in vivo. The antioxidant activity of extracts of leaves or bark of seven species of Amazonian plants was assessed by five different methodologies. The species studied were *Byrsonima japurensis* A. Juss. (Malpighiaceae), *Calycophyllum spruceanum* Benth. (Rubiaceae), *Derris floribunda* Benth. (Fabaceae), *Maytenus guianensis* Klotzch. (Celastraceae), *Passiflora nitida* Kunth L. (Passifloraceae), *Petiveria alliacea* L. (Phytolacaceae) and *Ptychopetalum olacoides* Benth. (Olacaceae). Initially, dried extracts were obtained by the cold maceration, using ethanol and water as solvents and drying in rotaevaporador followed by lyophilization. To characterize the antioxidant activity of the extracts were carried out chemical tests of radical sweep of 1,1-diphenyl-2-(2,4,6-trinitrofenil) hidrazila (DPPH[•]), 2,2-azinobis(3-ethylphenyl-thiazoline-6-sulfonate) or ABTS⁺, superoxide anion radical (AVS), singlet oxygen (¹Δ_gO₂). Also was made the method for determination of total phenols in the samples to compare the tests. The extracts were evaluated in different concentrations for each method and the concentration able to inhibit 50% (IC₅₀) to the radical oxidation was calculated using simple linear regression. The tests were correlated with each other. We also conducted tests biological agents through models of oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. And with the sample that showed higher antioxidant activity in all the tests were carried out test of induction of stress in Wistar rats of the species. For purposes of comparison with results for all tests were used patterns known as antioxidants, such as: ascorbic acid, galic acid, DABCO[®], TROLOX[®], quercetin, BHA, BHT, α-Tocopherol and β-carotene. In test-scanning radicals, the species *C. spruceanum* and *M. guianensis* were those that showed better results. The ethanol extract of the species *C. spruceanum* presented IC₅₀ = 7.5±0.9, 5.03±0.1, 18.19±3.0 e 92.43±24.8 µg/mL in the trials of DPPH, ABTS, AVS and singlet oxygen, respectively. There was a positive correlation between the antioxidants in vitro tests performed, and the test of DPPH[•] the only one who was correlated with all other tests. The method using the *S. cerevisiae* was not appropriate, since most extracts showed antifungal activity which prevented the use of it. In the test with the Wistar rat species *C. spruceanum* was able to alter the levels of serum and tissue markers of oxidative stress as MDA (malondialdehyde) and GPx (glutathione peroxidase). It was possible to know the potential antioxidant through five different tests in vitro of extracts from seven species of plants hitherto little explored in this potential. From this work, it was possible to organize an experimental protocol to study the potential of antioxidant plant extracts using chemical and biological tests.

Key words: DPPH, TEAC, Superoxide, Singlet Oxygen, Total Polyphenol, MDA, GPx, *Saccharomyces cerevisiae* and rats Wistar

LISTA DE FIGURAS E ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Substâncias antioxidantes de origem vegetal: (1) ácido gálico, (2) BHA, (3) BHT, (4) Quercertina, (5) α -Tocoferol e (6) β -Caroteno	30
Figura 2	Estrutura química da Fenilalanina (1), Tirosina (2) e Triptofano (3)	31
Figura 3	Estrutura química do Ácido ascórbico ou vitamina C	32
Figura 4	Estrutura química do Retinol ou Vitamina A	32
Figura 5	Estrutura química do Licopeno	33
Figura 6	Estrutura química do TROLOX [®]	35
Figura 7	Estrutura química da Xantina Oxidase	37
Figura 8	Estrutura do radical 2,2'-azinobis (3-etilfenil-tiazolina-6-sulfonato) ou ABTS ^{•+}	38
Figura 9	Estrutura do radical 1,1-difenil-2-(2,4,6-trinitrofenil) hidrazila ou DPPH [•]	39
Figura 10	Estrutura química do (5,6,11,12-tetrafenilnaptaceno) ou Rubreno	40
Figura 11	Estrutura química do DABCO	41
Figura 12	Estrutura química do ácido linoléico	41
Figura 13	Estrutura química do ácido úrico	42
Figura 14	Estrutura química da Fluoresceína	43
Figura 15	Estrutura química da Phycoerythrin (PE) ou Ficoeritrina	44
Figura 16	AAPH ou 2,2'-Azobis (2-metilpropanoamidina)	44
Figura 17	Phenazine methosulfate (PMS) e Nicotinamina Adenina Dinucleotídeo (NADH)	45
Figura 18	Estrutura química do radical NBT ^{•+} (Nitro Blue Tetrazolium), utilizada no ensaio para caracterização de atividade varredora de ânion radical superóxido	46
Figura 19	Principais agentes estressores utilizados em ensaios biológicos: (1) tetracloreto de carbono, (2) APAP ou paracetamol, (3) Paraquat e (4) Aloxano	48

Figura 20	Estrutura química da estrepto-zotocina	50
Figura 21	Estrutura química da N-acetilcisteína	50
Figura 22	Lago do Purupuru, Careiro Castanho – AM	55
Figura 23	Processo de preparação de extratos de plantas (folhas e raízes)	56
Figura 24	Modelo de adaptação de ensaio <i>in vitro</i> para caracterização de atividade antioxidante de espécies de plantas para realização em microplacas.....	58
Figura 25	Ensaio para caracterização de atividade varredora de anion radical superóxido em espécies de plantas realizado em microplacas.....	61
Figura 26	Método do Rubreno para caracterização de atividade antioxidante e fotoprotetora de espécies de plantas amazônicas com leitura em espectrofotômetro	62
Figura 27	Modelo qualitativo de ensaio com leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para detecção de atividade antifúngica presente nos extratos testados.....	65
Figura 28	Câmara asséptica para realização de ensaio com leveduras da espécie <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	65
Figura 29	Modelo Quantitativo de ensaio <i>in vivo</i> em microplacas com leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para caracterização de atividade antioxidante presente nos extratos testados.....	67
Figura 30	Extrato de espécie de planta amazônica (<i>Callycophyllum spruceanum</i>) preparado em solução com água destilada para teste de atividade antioxidante com animais (ratos da espécie Wistar)	69
Figura 31	Coleta de material biológico (punção cardíaca e amostra de tecido hepático) dos animais (ratos Wistar) para realização de dosagens de biomarcadores do estresse oxidativo - MDA e GPx.....	70
Figura 32	Curva de absorbância do ácido gálico, absorbância em relação à concentração (µg/mL)	72
Figura 33	Curva de atividade antioxidante característica da espécie <i>Callycophyllum spruceanum</i> pelo método DPPH	74
Figura 34	Curva de atividade antioxidante característica da espécie <i>Callycophyllum spruceanum</i> pelo método ABTS	76
Figura 35	Curva de atividade antioxidante característica da espécie <i>Callycophyllum spruceanum</i> pelo método de AVS	77
Figura 36	Curva de atividade antioxidante característica da espécie <i>Callycophyllum spruceanum</i> pelo método de Rubreno	79
Ilustração 1	Preparação de inóculo inicial de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	63
Ilustração 2	Preparação do inóculo final em meio líquido YPD para teste em microplacas	64
Fluxograma	Protocolo experimental de realização de ensaios para caracterização de atividades farmacológicas	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Métodos de extração para cada espécie de planta selecionada	56
Tabela 1	Percentagem de Polifenóis presente nas espécies de plantas estudadas e como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de extrato	65
Tabela 2	Milieuvalência (mEq) de Ácido Ascórbico de extratos de plantas amazônicas no método de DPPH e % de atividade antioxidante em amostras com concentração de 20 µg/mL	66
Tabela 3	Milieuvalência (mEq) de TROLOX [®] de extratos de plantas amazônicas pelo método de ABTS ⁺ e percentagem de atividade antioxidante (%) em amostras com concentração de 20 µg/mL	67
Tabela 4	Milieuvalência (mEq) de Ácido Gálico de extratos de plantas amazônicas no método de varredura de ânion radical superóxido (AVS) e % de atividade antioxidante em amostras com concentração de 50 µg/mL	69
Tabela 5	Milieuvalência (mEq) de DABCO de extratos de plantas amazônicas no método de Rubreno e % de atividade antioxidante em amostras com concentração de 100 µg/mL	70
Tabela 6	Concentrações inibitórias 50% (CI ₅₀) dos extratos de plantas testados, os resultados estão expressos em µg/mL	72
Tabela 7	Resultados do ensaio qualitativo utilizando leveduras da espécie <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para determinação de atividade antifúngica dos extratos.....	73
Tabela 8	Resultados do ensaio com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para determinação de atividade protetora dos extratos contra estresse oxidativo por incubação com peróxido de hidrogênio 2 mM.....	73
Tabela 9	Níveis de antioxidantes séricos (µg/dL) em ratos tratados com CCl ₄	74
Tabela 10	Níveis de antioxidantes teciduais (µg/dL) em ratos tratados com CCl ₄	75
Tabela 11	Teste de correlação de PEARSON	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABTS⁺	-	2,2'-azinobis (3-etilfenil-tiazolina-6-sulfonato)
AAPH	-	2,2'-Azobis (2-metilpropanoamidina)
APAP	-	paracetamol / acetoaminofeno
ARS	-	anion radical superóxido
BHA	-	Butylated Hydroxyanisole
BHT	-	Butylated HydroxyToluene
CAT	-	capacidade oxidante total
COT	-	capacidade antioxidante total
DABCO	-	1,4-diazabicyclo(2,2,2)octano
DCM	-	diclorometano
DNA	-	ácido desoxirribonucleico
DTNB	-	5,5 – ditiobis-(2-ácido nitrobenzico)
DPPH	-	2,2-difenil-1-(2,4,6-trinitrofenil)hidrazila
EDTA	-	sal sódico do ácido etilenodiaminotetracético
ERN	-	espécie reativa do nitrogênio
ERO	-	espécie reativa do oxigênio
Fe	-	ferro metal
Fe₂⁺	-	íon ferroso
Fe₃⁺	-	íon férrico
FRAP	-	capacidade de redução do ferro sérico
GPx	-	glutathione peroxidase
GSH	-	glutathione reduzida
HOO•	-	radical hidroperoxila
HPLC	-	cromatografia líquida de alta eficiência
INPA	-	instituto nacional de pesquisas da Amazônia
LDL	-	low density lipoprotein (lipoproteína de baixa densidade)
LPO	-	lipoperoxidação ou peroxidação lipídica
MDA	-	malondialdeído
mEq	-	miliequivalente
MeOH	-	metanol

NADH	-	nicotinamina adenina dinucleotídeo
NADPH	-	nicotinamina adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NCCLS	-	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NOS	-	óxido nítrico sintase
NO₃⁻	-	peroxinitrito
O₂^{•-}	-	ânion radical superóxido
OMS	-	Organização Mundial da Saúde
PE	-	Phycoerythrin (fitococianina)
PMS	-	Phenazine Metho-Sulfate
rpm	-	rotações por minuto
Rubreno	-	5,6,11,12-tetrafenilnaptaceno
SOD	-	superóxido dismutase
TBA	-	ácido tiobarbitúrico
TBARs	-	substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
TEAC	-	TROLOX [®] equivalent antioxidant capacity (capacidade antioxidante equivalente ao TROLOX [®])
TRAP	-	potencial total de absorção de radicais
TROLOX[®]	-	2-carbóxi-6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcromano
UFAM	-	Universidade Federal do Amazonas
USP	-	Universidade de São Paulo
WHO	-	World Health Organization
XOD	-	Xantina Oxidase
¹Δ_gO₂	-	oxigênio singlete

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Plantas medicinais.....	19
2.2 Espécies amazônicas	21
2.2.1 Família Malpigiaceae	21
2.2.2 Família Rubiaceae	22
2.2.3 Família Fabaceae	23
2.2.4 Família Celastraceae	24
2.2.5 Família Passifloraceae	25
2.2.6 Família Phytolacaceae	25
2.2.7 Família Olacaceae	26
2.3 Atividade antioxidante de plantas.....	27
2.4 Ensaios para caracterização de atividades antioxidantes de extratos de plantas	32
2.4.1 Ensaios químicos	33
2.4.2 ABTS ⁺⁺	35
2.4.3 DPPH [*]	37
2.4.4 Rubreno	38

2.4.5 Sistema β -caroteno/ácido linoléico	40
2.4.6 FRAP.....	41
2.4.7 TRAP.....	42
2.4.8 ORAC	43
2.4.9 Atividade Varredora de Superóxido (AVS)	45
2.4.10 Ensaio biológico	47
2.4.11 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	47
2.4.12 Modelo de estresse em ratos Wistar	49
3. OBJETIVOS.....	51
3.1 Geral.....	51
3.2 Específicos.....	51
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
4.1 Modelo de estudo.....	52
4.2 Obtenção das amostras.....	52
4.2.1 Plantas.....	52
4.2.2 Identificação das plantas.....	53
4.2.3 Coleta das plantas.....	53
4.2.4 Obtenção dos extratos.....	54
4.3 Caracterização da atividade antioxidante.....	55
4.3.1 Determinação de polifenóis totais	55

4.3.2	Teste do 2,2-difenil-1-(2,4,6-trinitrofenil)hidrazila ou DPPH.....	56
4.3.3	Teste de varredura do radical ABTS ⁺	58
4.3.3.1	<i>Preparo dos reagentes</i>	50
4.3.3.2	<i>Preparo das amostras</i>	49
4.3.3.3	<i>Realização do ensaio</i>	50
4.3.4	Atividade varredora de radical anion superóxido (AVS)	50
4.3.5	Teste de varredura do oxigênio singlete.....	52
4.3.6	Teste da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	53
4.3.6.1	<i>Teste qualitativo</i>	54
4.3.6.2	<i>Teste quantitativo</i>	56
4.3.7	Atividade antioxidante <i>ex vivo</i>	58
4.3.7.1	<i>Dosagem do malondialdeído (MDA)</i>	61
4.3.7.2	<i>Dosagem de Glutathione Peroxidase (GPx)</i>	61
4.5	Análise dos resultados	62
5.	RESULTADOS	63
6.	DISCUSSÃO	76
7.	CONCLUSÃO	85
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

1. INTRODUÇÃO

Radical livre é definido como qualquer átomo ou molécula que contém elétrons desemparelhados e tem existência independente. A retirada ou a adição de um elétron a uma molécula não-radicalar pode (ou não) converter esta em espécie radicalar. Os radicais livres são espécies químicas extremamente reativas, e que podem causar dano ou morte celular. Eles são continuamente produzidos pelo organismo, sendo a maioria por reações bioquímicas envolvendo oxigênio, que ocorrem normalmente no metabolismo (fontes endógenas) como na cadeia transportadora de elétrons, na mitocôndria, na hipóxia, na explosão respiratória pelos macrófagos, sendo também formados por fagocitose, como parte do controle da reação inflamatória (HERMES-LIMA, 2004).

Todos os organismos aeróbicos são expostos a espécies reativas de oxigênio (EROs) como ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), oxigênio singlete (1O_2 ou $^1\Delta_g O_2$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion hipoclorito (OCl^-) e radical hidroxila ($^{\cdot}OH$) bem como espécies reativas de nitrogênio (ERNs) como óxido nítrico ($^{\cdot}NO$) e peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) gerados pelo metabolismo. O acúmulo de ERO ou de ERN causa danos à estrutura das biomoléculas, gerando estresse oxidativo, que também pode ser definido como qualquer distúrbio celular no equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, em favor dos oxidantes. Em condições normais, o organismo mantém o equilíbrio entre a formação de radicais livres e a sua remoção por antioxidantes - incluindo a capacidade das células de reparar os danos oxidativos (GUTTERIDGE, 1995).

Muitas doenças estão associadas com o aumento na geração de radicais livres ou no decréscimo da capacidade antioxidante ou ambos. O equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes limita a saúde e a condição de doença, incluindo doenças neurodegenerativas, inflamação, aterosclerose, lesão de reperfusão, doenças cardiovasculares, artrite reumatóide e diabetes

(JONES, 2006). Algumas espécies reativas de oxigênio parecem contribuir para os sinais e sintomas apresentados nas doenças tropicais, logo a avaliação do estresse oxidativo gerado nestas patologias pode ajudar a entender o mecanismo de atuação das doenças e suas conseqüências (BILDIK et al., 2004; GANTT et al., 2001; NOOR et al., 2002; PAL et al., 2006; RAY et al., 1999).

Acredita-se que o estresse oxidativo seja de extrema importância na gênese e desenvolvimento de doenças como a hipercolesterolemia, hiperglicemia, hipertensão e alterações na atividade plaquetária. Inúmeras plantas amazônicas são tradicionalmente conhecidas por diversos usos tradicionais como hipoglicemiantes e antiaterogênicas, sendo que essas propriedades podem estar relacionadas com atividades antioxidantes, sugerindo a presença de compostos químicos com importantes ações farmacológicas, e ainda desconhecidos. Algumas destas plantas já tiveram seus efeitos estudados e comprovados mediante a identificação de seus princípios ativos, como o alto teor de ácido ascórbico encontrado em várias espécies de frutos (GUO et al., 2003; GARCÍA-ALONSO et al., 2004).

A geração de espécies radicalares está diretamente relacionada com a oxidação de lipídeos e substratos biológicos, por isso é tão importante a busca por novas fontes de substâncias antioxidantes, capazes de “varrer” ou inativar radicais livres (SANCHEZ-MORENO, 2002). Assim, apesar de se conhecer bastante os seus usos populares, a utilização de ensaios específicos para a caracterização de atividades antioxidantes em espécies amazônicas é uma área pouco desenvolvida na região. O desenvolvimento de testes capazes de caracterizar estas atividades de extratos vegetais por meio de ensaios químicos e biológicos é de extrema importância para elaboração de produtos biotecnológicos derivados de fontes naturais.

Aproveitando a rica biodiversidade local e o interesse comercial em desenvolver novos produtos com ação antioxidante, por exemplo, o crescimento do mercado de

fitoterápicos pode gerar nova fonte de renda e inovação em saúde, contribuindo futuramente para melhoria de qualidade de vida de pacientes portadores de doenças relacionadas com o estresse oxidativo. É importante também ressaltar que a identificação de novas atividades biológicas de produtos naturais poderá aumentar significativamente o valor comercial do referido produto ou espécie e, desta forma, servir como uma fonte de renda para a população local, contribuindo para o desenvolvimento sustentável da Amazônia. Neste sentido, é fundamental que se tenha um protocolo bem estabelecido para realização de testes *in vitro* e *in vivo*, sabendo-se correlacionar os resultados obtidos. E com isto poder comprovar a capacidade antioxidante de diversas plantas da região amazônica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Plantas medicinais

O conhecimento acerca das plantas tem acompanhado a evolução do homem através dos tempos. As civilizações primitivas, cedo, tomaram conhecimento das plantas comestíveis e de outras dotadas de maior ou menor toxicidade que, ao serem experimentadas no combate à doença, revelaram, embora empiricamente, o seu potencial curativo. Esse conhecimento foi desenvolvendo-se juntamente com as civilizações até chegar aos dias atuais, onde é sabido que as ações farmacológicas das plantas estão relacionadas à presença de compostos biologicamente ativos (DI STASI et al., 1989).

A correlação entre a estrutura química destes compostos e a ação fisiológica tem dado suporte à descoberta de novas moléculas naturais com elevada atividade farmacológica. Também o desenvolvimento da química analítica, pelo emprego dos modernos métodos cromatográficos, espectrofotométricos, e rádio imunológicos, apoiados em aparelhos cada vez mais sofisticados, tem permitido um melhor conhecimento da composição química dos fármacos vegetais e da estrutura dos seus componentes ativos (DI STASI et al., 1989).

Nos últimos anos, em virtude dos progressos alcançados pelos métodos analíticos, os conhecimentos sobre as plantas medicinais foram, consideravelmente, aumentados referendados em revistas especializadas da área. Um elevado número de novos constituintes isolados, estudos farmacológicos e mecanismos que envolvem a bioformação desses constituintes em plantas medicinais estão descritos. A Amazônia, com sua enorme biodiversidade, possui um grande potencial para produzir estes novos compostos (SILVA et al., 2007).

Contudo, isto é uma pequena parte do que se pode fazer, pois é significativo o número de plantas ainda não estudadas, tanto no sentido de uma utilização direta, como da obtenção de novos constituintes ativos que possam servir para preparar por semi-síntese compostos farmacologicamente ativos.

O Brasil possui cerca de dez por cento de toda a flora mundial. E apesar de ter proporcionado à humanidade produtos com propriedades extraordinárias como os curares, a emetina, a pilocarpina, entre outros, continua a ser um país com muitas potencialidades neste campo, considerando-se que menos de um por cento das espécies vegetais brasileiras já foram analisadas sob o ponto de vista químico e farmacológico (FERREIRA, 2002).

A utilização de plantas com fins medicinais - para tratamento, cura e prevenção de doenças - é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que entre 65 e 80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (VEIGA-JR et al., 2005).

Medicamentos à base de plantas medicinais têm sido cada vez mais utilizados. Dados do setor mostram que os fitoterápicos já representam sete por cento do segmento farmacêutico no Brasil, movimentando cerca de US\$ 700 milhões por ano. Esta expansão é atribuída ao potencial que esses produtos têm de prevenir e tratar doenças, com menos efeitos colaterais que os remédios alopáticos (CORREA JR. e SCHEFFER, 2006).

Os produtos oriundos da Amazônia, em especial os fitoterápicos, apresentam um potencial de abastecimento de mercado de exportação, bem como de originar um segmento de trabalhadores que de outra maneira dificilmente trabalhariam.

Desta maneira, a validação científica dos medicamentos de origem natural, ao associar estritamente o controle de qualidade à fabricação dos mesmos, vem conferir um poderoso

instrumento para o desenvolvimento de produtos dentro de tecnologias aceitáveis e competitivas no mercado.

A introdução de um novo produto fitoterápico, baseado no uso tradicional de uma planta, pode ser abreviada, a partir da sua validação científica, que lhe confere a autenticidade requerida para o suporte ético do medicamento planejado. Este processo é efetuado a partir da comprovação da atividade farmacológica da espécie, associada ao controle de sua composição botânica e química e de sua toxicidade, estipulada dentro dos patamares aceitáveis.

Há, na Amazônia, uma necessidade crescente de estabelecimento de estratégias políticas para o desenvolvimento de ações visando à busca dos potenciais terapêuticos de plantas amazônicas. Fato inteiramente relacionado à visão do desenvolvimento sustentável, trazendo uma fonte de renda para os detentores da terra onde a planta é coletada diretamente da natureza ou cultivada.

2.2 Espécies Amazônicas

2.2.1 Família Malpigiaceae

No Brasil, a maior parte das espécies da família Malpigiaceae é conhecida por ser utilizada com finalidade terapêutica e como alimento. Desse modo, há uma crescente necessidade de mais estudos fitoquímicos com essas espécies. As espécies do gênero *Byrsonima* são conhecidas popularmente como “muricis” e, em geral, são plantas nativas do norte, nordeste e região central do Brasil, podendo também serem encontradas em algumas regiões serranas do Sudeste. As espécies da família Malpigiaceae podem variar entre árvores e arbustos, e compreendem cerca de 60 gêneros e 1200 espécies. As folhas são simples, geralmente opostas e, freqüentemente, têm glândulas emparelhadas com o pecíolo ou base do

caule. São plantas com caracteres típicos das plantas do cerrado, geralmente arbóreas, com galhos retorcidos e porte médio.

Os “muricis” do Brasil são muitos e variados, distinguindo-se pelas cores e locais de ocorrência. São plantas de fácil adaptação, desenvolvendo-se bem em solos areno-argilosos, com clima quente e boa ventilação. Muitas espécies de murici fornecem frutos bastante consumidos e apreciados (por exemplo, a reputada acerola, rica em vitamina C), que são base da alimentação de algumas populações nas mais variadas preparações culinárias (no Nordeste, por exemplo, frutos da espécie *Byrsonima crassifolia*, amassados com farinha, fornecem a “cambica de murici”, rica em gorduras e de alto teor nutritivo). No estado do Pará, há um grande interesse em desenvolver pesquisas agrônômicas com os muricizeiros, devido ao grande consumo das frutas dessas plantas nessa região (DAVID e SANTOS, 2003).

2.2.2 Família Rubiaceae

A espécie *Callycophyllum spruceanum* Benth., comumente conhecida como “mulateiro” ou “pau-mulato” no Brasil, é da família das Rubiáceas. Este gênero já foi registrado na literatura por possuir inúmeros compostos metabólitos secundário, tais como alcalóides, iridóides, triterpenos e antraquinonas que possuem atividades antioxidantes importantes. É uma árvore de crescimento lento, que pode atingir 15-40 metros de altura e 4-5 metros de diâmetro de copa colunar. As folhas são grandes e semi-caducas. A floração produz flores brancas entre maio e junho. O tronco é retilíneo com a casca lisa e brilhante da cor bronzeada. É uma planta de difícil reprodução (CARDOSO et al., 2008).

O *Callycophyllum spruceanum* é uma enorme árvore da Amazônia que tem sido utilizada tradicionalmente para o tratamento de inúmeras doenças humanas, como: micoses, viroses, diversas infecções, câncer e doenças da pele, isto em toda a "Amazônia Legal", que

inclui o Brasil, Peru, Bolívia e Colômbia. Diversas partes da planta são usadas na medicina caseira: da casca se faz um emplasto, de uso tópico, para tratar cortes, feridas e queimaduras; o córtex, em infusão, é usado para infecções oculares, diabetes e males do ovário; em emplastos, como cicatrizante e antimicótico; a seiva é considerada antibacteriana, antioxidante, antiparasítica, repelente e inseticida, sendo empregada em cosméticos para eliminação de manchas e cicatrizes e prevenção de rugas. A árvore é extremamente ornamental, podendo ser empregada na formação de aléias, alamedas e cercas vivas. Ademais, é indicada para plantios mistos em áreas ciliares degradadas. Na Amazônia Peruana, uma decocção da casca é utilizada contra a chamada "sarna negra", uma infecção subcutânea causada por um aracnídeo. Na Amazônia brasileira, esta espécie é conhecida no tratamento de problemas estomacais, infecções diversas e tumores uterinos. Estas espécies são popularmente utilizadas como cicatrizante para lesões cutâneas e como antifúngicas de uso tópico. Existem algumas pesquisas relacionando esta espécie a atividades antimicrobiana, antifúngica, antioxidante e inseticida (ZULETA et al., 2003).

2.2.3 Família Fabaceae

A espécie *Derris floribunda* é da família das Fabaceae. Fabaceae é uma das maiores famílias botânicas, também conhecida como Leguminosae (leguminosas), de ampla distribuição geográfica. São aproximadamente 18.000 espécies em mais de 650 gêneros. Uma característica típica dessa família é apresentar o fruto do tipo legume, também conhecido como vagem (há exceções). É subdivididas em 3 subfamílias muito distintas: Faboideae (ou Papilionoideae), Caesalpinioideae (ou Caesalpiniaceae) e Mimosoideae (ou Mimosaceae). A variação no nome se deve à coexistência atual de mais de um sistema de classificação. Dentre

as substâncias que predominam nas espécies vegetais da família Fabaceae encontram-se os flavonóides que são considerados poderosos antioxidantes (RIBEIRO e KAPLAN, 2002).

2.2.4 Família Celastraceae

A espécie *Maytenus guianensis* Klotzch., pertencente à família das Celastraceae, é considerada uma árvore medicinal na Amazônia. Na região Amazônica, encontram-se duas espécies principais, *Maytenus ebenifolia* Reissek. e *Maytenus guyanensis* Klotzch., que são tradicionalmente conhecidas pelos nomes chichuá (xixuá) no Brasil e chuchuhuasi no Peru. Estas espécies são utilizadas como analgésicos e relaxantes musculares, para alívio de artrite, reumatismo, hemorróidas, inchaço nos rins, erupções cutâneas, como bem como prevenção do câncer de pele, e tratamento de constipações, diarreias e bronquites e finalmente como afrodisíacas e estimulantes tônicos. É utilizada medicinalmente como estimulante, tônico e relaxante muscular, para o alívio de artrite, reumatismo, hemorróidas, rim inchado, erupções de pele, prevenção do câncer de pele, entre outros. As cascas secas pulverizadas apresentam letalidade às larvas de *Artemia franciscana* Leach., bem como atividade antioxidante em testes *in vitro* baseados na varredura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil ou DPPH*. Extratos etanólicos liofilizados apresentaram efeito protetor solar parcial na região da luz UVB (MACARI et al., 2004; MACARI et al., 2006).

Em estudos com *Maytenus* spp. foram isoladas substâncias como: triterpenos, flavonóides, sesquiterpenos e alcalóides. Estudos sobre a atividade biológica revelaram atividades antitumorais, antimicrobianos e por último compostos inseticidas. De modo mais geral, sesquiterpenos alcalóides foram isolados de *Maytenus* spp., demonstrou-se ter atividade citotóxica e inseticida (KUO et al., 1990; KUO et al., 1994; ORABI et al., 2001; MACARI et al., 2006).

2.2.5 Família Passifloraceae

A *Passiflora nitida* L. é conhecida popularmente como maracujá-do-mato. Trata-se de uma espécie comestível rústica originária da flora amazônica, cujos frutos apresentam sabor exótico e são bastante apreciados para consumo in natura. Pertence ao subgênero *Passiflora*, série *Laurifoliae* e está dispersa por todo o norte da América do Sul. É muito popular o uso de preparações farmacêuticas a partir de suas folhas, que são ótimas fontes de componentes flavonoídicos. No Brasil a espécie tem sido utilizada como ansiolítico, sedativo, diurético e um analgésico (OGA et al., 1984). Um largo número de estudos tem demonstrado recentemente que os polifenóis possuem propriedades antioxidantes, podendo participar na prevenção de vários processos patofisiológicos associados com estresse oxidativo, tais como câncer, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares (SOUZA et al., 2007; VERZA et al., 2007; SOARES, 2002; SHAMI e MOREIRA, 2002).

2.2.6 Família das Phytolacaceae

A *Petiveria alliacea* L., pertencente à família das Phytolacaceae, possui muitas ações farmacológicas, tais como: atividade infectológica, antiinflamatória e oncológica (REVILLA, 2002). *Petiveria alliacea* (Phytolacaceae), conhecida popularmente como “tipi” ou “mucuracaa”, é originária da África, América do Sul e Central. É uma planta que habita locais úmidos e sombrios. Estudos anteriormente realizados com as raízes desta espécie revelaram a presença de mercaptanas com atividades antifúngica, acaricida e inseticida (JOHNSON et al., 1997; BENEVIDES et al., 2001). O infuso das raízes apresentou ação anticonceptiva e mostrou uma ação anestésica local. Os extratos da raiz e da folha possuem efeito abortivo e o

do caule efeito zigtóxico. Foi comprovada também sua ação depressora do sistema nervoso central, sendo o efeito anticonvulsivante o mais importante (DI STASI et al., 1989).

2.2.7 Família Olacaceae

As diversas partes da espécie *Ptychopetalum olacoides* Benth., pertencentes à família das Olacaceae, são de grande importância medicinal, apresentando diferentes princípios ativos com indicações terapêuticas. Segundo o uso medicinal popular, suas cascas e raízes são usadas na forma de chás para tratamento da impotência sexual, para problemas neuromusculares, gripe, reumatismo e astenia cardíaca e gastrintestinal. É também usada externamente na forma de banhos para tratamento da paralisia e do beribéri. Sua reputação de planta afrodisíaca é bem conhecida de longa data. Seu efeito neuromuscular para o tratamento dos sintomas do sistema nervoso central, incluindo a doença de Parkinson, os déficits da memória e as conseqüências do curso e ainda seu poder anti-reumático para soluções de desordens gastrintestinais, é, igualmente, bem conhecido; propriedades confirmadas por um estudo farmacológico publicado em 1925 (PINHEIRO et al., 2003).

Estudos conduzidos para determinar componentes ativos da espécie *Ptychopetalum olacoides* Benth, iniciado nos anos 20, encontraram ácidos graxos de cadeia longa (como o ácido araquidônico), taninos, esteróides, cumarinas, alcalóides (principalmente muirapuamine 0,05%), óleos essenciais, álcool triterpênico e lupeol. Foram, também, observados os efeitos afrodisíacos da planta, estando, hoje, listada na Farmacopéia Britânica, tornando-se parte da medicina herbal (PINHEIRO et al., 2003).

Entre suas propriedades farmacológicas, verificou-se que nos extratos alcoólicos e hidroalcoólicos há um bloqueio nos tremores induzidos por harmalina e eserina; e catatonia, induzida por perfenazina. Verificou-se ainda que os extratos revertem o quadro de

hiperatividade induzida por reserpina. Por promover uma ativação da digestão, é indicado em casos de inapetência, dispepsia e atonia gástrica. A excitação que causa sobre o sistema nervoso central justifica a indicação em casos de depressão, esgotamento e outras doenças de nível neurológico (PINHEIRO et al., 2003).

2.3 Atividade antioxidante de plantas

A busca por novas alternativas terapêuticas e produção de novos fármacos provenientes de produtos naturais, tem estimulado os estudos acerca dos princípios ativos de plantas, chamando a atenção para regiões com uma flora abundante, especialmente a região Amazônica. O interesse pela descoberta de novos antioxidantes a partir de fontes naturais vem crescendo nos últimos anos, principalmente por prevenir a deteriorização de alimentos e minimizar o dano oxidativo às células vivas (PEREIRA, 1996; ALCARAZ e CARVALHO, 2004).

Todos os seres vivos que, em seu metabolismo, utilizam oxigênio para a geração de energia liberam radicais livres no organismo. A priori, isso é incompatível com a vida a menos que haja um mecanismo compensatório e de defesa contra estas espécies. Esta defesa é então realizada por meio dos antioxidantes. É considerada como tal, qualquer substância que, em baixas concentrações, possua uma afinidade maior que qualquer outra molécula para interagir com os radicais livres prevenindo a oxidação do seu substrato (BACALLAO et al., 2001).

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), de nitrogênio (ERN), entre outras espécies reativas, é parte integrante do metabolismo humano e é observada em diversas condições fisiológicas. ERO e ERN têm importante função biológica, como na fagocitose fenômeno em que essas espécies são produzidas para eliminar o agente agressor. Por outro

lado, quando sua produção é exacerbada, o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio. O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante, com predomínio dos oxidantes, com dano conseqüente. A célula, unidade da vida é uma verdadeira usina de pró-oxidantes e antioxidantes (VASCONCELOS et al., 2007).

O sistema de defesa antioxidante dos organismos aeróbicos atua contra os danos causados pela injúria dos radicais livres, conhecidos também como espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) nos organismos vivos (DOTAN et al., 2004). O excesso das EROs e ERNs produzidas *in vivo* é prejudicial às proteínas, ao DNA, aos lipídios e a outras moléculas, tendo um papel crucial na patogênese de diversas doenças humanas, tais como o câncer, artrite reumatóide, doenças hepáticas, neurodegenerativas e pulmonares (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Um antioxidante, ao reagir com um radical livre, cede-lhe um elétron e o inativa, e em alguns casos – como ocorre com a vitamina E – podendo regenerar-se a sua forma inicial pela ação de outros antioxidantes e, assim, continuar com seu efeito “varredor” de radicais livres. Mas nem todos os antioxidantes atuam desta maneira, os enzimáticos catalisam e aceleram as reações químicas que utilizam radicais livres.

A busca por um estilo de vida benéfico à saúde do indivíduo tem impulsionando as pesquisas científicas em busca de novos antioxidantes, principalmente de origem natural, que possam ser utilizados nas indústrias alimentícia, farmacêutica, cosmética entre outras (MELO, 1989; KIM et al., 1997; MATIUCCI, 1998; MENSOR, 1999; MOREIRA, 1999; FREITAS, 2000).

Entre as inúmeras classificações existentes, os antioxidantes são principalmente classificados como exógenos (oriundos dos alimentos ingeridos) e endógenos (sintetizados pelo próprio organismo). As substâncias antioxidantes presentes nas plantas podem ser de

vários tipos: antocianidinas, cumarinas, compostos fenólicos, flavonóides, licopeno, terpenos entre outros (Figura 1).

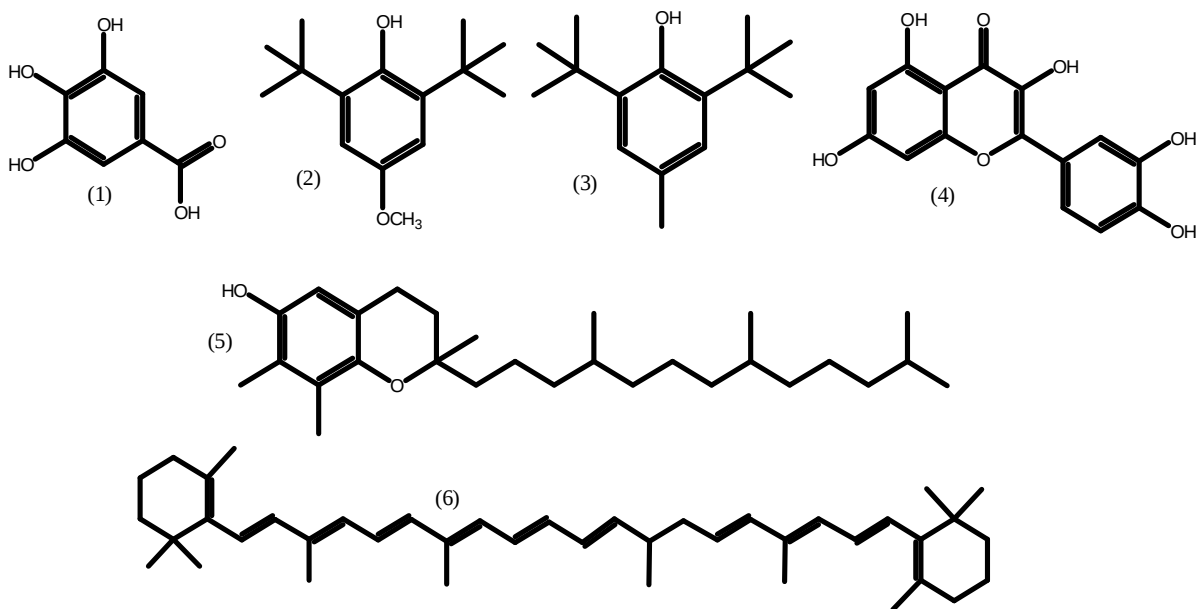


Figura 1 – Substâncias antioxidantes de origem vegetal: (1) ácido gálico, (2) BHA, (3) BHT, (4) Quercertina, (5) α -Tocoferol e (6) β -Caroteno.

Os principais compostos antioxidantes encontrados nas plantas são os fenólicos, entre eles os flavonóides. No Brasil e recentemente na região amazônica, o interesse em antioxidantes polifenólicos derivados de plantas tem aumentado notavelmente na última década, devido a seu elevado poder de remoção de radicais livres associados com várias doenças (SILVA et al., 2005; SOUZA et al., 2008).

Os polifenóis têm capacidade comprovada de doar hidrogênios e quelar íons metálicos como ferro e cobre, inibindo a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (SOARES, 2002; VILLANO et al., 2007). A quantificação espectrométrica de compostos fenólicos pode ser realizada por meio de uma variedade de técnicas, todavia, as que utilizam o reagente de Folin-Ciocalteu figuram entre as mais extensivamente utilizadas (LIMA et al., 2004; LIMA et al., 2006; PRADO et al., 2005; SINGLETON e ROSSI, 1965; SOUZA et al., 2007; VELIOGLU et al., 1998).

Compostos fenólicos são produzidos pelo metabolismo secundário de plantas a partir da glicose que é processada e usada para gerar os metabólitos secundários, originados a partir de aminoácidos aromáticos, como o triptofano, fenilalanina e a tirosina (Figura 2), precursores de compostos aromáticos. Alguns metabólitos secundários derivados do acetato são produzidos pela combinação desses intermediários ou de seus derivados, como: flavonóides, antraquinonas e taninos. Nas plantas, os compostos fenólicos funcionam como componente estrutural, possuindo também excelentes atividades antioxidante, antimicrobianas e antivirais (HERMES-LIMA, 2004).

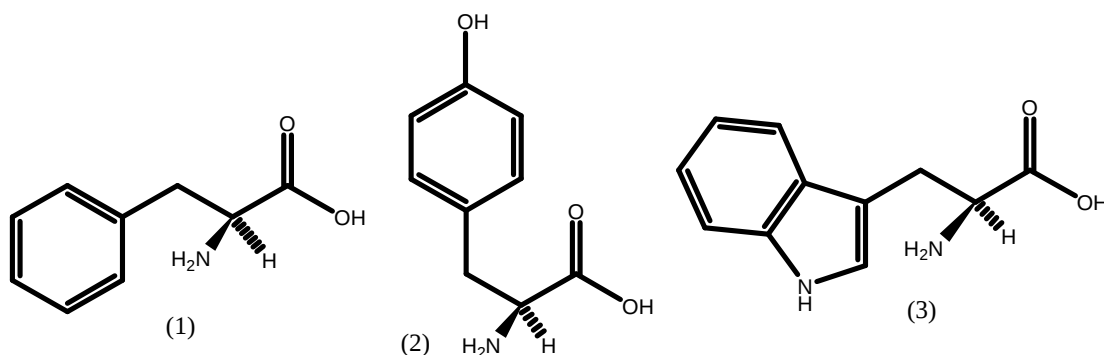


Figura 2 – Estrutura química da Fenilalanina (1), Tirosina (2) e Triptofano (3).

O ácido ascórbico (Figura 3), ou popularmente conhecido como vitamina C, é uma vitamina hidrossolúvel com ação antioxidante. Tem um efeito mediado pela interação direta com o oxigênio de várias espécies incluindo o ozônio e o óxido nítrico; neutraliza outras espécies reativas como o ácido hipocloroso e regenera a forma ativa de outros antioxidantes diretos. O ácido ascórbico também inibe diretamente a reação de formação de EROs mediado pelo ferro das ferroproteínas e pelo peróxido de hidrogênio (BACALLAO et al., 2001).

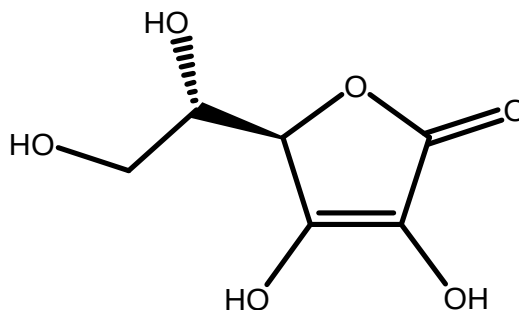


Figura 3 – Ácido ascórbico ou vitamina C.

O ácido ascórbico é ainda considerada um dos mais importantes antioxidantes presente em fluidos extracelulares. No organismo, esta vitamina atua em defesa contra a ação das EROs, evitando a oxidação dos lipídeos insaturados. Porém, em elevadas concentrações ou na presença de metais (ferro ou cobre) poderá exercer função pró-oxidante, promovendo a lipoperoxidação (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989).

Os carotenóides são grupos de pigmentos naturais responsáveis pela coloração de inúmeros vegetais. Um dos principais carotenóides é o β -Caroteno (Figura 1), também conhecido como pró-vitamina A, pois, em nosso organismo, ele se transforma em vitamina A (Figura 4), de acordo com a necessidade. Substância também pertencente ao grupo dos carotenóides, o licopeno (Figura 5) é um dos mais potentes antioxidantes estudados atualmente. Acredita-se que o seu consumo previne alguns tipos de cânceres, em especial, o de próstata, sendo sugerido na prevenção da carcinogênese e aterogênese por proteger moléculas como lipídios, lipoproteínas de baixa densidade (LDL), proteínas e DNA (AGARWAL e RAO, 2000).

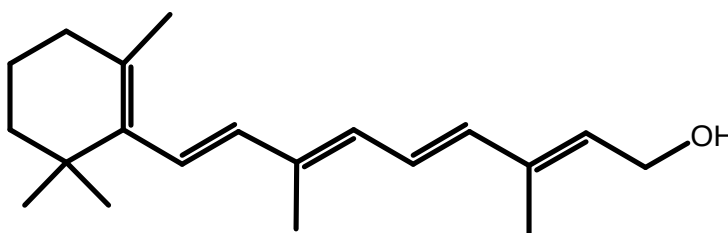


Figura 4 – Retinol ou Vitamina A

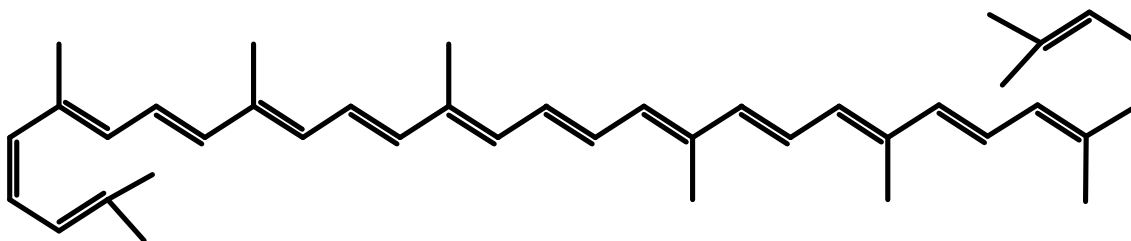


Figura 5 - Licopeno

A vitamina A (Figura 4) tem uma forte ação antioxidante que se reconhece principalmente pela neutralização do oxigênio no estado singlete por um mecanismo de transferência de energia do radical com a formação de um tripleto de vitamina A e posterior dissipação desta energia com a regeneração da vitamina. Mas, quando comparada ao β -Caroteno e aos carotenóides presentes em plantas, a vitamina A é menos eficiente em sua ação antioxidante por apresentar menor quantidade de insaturações em sua estrutura (BACALLAO et al., 2001).

O α -tocoferol ou vitamina E (Figura 1) é um importante agente sequestrador de radicais peróxidos, oxigênio no estado singlete e outras espécies reativas de oxigênio nas fases lipídicas biológicas das membranas e lipoproteínas, efeito muito importante em nível de determinados tecidos como o nervoso e muscular.

A vitamina E pode aliviar situações de estresse, particularmente as geradas pelo oxigênio. Este tipo de vitamina atua por meio do bloqueio das moléculas instáveis de oxigênio singlete. Esta previne a oxidação espontânea dos elementos poliinsaturados e protege, em termos funcionais, estruturas celulares importantes dos tecidos, supostamente mediante a inibição da peroxidação lipídica (BACALLAO et al., 2001).

2.4 Ensaios para caracterização de atividades antioxidantes de extratos de plantas

Atualmente, com o crescente interesse da comunidade científica em caracterizar a eficiência antioxidante dos alimentos naturais e dos sistemas biológicos, os testes para caracterização de atividades antioxidantes são o centro das atenções. Antioxidantes são compostos que atuam inibindo e/ou diminuindo os efeitos desencadeados pelos radicais livres e compostos oxidantes. Diferentes métodos podem ser utilizados para obter a diferenciação, seja qualitativa ou quantitativa, da capacidade antioxidante de compostos, tanto pelo emprego de testes sem a utilização de células (ensaios químicos) como pelo uso de culturas celulares e organismos vivos (ensaios biológicos).

Embora exista uma grande variedade de métodos utilizados para estes fins, não há métodos normatizados. Muitos protocolos são atualmente utilizados para avaliar antioxidantes de interesse na alimentação e nutrição, saúde e doença. Obviamente, a significância e relevância destes testes na avaliação de alimentos ou sistemas biológicos dependem da escolha adequada do método de ensaio. Os resultados inconsistentes têm sido obtidos por um grande número de antioxidantes conhecidos dependendo dos métodos usados para testar sua atividade (FRANKEL e MEYER, 2000; WANG et al., 2004).

2.4.1 Ensaios Químicos

A caracterização da atividade antioxidante/redutora por métodos químicos tem sido largamente utilizada pelos fitoquímicos em extratos de origem vegetal (BONDET et al., 1997; BACALLAO et al., 2001; MENSOR et al., 2001; ARTS et al., 2004; EREL, 2004; MOLYNEUX, 2004; YANG et al., 2007; ZHU et al., 2004). Esta atividade pode ser determinada utilizando-se substâncias conhecidas, capazes de serem reduzidos na presença de

antioxidantes. Segundo ARNAO (2000), os principais passos para realização de um ensaio químico para caracterização dessa atividade são:

- (1) dissolver um cromógeno em meio apropriado;
- (2) adicionar o antioxidante (extrato/fração);
- (3) medir a perda fotométrica do cromógeno radical observando a diminuição na absorbância de luz em um comprimento de onda conhecido;
- (4) as diminuições podem ser correlacionadas em uma curva da dose-resposta com um antioxidante padrão, expressando a atividade antioxidante como equivalente ao do antioxidante padrão, por exemplo: TROLOX[®] (Figura 6) ou o ácido ascórbico (Figura 3).

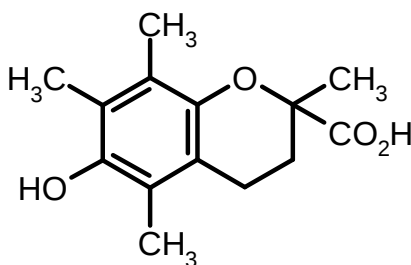


Figura 6 – Estrutura do TROLOX[®]
Fonte: Adaptado de BIOMOL (2006).

De acordo com o tipo de mecanismo de ação dos antioxidantes, os testes *in vitro*, utilizados para caracterizar atividades antioxidantes, podem ser agrupados em quatro tipos básicos: (1) seqüestradores de radicais; (2) inibidores de reações de oxidação ou auto-oxidação; (3) medidores de potencial de oxi-redução e (4) de ressonância magnética nuclear de spin de elétron (DAVID et al., 2004).

Os ensaios mais utilizados são os seqüestradores de radicais que se baseiam na medição da capacidade de uma substância (pressupostamente antioxidante) em seqüestrar os radicais livres. O provável potencial benéfico na saúde das substâncias antioxidantes presentes em frutas e legumes levaram a uma explosão da investigação sobre as propriedades

antioxidantes dos compostos polifenólicos, especialmente os flavonóides, que constituem aproximadamente 4000 diferentes compostos (FRANKEL e MEYER, 2000).

Uma grande variedade de métodos unidimensionais foi desenvolvida utilizando uma ampla gama de condições, com variedade de sistemas de geração de radicais, métodos de oxidação e observação de pontos finais. Esta diversidade metodológica utilizada para avaliar antioxidantes naturais de extratos vegetais e compostos fenólicos puros levou a ampla gama de resultados que são extremamente difíceis de interpretar. Estes não levam em conta o complexo mecanismo de ação antioxidante dos compostos fenólicos, as reações, bem como as suas múltiplas ações em sistemas biológicos complexos, e a significância dos efeitos do substrato sobre a eficácia antioxidante (FRANKEL e MEYER, 2000).

Quanto aos ensaios para a caracterização de atividade varredora de radicais, podem ser citados os métodos de DPPH[•] e ABTS^{•+} que empregam radicais estáveis em solução colorida. Após a adição do antioxidante com capacidade de sequestrar esses radicais que foram produzidos, ocorre mudança de coloração da solução. Essas soluções são submetidas a análises espectrofotométricas, e os resultados comparados quantitativamente com padrões de antioxidantes comerciais e/ou naturais (ARNAO, 2000; ARTS et al., 2004).

Os inibidores de reações de oxidação ou auto-oxidação avaliam a atividade antioxidante de uma determinada substância com acompanhamento da concentração das substâncias a serem protegidas. Os medidores de potencial de oxi-redução têm este nome por avaliarem, primeiramente, o potencial de oxidação e redução. Teoricamente, a capacidade antioxidante da substância é proporcional ao valor do potencial de redução (CARVALHO, 2004).

A ressonância de spin de elétron é um método que utiliza substâncias com propriedades paramagnéticas. Ex: radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$) produzidos *in situ* pela xantina oxidase (XOD) (Figura 7).

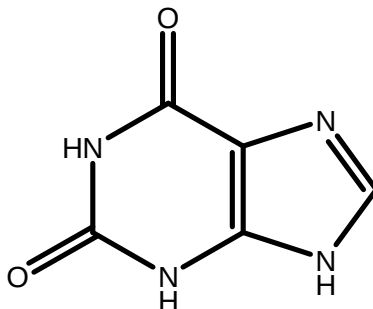


Figura 7 – Xantina Oxidase

Na literatura, encontram-se vários trabalhos que utilizam os métodos de varredura de radicais DPPH[•] e ABTS^{•+} em paralelo para avaliar a capacidade antioxidante de várias categorias de amostras (SHUI e LEONG, 2002; GORINSTEIN et al., 2003; KATALINIC et al., 2004; MILIAUSKAS et al., 2004). Estes dois métodos são os mais utilizados para avaliar o potencial antioxidante de materiais biológicos por apresentarem excelente estabilidade em determinadas condições do ensaio e serem fáceis de implementar em laboratórios fitoquímicos (ARNAO, 2000).

2.4.2 ABTS^{•+}

Segundo RE e colaboradores (1998), quando o método utilizando o cátion radical ABTS^{•+} [2,2'-azinobis (3-etilfenil-tiazolina-6-sulfonato)] (Figura 8) tem como referencial comparativo o antioxidante padrão chamado de TROLOX[®] (2-carbóxi-6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcromano), um análogo hidrossolúvel da vitamina E, o ensaio passa a ser conhecido como TEAC - Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (capacidade antioxidante equivalente a do TROLOX[®]). O TROLOX[®] (figura 1) é uma substância solúvel em tampão e considerada um potente antioxidante. A atividade dos compostos testados é expressa em valores de TEAC, definido como a concentração de TROLOX[®] que possui a mesma atividade que 1 mM da substância em teste (ARTS et al., 2004, OBÓN et al., 2005).

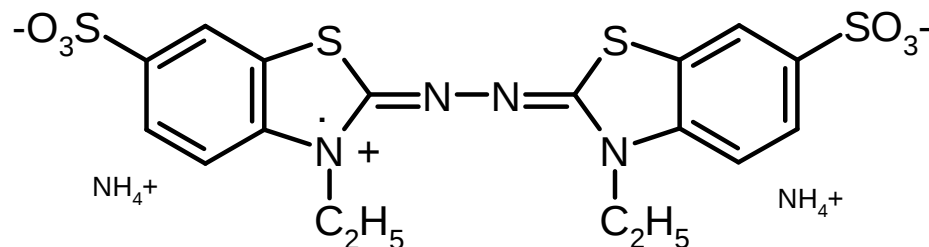


Figura 8 – Estrutura do cátion radical [2,2'-azinobis (3-etilfenil-tiazolina-6-sulfonato)] ou ABTS⁺
Fonte: Adaptado de TAKEBAYASHI et al. (2006).

Neste teste, a solução de ABTS⁺ tem a função de formar um radical colorido; então, a esta solução adiciona-se um antioxidante (extrato que se pretende testar), e, depois de um tempo determinado, dosa-se por espectrofotometria a concentração de radicais formados do ABTS⁺ restante na solução, medindo-se a absorbância em comprimento de onda de 734 nm. Então se faz o mesmo com uma amostra de TROLOX[®] e comparam-se os resultados. Assim, uma curva similar da dose-resposta pode ser obtida com ambos os cromógenos quando estes antioxidantes são usados como padrão (EREL, 2004; ARTS et al., 2004).

O ABTS⁺ é solúvel tanto em meio aquoso quanto em meio orgânico, e pode medir a capacidade antioxidante de compostos tanto de natureza hidrofílica quanto lipofílica. Sua solubilidade e estabilidade são tão boas quanto às reações com ele geradas.

2.4.3 DPPH[·]

O radical DPPH[·] (Figura 9) é um radical livre gerado de forma similar ao ABTS⁺, por reações químicas ou enzimáticas. Ele é solúvel apenas em meio orgânico, isto é uma limitação importante quando se trata de antioxidantes de origem hidrofílica. É um cromógeno muito estável que apresenta um pico de absorbância em 515nm, mais as metodologias utilizadas podem variar bastante (ARNAO, 2000; ZHUANG et al., 1999).

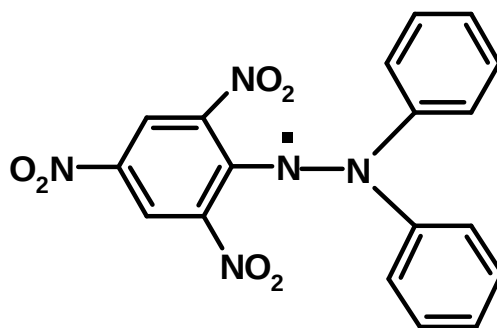


Figura 9 – Estrutura do radical 1,1-difenil-2-(2,4,6-trinitrofenil) hidrazila ou DPPH[•].

Fonte: Adaptado de TAKEBAYASHI et al. (2006).

No método de DPPH[•], O radical livre 1,1-difenil-2-(2,4,6-trinitrofenil) hidrazila ou DPPH[•] é um radical estável, o radical livre DPPH[•] (Figura 3) é produzido diretamente no meio orgânico e quando em contato com substâncias antioxidantes, há o seqüestro do radical DPPH[•] o que é evidenciado por meio da descoloração da solução, caracterizando a reação de redução (MOLYNEUX, 2004).

MENSOR e colaboradores (2001) consideraram o método DPPH[•] rápido e fácil para avaliar a presença de antioxidante na amostra. A grande vantagem deste método consiste na sua rápida preparação realizada em temperatura ambiente, eliminando, assim, qualquer risco de degradação térmica das moléculas em estudo (BONDET et al., 1997). O mecanismo reacional entre o antioxidante e o DPPH[•] depende da conformação estrutural do antioxidante (BRAND-WILLIAWS et al., 1995). Para melhor compreensão dos mecanismos que envolvem o DPPH[•] e o antioxidante é importante à caracterização química das substâncias intermediárias e finais da reação.

A reação de determinados compostos com DPPH[•] acontece rapidamente e, no caso de compostos fenólicos, parece que a redução do número de moléculas de DPPH[•] está associada ao número de hidroxila disponível na amostra. A impossibilidade da dissolução do DPPH[•] em meio aquoso torna-se uma limitação para estudo de antioxidantes hidrofílicos. No entanto, é um excelente método *in vitro* para investigar a atividade seqüestradora de radicais de

moléculas que possuam em seu mecanismo de ação a capacidade de doar átomos de hidrogênio para o radical (ARNAO, 2000).

2.4.4 Rubreno

Outra forma de realização da caracterização antioxidante é pelo método do 5,6,11,12-tetrafenilnaptaceno ou rubreno (Figura 10). Este método já foi utilizado para testar atividade antioxidante de substâncias isoladas de plantas (GREGIANINI et al., 2003) ou de frutos (OH et al., 2006). O rubreno é um hidrocarboneto policíclico sensível à radiação UV, emitida pela luz branca visível. Pode ser preparado em solução com clorofórmio, tendo coloração alaranjada e que, ao ser exposta à luz, reage formando oxigênio singlete que oxida a solução e faz com que esta se torne transparente. A perda na coloração é proporcional à intensidade de exposição à luz (GREGIANINI et al., 2003).

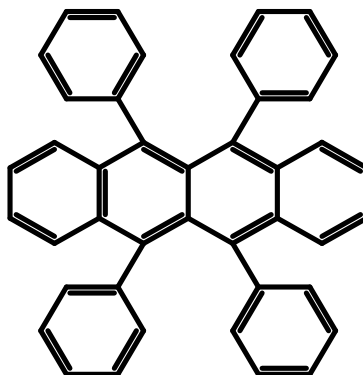


Figura 10 – Estrutura química do (5,6,11,12-tetrafenilnaptaceno) ou Rubreno.
Fonte: Adaptado de ARELLANO (2006).

Ao se adicionar uma substância que tenha capacidade antioxidante ou mais especificamente, varredor de oxigênio singlete, espera-se que ela detenha os efeitos da foto-oxidação da solução de rubreno. Para efeito de comprovação, utiliza-se uma substância com reconhecida ação varredora de oxigênio singlete como padrão antioxidante.

Uma destas substâncias é o 1,4-diazabícclo (2,2,2) octano (DABCO) (figura 11), um antioxidante conhecido na literatura pelo seu efeito anti-oxigênio singlete. Contudo, o β -caroteno, que também possui este efeito, pode ser utilizado como padrão no ensaio (GREGIANINI et al., 2003).

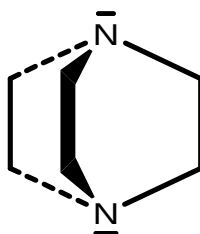


Figura 11 – Estrutura química do DABCO

Fonte: Adaptado de KRATZERT e IBOLD (2000).

2.4.5 Sistema β -caroteno/ácido linoléico

Um outro sistema de rápida seleção de substâncias e/ou misturas de antioxidantes é o sistema de co-oxidação do β -caroteno (Figura 1) com o ácido linoléico (Figura 12). Este método avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico. O método está fundamentado em medidas espectrofotométricas de descoloração (oxidação) do β -caroteno induzidas pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoléico (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

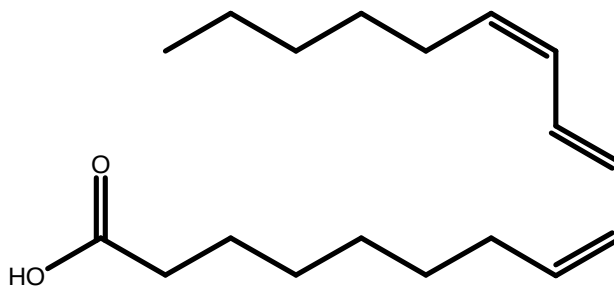


Figura 12 – Estrutura química do ácido linoléico

2.4.6 FRAP

O método de FRAP (habilidade de redução do ferro sérico) é outro método simples para caracterizar a capacidade antioxidante total do plasma, medindo a eficiência dos antioxidantes contidos na amostra em reduzir o ferro na presença de diferentes fatores enzimáticos e não enzimáticos. O método avalia diretamente a capacidade de antioxidantes em reduzir um complexo férrico (Fe^{3+}) a complexo ferroso (Fe^{2+}) em pH baixo. O resultado em coloração azul pode ser medido espectrofotometricamente em 593nm e tida como linearmente relacionadas com a total redução da capacidade de doar elétrons dos antioxidantes (OU et al., 2002; GUO et al., 2003).

A principal desvantagem desta abordagem é que a medida da capacidade redução não necessariamente reflete a atividade antioxidante. Uma vez que o método não inclui um substrato oxidável, não fornece informações sobre a propriedade de proteção dos antioxidantes. A vitamina C (Figura 3) e o ácido úrico (Figura 13), por exemplo, reduzem Fe^{3+} a Fe^{2+} . Já um antioxidante que reduz efetivamente um pró-oxidante não reduz, necessariamente, Fe^{3+} a Fe^{2+} . As limitações do método são: nem todo redutor que é hábil para reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} é antioxidante; nem todo antioxidante tem a habilidade específica para reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} , como por exemplo, a glutathione (FRANKEL e MEYER, 2000; VASCONCELOS et al., 2007).

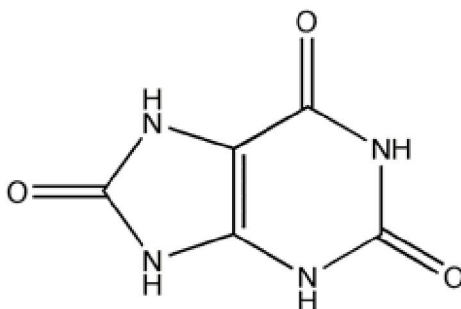


Figura 13 – Estrutura química do ácido úrico.

2.4.7 TRAP

O método de TRAP (potencial de absorção de radicais), introduzido por WAYNER et al. (1985), é utilizado para determinar o potencial de absorção total de radicais livres circulantes. É baseado na determinação do intervalo de tempo que o soro pode resistir à indução de peroxidação lipídica. Mede-se a formação de radicais peróxidos, que podem ser detectados por meio da reação de quimiluminescência. Pode ser um marcador de início de um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes no soro ou plasma. Quando um extrato vegetal é testado pelo método de TRAP, a reação é inibida por um tempo diretamente proporcional ao potencial antioxidativo do radical peróxido capturado pela amostra (NICULESCU et al., 2001; WAYNER et al., 1985).

2.4.8 ORAC

O método de ORAC foi desenvolvido e validado utilizando fluoresceína (Figura 15) como prova fluorescente (OU et al., 2001). Esta modificação fornece uma medida direta rompendo a cadeia hidrofílica, e determina a capacidade antioxidante contra radical peróxido. Pode-se utilizar também a proteína Phycoerythrin (PE) ou Ficoeritrina (Figura 16), fotossintética, marcadora de fluorescência, como alvo dos radicais.

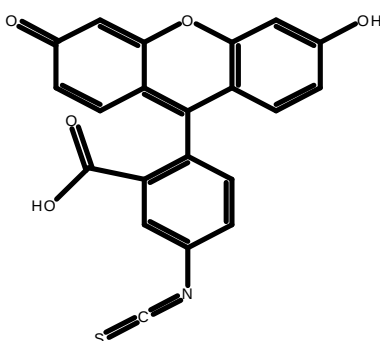


Figura 14 – Estrutura química da Fluoresceína

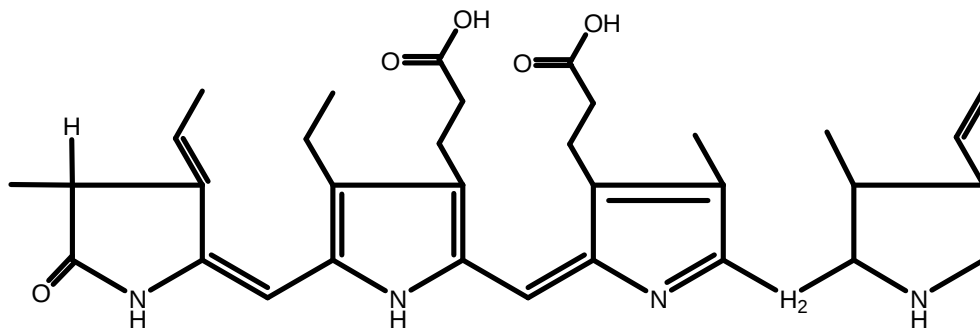


Figura 15 – Estrutura química da Phycoerythrin (PE) ou Ficoeritrina

O ORAC mede a diminuição da emissão de fluorescência de PE adicionada ao plasma em presença de um composto azo, gerador de radicais. A habilidade antioxidante do plasma é calculada a partir da medida da área sob a curva de decaimento da fluorescência (“Area Under the Fluorescence Decay Curve” – AUC, com emissão a 565 nm) comparada ao padrão que, na maioria das vezes, é o TROLOX[®]. A PE também pode ser oxidada utilizando-se AAPH ou 2,2'-Azobis (2-metilpropanoamidina) (Figura 17) para gerar radical peroxila, ou ainda, adicionando-se íons Cu^+ como redutores para gerar radicais hidroxila (VASCONCELOS et al., 2007).

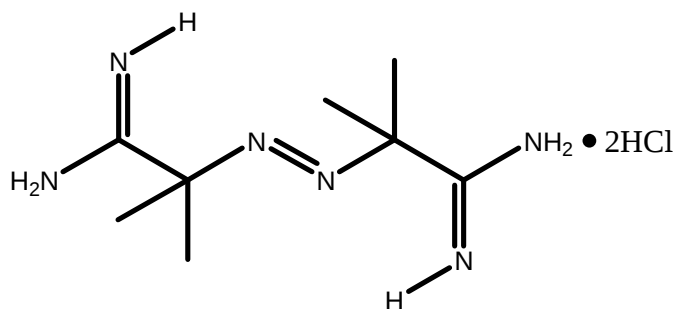


Figura 16 – AAPH ou 2,2'-Azobis (2-metilpropanoamidina)

No entanto, normalmente não é possível determinar diretamente a contribuição dos fitonutrientes para o valor total de ORAC. O método fornece informações substanciais no que diz respeito à capacidade antioxidante de compostos puros, tais como antocianidinas, flavonóides, cafeína e matriz alimentar complexa tais como vegetais, frutos e chás, e aveia.

Além disso, o método de ORAC é útil para avaliar a influência das temperaturas de cultivo e armazenagem sobre a atividade antioxidante de morangos (CAO et al., 1993; CAO et al., 1998).

2.4.9 Atividade Varredora de Superóxido (AVS)

Há também o ensaio para avaliação da atividade varredora do ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) onde estas são geradas durante o metabolismo de organismos aeróbicos, seja como produtos finais de reações enzimáticas ou acidentalmente como produtos celulares secundários de reações redoxes. Estes radicais são uma fonte potencial de lesões, pois podem agir diretamente sobre alvos biológicos ou indiretamente iniciando a produção de espécies altamente reativas de oxigênio, como o $^1\Delta_g O_2$ (oxigênio singlete) ou $OH^{\cdot}$ (radical hidroxila). Neste ensaio, o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é gerado pelo sistema PMS-NADH (Phenazine methosulfate e Nicotinamina Adenina Dinucleotídeo) (Figuras 18), reduzidos pela oxidação do Nitro Blue Tetrazolium (NBT) (Figura 19) (EWING e JANERO, 1995; OZTURK et al., 2007).

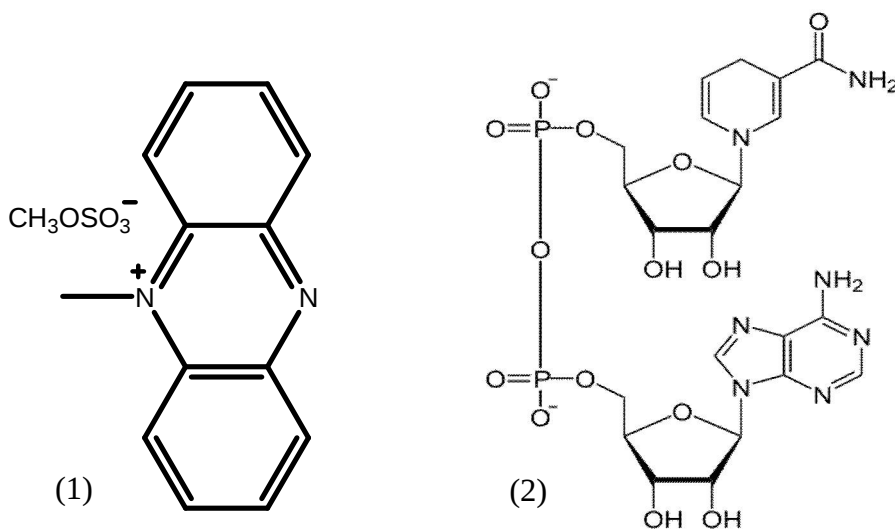


Figura 17 - Phenazine methosulfate (PMS) e Nicotinamina Adenina Dinucleotídeo (NADH)

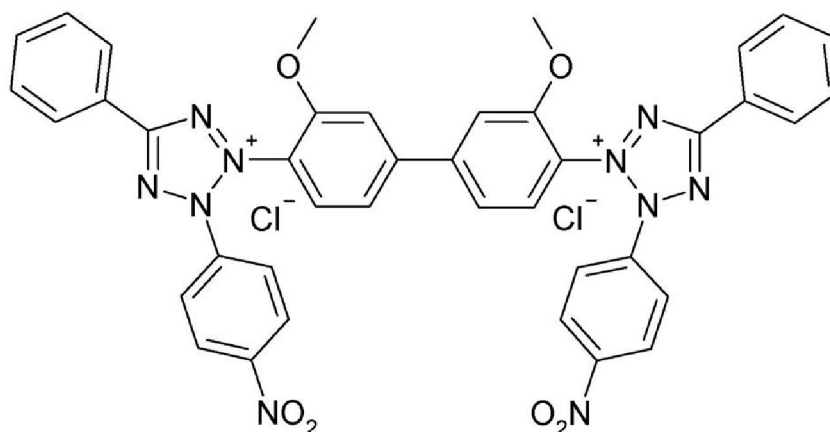
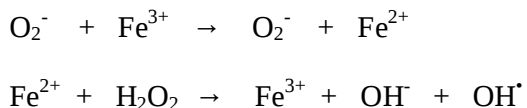


Figura 18 – Estrutura química do radical NBT^+ (Nitro Blue Tetrazolium), utilizada no ensaio para caracterização de atividade varredora de ânion radical superóxido.

Fonte: Adaptado de ARELLANO (2006).

A primeira linha de defesa contra a toxicidade do oxigênio é, portanto, a remoção de radical ânion superóxido antes que a formação de outros produtos nocivos possa ocorrer. As superóxido dismutases são considerados como as principais enzimas de defesa presentes nas células, pois varrem o radical ânion superóxido (POLLE et al., 1989).

Embora o radical ânion superóxido não possa iniciar diretamente a oxidação lipídica, ele é parte integrante deste processo. Este ensaio utiliza a varredura de $\text{O}_2^{\cdot-}$, pois, na presença de íons metálicos, os radicais hidroxila altamente reativos, podem ser gerados pela reação de Fenton, ilustrada abaixo:



Contudo, a varredura de $\text{O}_2^{\cdot-}$ não é o único mecanismo de inibição da oxidação lipídica em sistemas biológicos. Portanto, sistemas de alimentos e compostos fenólicos em extratos vegetais tendo propriedades as varredoras de $\text{O}_2^{\cdot-}$ não são necessariamente eficazes na prevenção de oxidação lipídica, mas podem ser consideradas uma espécie de antioxidante específico para uma espécie radicalar importante no estresse oxidativo de organismos vivos, o

radical hidroxila. As propriedades varredoras de $O_2^{\cdot-}$ foram empregadas para avaliar a atividade dos polifenóis. Para além destas insuficiências, medições da capacidade varredora de superóxido devem ser interpretadas com cautela, pois não pode haver equilíbrio alcançado quando são gerados radicais superóxido continuamente durante o ensaio (FRANKEL e MEYER, 2000).

2.4.10 Ensaio biológicos

Os testes químicos são mais rápidos e simples de serem executados, mas embora estes sejam relativamente simples para avaliação da capacidade antioxidante, não são muito representativos das condições celulares do homem. Por outro lado, ensaios microbianos, utilizando-se, principalmente, células eucarióticas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* têm se mostrado muito adequado para determinação da capacidade antioxidante de diferentes compostos, fornecendo resultados rápidos, reprodutíveis e passíveis de serem correlacionados ao observado no homem (SOARES et al., 2005).

A avaliação da capacidade antioxidante empregando animais de laboratório é, em geral, de difícil execução e necessita de um número elevado de animais para assegurar resultados estatisticamente significativos. Já os ensaios realizados com microorganismos são fáceis, rápidos e podem utilizar um grande número de células com as mesmas características genéticas.

2.4.11 *Saccharomyces cerevisiae*

Várias razões tornaram a levedura *Saccharomyces cerevisiae* um dos melhores modelos de sistema eucariótico unicelular para estudos de estresse oxidativo. Seu

metabolismo é semelhante ao de eucarióticos superiores, com mecanismos próprios de ativação metabólica (citocromo P450) e de detoxificação, que não estão presentes em bactérias. Os ensaios em células eucarióticas permitem a avaliação da atividade antioxidante de inúmeros compostos de forma rápida, econômica e reprodutível e os resultados obtidos podem ser mais facilmente extrapolados para o homem do que os obtidos em testes *in vitro* (SOARES et al., 2005).

A avaliação da capacidade antioxidante pode ser feita pela medida da sobrevivência de células tratadas com os antioxidantes em presença e ausência de agentes estressores (Figura 20), como por exemplo, a apomorfina e o paraquat (BENZIE e SZETO, 1999; WANG et al., 1999; ESPIN et al., 2000; SOARES et al., 2005). A *Saccharomyces cerevisiae* é um microorganismo que pode ser modificado geneticamente de modo a se tornar sensível à oxidação. O uso desses microorganismos como modelo biológico é particularmente atrativo por causa da facilidade na manipulação genética, na disponibilidade da sequência genômica completa da *Saccharomyces cerevisiae* e da conservação aparente de mecanismos moleculares entre a levedura e as células humanas. Aproximadamente 30% dos genes associados a doenças humanas combinam significativamente genes da levedura e, no contraste com seres humanos, os genes da levedura podem facilmente ser manipulados com as técnicas de biologia molecular (SILVA et al., 2005).

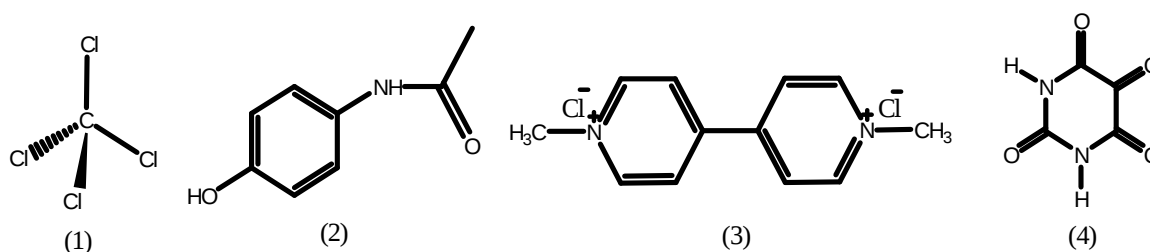


Figura 19 – Principais agentes estressores utilizados em ensaios biológicos: (1) tetracloreto de carbono, (2) APAP, acetoaminofeno ou paracetamol, (3) Paraquat e (4) Aloxano.

2.4.12 Modelo de estresse em ratos Wistar

Os ensaios biológicos também podem ser realizados com roedores como o rato Wistar, onde algumas substâncias são utilizadas para gerar lesão tecidual, denominadas agentes estressores, pois induzem à formação de radicais livres e, conseqüentemente, estresse oxidativo, causando, como dano primário, alterações nos constituintes plasmáticos, devido principalmente a peroxidação de lipídeos (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

O Paracetamol (Figura 19), ou APAP, é a droga de escolha para lesar os hepatócitos por mecanismo oxidativo. É um antipirético e analgésico eficaz quando utilizado em nível terapêutico, mas uma overdose aguda ou crônica pode causar lesões severas no fígado, com a possibilidade de falência do órgão. Além de sua relevância clínica, o APAP é utilizado extensivamente como modelo de toxina para avaliar agentes hepatoprotetores. Doses tóxicas de APAP levam ao estresse oxidativo do fígado (NORIEGA et al., 2000).

O tetracloreto de carbono (Figura 19) possui uma ação parecida com a do paracetamol (APAP), causando lesão no fígado, alterando constituintes do plasma e elevando os níveis de biomarcadores do estresse oxidativo, tais como o MDA (malondialdeído). Isto é facilmente caracterizado por meio das dosagens de biomarcadores tais como Malondialdeído (MDA), Hidroperóxidos, entre outros (DADKHAH et al., 2006; KADIISKA et al., 2005a; KADIISKA et al., 2005b; WANG et al., 2007).

O acetoaminofeno, o aloxano e a estreptozotocina (Figura 20) são substâncias comumente utilizadas quando o estudo visa testar também drogas hipoglicemiantes e que possam combater os efeitos do diabetes. Essas drogas também levam a alteração de marcadores do estresse oxidativo em ratos. Eles atuam sobre as células β do pâncreas, danificando-as, e levando a uma hiperglicemia diabética induzida por estresse oxidativo

(Figura) (COSTA et al., 2004; DELFINO et al., 2002; KIM et al., 2006; MAZZANTI et al., 2003).

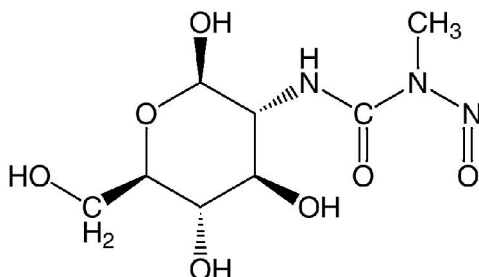


Figura 20 – Estrutura química da estreptozotocina.

Em todos os casos de estresse induzido, os animais são tratados por grupos. Um grupo controle negativo composto por ratos saudáveis e que não recebem nenhum tratamento, cujos valores obtidos nas dosagens dos biomarcadores de estresse oxidativo, servirão de valores basais para todos os outros grupos. Um grupo controle positivo, composto por animais que recebem droga de indução do estresse, fornecerá valores usados como referência dos danos causados pelo estresse induzido, como o tetracloreto de carbono (CCl₄), aloxano e a estreptozotocina. Os animais são tratados com o antioxidante do qual se pretende caracterizar a atividade antioxidante, seja um antioxidante padrão de atividade conhecida, como a N-acetilcisteína, ou um extrato vegetal a ser testado. As dosagens dos biomarcadores de estresse medidos são comparados entre os grupos, e então é estimada a eficácia de cada amostra (CAO et al., 1998; KADIISKA et al., 2005a; KADIISKA et al., 2005b).

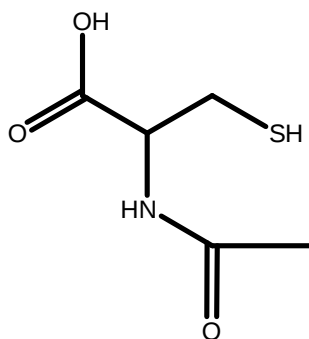


Figura 21 - Estrutura química da N-acetilcisteína.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Comparar metodologias utilizadas na caracterização de atividades antioxidantes de espécies de plantas amazônicas.

3.2 Específicos

3.2.1 Realizar ensaios químicos (DPPH, ABTS, AVS e Rubreno) e biológicos (indução de estresse em leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e ratos Wistar) capazes de caracterizar as atividades antioxidantes de extratos de plantas amazônicas;

3.2.2 Comparar as atividades antioxidantes entre as espécies: *Byrsonima japurensis* A. Juss., *Calycophyllum spruceanum* Benth., *Derris floribunda* Benth., *Maytenus guianensis* Klotzch., *Passiflora nitida* Kunth L., *Petiveria alliacea* L. e *Ptychopetalum olacoides* Benth.;

3.2.3 Elaborar um protocolo experimental para caracterização da atividade antioxidante em extratos vegetais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 reagentes

Água miliq, utilizada foi preparada usando um Millipore Milli-RO 12 plus (sistema Millipore Corp, MA, EUA). Todos os reagentes e solventes foram da mais alta pureza disponível, tendo sido obtidos a partir da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EUA).

4.1.2 Equipamentos

Espectrofotômetros utilizados: Ultrospec 2000 UV/Vis Spectrophotometer (Pharmacia Biotech, Cambridge, England); CELM modelo E-225D (CELM, Barueri – São Paulo, Brasil) e leitor de microplacas Thermoplate (TP-Reader, Thermoplate, Itália). Auto-analizador de bioquímica Cobas[®] Mira plus (Roche[®] Corporation). Pipetas monocal e multicanal Eppendorf (Eppendorf do Brasil Ltda. – São Paulo, Brasil). Autopurificador de água Millipore Milli-RO 12 plus (Millipore Corp, MA, EUA).

4.2 Modelo de Estudo

O modelo de estudo utilizado foi do tipo experimental e prospectivo, visando comparar técnicas de caracterização de atividades antioxidantes de espécies de plantas da Amazônia.

4.3 Obtenção das Amostras

4.3.1 Plantas

A escolha das plantas foi efetuada por meio de estudos fitoquímicos prévios e atividades biológicas correntes na literatura científica. Após elaboração dos extratos, foi realizado um teste rápido, (qualitativo) para determinação da presença de antioxidantes nos extratos. Este teste baseou-se na borrifação da placa cromatográfica, previamente eluída e seca contendo o extrato vegetal, com uma solução 0,2 % de 2,2-difenil-1-(2,4,6-trinitrofenil) hidrazila (DPPH) em metanol (MeOH). Após 5 min, a placa adquiriu a coloração púrpura, que contrastou ou não com um tom amarelo quando da presença de antioxidantes nas amostras previamente eluídas na mesma (AL-DABBAS et al., 2006; CUENDET e HOSTETTMANN, 1997). A seguir, a relação de plantas das quais foram preparados extratos brutos utilizados neste trabalho com seus respectivos números de depósitos:

- *Byrsonima japurensis* A. Juss. (127281), família Malpighiaceae (Saratudo);
- *Calycophyllum spruceanum* Benth. (174714), família Rubiaceae (Mulateiro);
- *Derris floribunda* Benth. (120839), família Fabaceae (Timbó-rana);
- *Maytenus guianensis* Klotzch. (157502), família Celastraceae (Chichuá);
- *Passiflora nitida* Kunth L. (209547), família Passifloraceae (Maracujá-do-mato);
- *Petiveria alliacea* L. (204569), família Phytolacaceae (Mucura-caã);
- *Ptychopetalum olacoides* Benth. (138278), família Olacaceae (Muirapuama).

4.3.2. Identificação das plantas

As plantas coletadas foram identificadas taxonomicamente pelo MSc. Carlos Alberto Cid Ferreira e MSc. Carlos Henrique Franciscón, ambos do CPBO/INPA, e as suas respectivas exsicatas foram depositadas no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e no herbário da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

4.3.3. Coleta das plantas

As amostras das plantas foram coletadas em diversos locais. A espécie *Derris floribunda* Benth. (Fabaceae) foi coletada na Praia Dourada, na cidade de Manaus-AM. As espécies *Calycophyllum spruceanum* Benth. (Rubiaceae), *Byrsonima japurensis* A. Juss. (Malpighiaceae), *Passiflora nitida* Kunth L. (Passifloraceae) e *Petiveria alliacea* L. (Phytolacaceae) foram coletadas no Lago do Purupuru no município de Careiro Castanho, no interior do Estado do Amazonas. As espécies *Maytenus guianensis* (Xixuá) e *Ptychopetalum olacoides* Benth. (Olacaceae) foram coletados em região próxima à cidade de Benjamin Constant, no estado do Amazonas. As amostras das espécies e suas respectivas exsicatas foram depositadas no herbário do INPA.

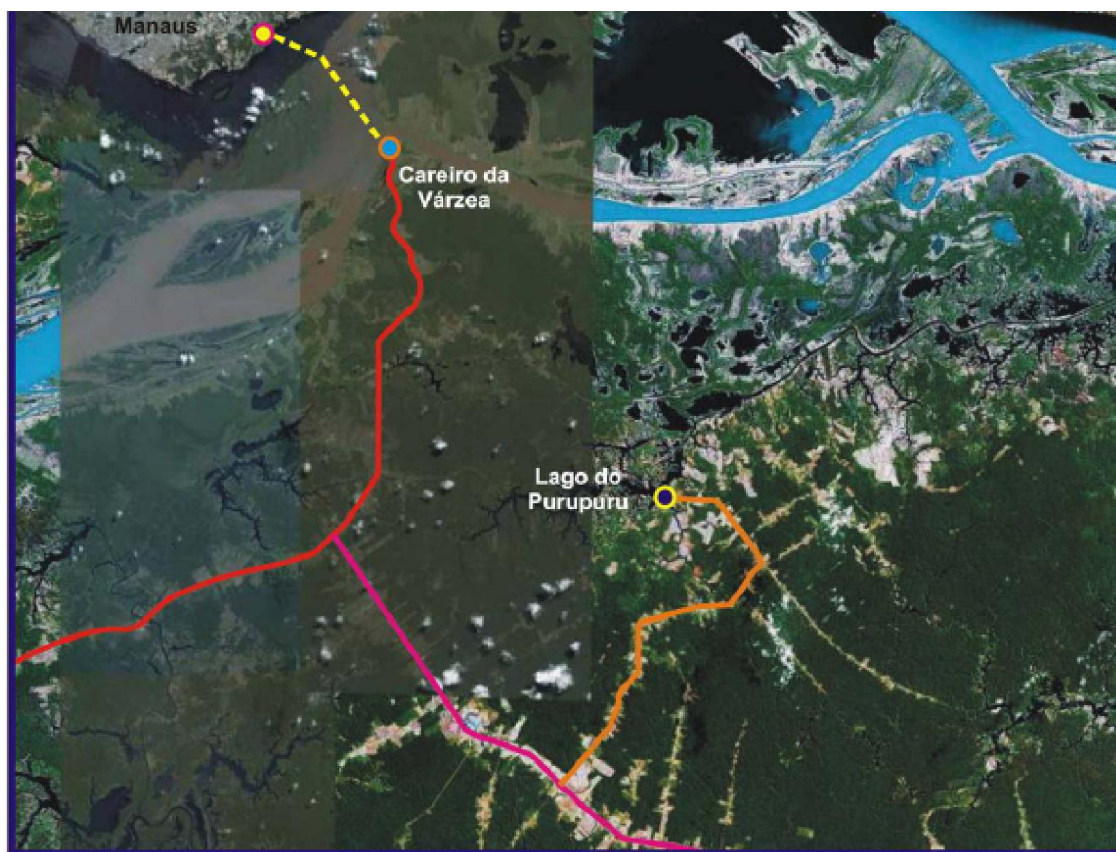


Figura 7 - Lago do Purupuru, Careiro Castanho - AM
Fonte - Google Earth, 2007.

4.3.4 Obtenção dos extratos

Para a preparação de seus respectivos extratos, as folhas ou cascas foram limpas, separadas e secas em temperatura ambiente, e, nos caso de algumas das espécies utilizadas, secas em estufa com circulação de ar em temperatura de 45°C por 48 horas. Em seguida trituradas com auxílio de um moinho de facas e deixadas sob maceração, primeiro com etanol na proporção de 2% (p/v) e depois com água. Com algumas espécies a extração foi auxiliada pelo uso de ultra-som por 20 min e repetido duas vezes para cada solvente. A solução extrativa foi filtrada e o solvente evaporado em evaporador rotativo sob pressão reduzida e baixa temperatura, e em seguida liofilizado até a obtenção de um pó seco o qual foi utilizado

nos ensaios antioxidantes (CANNELL, 1998; SIMÕES et al., 2004). O procedimento de extração encontra-se detalhado na tabela 1 e ilustrado na Figura 8.

Tabela 1 – Métodos de extração para cada espécie de planta selecionada.

Espécies estudadas	Parte utilizada	Solvente	Secagem	Extração	Tempo	Evaporação de solventes
<i>Byrsonima japurensis</i> A. Juss. (Malpighiaceae)	Casca	EtOH e H ₂ O	Estufa – T.A.	Maceração a frio.	48h	Rotaevaporador e liofilização
<i>Calycophyllum spruceanum</i> Benth. (Rubiaceae)	Casca	EtOH e H ₂ O	Estufa – T.A.	Maceração a frio.	48h	Rotaevaporador e liofilização
<i>Derris floribunda</i> Benth. (Fabaceae)	Folha	EtOH e H ₂ O	Estufa - ar quente (45°C / 48h)	Maceração, com auxílio de banho em ultra-som.	20min	Rotaevaporador e liofilização
<i>Maytenus guianensis</i> Klotzch. (Celastraceae)	Casca	EtOH	Estufa - ar quente (45°C / 48h)	Maceração, com auxílio de banho em ultra-som.	20min	Rotaevaporador e liofilização
<i>Passiflora nitida</i> Kunth L. (Passifloraceae)	Folha	EtOH e H ₂ O	Estufa – T.A.	Maceração a frio.	48h	Rota evaporador e liofilização
<i>Petiveria alliacea</i> L. (Phytolacaceae)	Folha	EtOH e H ₂ O	Estufa – T.A.	Maceração a frio.	48h	Rota evaporador e liofilização
<i>Ptychopetalum olacoides</i> Benth. (Olacaceae)	Folha	EtOH e H ₂ O	Estufa - ar quente (45°C / 48h)	Maceração, com auxílio de banho em ultra-som.	20min	Rota evaporador e liofilização

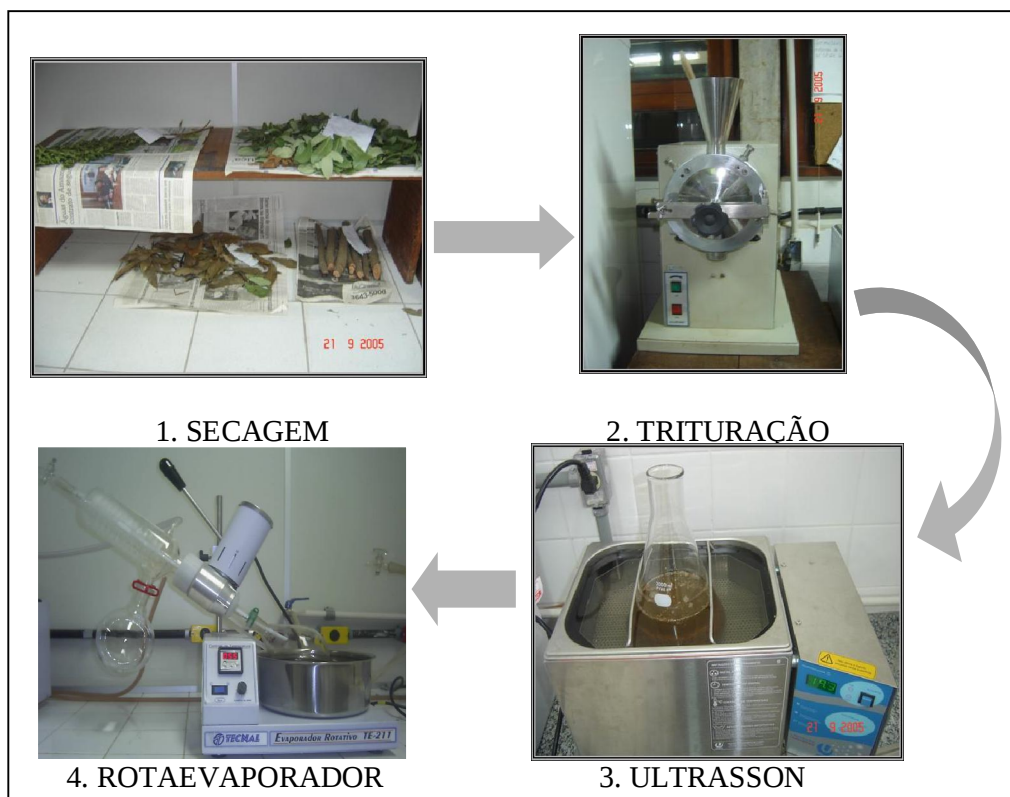


Figura 23 - Processo de preparação de extratos de plantas (folhas e raízes).

4.4 Realização de ensaios antioxidantes

4.4.1 Determinação de polifenóis totais

A determinação do teor de fenóis totais presentes nas amostras de extrato etanólico das espécies estudadas foi feita por meio de espectrofotometria utilizando o método de Folin-Ciocalteu segundo SINGLETON e ROSSI (1965) com modificações. Sucintamente, utilizou-se uma amostra de 100µL de extrato vegetal colocando-se em um tubo de ensaio. Em seguida adicionou-se 400µL de H₂O destilada e 160µL do reativo de Folin-Ciocalteu. Após homogeneizar em vortex adicionou-se 4mL de carbonato de sódio a 10,6%. Incubou-se por 3 min, e mediu-se absorbância em 715nm em espectrofotômetro (E-225D, CELM, Barueri – São Paulo, Brasil). O teor de polifenóis totais (FT) foi expresso como miligrama (mg) de EAG (equivalentes de ácido gálico) por grama (g) de extrato. Todas as análises foram realizadas em triplicata (SINGLETON e ROSSI, 1965; VELIOGLU et al., 1998).

O teor de polifenóis totais (FT) também foi apresentado em percentagem (%) de polifenóis presentes na amostra, obtido por meio da fórmula:

$$\% \text{ Polifenóis} = \frac{Abs_{amostra}}{Abs_{padrão}} \times 100$$

4.4.2 Teste do 2,2-difenil-1-(2,4,6-trinitrofenil)hidrazila ou DPPH*

O ensaio foi realizado segundo MOLYNEUX (2004) com pequenas modificações o qual foi adaptado para realização em microplaca de 96 poços. Inicialmente preparou-se uma solução de DPPH 0,8 mM em metanol (MeOH). Com o auxílio de pipetas multicanal, cada poço da microplaca recebeu um volume final de 350 µL, sendo 250 µL do extrato dissolvido

em metanol ou somente metanol para o poço controle e 100 µL de DPPH a 0,8 mM. Todas as amostras foram testadas em triplicata. Inicialmente foi realizada uma leitura apenas do extrato que foi utilizada como branco no teste. Após a adição do DPPH, incubou-se em temperatura ambiente e no escuro por 30 min e fez-se a leitura em um leitor de microplacas (TP-Reader, Thermoplate, Itália) em 517 nm (Figura 9). Utilizou-se o ácido ascórbico como antioxidante padrão, e como controle 250 µL de MeOH. Os resultados de atividade antioxidante foram obtidos no Excel, através da seguinte fórmula:

$$\%AA = 100 - \frac{Abs_{amostra} - Abs_{branco}}{Abs_{controle}} \times 100$$

A atividade antioxidante de cada extrato foi expressa como equivalentes g de ácido ascórbico / g de extrato seco. Foi considerado com forte atividade antioxidante, qualquer extrato com valor superior a 20 mEq g ácido ascórbico / g de extrato seco (BONDET et al., 1997; MENSOR et al., 2001; MOLYNEUX, 2004; TIEPPO et al., 2006).

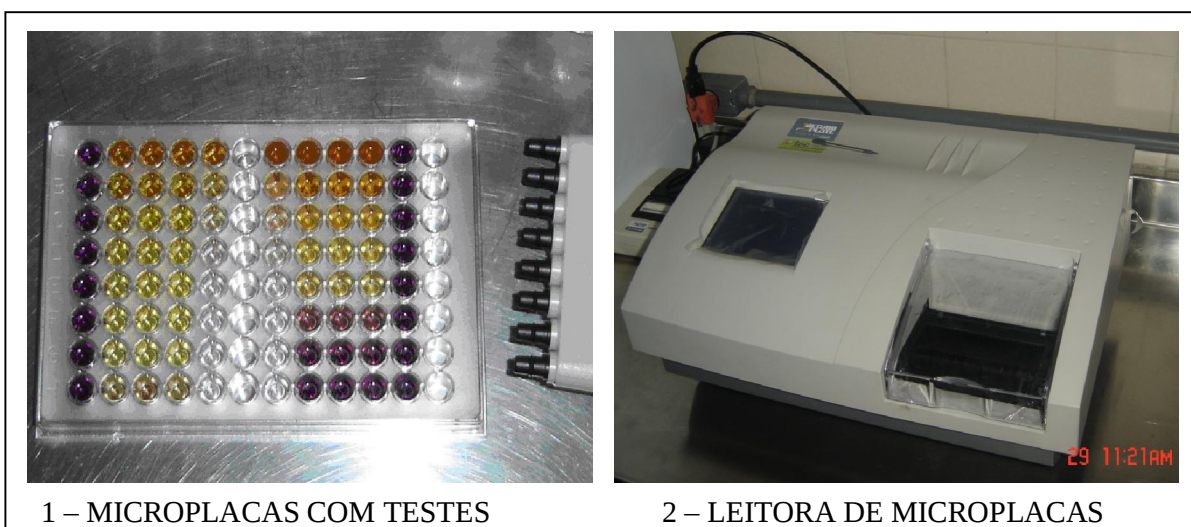


Figura 24 - Modelo de adaptação de ensaio *in vitro* para caracterização de atividade antioxidante de espécies de plantas para realização em microplacas.

4.43 Teste de varredura do radical 2,2'-azinobis (3-etilfenil-tiazolina-6-sulfonato) ou ABTS⁺

O método foi baseado na redução do ABTS [2,2'-azinobis (3-etilfenil-tiazolina-6-sulfonato)] e realizado segundo RE et al. (1998).

4.4.3.1 Preparo dos reagentes

Sucintamente, realizou-se o ensaio com uma solução de ABTS⁺ oxidado obtida através da dissolução de 10mg de ABTS em 5ml de água adicionada a uma solução de persulfato de potássio 5 mmol/L. A solução de persulfato de potássio (K⁺) a 5mmol/L foi preparada adicionando-se 0,0676g de persulfato de K⁺ em 50mL de H₂O. O reativo, então, foi preparado adicionando-se partes iguais (1:1) da solução de ABTS⁺ e da solução de persulfato de K⁺ 5mmol/L. A mistura foi incubada a T.A. e ao abrigo da luz por 24h (RE et al., 1998).

4.4.3.3 Realização do ensaio

O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços, onde, com o auxílio de pipetas multicanal, cada poço recebeu 40µL de ABTS⁺ oxidado, 60µL de água deionizada e 250µL do extrato vegetal na concentração de 0,1 a 10 mg/mL em água deionizada ou somente água no poço controle. Todas as amostras foram testadas em triplicata. Inicialmente foi realizada uma leitura apenas do extrato que foi utilizada como branco no teste. Após a adição do ABTS, incubou-se em temperatura e luz ambiente por 15min, fez-se a leitura em um leitor de microplacas (TP-Reader, Thermoplate, Itália) em 714nm (RE et al., 1998). Utilizou-se o TROLOX[®] como antioxidante padrão. A atividade antioxidante foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\%AA = 100 - \frac{Abs_{amostra} - Abs_{branco}}{Abs_{controle}} \times 100$$

A atividade antioxidante de cada extrato fora expressa como mEquivalentes g de TROLOX[®] / g de extrato seco. Considerou-se como atividade antioxidante, qualquer extrato com valor superior a 20 mEq TROLOX[®] /grama de extrato seco (ARTS et al., 2004; CAI et al., 2004; EREL, 2004; RE et al., 1998).

4.4.4 Atividade varredora de ânion radical superóxido (AVS)

O método utilizado para avaliar a capacidade varredora de ânions radicais superóxido foi o de OZTURK et al. (2007) com pequenas modificações nos volumes para realização do ensaio em microplacas (figura 9).

4.4.4.1 Preparo dos reagentes e amostras

Utilizou-se um solvente preparado com tampão TRIS-HCl (16mM), adicionando-se 0,1936g de TRIS em 100 mL de tampão, com pH ajustado para 8,0 adicionando-se ácido clorídrico (HCl). O reagente Nitro Blue Tetrazolium (250 µM), foi preparado dissolvendo-se 1 tablete de NBT em 60 mL do tampão TRIS-HCl. O reagente NADH (390 µM) foi preparado adicionando-se 5,5 mg de NADH a 20 mL de tampão TRIS-HCl. O Phenazine methisulfate (PMS) 10 µM foi preparado dissolvendo-se 3 mg em 100 mL de tampão TRIS-HCl. As amostras de extrato vegetal foram preparadas nas concentrações de 0,1 a 10 mg/mL em água deionizada ou somente água no poço controle.

4.4.4.2 Realização do ensaio

Com o auxílio de pipetas multicanal, em cada poço de um microplaca adicionou-se 50 µL de amostra dos extratos a serem testados, e em seguida 100 µL da solução de NBT (250µM), em seguida 100µL da solução de NADH (390µM). Realizou-se a leitura da

absorbância da placa em leitor de microplacas (TP-Reader, Thermoplate, Itália) em 560nm (A1). Em seguida adicionou-se 100µL da solução PMS (10µM) e incubou-se por 5min a 25 °C e realizou-se nova leitura das absorbâncias (A2) (OZTURK et al., 2007). O cálculo de inibição foi feito de acordo com a seguinte fórmula:

$$\%AA = 100 - \frac{Abs_{amostra} - Abs_{branco}}{Abs_{controle}} \times 100$$

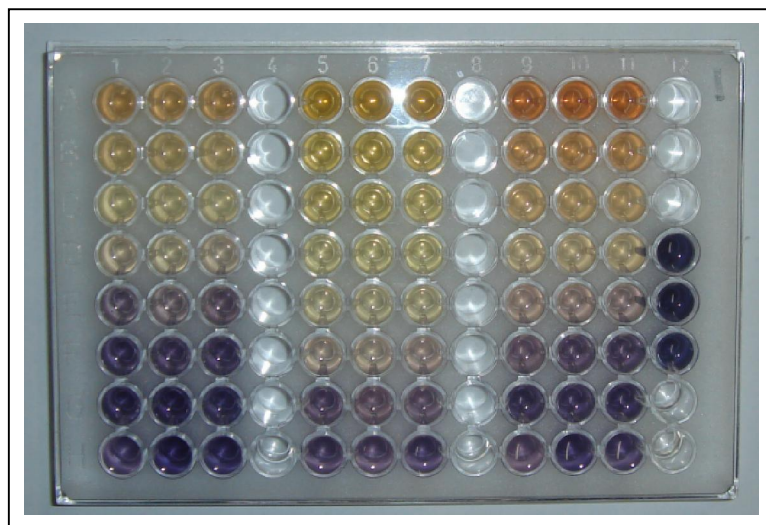


Figura 25 – Ensaio para caracterização de atividade varredora de ânion radical superóxido em espécies de plantas realizado em microplacas.

4.4.5 Teste de varredura do oxigênio singlete

O teste do rubreno foi realizado segundo condições previamente padronizadas. O rubreno é uma substância capaz de formar oxigênio singlete, ele oxida com a incidência de luz visível. Sua solução preparada em clorofórmio (CHCl_3) tem uma coloração laranja/avermelhada, e ao oxidar torna-se incolor. O princípio deste teste é adicionar uma substância que tenha capacidade fotoprotetora/antioxidante, espera-se que ela proteja a solução de rubreno contra a fotooxidação pelo oxigênio singlete formado com a exposição à

luz. Utilizou-se uma substância antioxidante padrão para efeito de comparação, a substância de escolha foi o DABCO, rotineiramente usado em testes diagnósticos de agentes químicos e bioquímicos envolvidos em processos oxidativos (GREGIANINI et al., 2003).

O testes foi realizado segundo GREGIANINI et al. (2003). Utilizou-se uma solução de rubreno preparada em clorofórmio (CHCl_3) a 0,8 mM, sem incidência de luz. O teste foi executado em tubo de ensaio de vidro transparente, cada tubo contendo 2mL de solução de Rubreno (0,8mM) e 20 μL de extrato das espécies vegetais a serem testadas. Em seguida os tubos foram mantidos a 20 cm de uma lâmpada fluorescente de 40 Watts por 120min a temperatura ambiente. Utilizou-se o DABCO como antioxidante padrão. As absorbâncias das soluções foram medidas, antes e após a exposição da luz em espectrofotômetro (E-225D, CELM, Barueri – São Paulo, Brasil) em 440nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata (figura 11). O cálculo de inibição foi realizado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = 100 - (A_2 \text{ amostra} - A_1 \text{ amostra} / A_2 \text{ controle} - A_1 \text{ controle}) \times 100$$

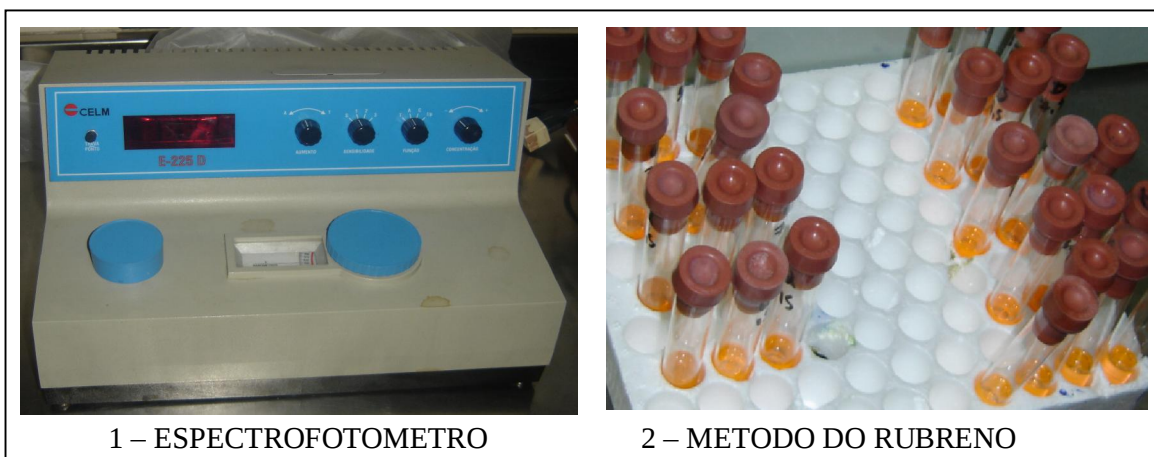


Figura 26 - Método do Rubreno para caracterização de atividade antioxidante e fotoprotetora de espécies de plantas amazônicas com leitura em espectrofotômetro.

4.4.6 Teste da *Saccharomyces cerevisiae*

O teste biológico para avaliação de atividade antioxidante dos extratos de plantas foi realizado com cepas de leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* modificadas geneticamente excluindo-se o gene que codifica a enzima catalase, tornando-as sensíveis ao peróxido de hidrogênio. As cepas foram doadas pelo Prof. Luiz Netto do Instituto de Biologia da Universidade de São Paulo - USP. As leveduras foram cultivadas em estufa, no laboratório de micologia do Curso de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM.

Para a realização do teste, as amostras foram padronizadas a fim de se obter um número conhecido de células para cada teste realizado, seguindo-se o protocolo M27-A2 da NCCLS/CLSI – National Committee For Clinical Laboratories Standards / Clinical and Laboratory Standards Institute (NCCLS, 2002). Portanto, fez-se um repique de uma nova cultura em meio YPD ágar (sólido), com no mínimo de 24h e no máximo de 48h de incubação a 37°C. Retirou-se uma pequena amostra deste cultivo, inoculando-a em 5 mL de soro fisiológico estéril (inóculo A). A solução foi agitada em vortex com velocidade baixa por 5 min e foi lida a absorbância em espectrofotômetro (E-225D, CELM, Barueri – São Paulo, Brasil) em 530 nm. Preparou-se a solução com absorbância em torno de 0,100 (= à aproximadamente $1 \text{ a } 5 \times 10^6$ células / mL).

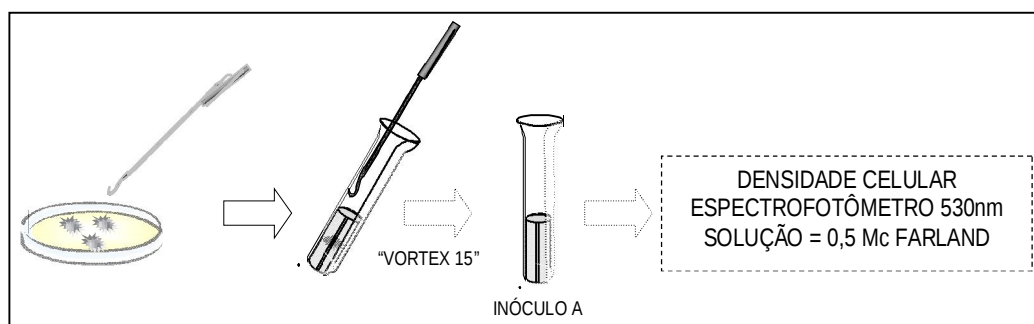


Ilustração 1 – Preparação de inóculo inicial de *Saccharomyces cerevisiae*.

A partir do inóculo inicial, transferiu-se 0,3 mL deste inóculo já ajustado (0,100 de absorbância) para um tubo contendo 2,7 mL de caldo YPD (diluição 1:10). Em seguida, transferiu-se 2,5 mL da solução acima para um tubo falcon contendo 47,5 mL de caldo YPD (diluição 1:20).

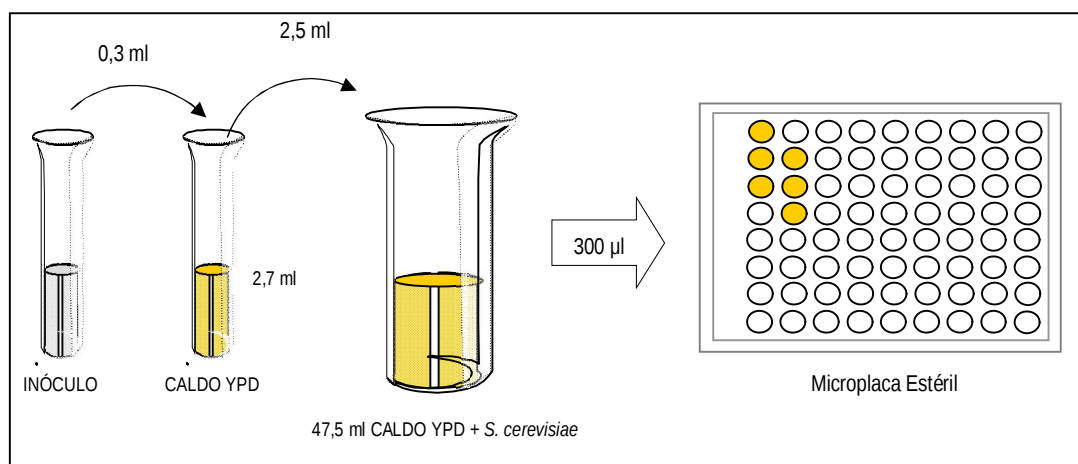


Ilustração 2 – Preparação do inóculo final em meio líquido YPD para teste em microplacas.

4.4.6.1 Teste qualitativo

Primeiramente, realizou-se um ensaio qualitativo para a verificação de uma possível atividade antifúngica dos extratos. O teste executado foi bem simples e rápido, simplesmente incubando-se amostras da levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae* com os extratos que pretendiam ser testados. O teste fora realizado em câmara asséptica pré-irradiada com luz U.V. onde as cepas de *Saccharomyces cerevisiae* foram inoculadas em placas de Petri com ágar YPD junto com os extratos das espécies de plantas a serem testadas. Adicionou-se 300 µL de inóculo com 10 µL de extrato vegetal diluído (10mg/mL) diluído em H₂O-bidestilada. Com o auxílio de uma alça de platina homogenizou-se a mistura por toda a superfície da placa. Após a incubação por 24h em estufa a 37°C, foi realizada a contagem de colônias para determinar o nível de sobrevivência (figura 12 e 13).

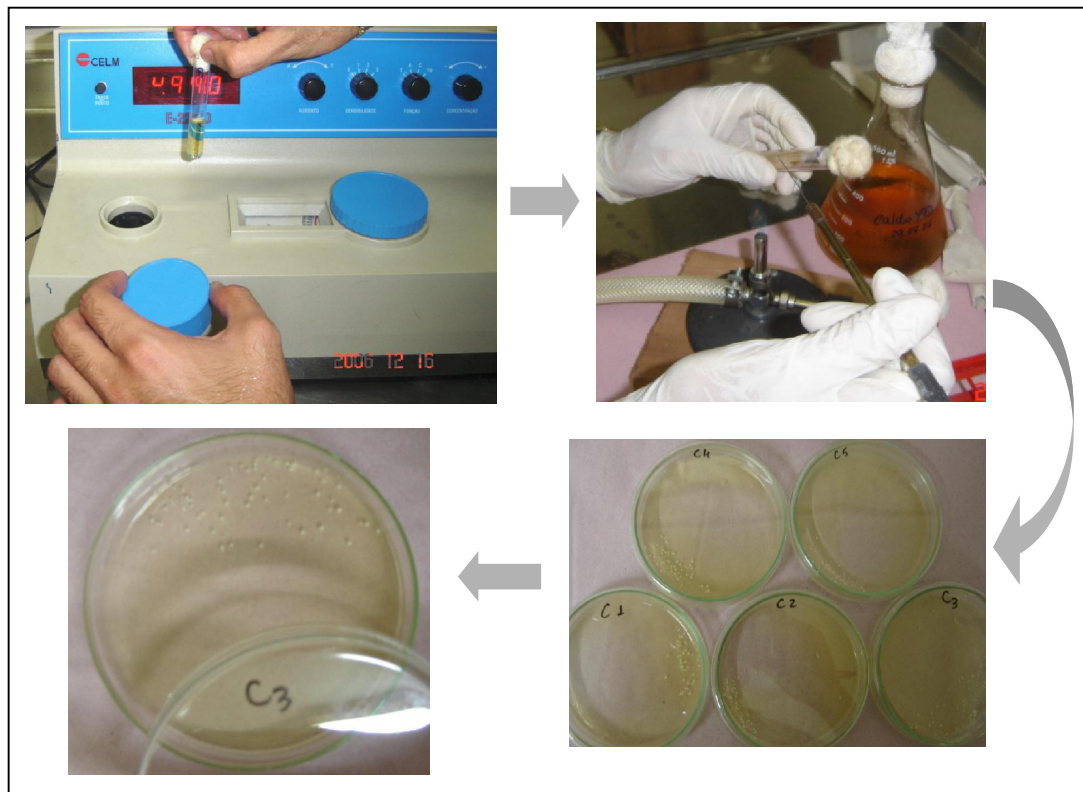


Figura 27 - Modelo Qualitativo de ensaio com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* para detecção de atividade antifúngica presente nos extratos testados.



Figura 28 - Câmara asséptica para realização de ensaio com leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*.

Os extratos que apresentaram atividade antifúngica seguiram diretamente para o teste com indução de estresse oxidativo em animais (ratos Wistar) e foram descartados do teste para caracterização de atividade protetora antioxidante com leveduras.

4.4.6.2 Teste quantitativo

Para os extratos que não apresentaram atividade antifúngica, a atividade antioxidante foi avaliada após a incubação deste numa cultura de leveduras submetida a um sistema de geração de estresse oxidativo por adição de peróxido de hidrogênio.

Com o auxílio de pipetas multicanal, distribuiu-se nas microplacas estéreis como controle positivo 300 µL da solução acima. Cada poço contendo 300 µL de inóculo C (ou caldo YPD para controle neg.), 40 µL de oxidante (H_2O_2 18-20 mM ou H_2O bidestilada para o branco) e 10 µL de amostra a ser testada (extrato 300µg/mL em H_2O bidestilada). Incubou-se em estufa a 37°C por 24h e fez-se a leitura em leitor de microplaca (TP-Reader, Thermoplate, Itália). Para a realização do teste, todas as amostras foram realizadas em triplicata e distribuídas nas microplacas da seguinte forma:

- ◆ *Uma amostra controle⁻ - somente caldo YPD;*
- ◆ *Uma amostra de controle⁺ - YPD caldo e leveduras;*
- ◆ *Uma amostra de controle⁺ com peróxido de hidrogênio (H_2O_2 2mM) - YPD caldo com leveduras e H_2O_2 ;*
- ◆ *Um controle⁺ e solvente utilizado na solução de extrato vegetal a ser testado - H_2O bidestilada;*
- ◆ *Um branco para controle da planta - controle⁺ com amostra de extrato vegetal;*
- ◆ *O teste propriamente dito - controle⁺, extrato de planta (300µg/mL) e H_2O_2 .*
- ◆ *Uma amostra padrão – controle⁺, ácido ascórbico (300µg/mL) e H_2O_2 .*

Após o período de incubação (24h e 48h), compararam-se os níveis de sobrevivência da levedura, medido no espectrofotômetro com comprimento de onda de 530nm, na presença e ausência de extrato vegetal que se supõe ter atividade antioxidante. A determinação da “turvação” do meio líquido indicou a presença de células vivas (leveduras). Um valor de absorção igual a 1,0 contém de 2 a 5×10^6 células (NCCLS, 2002).



Figura 29 - Modelo quantitativo de ensaio *in vivo* em microplacas com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* para caracterização de atividade antioxidante presente nos extratos testados.

Nas amostras onde não houve turvação do meio (meio apresenta-se límpido), houve morte celular por falta de atividade antioxidante do extrato testado. Foram considerados com efeito antioxidante aqueles extratos que promoverem uma proteção maior que 10% da atividade antioxidante do ácido ascórbico (SILVA et al., 2005).

4.4.7 Atividade antioxidante *ex vivo*

A fim de confirmar o resultado dos testes *in vitro*, foi realizado o ensaio antioxidante em ratos Wistar com as espécies *Callycophyllum spruceanum* (Mulateiro) e *Maytenus*

guianensis (Xixuá), conforme descrito abaixo (DADKHAH et al., 2006; KANTER et al., 2005; MAZZANTI et al., 2003).

Foram elaborados seis grupos contendo 5 animais em cada grupo, com peso corporal em torno de 200 g. Estes grupos foram distribuídos da seguinte forma:

- ◆ Grupo 1 - N-Acetilcisteína 200 mg/kg e CCl₄ (1200mg/kg de peso);
- ◆ Grupo 2 - *C. spruceanum* (+) 400 mg/kg;
- ◆ Grupo 3 - *C. spruceanum* 400 mg/kg + CCl₄;
- ◆ Grupo 4 - *C. spruceanum* 200 mg/kg + CCl₄;
- ◆ Grupo 5 - Controle (-) – animais não receberão nada;
- ◆ Grupo 6 - Controle (+) – animais receberão CCl₄ (azeite de oliva).

O Grupo 1 recebeu a solução de N-Acetilcisteína (solução de 1000 mg dissolvida em 500 mL de H₂O destilada) como padrão antioxidante e hepatoprotetor, estimando-se uma dose de 200 mg por kg ao dia para cada animal (figura 15). Os Grupos 2 e 3 receberam o extrato etanólico de *C. spruceanum* (2000 mg de extrato para 500 mL H₂O destilada) durante 4 dias seguidos estimando-se uma dose de 400 mg por kg de peso corporal (figura 15). O Grupo 4 recebeu o extrato etanólico de *C. spruceanum* (1000 mg de extrato para 500 mL H₂O destilada) durante 4 dias seguidos, estimando-se uma dose de 200 mg por kg de peso corporal (figura 15).

Os animais dos grupos 1, 2, 3 e 4 receberam os respectivos extratos durante 4 dias. As dosagens foram estimadas levando-se em consideração um volume de aproximadamente 20 mL por dia de extrato consumido por cada rato Wistar com peso corporal em torno de 200 mg de peso corporal. No 4º dia de tratamento, os grupos 1, 3, 4 e 5 receberam uma única dose de tetracloreto de carbono (CCl₄) 1200 mg/kg de peso diluído em azeite de oliva numa proporção 1:1 administrado por injeção intraperitoneal, obedecendo ao volume máximo de 1,5 mL por kg

de peso (CHANDAN et al., 2007; JODYNIS-LIEBERT et al., 2005; MURUGESH et al., 2006).

Após 24 horas da administração do CCl_4 , os animais foram sacrificados com injeção intraperitonal de hidrato de cloral a 30% para a coleta das amostras de 3 mL de sangue venoso utilizando-se heparina por punção intracardiaca. As amostras foram imediatamente processadas e analisadas para dosagem dos principais biomarcadores de estresse oxidativo (MDA e GPx). Foram coletadas também amostras de tecido hepático reservadas em recipiente contendo soro fisiológico refrigerado e mantidas em freezer a -4°C que foram posteriormente analisadas por preparo de homogenato de tecido. Destas soluções também foram feitas dosagens de MDA e GPx (CHANDAN et al., 2007; JODYNIS-LIEBERT et al., 2005; MURUGESH et al., 2006).

As amostras colhidas para análise do estresse oxidativo foram imediatamente processadas no Laboratório de Bioquímica Clínica do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Amazonas. As análises bioquímicas foram realizadas em um auto-analizador Cobas Mira Plus (Roche corp.[®]).



Figura 30 – Extrato de espécie de planta amazônica (*C. spruceanum*) preparado em solução com água destilada para teste de atividade antioxidante com animais (ratos da espécie Wistar).



Figura 31 – Coleta de material biológico, sangue por punção cardíaca e amostra de tecido hepático, dos animais (ratos Wistar) para realização de dosagens de biomarcadores do estresse oxidativo - MDA e GPx.

4.4.7.1 Dosagem do malondialdeído (MDA)

O malondialdeído é um produto secundário da peroxidação lipídica, proveniente da β -oxidação de ácidos graxos poliinsaturados com mais de duas duplas ligações, tais como ácido linoléico, araquidônico e docosaexanóico. Atualmente, o MDA é considerado um candidato potencial para ser escolhido como um biomarcador geral de dano oxidativo em plasma. O MDA foi o foco de atenção da peroxidação lipídica durante muitos anos, pelo fato de poder ser medido livre, utilizando-se o ácido tiobarbitúrico (TBA). O MDA reage com TBA e forma um cromógeno de cor rosa fluorescente, cuja absorção ocorre em comprimento de onda de 532 nm e fluorescência em 553 nm (KADIISKA et al., 2005a; KADIISKA et al., 2005b).

A dosagem dos níveis plasmáticos de malondialdeído foi realizada segundo ARGUELLES et al. (2004). Para determinação dos níveis de MDA adicionaram-se 100 mL de amostra a 1 mL de uma solução contendo ácido tricloroacético a 15%, ácido tiobarbitúrico a 0,38% em ácido clorídrico 0,25N. Esta mistura foi então aquecida em banho-maria por 30 minutos, e depois centrifugada. A absorbância do sobrenadante foi medida a 535nm. A

concentração das amostras foi determinada a partir da leitura de uma amostra com concentração conhecida (padrão) de malondialdeído a 4 µmol/L.

4.4.7.2 Dosagem de glutathione peroxidase (GPx)

Os níveis de glutathione peroxidase foram determinados no plasma e no lavado de plaquetas utilizando a metodologia de Paglia e Valentine (1967) (kit Randox laboratories ltda.). Neste método a GPx catalisa a oxidação da glutathione (GSH) com óxido hidrocloroso de cumeno. Em presença de glutathione redutase e NADPH, a glutathione oxidada (GSSG) é imediatamente reduzida com concomitante oxidação de NADPH à NADP⁺, produzindo um decréscimo na absorbância em 340nm. A absorbância foi determinada após 1, 2 e 3 min (PAGLIA e VALENTINE, 1967).

4.5 Análise dos resultados

Os resultados obtidos foram analisados utilizando o programa Microcal™ Origin® Versão 6.0 da Microcal Software Inc., e apresentados na forma gráfica por utilização do Programa Excel (Microsoft Word., St.Louis, MO, EUA). Os valores médios para concentração inibitória de 50% (CI₅₀) e os valores de miliequivalência (mEq) foram obtidos mediante a tabulação dos resultados no programa Excel for Windows. A concentração inibitória 50% foi obtida por regressão linear simples utilizando o programa Microcal™ Origin® Versão 6.0 da Microcal Software Inc. Os resultados dos ensaios químicos foram correlacionados por meio do teste de Pearson. Nos ensaios biológicos os grupos foram comparados pelo teste de Mann-whitney utilizando o programa Sigma Stat® da Systat Software Inc. (San Jose, Califórnia, USA). O nível de significância foi de p<0,05.

5. RESULTADOS

O presente estudo avaliou por diferentes metodologias as atividades antioxidantes de extratos aquosos e etanólicos de sete espécies de plantas amazônicas, sendo as seguintes espécies: *Byrsonima japurensis* (Saratudo), *Callycophyllum spruceanum* (Mulateiro), *Derris floribunda*, *Maytenus guianensis* (Chichuá), *Passiflora nítida* (Maracujá-do-mato), *Petiveria alliacea* (Mucuracã) e *Ptychopetalum olacoides benth* (Muirapuama).

Após obtenção dos extratos e confirmação da presença de atividade redutora pelo método do DPPH• qualitativo foi realizada a determinação do teor de compostos fenólicos. Este teste foi realizado utilizando o método de Folin–Ciocalteu com modificações (LIMA et al., 2004; LIMA et al., 2006; PRADO et al., 2005; SOUZA et al., 2007). A espécie que apresentou maior proporção de compostos fenólicos foi a *C. spruceanum* seguida da *B. japanurensis* com 6% e 5,9% de polifenóis totais, respectivamente, conforme apresentado na tabela 1: Os valores de equivalência foram calculados a partir da curva padrão obtida com ácido gálico (Figura 17).

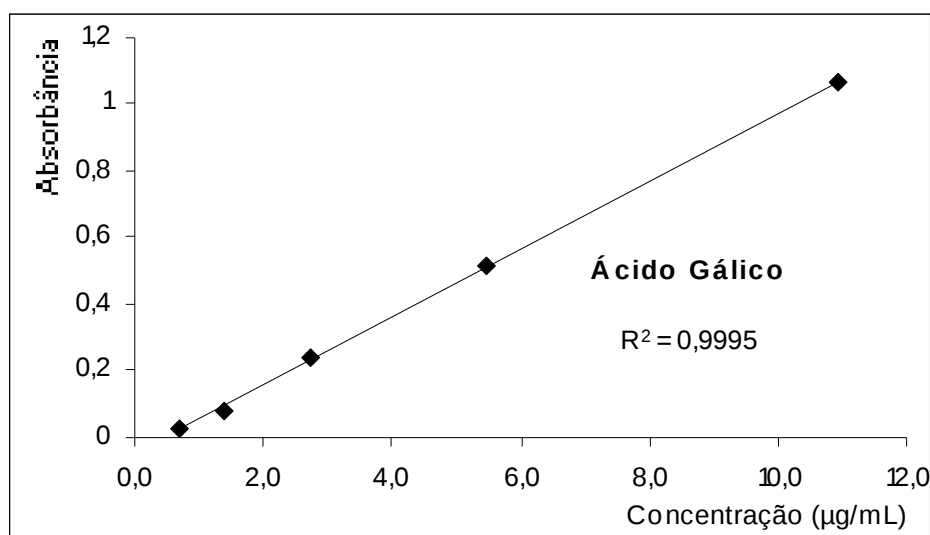


Figura 32 - Curva de absorbância do ácido gálico, absorbância em relação à concentração (µg/mL).

Tabela 1 - Percentagem de Polifenóis presente nas espécies de plantas estudadas e como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de extrato.

Espécie de planta	% Polifenóis	mEq (mg de ác. gálico / g de extrato
	Totais	seco)
<i>Byrsonima japurensis</i> - (Et)	5,9	59,4
<i>Callycophyllum spruceanum</i> - (Et)	6,0	60,2
<i>Derris floribunda</i> - (Et)	0,8	8,3
<i>Maytenus guianensis</i> - (Et)	5,8	58,7
<i>Passiflora nítida</i> - (Et)	0,3	3,2
<i>Petiveria alliacea</i> - (Et)	0,7	7,5
<i>Ptychopetalum olacoides benth</i> - (Et)	0,2	2,1

Nota: (Et) = Extratos Etanólicos.

A fim de otimizar as atividades a serem realizadas para caracterização de atividades antioxidantes em plantas, os testes utilizados seguiram uma sequência adotando-se critérios tais como estabilidade de reativos, custo de realização do método e especificidade de reação.

Por isso, o método que inicia o nosso protocolo para realização de ensaios antioxidantes foi o de varredura de radicais DPPH[•]. Este é de menor custo e é um reativo de ótima estabilidade. Pelo método de DPPH[•] calculamos os resultados em miliequivalência (mEq) em relação ao ácido ascórbico, e a atividade de cada extrato em uma concentração de 20 µg/mL expressos na tabela 3. A espécie que obteve o melhor resultado foi a *Callycophyllum spruceanum* (figura 18).

Tabela 2 – Miliequivalência (mEq) de ácido Ascórbico de extratos de plantas amazônicas no método de DPPH e % de atividade antioxidante em amostras com concentração de 20 µg/mL.

Extrato Vegetal	mEq (g Ac. Ascórbico / g de extrato)	% atividade (20 µg/mL)
<i>Maytenus guianensis</i> – (Et)	0,122	36,0
<i>Callycophilum spruceanum</i> – (Et)	0,461	91,73
<i>Callycophilum spruceanum</i> – Aq	0,208	61,64
<i>Byrsonima japurensis</i> – (Et)	0,412	87,43
<i>Byrsonima japurensis</i> – Aq	0,131	55,19
<i>Derris Floribunda</i> – (Et)	0,080	16,62
<i>Derris Floribunda</i> – Aq	0,011	5,98
<i>Petiveria alliacea</i> - (Et)	0,002	3,87
<i>Ptychopetalum olacoides benth.</i> - (Et)	0,116	16,5
<i>Passiflora nítida</i> – (Et)	0,070	24,9

Obs. (Et) = Extratos Etanólicos, (Aq) Extrato Aquoso.

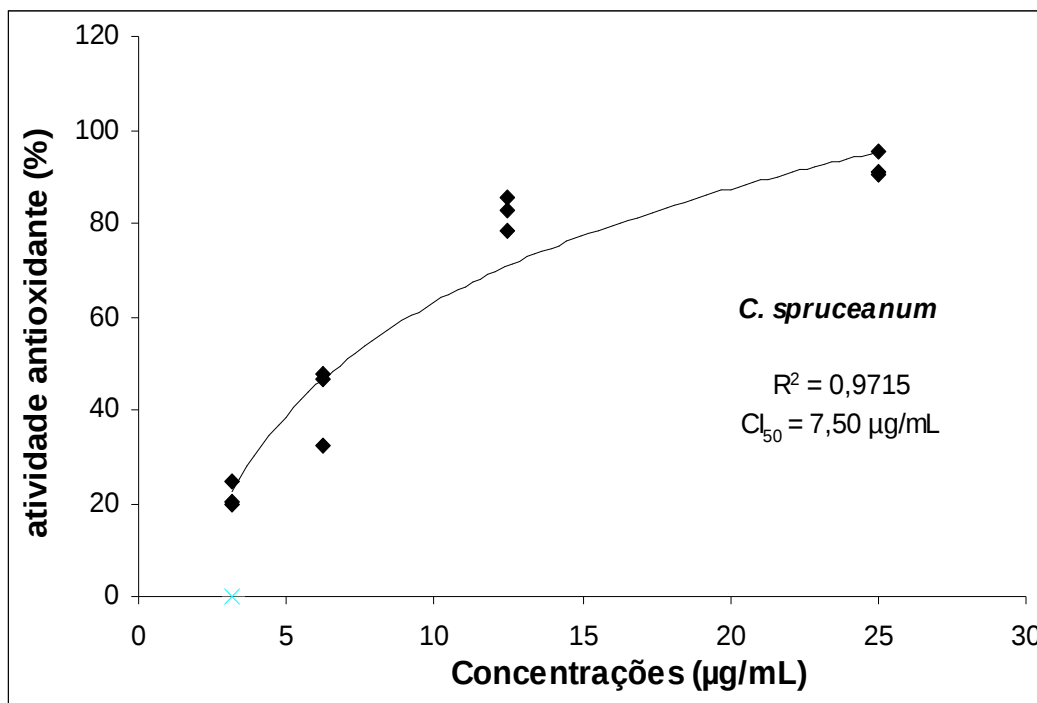


Figura 33 - Curva de atividade antioxidante característica da espécie *C. spruceanum* pelo método DPPH.

O método utilizado a seguir foi o de varredura de radicais ABTS⁺. Este também é um método de baixo custo, mais o seu radical não é tão estável quanto o de DPPH[·]. A tabela 3 apresenta os resultados de inibição dos extratos etanólicos e aquosos no método do ABTS⁺ e mostra a percentagem de inibição dos extratos numa concentração de 20 µg/mL e os valores de mEq em relação ao TROLOX. No presente teste, o extrato mais ativo foi o extrato etanólico de *C. spruceanum*, seguido também do extrato etanólico de *M. guianensis*. Uma curva típica obtida por este método está representada pelo extrato etanólico do *C. spruceanum* e apresentada na Figura 19.

Tabela 3 – Miliequivalência (mEq) de TROLOX[®] de extratos de plantas amazônicas pelo método de ABTS⁺ e percentagem de atividade antioxidante (%) em amostras com concentração de 20 µg/mL.

EXTRATO VEGETAL	mEq (g TROLOX / g extrato)	% atividade (20 µg/mL)
<i>Maytenus guianensis</i> – (Et)	0,484	76,55
<i>Callycophilum spruceanum</i> – (Et)	0,787	98,31
<i>Callycophilum spruceanum</i> – Aq	0,370	81,48
<i>Byrsonima japurensis</i> – (Et)	0,321	74,6
<i>Byrsonima japurensis</i> – Aq	0,149	46,73
<i>Derris Floribunda</i> – (Et)	0,098	25,82
<i>Derris Floribunda</i> – Aq	0,043	16,52
<i>Petiveria alliacea</i> - (Et)	0,006	4,26
<i>Ptychopetalum olacoides benth.</i> - (Et)	0,453	85,18
<i>Passiflora nítida</i> – (Et)	0,103	30,8

Obs. (Et) = Extratos Etanólicos, (Aq) Extrato Aquoso.

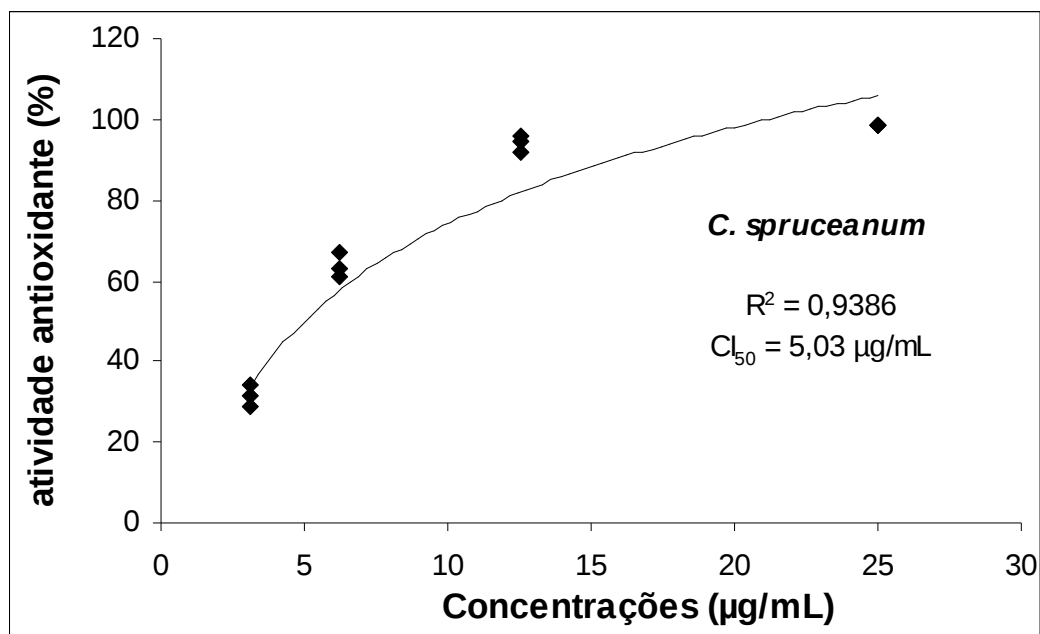


Figura 34 - Curva de atividade antioxidante característica da espécie *C. spruceanum* pelo método ABTS.

No método seguinte levou-se em consideração uma maior especificidade de atividade. Este ensaio avalia a varredura de ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) dos extratos testados. Os resultados deste teste, apresentados na tabela 4, estão expressos em mEq de ácido gálico e mostram a porcentagem de atividade dos extratos numa concentração de 50 µg/mL. O extrato mais ativo foi o extrato etanólico de *C. spruceanum*, seguido também do extrato etanólico de *M. guianensis*. Uma curva típica obtida por este método está representada pelo extrato etanólico do *C. spruceanum* e apresentada na Figura 20.

Tabela 4 – Miliequivalência (mEq) de ácido Gálico de extratos de plantas amazônicas no método de varredura de ânion radical superóxido (AVS) e % de atividade antioxidante em amostras com concentração de 50 µg/mL.

EXTRATO VEGETAL	mEq (g Ac. Gálico/g extrato)	% atividade (50 µg/mL)
<i>Maytenus guianensis</i> – (Et)	0,223	65,52
<i>Callycophilum spruceanum</i> – (Et)	0,432	85,0
<i>Callycophilum spruceanum</i> – Aq	0,186	58,6
<i>Byrsonima japurensis</i> – (Et)	0,175	55,85
<i>Byrsonima japurensis</i> – Aq	0,199	59,5
<i>Derris Floribunda</i> – (Et)	0,027	11,27
<i>Derris Floribunda</i> – Aq	0,129	38,91
<i>Petiveria alliacea</i> - (Et)	0,099	37,12
<i>Ptychopetalum olacoides benth.</i> - (Et)	0,055	24,44
<i>Passiflora nítida</i> – (Et)	0,078	30,55

Obs. (Et) = Extratos Etanólicos, (Aq) Extrato Aquoso.

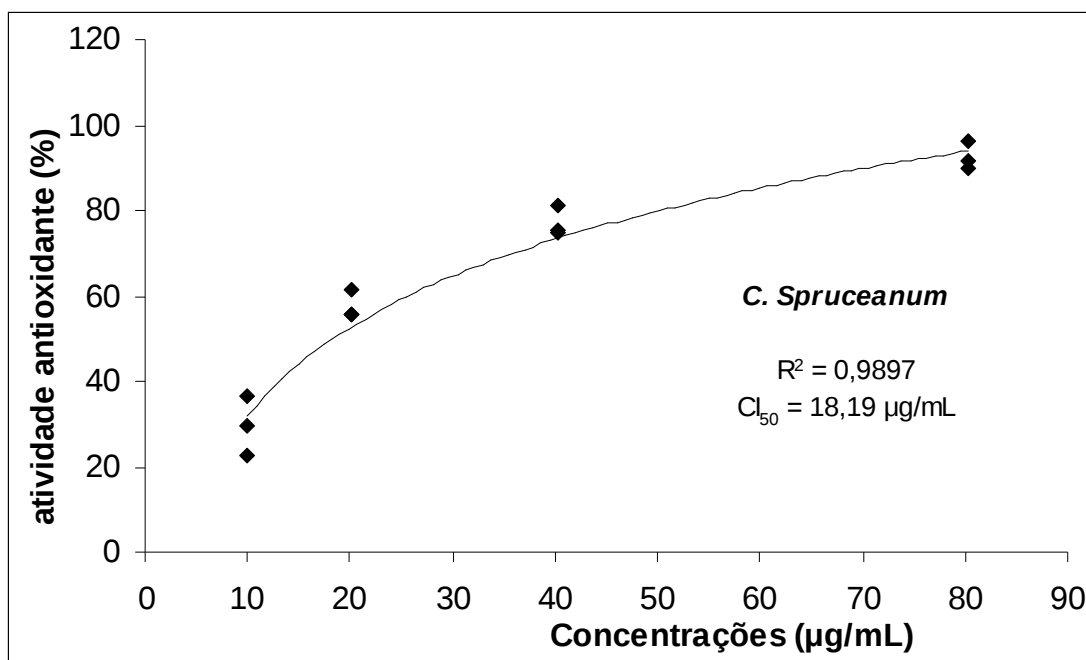


Figura 35 - Curva de atividade antioxidante característica da espécie *C. spruceanum* pelo método de AVS.

O último ensaio químico realizado, foi o método com rubreno. Os resultados do teste, apresentados na tabela 5, estão expressos em mEq de DABCO e em porcentagem de atividade dos extratos em uma concentração de 100 µg/mL. Os extratos mais ativos foram o extrato etanólico e aquoso de *C. spruceanum*, seguido também do extrato etanólico de *M. guianensis*, conforme apresentado na Figura 21.

Tabela 5 – Miliequivalência (mEq) de DABCO de extratos de plantas amazônicas no método de Rubreno e % de atividade antioxidante em amostras com concentração de 100 µg/mL.

EXTRATO VEGETAL	mEq (g DABCO / g extrato)	% atividade (100ug/mL)
<i>Maytenus guianensis</i> – (Et)	0,101	9,51
<i>Callycophilum spruceanum</i> – (Et)	0,631	59,25
<i>Callycophilum spruceanum</i> – (Aq)	0,518	49,32
<i>Byrsonima japurensis</i> – (Et)	0,004	21,60
<i>Byrsonima japurensis</i> – (Aq)	0,015	12,25
<i>Derris Floribunda</i> – (Et)	---	S.A.
<i>Derris Floribunda</i> – (Aq)	---	S.A.
<i>Petiveria alliacea</i> - (Et)	0,007	7,13
<i>Ptychopetalum olacoides benth.</i> - (Et)	0,007	3,88
<i>Passiflora nítida</i> – (Et)	---	S.A.

Obs. (Et) = Extratos Etanólicos, (Aq) = Extrato Aquoso, N.D. = não desenvolvido e S.A. = sem atividade.

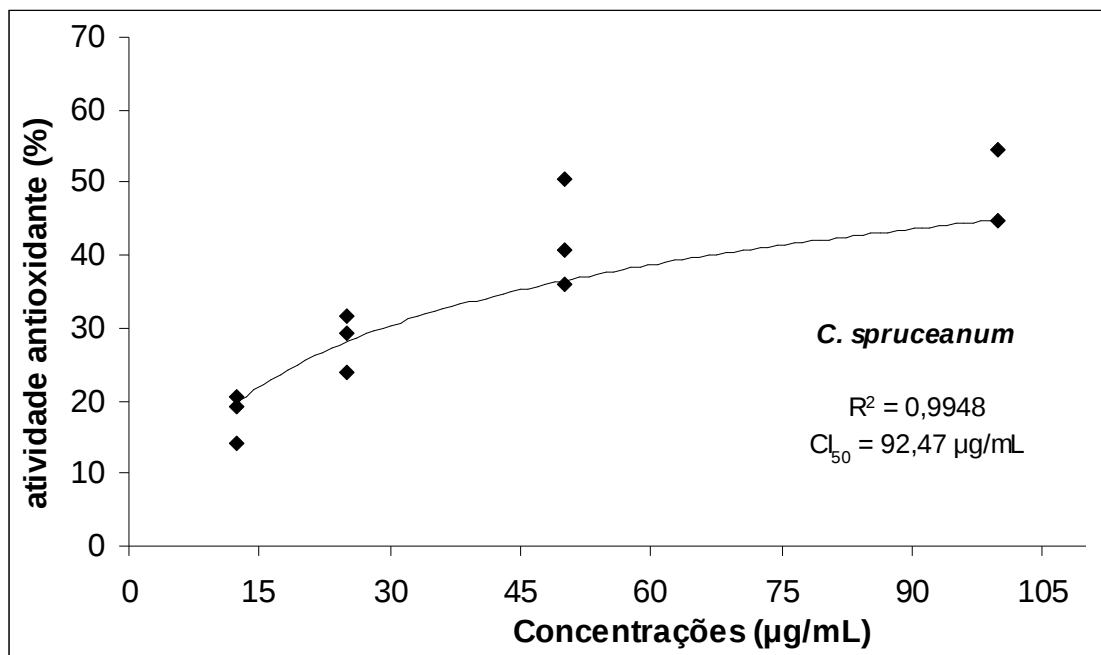


Figura 36 - Curva de atividade antioxidante característica da espécie *C. spruceanum* pelo método do Rubreno.

Os valores da concentração inibitória de 50% (CI_{50}) de todas as amostras de extratos vegetais ou padrões antioxidantes (utilizados para efeitos de comparação) estão representados na tabela 6.

Tabela 6 – Concentrações inibitórias 50% (CI₅₀) dos extratos de plantas testados, os resultados estão expresso em µg/mL.

PLANTA - EXTRATO	ABTS	DPPH	AVS	RUBRENO
<i>Maytenus guianensis</i> – (Et)	8,19 ± 0,3	28,44 ± 0,8	35,28 ± 3,0	517 ± 70,8
<i>Callycophilum spruceanum</i> – (Et)	5,03 ± 0,1	7,50 ± 0,9	18,19 ± 3,0	92,43 ± 24,8
<i>Callycophilum spruceanum</i> – (Aq)	10,70 ± 0,5	16,60 ± 2,2	42,12 ± 0,7	112,57 ± 17,5
<i>Byrsonima japurensis</i> – (Et)	12,33 ± 0,2	8,4 ± 0,6	44,92 ± 6,4	1408,24 ± 113,5
<i>Byrsonima japurensis</i> – (Aq)	26,60 ± 0,8	26,36 ± 2,8	39,45 ± 4,5	361,13 ± 165,7
<i>Derris Floribunda</i> – (Et)	40,70 ± 0,9	26,34 ± 3,4	289,33 ± 21,8	S.A.
<i>Derris Floribunda</i> – (Aq)	91,70 ± 3,7	296,52 ± 5,3	60,65 ± 4,0	S.A.
<i>Petiveria alliacea</i> - (Et)	574,63 ± 5,8	2432,97 ± 191,0	78,96 ± 5,6	743,23 ± 8,9
<i>Ptychopetalum olacoides benth.</i> - (Et)	8,73 ± 0,3	29,73 ± 0,3	142,42 ± 16,5	715,16 ± 195,6
<i>Passiflora nítida</i> – (Et)	38,49 ± 1,9	49,93 ± 0,1	100,25 ± 9,9	S.A.
α-Tocoferol	12,48 ± 0,6	10,44 ± 0,4	179,9 ± 14,4	N.D.
BHA	2,83 ± 0,2	6,03 ± 0,1	S.A.	N.D.
BHT	9,97 ± 0,4	176,33 ± 1,3	S.A.	N.D.
TROLOX	3,96 ± 0,1	5,66 ± 0,2	S.A.	N.D.
QUERCERTINA	2,53 ± 0,1	2,57 ± 0,1	15,75 ± 1,5	121,00 ± 12,5
AC. ASCÓRBICO	4,84 ± 0,3	2,74 ± 0,3	32,91 ± 1,6	N.D.
AC. GALICO	1,035 ± 0,1	1,14 ± 0,2	7,85 ± 1,2	N.D.
β-CAROTENO	N.D.	N.D.	S.A.	9,24 ± 0,1
DABCO	N.D.	N.D.	S.A.	58,4 ± 6,0

Obs. (Et) = Extratos Etanólicos, (Aq) = Extrato Aquoso, N.D. = não desenvolvido e S.A. = sem atividade.

Para correlacionar os ensaios *in vitro* realizamos o teste de Pearson adotando-se $p < 0,05$. O resultado esta apresentado na tabela a seguir (tabela 7).

Tabela 7 – Índice de correlação entre os ensaios obtido por meio do teste de correlação de Pearson.

	ABTS	DPPH	SUPEROXIDO	RUBRENO	POLIFENÓIS
ABTS	-	0,726*	0,607*	0,535	0,630
DPPH		-	0,778*	0,737*	0,829*
SUPEROXIDO			-	0,707*	0,904*
RUBRENO				-	0,550
POLIFENÓIS					-

* p<0,05

Em seguida realizaram-se ensaios *in vitro* em microplacas com leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. A primeira parte deste ensaio foi qualitativa, utilizada para verificar possíveis atividades antifúngicas dos extratos; foi realizado de forma simples, apenas incubando os extratos com a cepa, e após 24h fazendo uma contagem de colônias (tabela 8). O segundo ensaio foi quantitativo, para determinação de atividade protetora dos extratos contra estresse oxidativo causado por incubação peróxido de hidrogênio 2 mM (tabela 9).

Tabela 8 – Resultados do ensaio qualitativo utilizando leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* para determinação de atividade antifúngica dos extratos.

Extrato / Amostra	nº de colônias (unid.)	% Inibição do Crescimento
Controle*	60	0
<i>C. spruceanum</i> (Et)	46	23,33
<i>C. spruceanum</i> (Aq)	50	19,36
<i>Byrsonima japurensis</i> (Et)	51	15,0
<i>Byrsonima japurensis</i> (Aq)	55	11,29
<i>Derris Floribunda</i> (Et)	57	5,38
<i>Derris Floribunda</i> (Aq)	60	3,23
<i>Petiveria alliacea</i> (Et)	51	17,74
<i>Ptychopetalum olacoides benth.</i> (Et)	52	16,13
<i>Passiflora nítida</i> (Et)	55	11,30
<i>Maytenus guianensis</i> (Et)	50	19,36

Obs. (Et) = Extratos Etanólicos, (Aq) = Extrato Aquoso, N.D. = não desenvolvido e S.A. = sem atividade. * = controle é composto somente por caldo YPD e Levedura, onde o crescimento é igual a 100%.

Tabela 9 – Resultados do ensaio com *Saccharomyces cerevisiae* para determinação de atividade protetora dos extratos contra estresse oxidativo por incubação com peróxido de hidrogênio 2 mM.

Extrato / Amostra (300 µg/mL)	% Crescimento
Controle*	100,00
Controle* + H ₂ O ₂ (2 mM)	10,00
Acido ascórbico + H ₂ O ₂ (2 mM)	92,45
<i>M. guianensis</i> Et + H ₂ O ₂ (2 mM)	21,06
<i>C. spruceanum</i> Aq + H ₂ O ₂ (2 mM)	21,39
<i>B. japanurensis</i> Aq + H ₂ O ₂ (2 mM)	12,24
<i>Passiflora nítida</i> Et + H ₂ O ₂ (2 mM)	21,39
<i>Derris floribunda</i> Et + H ₂ O ₂ (2 mM)	17,59
<i>Derris floribunda</i> Aq + H ₂ O ₂ (2 mM)	21,53
<i>P. olacoides</i> Et + H ₂ O ₂ (2 mM)	21,00

Obs. (Et) = Extratos Etanólicos, (Aq) = Extrato Aquoso, N.D. = não desenvolvido e S.A. = sem atividade. * = controle é composto somente por caldo YPD e Levedura, onde o crescimento é igual a 100%.

Nenhum dos extratos mostrou-se suficientemente eficiente para prevenir a morte por oxidação das células de *Saccharomyces* como antioxidante padrão utilizado no teste, neste caso ácido ascórbico. E para os testes de estresse oxidativo com ratos da espécie Wistar foram feitas dosagens de biomarcadores de estresse oxidativo (MDA e GPx) para amostras de soro/plasma e tecidos, após incubação com a espécie *C. spruceanum*. Os resultados estão expressos nas tabelas abaixo (tabelas 10 e 11).

Tabela 10 – Níveis de antioxidantes séricos ($\mu\text{g/dL}$) em ratos tratados com CCl_4 e extrato vegetal.

GRUPO	MDA ($\mu\text{mol/L}$)	GPx (U/g HGb)
Controle*	$5,96 \pm 1,8$	$236,40 \pm 29,8$
CCl_4	$8,75 \pm 2,5$	$252,80 \pm 26,8$
<i>C. spruceanum</i> 200 mg/kg	$6,27 \pm 2,7$	$270,40 \pm 33,2$
<i>C. spruceanum</i> 400 mg/kg	$5,05 \pm 0,9$ b	$264,80 \pm 9,6$
CCl_4 + <i>C. spruceanum</i> 400 mg/kg	$5,40 \pm 1,3$ b	$255,00 \pm 35,8$
CCl_4 + N-acetilcisteína	$4,88 \pm 2,1$ b	$284,00 \pm 38,4$

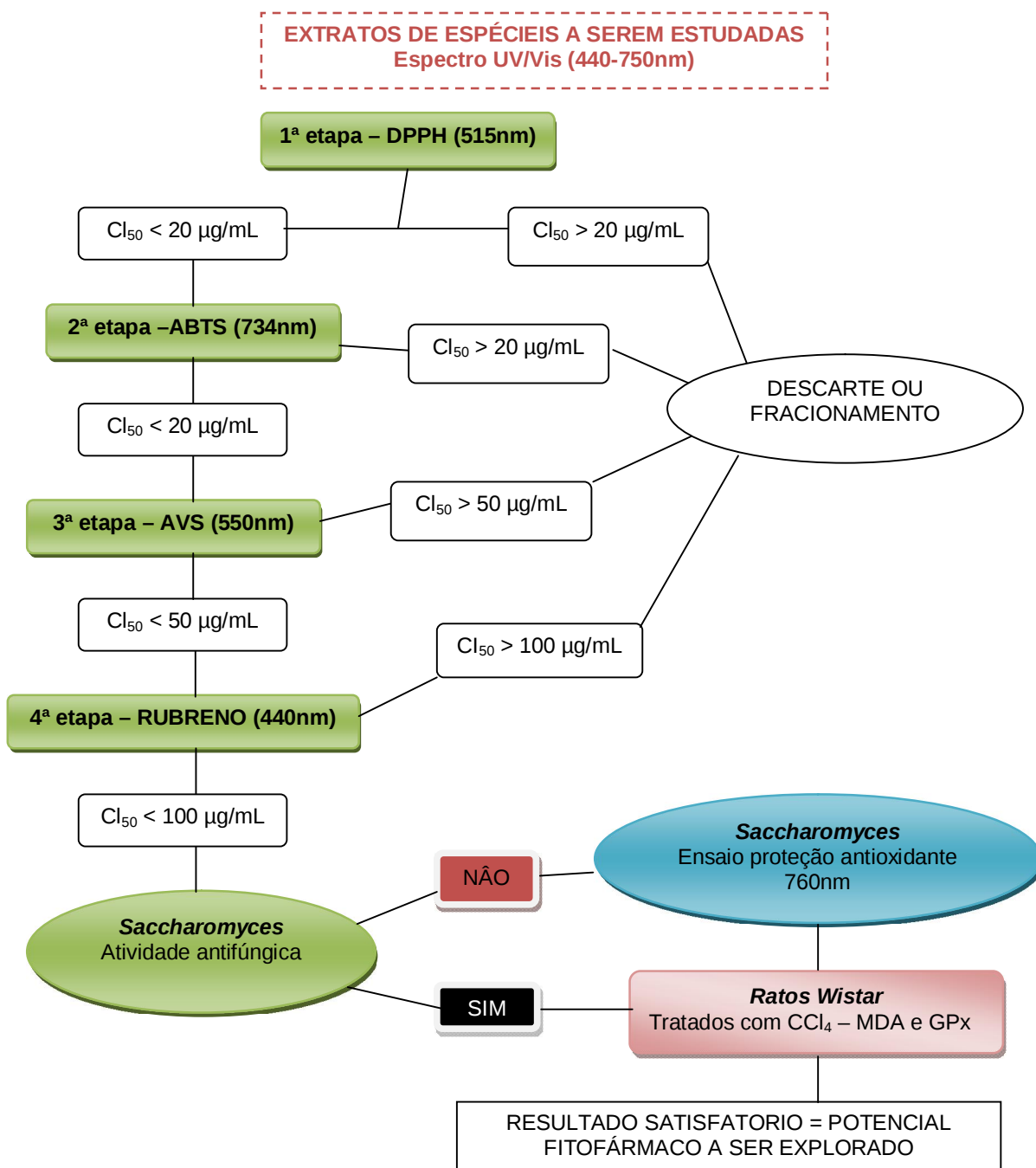
* - Animais sem exposição ao agente estressor (Acetoaminofeno ou Tetracloreto de Carbono)

Tabela 11 - Níveis antioxidantes teciduais ($\mu\text{g/dL}$) em ratos tratados com CCl_4 e extrato vegetal.

GRUPO	MDA tecidual ($\mu\text{mol/g}$ proteínas)	GPx tecidual (U/g prot.)
Controle*	$0,25 \pm 0,1$	$23,06 \pm 8,9$ b e
CCl_4	$0,19 \pm 0,1$	$19,69 \pm 1,8$
<i>C. spruceanum</i> 200 mg/kg	$0,12 \pm 0,1$ b	$3,98 \pm 2,3$ b
<i>C. spruceanum</i> 400 mg/kg	$0,36 \pm 0,2$	$8,33 \pm 1,0$ b
CCl_4 e <i>C. spruceanum</i> 400 mg/kg	$0,28 \pm 0,1$	$10,21 \pm 1,6$ a, b
CCl_4 e N-acetilcisteína	$0,26 \pm 0,2$	$9,24 \pm 1,1$ b, c

* - Animais sem exposição ao agente estressor (Acetoaminofeno ou CCl_4)

Assim, elaborou-se um protocolo experimental, agora adotado pelo grupo de pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas para realização de ensaios antioxidantes com extratos de plantas.



Fluxograma - Protocolo experimental de realização de ensaios para caracterização de atividades farmacológicas

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho objetivou comparar metodologias para a caracterização de atividades antioxidantes, analisando extratos obtidos de diferentes espécies de plantas amazônicas. As plantas estudadas foram: *Byrsonima japurensis*, *Callycophyllum spruceanum*, *Derris floribunda*, *Maytenus guianensis*, *Passiflora nítida*, *Petiveria alliacea* e *Ptychopetalum olacoides*.

Elaborou-se um protocolo experimental de realização de ensaios “*in vitro*” e “*in vivo*” para caracterização de atividades antioxidantes de extratos de plantas. Todos os testes *in vitro* utilizados na pesquisa, com exceção para o método que utiliza o rubreno para a varredura do oxigênio singlete, foram desenvolvidos com pequenas modificações para determinação em microplacas (MOREIRA et al., 2005). Para os testes *in vitro*, utilizou-se como primeiro ensaio o método de varredura do radical DPPH[•], seguido do ABTS⁺, do método de atividade varredora de superóxido e o método do Rubreno. Em seguida, realizaram-se os ensaios em modelos biológicos, iniciando-se o ensaio com leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* e o teste de estresse com ratos da espécie Wistar (Fluxograma).

A atividade antioxidante de plantas pode estar diretamente ligada a diversos compostos químicos presentes nas mesmas. Mas, dentre estes compostos, nenhum é tão representativo quanto os compostos fenólicos. Em 2004, CAI e colaboradores analisaram a capacidade antioxidante pelo método de ABTS⁺ de mais de 112 espécies de plantas medicinais usadas no tratamento e prevenção do câncer pela população chinesa. E seus resultados indicaram atividade antioxidante fortemente evidenciada, principalmente nas plantas que apresentavam predominância de compostos fenólicos.

Com isso, realizou-se um ensaio para a determinação de polifenóis totais dos extratos estudados. O método utilizado foi com reagente Folin-Ciocalteu (FCR). Esse método é

importante, pois além de ser muito disponível comercialmente, o seu processo já fora bastante padronizado (LIMA et al., 2006; SILVA et al., 2007; SOUZA et al., 2007; VERZA et al., 2007). Estes resultados vêm confirmar os resultados dos testes *in vitro*, onde as espécies que apresentam maior atividade antioxidante são justamente aquelas que apresentam um valor maior de compostos fenólicos pelo teste de Folin-Ciocalteu (*Byrsonima japurensis*, *Callycophyllum spruceanum* e o *Maytenus guianensis*). Quando foi realizado um teste de correlação do teor de polifenóis com os demais ensaios antioxidantes, este teve um índice de correlação de 0,829 com o método do DPPH e 0,630 para o teste do ABTS (Tabela 7).

Encontram-se na literatura inúmeros trabalhos que utilizam os testes *in vitro* com DPPH[•] e ABTS⁺ para avaliar a capacidade varredura de radicais livres para várias categorias de amostras (GORINSTEIN et al., 2003; KATALINIC et al., 2004; MILIAUSKAS et al., 2004). Estes dois métodos são os mais utilizados para avaliar o potencial antioxidante de materiais biológicos por apresentarem excelente estabilidade e baixo custo em determinadas condições de ensaio (ARNAO, 2000) e também por serem fáceis de implementar em laboratórios fitoquímicos.

Neste trabalho adotou-se como método primário, o teste de DPPH[•] para iniciar a pesquisa sobre caráter antioxidante das plantas estudadas, devido ao seu baixo custo e a alta estabilidade do reativo empregado. MENSOR et al. (2001) consideraram o método DPPH[•] rápido e fácil para avaliar a presença de antioxidante na amostra com a grande vantagem deste método poder ser preparado e realizado em temperatura ambiente, eliminando, assim, qualquer risco de degradação térmica das moléculas em estudo (BONDET et al., 1997). Os melhores resultados obtidos foram das espécies *Callycophyllum spruceanum*, *Byrsonima japurensis* e *Maytenus guianensis*, em ordem decrescente respectivamente. O que confirma os resultados obtidos com os ensaios para caracterização de compostos fenólicos totais realizados com as espécies.

Em seguida utilizou-se o método de ABTS⁺, já descrito exhaustivamente por muitos autores e indicado para verificar a atividade antioxidante de substâncias com caráter lipofílico ou hidrofílico, incluindo os flavonóides, carotenóides e plasma. No entanto, mostram-se efetivo para avaliar atividade antioxidante de vegetais, alimentos, óleos, bebidas, extratos de plantas entre outros. Este ensaio possui uma grande variedade metodológica relativa à formação do cátion radical, ao tempo de reação, ao comprimento de onda e etc., o que facilita a sua adaptação para diversos tipos de amostras (ARNAO et al., 2001; BENAVENTE-GARCIA et al., 2000; CAO et al., 1998; CARVALHO, 2006; RE et al., 1998).

Pelo ensaio com ABTS⁺, verificou-se uma maior atividade antioxidante das espécies: *Callycophyllum spruceanum*, *Ptychopetalum olacoides benth*, *Maytenus guianensis* e *Byrsonima japurensis*, em ordem decrescente respectivamente. A alta atividade antioxidante apresentada pelas espécies *C. spruceanum*, *B. japanurensis* e *M. guianensis* pode ser indicativo de grande concentração de compostos fenólicos nestas espécies. Mas também se verificou que algumas espécies (devido outros constituintes) podem apresentar grande atividade antioxidante, como o ocorrido com a essa espécie *Ptychopetalum olacoides benth*, que obteve a menor concentração de compostos fenólicos dentre as espécies aqui abordadas (Tabela 1), porem foi o segundo mais ativo.

Sabemos que o DPPH[•] possui a maior estabilidade dentre todos os reativos aqui utilizados, mas quando se trata de extratos vegetais, como os testados neste trabalho, que podem apresentar forte coloração, o método de ABTS⁺ leva vantagem. Enquanto o pico máximo de absorção do ensaio utilizando DPPH[•] fica em torno de 515 nm, o ensaio com ABTS⁺ utiliza comprimento de onda em torno de 730 nm, o que diminui algumas formas de interferência no ensaio pertinentes à forte coloração de algumas amostras, talvez devido à presença de substâncias muito coloridas, tais como antocianidinas e carotenóides (ARNAO, 2000).

A habilidade de alguns extratos em varrer radicais livres em ensaios simples de avaliação de capacidade antioxidante tais como os gerados pelo método do ABTS⁺ e DPPH[•] não significa que este funcione plenamente em mecanismos complexos tais como substratos fisiológicos. O radical ânion superóxido (O₂^{•-}) é uma espécie radicalar produzida constantemente nos organismos por diversos processos celulares, tais como a cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, no microssomo, e por meio de enzimas como xantina oxidase e NADPH oxidase, e pode estar aumentado em diversas patologias (POLLE et al., 1989).

Os O₂^{•-} são gerados durante o metabolismo como produtos finais de reações enzimáticas ou acidentalmente como produtos celulares secundários de reações redoxes. Estes radicais são fontes potenciais de lesões, pois podem agir diretamente sobre alvos biológicos ou indiretamente iniciando a produção de espécies altamente reativas de oxigênio, como o oxigênio singlete (1ΔO₂) ou o radical hidroxila (OH[•]). A primeira linha de defesa contra a toxicidade do oxigênio é, portanto, a remoção de radical ânion superóxido antes que a formação de outros produtos nocivos possa ocorrer (POLLE et al., 1989).

Pensando nisso, levou-se em consideração a importância de se caracterizar a atividade varredora de ânion superóxido (AVS) dos extratos estudados. Muitas pesquisas recentes utilizaram este método como forma mais específica de ensaio com atividade antioxidante de espécies vegetais (EWING & JANERO, 1995; HUANG et al., 2005; VASCONCELOS et al., 2007; OZTURK et al., 2007). Neste ensaio, os extratos que apresentaram maior atividade foram: *C. spruceanum*, *M. guianensis* e *B. japanurensis*, em ordem decrescente de atividade, respectivamente. Mas também se obteve um resultado satisfatório das espécies *Derris Floribunda*, *Petiveria alliacea* e *Passiflora nítida*. Sabe-se que os radicais ânions superóxido são fontes potenciais de lesões, pois podem agir diretamente sobre alvos biológicos ou indiretamente iniciando a produção de espécies altamente reativas. Isso vem a corroborar os

conhecimentos étnicos sobre as mais variadas atividades terapêuticas destas espécies, e que nos levaram a escolha das mesmas para estudo.

A espécie radicalar do oxigênio singlete é o estado eletronicamente excitado do oxigênio, produzido por reações fotoquímicas ou por outras radiações; reage com um grande número de moléculas biológicas, incluindo lipídeos da membrana, iniciando processos de peroxidação. Utilizou-se então um ensaio com rubreno, reativo que oxida na presença de luz formando oxigênio singlete ($^1\Delta_g\text{O}_2$). Este ensaio é utilizado para indicar atividades fotoprotetora das amostras.

O potencial antioxidante de cada extrato foi determinado em mEq do DABCO por grama de extrato seco. Foram utilizados valores de CI_{50} resultantes das atividades de espécies estudadas e dos antioxidantes padrões para se ter miliequivalência (mEq – g de antioxidante padrão por g de extrato vegetal) para cada teste (GREGIANINI et al., 2003). No método de rubreno não houve atividade para a maioria das espécies testadas, o menor valor de CI_{50} obtido foi da espécie *Callycophilum spruceanum* de 92,43 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 6). Este ensaio caracteriza a atividade antioxidante por meio do mecanismo de varredura do oxigênio singlete, gerado a partir da radiação luminosa, o que simula a radiação UV pela exposição à luz solar. Uma boa atividade de extratos vegetais neste ensaio indicaria uma espécie promissora à elaboração de uma solução protetora contra radiação solar. Mais devido ao baixo comprimento de onda utilizado neste ensaio, não descartamos a possibilidade de uma interferência na reação devido à forte coloração dos extratos vegetais.

No ensaio para a caracterização de compostos fenólicos, utilizando o método de Folin-Ciocalteu modificado, verificou-se uma maior concentração de compostos fenólicos nas espécies *Callycophyllum spruceanum*, *Byrsonima japurensis* e *Maytenus guianensis*, em ordem decrescente respectivamente. Este dado vem a corroborar os bons resultados

encontrados nestas espécies, e também surgem para comprovar a alta atividade antioxidante dos compostos fenólicos presentes nos vegetais.

Na espécie *Derris floribunda* a provável presença dos flavonóides nos extratos desta espécie (alcoólico e aquoso) pode ter contribuído para resultados obtidos, principalmente, no método de DPPH[•]. Seu extrato etanólico apresentou atividade nos três métodos (DPPH[•], ABTS⁺ e AVS) e pouca eficiência antioxidante pelo método do Rubreno (RIBEIRO e KAPLAN, 2002).

Conforme visto durante a realização desta pesquisa, a atividade antioxidante de plantas pode estar diretamente relacionada com a presença de compostos fenólicos. Sabe-se que os antioxidantes quando não são provenientes de via endógena (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase) provêm da via exógena por intermédio da ingestão de alimentos ricos em antioxidantes (α -tocoferol, β -caroteno, ácido ascórbico, etc.). Estas substâncias, geralmente oriundas de vegetais, na sua grande maioria são compostos fenólicos, o que justifica a boa correlação entre os ensaios antioxidantes e teste para determinação de polifenóis totais, conforme demonstrado na tabela 12.

Quando foi realizado o teste de correlação entre os diferentes ensaios como mostrado na tabela 11, verificaram-se correlações estatisticamente significativas entre os testes, principalmente com as concentrações de polifenóis com os testes de varredura de radicais. Contudo, o único teste que apresentou correlação significativa com todos os demais ensaios foi o teste de varredura do DPPH, demonstrando o já conhecido amplo espectro de atividade deste método. Por este achado e por outras razões já explicitadas, isto o torna um excelente teste para varredura de potencial antioxidante de extratos vegetais. Por outro lado, as baixas CI₅₀ encontradas demonstram o excelente potencial antioxidante das espécies estudadas. Salientando que estes dados aqui apresentados, até o presente momento, não estavam

disponíveis para nenhuma destas espécies, torna claro o grande potencial da flora amazônica no provimento de novos bioativos com potencial de uso terapêutico.

Em relação à eficiência dos testes *in vitro* é importante salientar que nem toda esta atividade antioxidante contida nos extratos das plantas estudadas é sinônimo de eficiência para ensaios *in vivo*. Os testes *in vitro* são mais rápidos e simples de serem executados, mas, frequentemente, o resultado não é garantia de uma boa atividade antioxidante em modelos biológicos.

Por isso, ensaios biológicos, utilizando principalmente células eucarióticas da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, têm se mostrado um complemento para determinação da capacidade antioxidante de diferentes compostos, fornecendo resultados rápidos, reprodutíveis e passíveis de serem correlacionados ao observado no homem (SOARES et al., 2005).

No presente trabalho, utilizaram-se as leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* modificadas geneticamente onde fora retirado o gene que codifica a enzima catalase, tornando-as sensíveis ao peróxido de hidrogênio. Sabendo-se que algumas das espécies de plantas estudadas neste trabalho possuem algum tipo de atividade antimicrobiana, foram realizados dois testes com as cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (FENNER et al., 2006; ZULETA et al., 2003).

O primeiro ensaio de incubação das cepas, feito diretamente com os extratos vegetais, teve caráter qualitativo e serviu para verificar qualquer possível atividade antifúngica existente nos extratos. Foi realizado de forma simples, apenas incubando os extratos com a cepa, e após 24h fazendo uma contagem de colônias (tabela 8). As espécies que obtiveram a maior percentagem de inibição do crescimento das cepas foram a *C. spruceanum*, *M. guianensis*, *Petiveria alliacea*, *Ptychopetalum olacoides benth.* e *B. japanurensis*, em ordem decrescente respectivamente.

Em seguida realizou-se um novo ensaio para determinação de atividade protetora dos extratos contra estresse oxidativo causado por incubação peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 2 mM. Nenhuma das espécies exibiu atividade protetora, e quando comparadas ao ácido ascórbico, que obteve percentagem de atividade antioxidante em torno de 92%, os extratos testados, na mesma concentração, não obtiveram atividade antioxidante maior que 12% em nenhuma das espécies.

Para a espécie *C. spruceanum*, que se mostrou mais eficaz na varredura de radicais livres nos ensaios *in vitro*, realizou-se um ensaio *in vivo* por indução de estresse oxidativo em ratos da espécie Wistar. Estes animais foram tratados com tetracloreto de carbono (CCl₄) como indutor do estresse oxidativo. Aqui, pode-se verificar uma boa atividade antioxidante desta espécie ao compararmos o seu efeito com o fármaco N-acetilcisteína, que é uma droga antioxidante conhecida na literatura por sua capacidade de inibir radicais livres (PAULA et al., 2006) e também pelo seu efeito hepatoprotetor (PASTOR et al., 1997; VERCELINO et al., 2008). Houve uma diminuição significativa nos níveis de MDA no soro e também um aumento significativo nos níveis séricos de GPx, indicando maior proteção antioxidante no grupo que ingeriu o extrato de *C. spruceanum* por via oral.

7. CONCLUSÃO

- Foi possível conhecer o potencial antioxidante através de cinco diferentes testes *in vitro* de extratos de sete espécies de plantas até então pouco exploradas quanto a este potencial comparando os resultados com padrões de conhecida atividade antioxidante.
- Das espécies estudadas, aquelas que apresentaram os resultados mais representativos quanto ao potencial antioxidante foram às plantas *Callycophyllum spruceanum*, *Maytenus guianensis* e a *Byrsonima japurensis*.
- Foi observada correlação positiva entre os testes antioxidantes *in vitro* realizados, sendo o teste do DPPH• o único que se correlacionou com todos os demais testes.
- O teste utilizando cepas de *Saccharomyces cerevisiae* não se mostrou eficaz para o estudo do potencial antioxidante das espécies estudadas, pois a maioria dos extratos apresentou atividade antifúngica o que inviabilizou o teste antioxidante.
- A espécie *C. spruceanum* que apresentou os melhores resultados nos testes *in vitro*, quando analisada no modelo de estresse oxidativo com CCl₄ em ratos wistar, foi capaz de alterar os níveis séricos e teciduais de marcadores do estresse oxidativo como malondialdeído e glutathione peroxidase.
- A partir da realização deste trabalho foi possível organizar um protocolo experimental para estudo do potencial antioxidante de extratos vegetais utilizando testes *in vitro* e *in vivo*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, S.; RAO, A.V. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *Canadian Medical Association Journal*, n.163, v.6, p.739-44, 2000.

ALCARAZ, M.J.; CARVALHO, J.C.T. Flavonóides como agentes antiinflamatórios. In: CARVALHO J.C.T. *Fitoterápicos antiinflamatórios*. Ribeirão Preto: Ed. Tecmedd, 2004.

AL-DABBAS, M.M.; KITAHARA, K.; SUGANUMA, T.; HASHIMOTO, F.; TADERA, K. Antioxidant and α -Amylase inhibitory compounds from aerial parts of *Varthemia iphionoides* boiss. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, v. 70, n° 9, p. 2178-2184, 2006.

ARELLANO, M.F. *Química Orgânica para Biólogos - Introducción a la nomenclatura y formulación em Química Orgânica*. Depart. Quim. Orgân. Y Farmac., Sesión de Modelización Molecular, Universidade de Navarra. Disponível em: <http://www.unav.es/organica/docencia/organica_b/Nomenclatura.pdf>. Acesso em: 20/11/2006.

ARGUELLES, S.; GARCIA, S.; MALDONADO, M.; MACHADO, A.; AYALA, A. Do the serum oxidative stress biomarkers provide a reasonable index of the general oxidative stress status? *Biochimica et Biophysica Acta*, n° 1674, p. 251-259, 2004.

ARNAO, M.B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a pratical case. *Trends in Food Science & Technology*., n° 11, p. 419-421, 2000.

ARTS, M.J.T.J.; DALLINGA, J.S.; VOSS, H.P.; HAENEN, G.R.M.M.; BAST, A. A new approach to asses the total antioxidant capacity using the TEAC assay. *Food Chemistry*, v. 88, p. 567-570, 2004.

BACALLAO, L.L.G.; GOMEZ, L.V.G.; DOMINGUEZ, D.M.R.; GARCIA, E.S. Plantas con propiedades antioxidants. *Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas*, v. 20, n° 3, p. 231-35, 2001.

BENEVIDES, PJC, YOUNG, MCM, GIESBRECHT, AM., ROQUE, NF., BOLZANI, VS. Antifungal polysulphides from *Petiveria alliacea* L. *Phytochemistry*, v. 57, p. 743-747, 2001.

BENZIE, I. F. F.; SZETO, Y. T. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, n° 47, p. 633-636, 1999.

BILDIK, A.; KARGIN, F.; SEYREK, K.; PASA, S.; OZENSOY, O. Oxidative stress and non-enzymatic antioxidante status in dogs with visceral Leishmaniosis. *Research in Veterinary Science*, v. 77, p.63-66, 2004.

BIOMOL Research Laboratories Inc. **PRODUCT DATA BIOMOL – Trolox®**. Disponível em: <<http://www.funakoshi.co.jp/datasheet/MOL/FR105.pdf>>. Acesso em: 03/12/2006.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH• Free Radical Method. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 30, n° 6, p. 609-615, 1997.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant Activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 28, n° 1, p. 25-30, 1995.

CANNELL, R. J. P. **Natural Products Isolation**. Totowa, New Jersey: Editora Humana Press, 1998.

CAI, Y.; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Science**, v. 74, p. 2157–2184, 2004.

CAO, G.; ALESSIO, H.M.; CUTLER, R.G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. **Free Radicals in Biology & Medicine**, n° 14, p. 303-311, 1993.

CAO, G.; BOOTH, S.L.; SADOWSKI, J.A.; PRIOR, R.L. Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables. **American Journal of Clinical Nutrition**, n° 68, p. 1081–1087, 1998.

CARDOSO, C.L.; SILVA, D.H.S.; YOUNG, M.C.M.; GAMBOA, I.C.; BOLZANI, V.S. Indole monoterpene alkaloids from *Chimarrhis turbinata* DC Prodr.: a contribution to the chemotaxonomic studies of the Rubiaceae family. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n° 1, p. 26-29, 2008.

CARVALHO, J.C.T. **Fitoterápicos antiinflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto: Ed. Tecmedd, 2004.

CARVALHO, S.R. **Otimização e validação do método ABTS+ e avaliação das atividades antioxidantes de extratos de plantas nativas da amazônia**. Manaus: UEA, 2006. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais), Universidade do Estado do Amazonas, 2006.

CHANDAN, BK; SAXENA, AK; SHUKLA, S.; SHARMA, N.; GUPTA, D.K.; SURI, K.A.; SURI, J.; BHADOURIA, M.; SINGH, B. Hepatoprotective potential of *Aloe barbadensis* Mill. against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n° 3, p. 560-566, 2007.

CORRÊA JR, C.; SCHEFFER M.C. **“Plantas Medicinais e Fitoterápicos: Uma Resposta Nacional”**. EMATER - 8ª Conferência das Partes da Convenção sobre Diversidade Biológica (COP-8). Curitiba (PR), 2006.

COSTA, L.P.; HARTHMANN, A.; ARRUDA, P.; ANGELIS, K.D.; IRIGOYEN, M.C. Treinamento físico melhora a disfunção quimiorreflexa em ratos diabéticos por estreptozotocina. **Revista Brasileira de Educação Física e Esporte**, v. 18, n° 3, p. 293-301, 2004.

CUENDET, M.; HOSTETTMANN, K. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. **Helvetica Chimica Acta.**, v. 80, nº4, p.1145-1152, 1997.

DADKHAH, A.; FATEMI, F.; KAZEMNEJAD, S.; RASMI, Y.; ASHRAFI-HELAN, J.; ALLAMEH, A. Differential effects of acetaminophen on enzymatic and non-enzymatic antioxidant factors and plasma total antioxidant capacity in developing and adult rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 281, nº 1-2, p. 145–152, 2006.

DAÍ, J.R.; CARDELLINA, J.H.; MAHON, J.M.; BOYD, M.R. Zerumbone, an HIV-inhibitory and cytotoxic sesquiterpene of *Zingiber aromaticum* and *Zingiber zerumbet*. **Natural Product Letters**, v.10, nº 2, p. 115-118, 1997.

DAVID, J.P.; BARREIROS, A.L.B.; DAVID, J.M.. Antioxidantes de fontes naturais. In: CARVALHO, J.C.T. **Fitoterápicos antiinflamatórios**. Ribeirão Preto: Ed. Tecmedd, 2004.

DAVID, J.M.; SANTOS, F.A. Flavonóide e triterpenos de *Stigmaphyllon paralias*. **Química Nova**, v. 26, nº 4, p. 484-487, 2003.

DELFINO, V.D.; FIGUEIREDO, J.F.; MATSUO, T.; FÁVERO, M.E.; MATNI, A.M.; MOCELIN, A.J. Streptozotocin-induced diabetes mellitus: long-term comparison of two drug administration routes. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, nº 24, v.1, p.31-6, 2002.

DI STASI L.C. **Plantas medicinais na Amazônia**. São Paulo, Ed. UNESP, 1989.

DOTAN, Y.; LICHTENBER, G.; PINCHUK, I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. **Progress in Lipid Research.**, v. 43, nº 3, p. 200-227, 2004.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/Ácido Linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, nº 26, v. 2, p. 446-452, 2006.

EREL, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS⁺ radical cation. **Clinical Biochemistry**, v. 37, nº 4, p. 277-285, 2004.

ESPÍN, J.C.; SOLER-RIVAS, C.; WICHES, H.J. Characterization of the total free scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, nº 3, p. 648-656, 2000.

EWING, J.F.; JANERO, D.R. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. **Analytical Biochemistry**, v. 232, nº 2, p. 243–248, 1995.

FENNER, R.; BETTI, A.H.; MENTZ, L.A.; RATES, S.M.K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, nº 3, p. 369-394, 2006.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, nº 1, p. 61-68, 1997.

FERREIRA, S.H. **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil**. 2002. Disponível em: <<http://www.abc.org.br/~sferreira>>. Acesso em: 15/02/2006.

FRANKEL, E.N.; MEYER, A.S. Review: The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, nº 13, p. 1925-1941, 2000.

FREITAS, P.C.D. **Avaliação "in vitro" da atividade antioxidantes de plantas medicinais brasileiras da família Piperraceae**. São Paulo: USP, 2000. Tese (Doutorado em Fármacos e Medicamentos), Universidade de São Paulo, 2000.

GANTT, K.R.; GOLDMAN, T.L.; McCORMICK, M.L.; MILLER, M.A.; JERONIMO, S.M.B.; NASCIMENTO, E.T.; BRITIGAN, B.E.; WILSON, M.E. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. **Journal of Immunology**, v.165, nº 2, p. 893-901, 2001.

GARCIA-ALONSO, M.; DE PASCUAL-TERESA, S.; SANTOS-BUELGA, C.; RIVAS-GONZALO, J.C. Evaluation of the antioxidant properties of fruits. **Food Chemistry**, v. 84, nº 1, p. 13-18, 2004.

GORINSTEIN, S.; MARTIN-BELLOSO, O.; KATRICH, E.; LOJEK, E. Comparison of the contents of the main biochemical compounds and the antioxidant activity of some Spanish olive oils as determined by four different radical scavenging tests. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 14, nº 3, p. 154-159, 2003.

GREGIANINI, T.S.; SILVEIRA, V.C.; PORTO, D.; KERBER, V.A.; HENRIQUES, A.T.; FETT-NETO, A.G. The Alkaloid Brachycerine is induced by ultraviolet radiation and is a singlet oxygen quencher. **Photochemistry and Photobiology**, v.78, nº 5, p. 470-474, 2003.

GUO, C.; YANG, J.; WEI, J.; LI, Y.; XU, J.; JIANG, Y. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. **Nutrition Research**, v. 23, nº 12, p. 1719-1726, 2003.

GUTTERIDGE, J. M.C.. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **Clinical Chemistry**, v. 41, nº 12, p.1819-1828, 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology & Medicine**, 2^a ed. New York : Oxford University Press, 1989.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology & Medicine**, 3^a ed., New York: Oxford University Press, p. 936, 1999.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: STOREY, K.B. (Org.) **Functional Metabolism: Regulation and Adaptation**. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, p. 319-368, 2004.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agriculture & Food Chemistry*, v. 53, n° 6, p. 1841-1856, 2005.

JODYNIS-LIEBERT, J.; MATŁAWSKA, I.; BYLKA, W.; MURIAS, M. Protective effect of *Aquilegia vulgaris* (L.) on APAP-induced oxidative stress in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 97, n° 2, p. 351-358, 2005.

JOHNSON, L.; WILLIAMS, L.A.D.; ROBERTS, E.V. An insecticidal and acaricidal polysulfide metabolite from the roots of *Petiveria alliacea*. *Pesticide science*, v. 50, n° 3, p. 228-232, 1997.

JONES, D.P. Redefining oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling*, v. 8, n. 9-10, p. 1865-1879, 2006.

KADIISKA, M.B.; GLADEN, B.C.; BAIRD, D.D.; GERMOLEC, D.; GRAHAM, L.B.; PARKER, C.E.; NYSKA, A.; WACHSMAN, J.T.; AMES, B.N.; BASU, S.; BROTH, N.; FITZGERALD, G.A.; FLOYD, R.A.; GEORGE, M.; HEINECKE, J.W.; HATCHI, G.E.; HENSLEY, K.; LAWSON, J.A.; MARNETT, L.J.; MORROW, J.D.; MURRAY, D.M.; PLASTARAS, J.; ROBERTS, L.J.; ROKACH, J.; SHIGENAG, M.K.; SOHAL, R.S.; SUN, J.; TICE, R.R.; VAN THIELG, D.H.; WELLNER, D.; WALTER, P.B.; TOMER, K.B.; MASON, R.P.; BARRETT, J.C. Biomarkers of Oxidative Stress Study II. Are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCl₄ poisoning?. *Free Radicals in Biology & Medicine*, v. 38, n° 6, p. 698– 710, 2005a.

KADIISKA, M.B.; GLADEN, B. C.; BAIRD, D.D.; GRAHAM, L. B.; PARKER, C.E.; AMES, B.N.; BASU, S.; FITZ-GERALD, G.A.; LAWSON, J.A.; MARNETT, L.J.; MORROW, J.D.; MURRAY, D.M.; PLASTARAS, J.; ROBERTS, L.J.; ROKACH, J.; SHIGENAGA, M.K.; SUN, J.; WALTER, P.B.; TOMER, K.B.; BARRETT, J.C.; MASON, R.P. Biomarkers of oxidative stress study III. Effects of the nonsteroidal anti-inflammatory agents indomethacin and meclofenamic acid on measurements of oxidative products of lipids in CCl₄ poisoning. *Free Radicals Biology & Medicine*, v. 38, n° 6, p. 711-718, 2005b.

KANTER, M.; COSKUN, O.; BUDANCAMANAK, M. Hepatoprotective effects of *Nigella sativa* L and *Urtica dioica* L on lipid peroxidation, antioxidant enzyme systems and liver enzymes in carbon tetrachloride-treated rats. *World Journal of Gastroenterology*, n° 11, v. 42, p. 6684-6688, 2005.

KATALINIC V.; MILOS, M.; KULISIC, T.; JUKIC, M. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, v. 94, n° 4, p. 550-557, 2004.

KIM, B. J.; KIM, J.H.; KIM, H.P.; HEO, M.Y. Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use (II): anti-oxidative activity and free radical scavenging activity. *International Journal of Cosmestic Science*, v. 19, n° 6, p. 299-307, 1997.

KIM, Y.W.; KI, S.H.; LEE, J.R.; LEE, S.J.; KIM, C.W.; KIM, S.C.; KIM, S.G. Liquiritigenin, an aglycone of liquiritin in *Glycyrrhizae radix*, prevents acute liver injuries in rats induced by acetaminophen with or without buthionine sulfoximine. *Chemico-Biological Interactions*, v. 161, n° 2, p. 125-138, 2006.

KRATZERT, M.; IBOLD, S. **Fabricação de plásticos: Poliadição**. Ensino da química, da Universidade Livre de Berlim. Instituto de Química, TAKUSTR, 2000. Disponível em: <<http://www.chemie.fu-berlin.de/fb/fachdid>>. Acesso em: 10/07/2008.

KUO, Y.H.; CHEN, C.H.; KUO, L.M.; KING, M.L.; WU, T.S.; HARUNA, M.; LEE, K.H.. Antitumor agents, 112. Emarginatine B, a novel potent cytotoxic sesquiterpene pyridine alkaloid from *Maytenus emarginata*. **Journal of Natural Products**, v. 53, nº 2, p. 422–428, 1990.

KUO, Y.H.; CHEN, C.H.; KING, M.L.; WU, T.S. Sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus emarginata*: emarginatine-C and D and cytotoxic emarginatine-E and emarginatinine. **Phytochemistry**, v. 35, nº 3, p. 803-807, 1994.

LIMA, A.R.; BARBOSA, V.C.; SANTOS FILHO, P.R.; GOUVÊA, C. M.C.P. Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, nº 4, p.531-536, 2006.

LIMA, V.L.A.G.; MÉLO, E.A.; MACIEL, M.I.S.; SILVA, G.S.B.; LIMA, D.E.S.; Fenólicos totais e atividade antioxidante do extrato aquoso de broto de feijão-mungo (*Vigna radiata* L.). **Revista de Nutrição**, v. 17, nº 1, p. 53-57, 2004.

MACARI, P.A.T.; PORTELA, C.N.; CELANI, F.B.; POHLIT, A.M. Isolamento de um flavonóide da casca de *Maytenus guyanensis*. **XXVI Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares**. Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, 2004.

MACARI, P.A.T.; PORTELA, C.N.; POHLIT, A.M. Antioxidant, cytotoxic and UVB-absorbing activity of *Maytenus guyanensis* Klotzch. (Celastraceae) bark extracts. **Acta Amazonica**, v. 36, nº 4, p. 513–518, 2006.

MATIUCCI, C. A. R. **Atividades antioxidante “in vitro” em plantas com propriedades medicinais**. Jundiaí: UFV, 1998. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimento), Universidade Federal de Viçosa, 1998.

MAZZANTI, C.M.; SCHOSSLER, D.R.; FILAPPI, A.; PRESTES, D.; BALZ, D.; MIRON, V.; MORSCH, A.; SCHETINGER, M.R.C.; MORSCH, V.M.; CECIM, M. Extrato da casca de *Syzygium cumini* no controle da glicemia e estresse oxidativo de ratos normais e diabéticos. **Ciência Rural**, v. 33, nº 6, p. 1061-1065, 2003.

MELO, M. S. O. nº **Antioxidantes Naturais da castanha do Brasil (*Bertholetia excelsa*), da castanha do caju (*Anacardium occidentale*) e fruto do dendezeiro (*Elais guineensis*, Jacq.)** São Paulo: USP, 1989. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos), Universidade de São Paulo, 1989.

MENSOR, L. L. **Avaliação da atividade antioxidante de plantas brasileiras**. Rio de Janeiro: UFRJ, 1999. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1999.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH• free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, nº 2, p. 127-130, 2001.

MILIAUSKAS, A. G.; VENKUTONIS A. P.R.; VAN BEEK B. T. A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**, v.85, nº 2, p. 231-237, 2004.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Journal of Science Technology**, v. 26, nº 2, p. 211-219, 2004.

MOREIRA, A. V. B. **Avaliação da atividade antioxidante de semente de mostarda (Brassica Alba, L) I.- Identificação dos principais compostos responsáveis pela inibição da oxidação.** São Paulo: USP, 1999. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos), Universidade de São Paulo, 1999.

MOREIRA, D.L.; LEITÃO, SG.; GONÇALVES, JLS.; WIGG, MD.; LEITÃO, G.G. Antioxidant And Antiviral Properties Of *Pseudopiptadenia Contorta* (Leguminosae) And Of Quebracho (*Schinopsis* Sp.) Extracts. **Química Nova**, v. 28, nº 3, p. 421-425, 2005.

MURUGESH, K.; YELIGAR, V.; DASH, D.K.; SENGUPTA, P.; MAITI, B.C.; MAITY, T.K. Antidiabetic, antioxidant and antihyperlipidemic status of *Heliotropium zeylanicum* extract on streptozotocin-Induced diabetes in rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, nº 29, v. 11, p. 2202—2205, 2006.

NCCLS. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras: Norma Aprovada M27-A2.** Pennsylvania: Estados Unidos, 2ª edição, v. 22, nº 15, 2002.

NICULESCU, L.; STANCU, C.; SIMA, A.; TOPORAN, D.; SIMIONESCU, M. The total peroxy radical trapping potential in serum - an assay to define the stage of atherosclerosis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 5, nº 3, p. 285-294, 2001.

NOOR, R.; MITTAL, S.; IQBAL, J. Superoxide dismutase – applications and relevance to human diseases. **Medical Science Monitor**, v. 8, nº 9, p. 210-215, 2002.

NORIEGA, G.O.; OSSOLA, J.O.; TOMARO, M.L.; BATLLE, A.M.D.C. Effect of acetaminophen on heme metabolism in rat liver. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 32, nº 9, p. 983–991, 2000.

OBÓN, J.M.; CASTELLAR, M.R.; CASCALES, J.A.; FERNANDEZ-LOPEZ, J.A. Assesment of the TEAC method for determining the antioxidant capacity of synthetic red food colorants. **Food Research International**, v. 38, nº 8-9, p. 842-845, 2005

OGA, S.; DE FREITAS, P.C.; GOMES DA SILVA, A.C.; HANADA, S. Pharmacological trials of crude extract of *Passiflora alata*. **Planta Medica**, v. 50, n. 4, p.303-306, 1984.

OH, Y.S.; JANG, E.S.; BOCK, J.Y.; YOON, S.H.; JUNG, A.Y. Singlet Oxygen Quenching Activities of Various Fruit and Vegetable Juices and Protective Effects of Apple and Pear

Juices against Hematolysis and Protein Oxidation Induced by Methylene Blue Photosensitization. *Journal of Food Science*, v. 71, n° 4, p. 260-268, 2006.

ORABI, K.Y.; AL-QASOUMI, S.I.; EL-OLEMY, M.M.; MOSSA, J.S.; MUHAMMAD, I. Dihydroagarofuran alkaloid and triterpenes from *Maytenus heterophylla* and *Maytenus arbutifolia*. *Phytochemistry*, v. 58, n° 3, p. 475-480, 2001.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR R.L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, n° 10, p. 4619-4626, 2001.

OU, B.; HUANG, D.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J.A.; DEEMER, E.K. Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n° 11, p. 3122-3128, 2002.

OZTURK, M.; AYDOGMUS-OZTURK, F.; DURU, M.E.; TOPÇU, G. Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*): An edible medicinal plant. *Food Chemistry*, n° 103, n° 2, p. 623-630, 2007.

PAGLIA, D.E.; VALENTINE, W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v. 70, n° 1, p. 158-169, 1967.

PAL, B.K.; KULKARNI, S.; BHANDARI, Y.; GANESH, B.B.; GOSWAMI, K.; REDDY, M.U.R. Lymphatic filariasis: possible pathophysiological nexus with oxidative stress. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 100, n° 7, p. 650-655, 2006.

PAULA, A.S.; NASCIMENTO, P.D.; CALVANO, D.C.; VIEIRA, A.D.D.; MOURA, F.J.D.; FRANCO-NETO, E.A.; ROSA, T.T.; VEIGA, J.P.R. Efeito protetor da n-acetilcisteína em pacientes com função renal normal expostos a contraste radiológico hiperosmolar. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*. v. 26, n° 1, p. 15-19, 2006.

PEREIRA, R. B. *Avaliação da atividade antioxidante em sementes de frutas cítricas*. São Paulo: USP, 1996 Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) Universidade de São Paulo, 1996.

PASTOR, A.; COLLADO, P.S.; ALMAR, M.; GONZALEZ-GALLEGO, J. Antioxidant enzyme status in biliary obstructed rats: effects of N-acetylcysteine. *Journal of Hepatology*. v.21, p. 363-310, 1997.

PINHEIRO, K.G.; RODRIGUES, E.R.; MORETI, D.L.C.; MARTINS, C.H.G.; STOPPA, M.A.; ALVES, E.G.; LOPES, R.A.; SALA, M.; PETENUSCI, S.O. *Estudo hematológico em ratos sob ação de plantas medicinais *Ptychopetalum olacoides* BENTH.* 7ª Jornada de Biomedicina. Universidade de Franca, 2003.

POLLE, A.; KRINGS, B.; RENNENBERG, H. Superoxide Dismutase Activity in Needles of Norwegian Spruce Trees (*Picea abies* L.). *Plant Physiology*, v. 90, n° 4, p. 1310-1315, 1989.

PRADO, C.C.; ALENCAR, R.G.; PAULA, J.R.; BARA, M.T.F. Avaliação do teor de polifenóis da *Camellia sinensis* (chá-verde). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, nº 2, p. 164-167, 2005.

RAY, G.; KUMAR, V.; KAPOOR, A.V.; DUTRA, A.; BATRA, S. Status of antioxidants and other biochemical abnormalities in children with dengue fever. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 45, nº 1, p. 4-7, 1999.

RE R., PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS⁺ radical cation decolorization assay. **Free Radicals in Biology and Medicine**, v. 26, nº 9-10, p. 1231-1237, 1998.

REVILLA, J. **Apontamentos para a Cosmética Amazônica**. SEBRAE-AM / INPA, Manaus. 532 p., 2ª ed., 2002.

RIBEIRO, C.V.C.; KAPLAN, M.A.C. Tendências evolutivas de famílias produtoras de cumarinas em angiospermae. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 533-538, 2002.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, v.3, n.8, p. 121-137, 2002

SHAMI, N.J.I.E.; MOREIRA, E.A.M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 2, p. 227-236, 2004.

SHUI, G.; LEONG, L.P. Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 977, nº 1, p. 89-96, 2002.

SILVA, C.G.; HERDEIRO, R.S.; MATHIAS, C.J.; PANEK, A.D.; SILVEIRA, C.S.; RODRIGUES, V.P.; RENNO, M.N.; FALCAO, D.Q.; CERQUEIRA, D.M.; MINTO, A.B.M.; NOGUEIRA, F.L.P.; QUARESMA, C.H.; SILVA, J.F.M.; MENEZES, F.S.; ELEUTHERIO, E.C.A. Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. **Pharmacological Research**, v. 52, nº 3, p.229-233, 2005.

SILVA, E.M.; SOUZA, J.N.S.; ROGEZ, H.; REES, J.F.; LARONDELLE, Y. Antioxidants activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food chemistry**, v. 101, nº 3, p. 1012-1018, 2007.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª edição, Florianópolis: Editora da Universidade, 2004.

SINGLETON, V.L., ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, nº 3, p. 144-158, 1965.

SOARES, D.G.; ANDREAZZA, A.C.; SALVADOR, M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, nº 1, p. 95-100, 2005.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, nº 1, p. 71-81, 2002.

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

SOUZA, J.N.S.; SILVA, E.M.; LOIR, A.; REES, J.F.; ROGEZ, H.; LARONDELLE, Y. Antioxidant capacity of four polyphenol-rich Amazonian plant extracts: A correlation study using chemical and biological in vitro assays. **Food Chemistry**, v. 106, nº 1, p. 331-339, 2008.

TAKEBAYASHI, J.; TAI, A.; GOHDA, E.; YAMAMOTO, I. Characterization of the radical-scavenging reaction of 2-o-substituted ascorbic acid derivatives, AA-2G, AA-2P, and AA-2S: a kinetic and stoichiometric study. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, nº 4, p. 766-771, 2006.

TIEPPO, M.; PORAWSKI, M.; SALVADOR, M.; MOREIRA, A.J. COLLADO, P.S.; GONZÁLEZ-GALLEGU, J.; MARRONI, N.P. *Croton cajucara benth.* leaf extract scavenges the stable free radical DPPH• and protects against oxidative stress induced by paraquat. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, nº 1, p. 161-165, 2006.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, nº 5, p. 1323-1338, 2007.

VEIGA-JR, V.F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, nº 3, p. 519-528, 2005.

VELIOGLU, Y.S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B.D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, nº 46, p. 4113-4117, 1998.

VERCELINO, R.; TIEPPO, J.; DIAS, A.S.; MARRONI, C.A.; GARCIA, E.; MEURER, L.; PICADA, J.N.; MARRONI, N.P. N-acetylcysteine effects on genotoxic and oxidative stress parameters in cirrhotic rats with hepatopulmonary syndrome. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 102, nº 4, p. 370-376, 2008.

VERZA, S.G.; KREINECKER, M.T.; REIS, V.; HENRIQUES, A.T.; ORTEGA, G.G. Avaliação das variáveis analíticas do método de folin-ciocalteu para determinação do teor de taninos totais utilizando como modelo o extrato aquoso de folhas de *Psidium guajava* L. **Química Nova**, v. 30, nº 4, p. 815-820, 2007.

VILLANO, D.; FERNANDEZ-PACHON, M.S.; MOYA, M.L.; TRONCOSO, A.M.; GARCIA-PARRILLA, M.C. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH[•] free radical. *Talanta*, v. 71, n° 1, p. 230–235, 2007.

WANG, C.C.; CHU, C.Y.; CHU, K.O.; CHOY, K.W.; KHAW, K.S.; ROGERS, M.S.; PANG, C.P. Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity Assay Versus Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay in Plasma. *Clinical Chemistry*, v. 50, n° 5, p. 952-954, 2004.

WANG, F.R.; AI, H. CHEN, X.M.; LEI, C.L. Hepatoprotective effect of a protein-enriched fraction from the maggots (*Musca domestica*) against CCl₄-induced hepatic damage in rats. *Biotechnology Letters*, v. 29, n° 6, p. 853-858, 2007.

WANG, M.; JIN, Y.; HO, C.T. Evaluation of resveratrol derivatives as potential antioxidants and identification of a reaction product of resveratrol and 2,2-diphenyl 1-picrylhydrazyl radical. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, n° 47, v. 10, p. 3947- 3977, 1999.

WAYNER, D.D.; BURTON, G.W.; INGOLD, K.U.; LOCKE, S. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, v.187, n° 1, p. 33-37, 1985.

YANG, D.; WANG, Q.; KE, L.; JIANG, J.; YING, T. Antioxidant activities of various extracts of lotus (*Nelumbo nuficera Gaertn*) rhizome. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, n° 16, v. 1, p. 158-163, 2007.

ZHU, Y.Z.; HUANG, S.H.; TAN, B.K.H.; SUN, J.; WHITEMAN, M.; ZHU, Y.-C. Antioxidants in Chinese herbal medicines: a biochemical Perspective. *Natural Products Reports*, v. 21, p. 478–489, 2004.

ZHUANG, Q.; SCHOLZ, F.; PRAGST, F. The voltammetric behaviour of solid 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) microparticles. *Electrochemistry Communications*, v. 1, n° 9, p. 406–410, 1999.

ZULETA, L.M.C.; CAVALHEIRO, A.J.; SILVA, D.H.S.; FURLANA, M.; YOUNG, M.C.M.; ALBUQUERQUE, S.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V.S. Seco-Iridoids from *Calycophyllum spruceanum* (Rubiaceae). *Phytochemistry*, v. 64, n° 2, p.549-553, 2003.