

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA - FCFAR



Estudo da ação do extrato bruto de *Morus nigra* L. (*Moreaceae*) e frações fenólicas sobre a atividade antimicrobiana e geração de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio: *in vitro* com ensaios “químicos”, enzimáticos, e celular.

RICARDO ALEXANDRE HAKIME SILVA

ORIENTADOR: Prof. Dr. IGUATEMY LOURENÇO BRUNETTI

CO-ORIENTADORAS: Prof^ª. Dr^ª. OLGA MARIA MASCARENHAS DE FARIA OLIVEIRA

Prof^ª. Dr^ª. HÉRIDA REGINA NUNES SALGADO

ARARAQUARA

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA - FCFAR

Estudo da ação do extrato bruto de *Morus nigra* L. (*Moreaceae*) e frações fenólicas sobre a atividade antimicrobiana e geração de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio: *in vitro* com ensaios “químicos”, enzimáticos, e celular.

RICARDO ALEXANDRE HAKIME SILVA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicado à Farmácia, Área de Análises Clínicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Biociências e Biotecnologia aplicado à Farmácia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. IGUATEMY LOURENÇO BRUNETTI

CO-ORIENTADORAS: Profa. Dra. OLGA MARIA MASCARENHAS DE FARIA OLIVEIRA

Profa. Dra. HÉRIDA REGINA NUNES SALGADO

ARARAQUARA

2012

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti
Orientador e Presidente da Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Adelaide Faljoni-Alario
Membro Titular

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Terezan
Membro Titular

Prof^a. Dr^a. Eliana Varanda
Membro Titular

Prof^a. Dr^a. Mariza Pires de Melo
Membro Titular

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

À Deus, por proporcionar tudo em minha vida.

À minha Esposa, Sara, pelo carinho, apoio e compreensão nos momentos de dificuldades.

Aos meus Pais, Gervásio e Célia, pelo apoio dedicado à família e aos nossos estudos.

À minha Sogra Lourdes, pelo acolhimento e carinho.

Aos meus irmãos, Sérgio e Luis Henrique, por todos os momentos de convivência e palavras de apoio e incentivo.

Ao meu cunhado Marcelo, minhas cunhadas Evelin e Karina, pelo carinho e alegrias que compartilham conosco.

Aos meus sobrinhos, Júnior, Daniella, Leonardo e Mateus, pela alegria que sempre trazem para nós.

Aos Professores,

Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti,

Dr^a. Olga Maria Mascarenhas de Faria Oliveira,

Dr^a. Hérica Regina Salgado Nunes,

... pela dedicação ao ensino, à pesquisa e orientação segura e paciente que possibilitou a realização deste trabalho

... pelos momentos de compreensão em minhas dificuldades e obstáculos

... pela sincera confiança em mim depositada.

AGRADECIMENTO

Ao Professor Dr. João Batista Fernandes,
...pelo acolhimento em seu grupo de pesquisa e confiança.

Ao Professor Dr. Murilo Marinho de Castro Lima,
... pela valiosa ajuda nas elucidações das biomoléculas isoladas nesta tese,
bem como pela disponibilidade e amizade então demonstrada.

À Professora Dr^a. Ana Paula Terezan,
... pela orientação e permanente disponibilidade que me permitiram
encontrar informações e soluções que em muito contrubuíram para a execução
dessa tese.

Aos Técnicos Maria de Fátima Rodrigues e Marcos Dangona,
...pelo suporte técnico que muito contribuiu para a realização dessa tese.

Aos amigos Vânia, Clara, Renata, Ketylin,
...pelo apoio e amizade que me fortaleceram durante esse período.

Aos amigos do Laboratório de Produtos Naturais da UFSCar,
...pela convivência, troca de experiências e amizade.

EPÍGRAFE

“Sente Deus como único motivo de afeto do teu coração, como único pai, irmão, amigo, consolador, médico, solução, Esposo da tua alma.

Confia somente nele, como faz uma criança que se entrega completamente à mãe.

Tudo passa e o que permanece é apenas quanto amor de Deus recolhemos no nosso coração.”

Chiara Lubich

RESUMO

A espécie *Morus nigra* L. (Moraceae), amoreira negra, é originária do Sudoeste Asiático, sendo frequente nas regiões tropicais de todo o mundo. Do ponto de vista etnobotânico, a *M. nigra* possui popularidade por apresentar, não somente valores alimentares nutricionais, mas por conter vários compostos com ação terapêutica como adstringente, antiinflamatória, antioxidante e antitérmica, depurativa, analgésica, antisséptica, hipoglicemiante e usada no controle do climatério, não somente nos frutos, mas também em outras partes da planta como folhas e cascas da árvore. Os vegetais, presentes em grande quantidade na dieta humana, produzem um vasto número de substâncias naturais, chamados de metabólitos secundários como os compostos fenólicos, entre eles os flavonoides e polifenóis, que apresetam potencial antioxidante ou seja, são capazes de inibir ou atrasar os processos oxidativos, gerados por espécies oxidativas radiculares, ou não, retardando ou prevenindo a oxidação de lipídios ou outras biomoléculas, evitando assim o surgimento de patologias relacionadas ao estresse oxidativo. O objetivo do trabalho foi avaliar o potencial antioxidante, antimicrobiano e anti-hemolítico do extrato bruto etanólico, obtidos por maceração de folhas de *M. nigra* e suas frações, produtos da partição líquido-líquido com hexano, acetato de etila e *n*-butanol. Para a avaliação da atividade antioxidante, foram utilizadas técnicas de supressão de espécies radiculares como DPPH, ABTS, anion superóxido e óxido nítrico, além de espécies oxidante não radicalar, como o HOCL. Também foi observado o efeito oxidorreduutor das frações sobre a atividade catalítica da enzima *horseradish peroxidase* (HRP). A atividade anti-hemolítica foi avaliada por dosagem espectrofotométricos da hemoglobina liberada após a hemólise sem indução e com indutores HOCl e AAPH. Atividade antimicrobiana foi avaliada por técnica de microdiluições, frente aos microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* e *Candida krusei*. Para a purificação e

identificação dos metabólitos secundários de *M. nigra*, foi utilizado cromatografia em coluna de Sílica gel e Sephadex LH-20, além de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando coluna preparativa C18, além da cromatografia em camada delgada (CCD) para o monitoramento das frações isoladas. Na identificação estrutural dos compostos isolados foi utilizada a técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) uni e bidimensional. Os resultados evidenciaram que as frações acetato e *n*-butanólica apresentaram atividade antioxidante frente às espécies radicalares e não radicalares, além de inibir a atividade catalítica da HRP, apresentarem atividade anti-hemolítica, bem como uma atividade antifúngica moderada da fração acetato frente à cepa *C. albicans* e *C. krusei*; e uma fraca atividade da fração aquosa frente a *C. krusei*, com nenhuma atividade para os demais microorganismos testados. A partir da purificação das frações acetato, *n*-butanólica e aquosa, foram possíveis identificar por RMN a presença de flavonoides como o tilirosídeo, tetrametoxicatequina, galocatequinas, compostos fenólicos como a cumarina umbeliferona e o ácido clorogênico. Com exceção da cumarina, todos estes compostos fenólicos identificados em nossa pesquisa apresentam atividade anti radicalar, sendo prováveis agentes das supressões das espécies reativas estudada, incluindo a atividade anti-hemolítica e antifúngica.

ABSTRACT

The species *Morus nigra* L. (Moraceae), mulberry black, is indigenous to Southeast Asia and is common in tropical regions around the world. From the viewpoint ethnobotanical, *M. nigra* has popularity by presenting not only food nutritional values, but it contains several compounds with therapeutic action as an astringent, anti-inflammatory, antioxidant and antipyretic, depurative, analgesic, antiseptic, hypoglycemic and used to control the menopause, not only in the fruits, but also in other plant parts such as leaves and bark of the tree. The plant, present in large quantities in the human diet, produce a large number of natural substances, called secondary metabolites such as phenolic compounds, including flavonoids and polyphenols, which are potent antioxidant that is, are able to inhibit or delay the process oxidative, oxidative species generated by free radical or not, delaying or preventing the oxidation of lipids and other biomolecules, thus avoiding the emergence of diseases related to oxidative stress. The objective of this study was to evaluate the potential antioxidant, antimicrobial and anti-hemolytic crude ethanol extract obtained by maceration of leaves of *M. nigra* and its fractions, the product liquid-liquid partition hexane, ethyl acetate and *n*-butanol. To evaluate the antioxidant activity, we used techniques such as deletion of DPPH radical species, ABTS, superoxide anion and nitric oxide, and non-oxidizing free radical species, such as HOCl. We also observed the effect of fractions oxidoreductor on catalytic activity of the enzyme horseradish peroxidase (HRP). The anti-hemolytic activity was evaluated by spectrophotometric measurement of hemoglobin released upon hemolysis without induction and inducer AAPH and HOCl. Antimicrobial activity was evaluated by microdiluições technique, compared to the microorganisms *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* and *Candida krusei*. For purification and identification of secondary metabolites *M. nigra* was used column chromatography on silica gel and SEPHADEX LH-20, and high

performance liquid chromatography (HPLC) using preparative C18 column, beyond the thin-layer chromatography (TLC) for monitoring the isolated fractions. The identification of the structural isolated compounds was used the technique of Nuclear Magnetic Resonance (NMR) uni-and bidirectional. The results showed that the fractions acetate and *n*-butanol showed antioxidant activity in the face of radical species and not radical, in addition to inhibiting the catalytic activity of HRP, presenting anti-hemolytic activities as well as a moderate antifungal activity of the acetate fraction against clade *C. albicans* and *C. krusei*, and an aqueous fraction of weak activity against *C. krusei*, with no activity for the other microorganisms tested. From the purification of the fractions ethyl, *n*-butanol and water were made possible by NMR to identify the presence of flavonoids as tiliroside, tetrametoxicatequina, galocatequinas, phenolic compounds such as coumarin umbeliferona and chlorogenic acid. With the exception of coumarin, all these phenolic compounds identified in our research have anti free radical activity, with likely agents of deletions of reactive species studied, including the anti-hemolytic activity and antifungal.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ASPECTO DA <i>M. NIGRA</i> EM PERÍODO DE FRUTIFICAÇÃO.....	5
FIGURA 2 – ESTRUTURA DOS PRINCIPAIS ÁCIDOS FENÓLICOS PRESENTES EM VEGETAIS.....	8
FIGURA 3 - ESTRUTURA BÁSICA DOS FLAVONOIDES.....	10
FIGURA 4 – NÚCLEO FLAVÔNICOS: A); B) NÚCLEO BENZOPIRÍLICO..	11
FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA SIMPLIFICADA DA BIOSÍNTESE DE FLAVONOIDES	12
FIGURA 6 – BIOSÍNTESE DE FLAVONOIDES	13
FIGURA 7 – A) FLAVONA; B) FLAVANONA	14
FIGURA 8 – A) CHALCONAS; B) AURONAS; C) ISOFLAVONAS.	15
FIGURA 9 – PRINCIPAIS CLASSES DE FLAVONOIDES.....	16
FIGURA 10 – CAPTURA/SUPRESSÃO DE RADICAIS LIVRES PELOS FENÓIS E POLIFENÓIS	21
FIGURA 11 – RELAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE ACORDO COM O NÚMERO E POSIÇÃO DOS GRUPOS HIDROXILAS	22
FIGURA 12 – LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO NA ESPÉCIE NEUTRA DE SUBSTÂNCIAS CONTENDO OXIGÊNIO EM GRUPO SUBSTITUINTE	22
FIGURA 13 – RELAÇÃO ESTRUTURA ATIVIDADE DE FLAVONOL E FLAVONA	23
FIGURA 14 – ESQUEMA DE FISSÃO HOMOLÍTICA E FISSÃO HETEROLÍTICA.	25
FIGURA 15 – FORMAÇÃO DAS ERO.	26
FIGURA 16 – COMPLEXOS DA CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL E MECANISMO DE GERAÇÃO E DESINTOXICAÇÃO DE ERO, EM ESPECIAL O ÂNION RADICAL SUPERÓXIDO	33
FIGURA 17 – GERAÇÃO DE ERO NA MITOCÔNDRIA	34

FIGURA 18 – SÍNTESE INTRACELULAR DE ERO DERIVADAS DA AÇÃO CATALÍTICA DA XANTINA OXIDASE	35
FIGURA 19 – SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO VIA OXIDAÇÃO DA L-ARGININA, CATALISADA PELA NOS.	36
FIGURA 20 – CICLOS DE HALOGENAÇÃO E PEROXIDAÇÃO VIA MIELOPEROXIDASE.....	39
FIGURA 21– ESTRUTURA DO DPPH ANTES E APÓS REAÇÃO COM ANTIOXIDANTE.....	40
FIGURA 22 – OXIDAÇÃO DO ABTS PELO K₂S₂O₈	42
FIGURA 23 – TERMÓLISE DO 2,2'-AZOBIS(2-AMIDINOPROPANO), APPH, E GERAÇÃO DE RADICAIS PEROXILAS (AOOH) E LIPÍDICOS (L[•]).....	43
FIGURA 24 – INTERCONVERSÃO DA GLUTATIONA NAS SUAS FORMAS REDUZIDAS (GSH) E OXIDADA (GSSG) PELA AÇÃO DAS ENZIMAS GLUTATIONA PEROXIDASE (GSH-Px) E GLUTATIONA REDUTASE (GSH-Rd).	47
FIGURA 25 – MECANISMO DE CONVERSÃO DO ÁCIDO ASCÓRBICO EM ÁCIDO DEHIDROASCÓRBICO.	48
FIGURA 26 – OXIDAÇÃO DO ÁCIDO ASCÓRBICO À DEHIDROASCÓRBICO NA REDUÇÃO DE RADICAIS LIVRES	49
FIGURA 27 – RECICLAGEM DO RADICAL LIPÍDIO-PEROXILA PELO α-TOCOFEROL E DO α-TOCOFEROL PELO ÁCIDO ASCÓRBICO	50
FIGURA 28 – HIDRÓLISE DO CAROTENO EM RETINOL	51
FIGURA 29 – REGENERAÇÃO DO TOCOFEROL PELO UBIQUINOL.....	52
FIGURA 30 – MECANISMO ANTIOXIDANTE DOS URATOS	53
FIGURA 31 – AÇÃO QUELANTE DE METAIS PELOS URATOS	54
FIGURA 32 – MECANISMO CATALÍTICO DA <i>HORSERADISH PEROXIDASE</i>	57
FIGURA 33 – CICLOS CONHEIDOS PARA MPO.	58
FIGURA 34 - FLUXOGRAMA DA OBTENÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE FOLHAS DE <i>MORUS NIGRA</i> L. POR MACERAÇÃO.	65

FIGURA 35 – FLUXOGRAMA DA PARTIÇÃO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE FOLHAS DE <i>MORUS NIGRA</i> L.	66
FIGURA 36 – FLUXOGRAMA DA CROMATOGRAFIA EM COLUNA COM SÍLICA C18 PARA RETIRADA DA CLOROFILA DA FAcOEt.	68
FIGURA 37 – FLUXOGRAMA DAS CROMATOGRAFIAS REALIZADAS COM A FRAÇÃO FAcOEt.....	70
FIGURA 38 – FLUXOGRAMA DAS CROMATOGRAFIAS EM SEPHADEX LH-20 DA FRAÇÃO FBUOH.....	71
FIGURA 39 – FLUXOGRAMA DAS CROMATOGRAFIAS EM SÍLICA GEL FLECH E CLAE-PREPARATIVA DAS SUBFRAÇÃO FBUOH.....	72
FIGURA 40 – FLUXOGRAMA DA CROMATOGRAFIA EM SEPHADEX LH-20 COM A FRAÇÃO FAQ.....	73
FIGURA 41 – FLUXOGRAMA DA CROMATOGRAFIA EM CLAE-PREPARATIVA COM A FAQ.....	74
FIGURA 42 - REAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO COM MOLIBDÊNIO, COMPONENTE DO REAGENTE DE <i>FOLIN-CIOCAULTEAU</i>	76
FIGURA 43 - CURVA ANALÍTICA DE ÁCIDO GÁLICO PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS PELO MÉTODO DE <i>FOLIN-CIOCALTEAU</i>	77
FIGURA 44 – FORMAÇÃO DO CROMÓFORO FLAVONÓIDE-ALUMÍNIO.	78
FIGURA 45 - CURVA ANALÍTICA DE QUERCETINA PARA DETERMINAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS PÓR COMPLEXAÇÃO COM ALUNÍNIO.....	79
FIGURA 46 - OXIDAÇÃO DO TMB POR AGENTES OXIDANTES	82
FIGURA 47 – DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS DAS TÉCNICAS EXTRATIVAS PELO MÉTODO DE <i>FOLIN-CIOCALTEAU</i>	91
FIGURA 48 - RENDIMENTO DE FENÓIS TOTAIS ($\mu\text{g/mL}$ EQUIVALENTES EM ÁCIDO GÁLICO).....	93
FIGURA 49 - FLAVONOIDES TOTAIS ($\mu\text{g/mL}$ EQUIVALENTES EM QUERCETINA)	94

FIGURA 50 - FENÓIS TOTAIS (MÉTODO DE <i>FOLIN-CIocalteu</i>) EXPRESSO EM MILIGRAMAS EQUIVALENTES EM ÁCIDO GÁLICO POR GRAMA DAS FRAÇÕES DE <i>M. NIGRA</i> L.	96
FIGURA 51 - FLAVONOIDES TOTAIS (MÉTODO DE COMPLEXAÇÃO COM ALUNÍNIO) EXPRESSO EM MILIGRAMAS EQUIVALENTES EM QUERCETINA POR GRAMA DAS FRAÇÕES DE <i>M. NIGRA</i>	97
FIGURA 52 - IC ₅₀ PARA SUPRESSÃO DE RADICAL ABTS	100
FIGURA 53 - POTENCIAL DE SUPRESSÃO DO RADICAL DPPH PELO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES OBTIDOS DE <i>MORUS NIGRA</i>	101
FIGURA 54 - IC ₅₀ PARA SUPRESSÃO DO ÁCIDO HIPOCLOROSO (HOCl)	102
FIGURA 55 - IC ₅₀ PARA SUPRESSÃO DE ÂNION RADICAL SUPERÓXIDO (O ₂ ^{•-}).....	104
FIGURA 56 – IC ₅₀ PARA SUPRESSÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (ON).....	106
FIGURA 57 – PORCENTAGEM DE HEMÓLISE FRENTE AO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>M. NIGRA</i>	107
FIGURA 58 – IC ₅₀ PARA SUPRESSÃO DA HEMÓLISE INDUZIDA POR AAPH FRENTE AO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>M. NIGRA</i>	107
FIGURA 59 – IC ₅₀ PARA SUPRESSÃO DA HEMÓLISE INDUZIDA POR HOCl FRENTE AO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>M. NIGRA</i>	108
FIGURA 60 – GRÁFICO DA CINÉTICA DA OXIDAÇÃO DO OXIDAÇÃO DO GUAIACOL PELA HRP.....	111
FIGURA 61 – GRÁFICO DUPLO RECÍPROCO DA CINÉTICA DA OXIDAÇÃO DO GUAIACOL PELA HRP.....	112
FIGURA 62 – IC ₅₀ PARA A CINÉTICA DA OXIDAÇÃO DO GUAIACOL PELA HRP COM O EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>M. NIGRA</i>	113
FIGURA 63 – GRÁFICO DE MICHAELIS-MENTEN REPRESENTANDO A CINÉTICAS DA OXIDAÇÃO DO GUAIACOL PELA HRP, NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DA FACoEt	114

FIGURA 64 – GRÁFICO DUPLO-RECÍPROCO REPRESENTANDO A CINÉTICAS DA OXIDAÇÃO DO GUAIACOL PELA HRP, NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DA FACOEt	114
FIGURA 65 – GRÁFICO DE MICHAELIS-MENTEN REPRESENTANDO A CINÉTICAS DA OXIDAÇÃO DO GUAIACOL PELA HRP, NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DA FBUOH	116
FIGURA 66 – GRÁFICO DE DUPLO-RECÍPROCO REPRESENTANDO A CINÉTICAS DA OXIDAÇÃO DO GUAIACOL PELA HRP, NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DA FBUOH	116
FIGURA 67 – ESTRUTURA QUÍMICA DO FLAVONOIDE TILIROSÍDEO	119
FIGURA 68 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE FAC-1.1	121
FIGURA 69 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DE FAC-1.1	122
FIGURA 70 – ESPECTRO DE COSY DE FAC-1.1	123
FIGURA 71 – MAPA DE CONTORNO HSQC DE FAC-1.1	123
FIGURA 72 – MAPA DE CONTORNO HMBC DE FAC-1.1	124
FIGURA 73 – ÁCIDO CLOROGÊNICO 5- <i>O</i> -CAFEOLQUÍNICO	126
FIGURA 74 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA FAC-1.2	127
FIGURA 75 – MAPA DE CONTORNO HSQC DA FAC-1.2	128
FIGURA 76 – MAPA DE CONTORNO HMBC DA FAC-1.2	128
FIGURA 77 – 7-HIDROXICUMARINA (UMBELIFERONA).....	130
FIGURA 78 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE FBUOH-1	131
FIGURA 79 – 5,7,3',4'-TETRA-METOXI-CATEQUINA	133
FIGURA 80 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE FBUOH-6.2	134
FIGURA 81 – MAPA DE CONTORNO HSQC DE FBUOH-6.2	135
FIGURA 82 – MAPA DE CONTORNO HMBC DE FBUOH-6.2	135
FIGURA 83 – GALOCATEQUINA.....	137
FIGURA 84 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA FAQ-3	138
FIGURA 85 – MAPA DE CONTORNO HSQC DA FAQ-3	139
FIGURA 86 – MAPA DE CONTORNO HMBC DA FAQ-3	139

FIGURA 87 – ESPECTRO DE RMN ^1H DA SUBFRAÇÃO FAC-1.3	140
FIGURA 88 – ESPECTRO DE RMN ^1H DA SUBFRAÇÃO FAC-1.4	140
FIGURA 89 – ESPECTRO DE RMN ^1H DA SUBFRAÇÃO FAC-2.1	141
FIGURA 90 – ESPECTRO DE RMN ^1H DA SUBFRAÇÃO FAC-2.2	141
FIGURA 91 – ESPECTRO DE RMN ^1H DA SUBFRAÇÃO FBUOH-6.3	141
FIGURA 92 – ESPECTRO DE RMN ^1H DA SUBFRAÇÃO FAQ-1	142
FIGURA 93 – ESPECTRO DE RMN ^1H DA SUBFRAÇÃO FAQ-2	142
FIGURA 94 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO PRECIP-FAC-1	143
FIGURA 95 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO PRECIP-FAC-2	143
FIGURA 96 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO PRECIP-FAQ	143

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – CLASSE DE FLAVONOIDES E ALGUMAS CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS E FARMACOLÓGICAS CONHECIDAS	20
TABELA 2 – CLASSIFICAÇÃO E NOMENCLATURA DAS ESPÉCIES REATIVAS DERIVADAS DO OXIGÊNIO	26
TABELA 3 – OCUPAÇÃO DOS ORBITAIS MOLECULARES ANTILIGANTES PARA OS ESTADOS ELETRÔNICOS DO O ₂	30
TABELA 4 – CLASSIFICAÇÃO E NOMENCLATURA DAS ESPÉCIES REATIVAS DERIVADAS DO NITROGÊNIO	36
TABELA 5 - MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DO RENDIMENTO EM FENÓIS TOTAIS OBTIDOS PELAS DIVERSAS TÉCNICAS EXTRATIVAS.....	92
TABELA 6 - MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DAS DETERMINAÇÕES DE FENÓIS TOTAIS OBTIDOS DURANTE AS ETAPAS DE MACERAÇÃO.....	93
TABELA 7 – MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DAS DETERMINAÇÕES DE FLAVONOIDES TOTAIS OBTIDOS DURANTE AS ETAPAS DE MACERAÇÃO.....	94
TABELA 8 - MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DAS DETERMINAÇÕES DE FENÓIS TOTAIS DOS EXTRATOS PÓS-PARTIÇÃO.....	96
TABELA 9 - MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DAS DETERMINAÇÕES DE FLAVONOIDES TOTAIS DOS EXTRATOS PÓS-PARTIÇÃO.....	97
TABELA 10 - MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DAS DETERMINAÇÕES DO IC ₅₀ PARA O ABTS ^{•+} COM EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>M. NIGRA</i>	100
TABELA 11 - MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DAS DETERMINAÇÕES DO IC ₅₀ PARA O DPPH COM EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>M. NIGRA</i>	101
TABELA 12 - MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DAS DETERMINAÇÕES DA CAPACIDADE DE SUPRESSÃO DE HOCL PELOS EXTRATOS BRUTO E PÓS-PARTIÇÃO	103

TABELA 13- MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DAS DETERMINAÇÕES DA CAPACIDADE DE SUPRESSÃO DE $O_2^{\bullet-}$ PELOS EXTRATOS BRUTO E PÓS-PARTIÇÃO.....	104
TABELA 14 - MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DAS DETERMINAÇÕES DA CAPACIDADE DE SUPRESSÃO DO ÓXIDO NÍTRICO PELOS EXTRATOS BRUTO E PÓS-PARTIÇÃO	105
TABELA 15 - MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DAS DETERMINAÇÕES DE IC_{50} PARA SUPRESSÃO DA HEMÓLISE PROMOVIDA POR AAPH.	108
TABELA 16 - MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DAS DETERMINAÇÕES DE IC_{50} PARA SUPRESSÃO DA HEMÓLISE PROMOVIDA POR HOCL.	109
TABELA 17 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) PARA O CONTROLES (CIPROFLOXACINO E FLUCONAZOL) E PARA O EXTRATO BRUTO E SUAS FRAÇÕES DOS FRUTOS DE <i>M. NIGRA</i> FRENTE AOS MICRO-ORGANISMOS	110
TABELA 18 – MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS VALORES DE IC_{50} OBTIDOS PELA INIBIÇÃO DA CINÉTICA DE HRP FRENTE AO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>M. NIGRA</i>	113
TABELA 19 – DESLOCAMENTOS EM PPM DO ESPECTRO DE RMN ^{13}C E 1H PARA SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DA SUBFRAÇÃO FAC-1.1 DE <i>M. NIGRA</i>	120
TABELA 20 - DADOS DE RMN DE 1H E ^{13}C DE FAC-1.2.....	126
TABELA 21 – DADOS DE RMN DE 1H DA FBUOH-1	130
TABELA 22 – DADOS DE RMN DE 1H E ^{13}C DE FBUOH-6.2	133
TABELA 23 – DADOS DE RMN DE 1H E ^{13}C DA FAQ-3.....	137

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

δ : deslocamento químico (ppm)

J: constante de acoplamento (Hz)

μ g: micrograma

μ L: microlitro

$^1\text{O}_2$: oxigênio singlete

AAPH: 2,2'-azobis(2-metilpropionamidina) diidrocloreto

ABTS: ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolínico-6-sulfônico)

ATCC: *American Type Culture Collection*

CBM: concentração bacteriana mínima

CFM: concentração fúngica mínima

CIM: concentração inibitória mínima

COSY: *correlated spectroscopy* (^1H - ^1H)

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

d: duplete

dd: duplo duplete

ddd: duplo duplo duplete

DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

DTNB: ácido 5,5'-ditio-2-nitrobenzóico

EBEtOH: fração extrato bruto etanólico

ERO: espécies reativas de oxigênio

FAc: subfração acetato

FAcOEt: fração acetato de etila

FAq: fração aquosa final

FBuOH: fração *n*-butanólica

FHex: fração hexânica

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

Hz: hertz

HO•: radical hidroxil

HOCl (HClO): ácido hipocloroso

HMQC: *heteronuclear multiple quantum coherence* (¹H-¹³C)

HMBC: *heteronuclear multiple bond coherence* (¹H-¹³C)

HRP: *Horseradish* peroxidase

K_M: constante de Michaelis-Menten

LDL: lipoproteína de baixa densidade

LPMN: leucócitos polimorfonucleares

mL: mililitro

MOPS: ácido 3-(*N*-morfolino)propanosulfônico

MPO: mieloperoxidase

MSF: metassulfato de fenazina

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

NBT: nitroblue tetrazolium

NCCLS: *National Committee for Clinical Laboratory Standards*

O₂-•: ânion superóxido

OCI⁻ (CIO⁻): ânion hipoclorito

PMA: éster de forbol miristato

PMA: acetato de forbol miristato

ppm: parte por milhão

R_f: fator de retenção

RL: radical livre

RMN de ¹H: ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN de ¹³C: ressonância magnética nuclear de carbono treze

s: singleto

SOD: superóxido dismutase

Tau: taurina

TauCl: taurinacloramina

TMB: 3,5,3',5'-tetrametilbenzidina

TNB: ácido 5-tio-2-nitrobenzóico

TPO: peroxidase da tireóide

V₀: velocidade inicial

V_{máx}: velocidade máxima

SUMÁRIO

Capítulo 1 – TESE

Resumo	vii
Abstract	ix
Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xvii
Lista de Abreviatura	xix
1 Introdução.....	1
1.1 Considerações gerais sobre o uso de plantas medicinais	1
1.2 <i>Morus</i> sp.	3
1.2.1 Classificação Botânica	3
1.2.2 <i>Morus nigra</i> L.: Descrição Morfológica.....	4
1.2.3 Informações sobre a fitoquímica de <i>M. nigra</i> L.	5
2 Compostos Fenólicos e Flavonoides	7
2.1 Compostos Fenólicos	7
2.2 Flavonoides	9
2.2.1 Os constituintes flavônicos: Composição Química	14
2.2.2 Propriedades Físico-Químicas dos Flavonoides	19
2.2.3 Propriedades biológicas mais relevantes.....	19
2.2.4 Relação Estrutura atividade e propriedade antioxidante dos flavonoides.....	21
3 Espécies Reativas e Radicais Livres.....	24

3.1	Espécies Reativas do Oxigênio (ERO).....	25
3.1.1	Ânion-radical Superóxido ($O_2^{\bullet-}$)	27
3.1.2	Radical Hidroxila ($HO^{\bullet}$)	28
3.1.3	Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)	29
3.1.4	Oxigênio singlete (1O_2)	30
3.1.5	Produção ERO pela mitocôndria	32
3.2	Espécies Reativas do Nitrogênio (ERN)	35
3.2.1	Óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) e derivados	37
3.2.2	Ácido hipocloroso ($HOCl$).....	38
3.2.3	Cloraminas	39
3.3	Radicais livres sintéticos utilizados nos ensaios de atividade antioxidante	40
3.3.1	Radical DPPH $^{\bullet}$	40
3.3.2	Cátion radical ABTS $^{+\bullet}$	41
3.3.3	Radical AAPH	42
3.4	Antioxidantes.....	43
3.4.1	Antioxidantes presentes no organismo	44
3.5	Estresse Oxidativo.....	54
3.6	Enzimas como ferramentas para o estudo antioxidante	56
3.6.1	Peroxidases	56
4	Objetivos.....	61
5	Materiais e Métodos	63
5.1	Material vegetal	63
5.2	Reagentes e Solventes	63
5.3	Preparo do extrato hidroalcoólico de <i>Morus nigra</i> L.	64

5.4	Obtenção do extrato bruto etanólico seco	65
5.5	Fracionamento do extrato bruto etanólico (EBEtOH).....	66
5.6	Separação cromatográfica e purificação dos compostos fenólicos	67
5.6.1	Cromatografia em Camada Delgada – CCD.....	67
5.7	Cromatografia, purificação e identificação das subfrações isoladas de <i>M. nigra</i>	67
5.7.1	Cromatografia em coluna da FAcOET	68
5.7.2	Cromatografia em coluna da FbuOH	70
5.7.3	Cromatografia em coluna da FAq.....	72
5.7.4	Separação por CLAE da FAcOEt e FAq	74
5.8	Identificação de metabólitos secundários das folhas de <i>M. nigra</i> por RMN.	75
5.9	Análise Fitoquímica	75
5.9.1	Preparo das soluções padrão de fenóis e flavonoides	75
5.9.2	Preparo das soluções teste do extrato e frações	75
5.9.3	Análise quantitativa de fenóis totais	76
5.9.4	Análise quantitativa de flavonoides totais	78
5.10	Atividade antioxidante do extrato bruto e frações de <i>M. nigra</i>	79
5.10.1	Atividade antioxidante total sobre radical ABTS ^{•+}	80
5.10.2	Atividade supressora sobre o radical DPPH [•]	80
5.10.3	Atividade supressora do ácido hipocloroso (HOCl)	81
5.10.4	Atividade supressora do ânion radical superóxido (O ₂ ^{•-}).....	83
5.10.5	Atividade supressora de óxido nítrico.....	84
5.11	Estudo do potencial anti-hemolítico do extrato e frções de <i>M. nigra</i> sobre eritrócitos humanos	84

5.11.1	Obtenção de eritrócitos e determinação da hemólise.....	84
5.11.2	Proteção sobre dano provocado pelo radical AAPH em eritrócitos.....	85
5.11.3	Proteção sobre dano provocado pelo ânion hipoclorito (OCl ⁻) em eritrócitos.....	85
5.12	Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica do extrato bruto etanólico das folhas de <i>M. nigra</i> e suas frações.....	86
5.12.1	Preparo do inóculo	86
5.12.2	Agente antibacteriano e antifúngico	86
5.12.3	Verificação da Atividade Antibacteriana e Antifúngica do extrato bruto etanólico e frações de folhas de <i>M. nigra</i> pelo método da microdiluição.....	87
5.12.4	Determinação da Concentração Bactericida e Fungicida Mínima (CBM/CFM) do extrato e frações de <i>M. nigra</i>	88
5.13	Cinética de oxidação do guaiacol pela HRP	88
5.14	Análise Estatística	89
5.15	Descarte de resíduos	89
6	Resultados e Discussão.....	91
6.1	Determinação do solvente extrator e da melhor técnica extrativa.....	91
6.2	Rendimento da extração pela técnica de maceração	92
6.3	Rendimento dos extratos após a partição	94
6.4	Determinação de fenóis e flavonoides totais nas frações fenólicas.....	95
6.5	Atividade antioxidante do extrato e frações de <i>M. nigra</i>	98
6.5.1	Determinação do potencial supressor do radical ABTS ^{•+}	99
6.5.2	Determinação do potencial supressor do radical DPPH	101
6.5.3	Atividade supressora do ácido hipocloroso (HOCl)	102
6.5.4	Atividade supressora do ânion radical superóxido (O ₂ ^{•-})	103

6.5.5	Atividade supressora de Óxido Nítrico (NO [•])	105
6.6	Atividade Anti-hemolítica de Eritrócitos	106
6.7	Atividade antimicrobiana	109
6.8	Avaliação do extrato bruto e frações de <i>M. nigra</i> sobre a cinética enzimática da HRP.	111
6.9	Identificação por RMN das subfrações isoladas da FAcOEt.	117
6.9.1	Identificação do flavonóide FAc-1.1	117
6.9.2	Identificação do derivado de ácido quínico da FAc-1.2	124
6.10	Identificação por RMN das subfrações isoladas da FBuOH.	129
6.10.1	Identificação da cumarina presente na FBuOH-1	129
6.10.2	Identificação da subfração FBuOH-2 e FbuOH-6.1	131
6.10.3	Identificação do Flavan-3-ol FBuOH-6.2	131
6.11	Identificação por RMN das subfrações isoladas da FAq.	136
6.11.1	Identificação do Flavan-3-ol da FAq-3	136
6.13	Resumo dos resultados	144
7	Conclusão	146
8	Referências	148
	Anexos	176



1 Introdução

1 Introdução

1.1 Considerações gerais sobre o uso de plantas medicinais

A utilização de plantas medicinais para tratamento, cura e prevenção de doenças é conhecida desde a antiguidade, sendo as obras mais antigas sobre medicina e plantas medicinais originárias da China e Egito. Diversas culturas se utilizam das plantas medicinais como principal, ou mesmo a única matéria prima para elaboração de medicamentos (ALZUGARAY; ALZUGARAY, 1983; YAMADA, 1998).

Estima-se a existência de 250.000 a 500.000 espécies de plantas no mundo segundo Hamburger e Hostettmann (1991). No início do século XX, a descoberta e o desenvolvimento de processos de síntese de compostos orgânicos, culminaram no desenvolvimento de diversos medicamentos. Entretanto seus efeitos colaterais somados aos altos valores dos medicamentos sintéticos e o interesse por compostos fitoterápicos promoveram a busca por novas drogas como alternativa de tratamento (VOLAK; STODOLA, 1990).

O Brasil é um dos países com elevada biodiversidade, Barata e Queiroz (1995) relatam que nosso país possui cerca de 50 mil espécies de plantas superiores, distribuídas em grandes biomas: a Amazônia com 25-30 mil espécies, a mata Atlântica com 16 mil, o Cerrado com 7 mil e as demais espécies distribuídas entre a Caatinga e a Floresta Subtropical. Entretanto, apenas uma pequena parcela da flora brasileira e mundial tem sido explorada cientificamente quanto ao seu potencial para produção de fármacos.

Segundo a Organização Mundial da Saúde – OMS, 85% da população mundial utiliza plantas medicinais para o tratamento de doenças; estima-se que 82 % da população brasileira utilizam produtos a base de ervas (ABIFISA, 2009) e em torno de 25% dos medicamentos prescritos mundialmente são de origem vegetal (AKERELE, 1993; HAMBURGER; HOSTETTMAN, 1991).

Segundo a OMS, medicamentos fitoterápicos são princípios ativos presentes na planta como um todo, ou em parte dela, na forma de extrato total ou processado. O crescente

interesse nos fitoterápicos se eflete a utilização destas biomoléculas protótipos, possibilitando o delineamento e o planejamento racional de novos fármacos. Quando se procura obter princípios ativos de plantas, um dos principais aspectos a ser observado consiste nas informações da etnomedicina, ou seja, da medicina popular (YUNES et al., 2001).

As plantas medicinais podem ser utilizadas como misturas complexas, contendo todos os constituintes presentes no vegetal, extratos sob a forma de infusão, óleos essenciais e tinturas, ou podem ainda ser utilizadas também para fornecer os princípios ativos “quimicamente” puros. A atividade farmacológica apresentada por uma planta é, portanto, resultado da ação de um ou mais princípios ativos presente(s) no fitoterápico (YUNES et al., 2001).

Embora cerca de 100 mil compostos oriundos de plantas e, aproximadamente 20 mil compostos obtidos de microorganismos tenham sido descritos, a fonte de metabólitos secundários como a possibilidade de novas e diferentes estruturas se torna de extrema importância à química medicinal e agricultura. Ainda que uma planta possa conter centenas de metabólitos secundários, apenas os compostos presentes em maior concentração são geralmente isolados e estudados pela fitoquímica clássica. A análise de compostos e de suas atividades biológicas é muito complexa e longa. Geralmente compostos presentes em menor proporção na planta tem sido os que apresentaram melhores efeitos biológicos, assim, torna-se necessário explorar frações e compostos puros das plantas. (YUNES; PEDROSA; CEVHINEL, 2001).

1.2 *Morus* sp.

O gênero *Morus* é constituído de aproximadamente 24 espécies, uma subespécie com descrição de pelo menos 100 variedades (PADILHA et al., 2010; MACHII et al., 2000).

1.2.1 Classificação Botânica

A amoreira, nome popular, está classificada no (LORENZI et al., 2003):

Reino *Plantae*;

Divisão *Magnoliophyta*;

Classe *Magnoliopsida*;

Ordem: *Urticales*;

Família: *Moraceae*;

Gênero: *Morus*.

Morus sp. encontra-se bem representada no Brasil tanto por espécies silvestres como cultivadas. De um modo geral é frequente nas regiões tropicais de todo o mundo (LORENZI et al., 2003; ERCISLI; ORHAN, 2007). Segundo Zhao e colaboradores (2005), as espécies mais populares compreendem: *Morus alba* (Amoreira branca; Extremo Oriente), *Morus australis* (amoreira chinesa; Sudeste Asiático), *Morus insignis* (amoreira americana; América central e América do Sul), *Morus mesozygia* (amoreira africana, África central e do sul), *Morus microphylla* (amoreira do Texas; do Sul e do centro da América do Norte), *Morus nigra* (amoreira negra; Sudoeste Asiático), *Morus rubra* (amoreira vermelha; Leste da América do Norte).

É uma planta de fácil adaptação, cosmopolita, predominando nas regiões tropicais, sendo natural do oeste da Ásia (HOLMES, 1996). Na Turquia, é conhecida e utilizada a mais de 400

anos, em licores, doces e sucos. Na Índia e China, as folhas de *Morus alba* são utilizadas na alimentação do bicho da seda (*Bombyx mori* L.) (ERCISLI; ORHAN, 2007).

Do ponto de vista etnobotânico, a *Morus sp.* é utilizada em todo o mundo como adstringente, antiinflamatório, anti-térmica, cicatrizante, depurativa e diurética, odontalgia (analgésico), anti-séptica e vermífuga, hipoglicemiante, tratamento do climatério e emético (PADILHA et al., 2010; QUER, 2007; NADERI; ASGAY, 2004).

1.2.2 *Morus nigra* L.: Descrição Morfológica

M. nigra (Figura 01), é uma árvore caducifólia¹, de 7-12 m de altura, com tronco revestido por casca fina, quase lisa, de cor acinzentada. Ramos mais ou menos horizontais com as extremidades algo pendentes, formando uma copa achatada em forma de guarda-chuva. Folhas simples, cartáceas² e serrilhadas, com inervação penínérvea³ e saliente, superfície superior brilhante, de 6-12 cm de comprimento, com pecíolo de 1-2 cm. Planta dióica⁴, raramente monóica⁵, com inflorescências formadas entre julho e agosto, tanto as masculinas quanto as femininas, em amentilhos⁶ pendentes e alongados (3-6 cm de comprimento), as masculinas mais finas. Os frutos são drupas compostas, cilíndricos, de superfície tuberculada, inicialmente vermelhos e pretos quando maduros, de 1-2 cm de comprimento, de polpa carnosa, muito sumosas, refrescantes e de sabor agri-doce, constituída na reunião de diversas bagas, cada uma originada de uma flor. A parte suculenta é constituída

1- Caducifólia: nome dado às plantas que, numa certa estação do ano, perdem suas folhas, geralmente nos meses mais frios e com chuva (outono e inverno); **2- Cartácea:** quando as folhas são finas e rígidas e se forem quebradiças; **3- Penínérvea:** nervura principal, que se distingue das demais, se originam as secundárias e destas as terciárias, lembrando a disposição das barbas de uma pena de ave; **4- Dióica:** onde os sexos se encontram separados em indivíduos diferentes; **5- Monóica:** inflorescência que apresentam o dois tipos sexuais; **6- Amentilhos:** tipo de inflorescência em que os pedicelos das flores se inserem em diversos níveis no eixo comum, a ráquis, atingindo diferentes alturas, e cujas flores se abrem sucessivamente na extremidade do ramo (FERREIRA, 1986).

pelo cálice e eixo de inflorescência, denominado sorose (PADILHA et al., 2010; QUER, 2007; OJASTI et al., 2001; OLIVEIRA et al., 1998; GEMTCCHÚJNICOV, 1976).



Figura 1 – Aspecto da *M. nigra* em período de frutificação; Folhas (www.institutohorus.org.br).

A *M. nigra* L. não apresenta somente valores alimentares nutricionais, mas contém vários compostos com ação terapêutica, não somente nos frutos, mas também em outras partes da planta. As cascas das árvores, os frutos e as folhas de *M. nigra* são largamente utilizados na medicina popular (QUER, 2007; NADERI; ASGAY, 2004).

1.2.3 Informações sobre a fitoquímica de *M. nigra* L.

Há um grande interesse no estudo estrutural e farmacológico dos compostos fenólicos isoprenóides substituídos (entre eles os flavonoides), os quais são encontrados em várias espécies da família *Moraceae* (NOMURA E HANO, 1994).

Sývacý e SÖkmen (2004), na Turquia, realizaram estudos fitoquímicos sobre os efeitos sazonais nos teores de fenóis totais e atividade antioxidante em galhos de *M. nigra* L. e *M. alba* L. observaram maior produção de fenóis totais, antocianinas e consequentemente, maior atividade antioxidante (avaliada com DPPH) era no período de outubro, onde observa-se uma temperatura média de 16.3° C, 38.8% de umidade e 11.2 mm de chuva.

A maioria dos estudos fitoquímicos realizados com *M. nigra* estão voltados aos frutos. Ercisli e Orhan (2007) observaram que frutos de *M. nigra* apresentam teores de flavonoides e fenóis totais maiores do que as espécies *M. alba* e *M. rubra*.

Os frutos de *M. nigra* e *M. alba* foram estudados por Pawlowska e colaboradores (2008), isolaram e identificaram cinco compostos do extrato metanólico, entre os quais, os compostos (quercetina-3-*O*-glucoside, quercetina-3-*O*-rutinosídeo, canferol-3-*O*-rutinoside e 5-*O*-ácido cafeoilquínico); a análise dos pigmentos de *M. rubra* e *M. nigra* revelaram a presença de quatro antocianinas reconhecidas como cianidina 3-*O*-glicosídeo, cianidina-3-*O*-rutinosídeo, pelargonidina-3-*O*-glicosídeo e pelargonidina 3-*O*-rutinosídeo. Naderi e Asgay (2004) sugerem que os frutos apresentam efeito protetor sobre peroxidação lipídica em eritrócitos humanos, sobre os hepatócitos de ratos e sobre lipoproteínas humanas de baixa densidade (LDL).

Foram investigados a atividades anticândida *in vitro* dos extratos aquoso e metanólico dos frutos de *M. nigra*, coletados na região de Erzincan (Turquia), os resultados mostraram atividade antifúngica para *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *Geotricum candidum* (YIGIT et al., 2007).

Estudos evidenciam que nas folhas de *M. Alba* apresentam o flavonoides e flavoglicosídeos, como quercetina, isoquercitrina, canferol-3-*O*-beta-D-glicopiranosideo (astragalina), canferol-3-*O*-(6"-*O*-acetil)-beta-D-glicopiranoside, quercetina-3-*O*-(6"-*O*-acetil)-beta-D-glicopiranosideo, quercetina-3-*O*-beta-D-glicopiranosideo, canferol-3-*O*-alpha-L-Ramnopiranosil-(1→6)-beta-D-glicopiranosideo, quercetina-3-*O*-alpha-L-Ramnopiranosil-(1→6)-beta-D-glicopiranosideo (rutina), quercetina-3-*O*-beta-D-glucopiranosil-(1→6)-beta-D-glicopiranosideo e quercetina-3,7-di-*O*-beta-D-glucopyranoside (DOI et al., 2001; KIM et al., 1999). Ensaio com folhas de *M. alba* demonstraram efeitos promissores na glicemia sanguínea (efeito anti-hiperglicêmico), no dano oxidativo, e na glicação da hemoglobina de

ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (NAOWABOOT et al., 2009; ZANG et al., 2009; CHEN et al., 1995), e efeito protetor sobre a oxidação da LDL colesterol e desenvolvimento de placas ateroscleróticas (DOI et al., 2001).

2 Compostos Fenólicos e Flavonoides

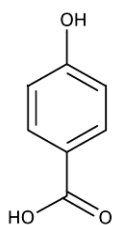
2.1 Compostos Fenólicos

As plantas produzem um vasto número de substâncias naturais, chamados de metabólitos secundários com potenciais antioxidantes, antimicrobianos e imunomoduladores na tentativa de se adaptarem às agressões do meio ambiente. Encontrados naturalmente em frutas e hortaliças, esses metabólitos apresentam efeitos benéficos sobre a saúde humana. Entre essas substâncias estão os compostos fenólicos e entre eles os flavonoides e polifenóis, encontrados em plantas e presentes em grande quantidade na dieta humana (SIMÕES et al., 2007).

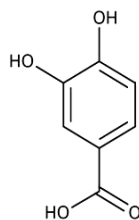
Os compostos fenólicos incluem desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização (SIMÕES et al., 2007; BRAVO, 1998). Estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (CROFT, 1998). Alguns compostos fenólicos apresentam sob a forma de polímeros, por exemplo, os taninos e as ligninas (SIMÕES et al., 2007; SOARES, 2002).

Os ácidos fenólicos consistem em dois grupos, derivados do ácido hidroxibenzóico e derivados do ácido hidroxicinâmico (Figura 2). Os ácidos hidroxibenzóicos incluem os ácidos gálico, *p*-hidroxibenzóico, protocatéquico, vanílico e sirínico, que têm estrutura comum, C6–C1 (BALASUNDRAM et al., 2006); enquanto os ácidos hidroxicinâmicos, são compostos aromáticos com três carbonos que formam uma cadeia lateral (C6–C3), como os ácidos caféico, ferúlico, *p*-cumárico e sinapínico, sendo os mais comuns (BRAVO, 1998).

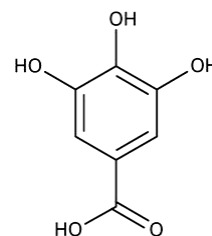
Ácidos derivados do hidroxibenzóico:



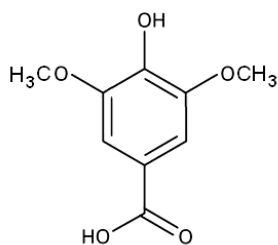
Ácido *p*-hidroxibenzóico



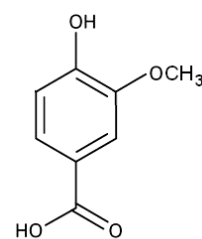
Ácido protocatéquico



Ácido Gálico

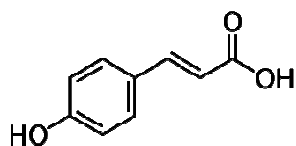


Ácido Siríngico

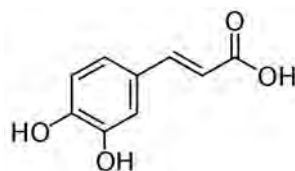


Ácido Vanílico

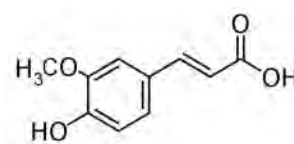
Ácidos derivados do hidroxicinâmico:



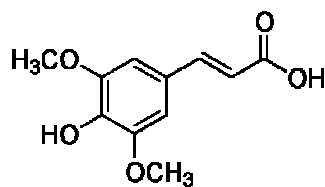
Ácido *p*-cumárico



Ácido Caféico



Ácido ferúlico



Ácido sinapínico
(Ác. sinápico)

Figura 2 – Estrutura dos principais ácidos fenólicos presentes em vegetais (BRAVO, 1998).

Os compostos fenólicos podem interagir com os radicais livres sendo consumidos durante a reação (ANGELO; JORGE, 2007). Por exemplo, ácidos sinápico, ferúlico e *p*-cumárico são antioxidantes mais ativos do que os derivados do ácido benzóico, tais como ácido protocatéquico, sirínico e vanílico (BALASUNDRAM et al., 2006). Isso se deve à dupla ligação presente na molécula dos derivados do ácido cinânico, que participa da estabilidade do radical por ressonância de deslocamento do elétron desemparelhado, enquanto que os derivados do ácido benzóico não apresentam essa característica (WANASUNDARA et al., 1994). Esses compostos fenólicos podem inibir os processos da oxidação em certos sistemas, mas isso não significa que eles possam proteger as células e os tecidos de todos os tipos de danos oxidativos, já que podem apresentar atividade pró-oxidante em determinadas condições (DECKER, 1997).

Vegetais ricos em compostos fenólicos por serem tradicionalmente consumidos como alimentos, são considerados seguros, tanto pelos consumidores como pela indústria de alimentos. Constatação que, no entanto não garante a sua inocuidade, requerendo, portanto estudos toxicológicos sobre estes compostos fitoquímicos (MELO; GUERRA, 2002). Muitos destes compostos são encontrados nos frutos de *M. nigra*, destacando os ácidos gálico, hidroxicaféico, *m-e-p*-cumárico e o 3,4-dimetoxicinâmico (SELLAPPAN et al., 2002; ZADERNOWSKI et al., 2005).

2.2 Flavonoides

Os flavonoides formam um grupo extenso de compostos, pelo número dos seus constituintes naturais e distribuição ampla no reino vegetal. Os flavonoides estão presentes em folhas, flores, frutos e ocasionalmente em outras regiões da planta, desde as raízes às sementes (ZHANG et al., 2008; GATTUSO et al., 2007). Eles são responsáveis pela cor, adstringência e amargura, por exemplo, em vinho (WANG; HUANG, 2004). Compreende, fundamentalmente, os derivados flavônicos (do Latim *flavus*, amarelo), antocianicos (do

Grego, *anthos*, flor e *Kyanus*, azul), as catequinas ou catecóis e outros constituintes com eles relacionados (COSTA, 2002).

Flavonoides apresentam quinze carbonos em seu esqueleto básico, sendo compostos fenólicos do tipo C6-C3-C6, formados por dois anéis aromáticos, sistema benzopirânico (cromona), a partir do qual é iniciada a numeração das estruturas conforme nomenclatura oficial IUPAC, (1971), e por um núcleo fundamental benzopirano ou cromano ao qual se encontra ligado um anel aromático, isto é, do 2-fenil-benzopirano (Figura 3).

Na nomenclatura usual (MARKHAM, 1982) os anéis são designados como A, B e C e os átomos de carbono individuais são referidos por um sistema que utiliza números arábicos para os anéis A e C e números marcados com (') para o anel B. Os grupos substituintes recebem um número de acordo com a posição em que se encontram, e a subclasse do flavonoide é especificado no final.

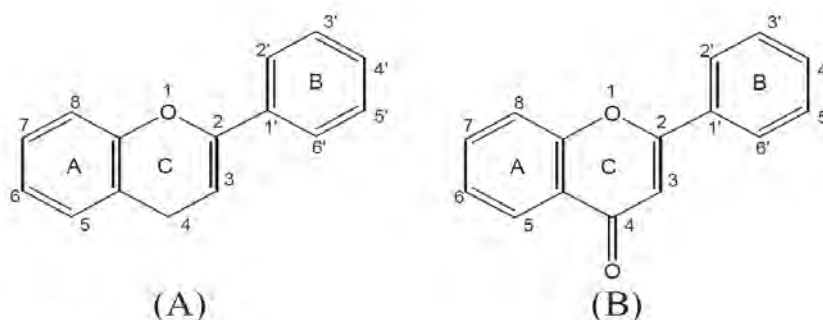


Figura 3 - (A) Estrutura básica dos flavonoides e (B) Estrutura básica dos flavonoides com grupos carbonila no C-4 (HUBER e RODRIGUES-AMAYA, 2008).

Os flavonoides concentram-se predominantemente nas partes aéreas das plantas, ocorrendo em menor proporção nas raízes e rizomas (DEWICK, 2001). Apresentam ligações conjugadas, que garante intensa absorção de luz UV (espectro com absorção máxima na luz UV a 254 e 350nm), ou mesmo na luz visível (HARBORNE, 1984). Distinguem-se os pigmentos amarelos ou flavônicos pelo grupo fundamental da α,β -benzeno- γ -pirona (figura 4, A) e os pigmentos azuis e vermelhos pelo núcleo benzopirílico ou flavílio (figura 4, B) de estrutura básica

(COSTA, 2002). Estes núcleos frequentemente encontram-se oxigenados e a maioria está conjugada com açúcares, sendo chamados de heterosídeos. Já na forma livre, são denominados agliconas (SIMÕES et al., 2007).

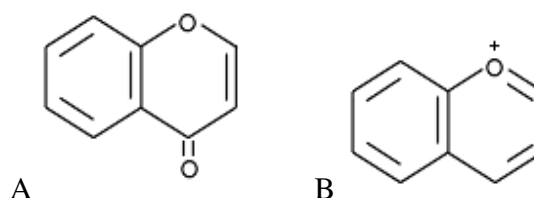


Figura 4 – Núcleo flavônicos: A) Estrutura do α,β -benzeno- γ -pirona; B) núcleo benzopirílico. . (COSTA, 2002).

Os flavonoides têm origem biossintética mista, ou seja, parte do seu esqueleto deriva do caminho do acetato e a outra parte deriva do caminho chiquimato, mais precisamente do ácido *p*-cumárico (DEWICK, 2001). Uma representação esquemática da biossíntese de flavonoides, retirada de Simões e colaboradores (2007) está apresentada na Figura 5.

Na biossíntese dos flavonoides, a primeira substância formada é uma chalcona, que está em equilíbrio enzimático com sua flavanona correspondente. O par chalcona/flavanona é precursor das subclasses dos flavonoides. Diretamente dele, derivam as flavonas, os isoflavonoides e os dihidroflavonoides. Estes últimos são intermediários da síntese de catequinas, antocianidinas e flavonóis. As auronas derivam diretamente das chalconas (HAHLBROCK, 1981). Os últimos passos na biossíntese dos flavonoides estão associados aos processos de *O*-e-*C*-glicosilações, acilação dos açúcares e alquilações (SALEH, 1979).

Estudos têm demonstrado a influência de alguns fatores ambientais na regulação gênica de flavonoides (FUGLEVAND et al., 1996).

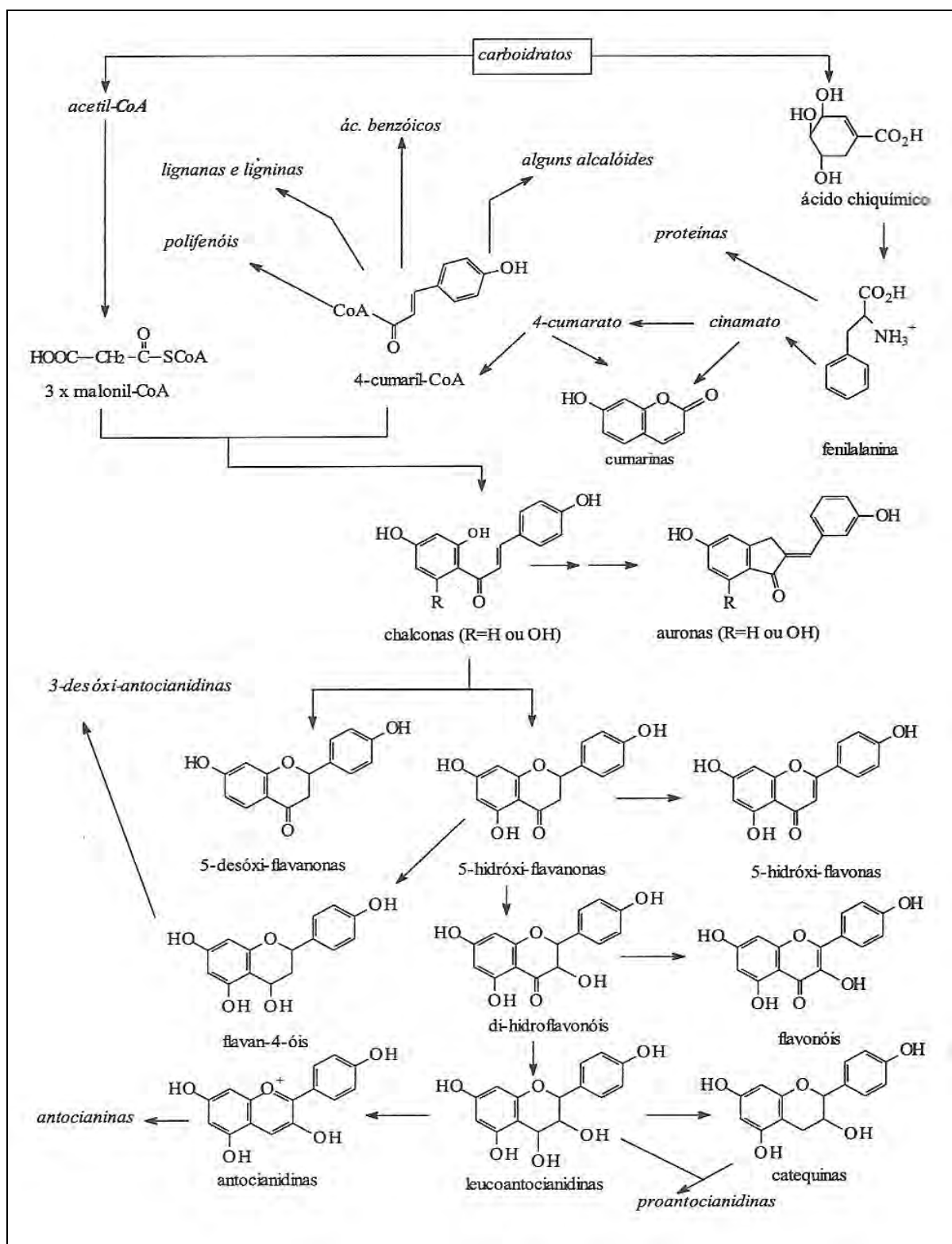


Figura 5 – Representação esquemática simplificada da biossíntese de flavonoides (SIMÕES, 2007).

Os flavonoides são formados por uma série de reações de condensação entre o ácido cinâmico (átomos de carbono 2 e 3 do anel B e 4 do anel C) e resíduos malonil (anel A), a qual forma a estrutura de substâncias fenólicas do tipo C6-C3-C6, sendo heterosídeos com quinze carbonos em seu esqueleto básico. Os três carbonos que fazem a ponte entre o anel fenil são comumente ciclizados para formar um terceiro anel (anel C), como mostra a Figura 6 (CUYCKENS; CLAEYS, 2004).

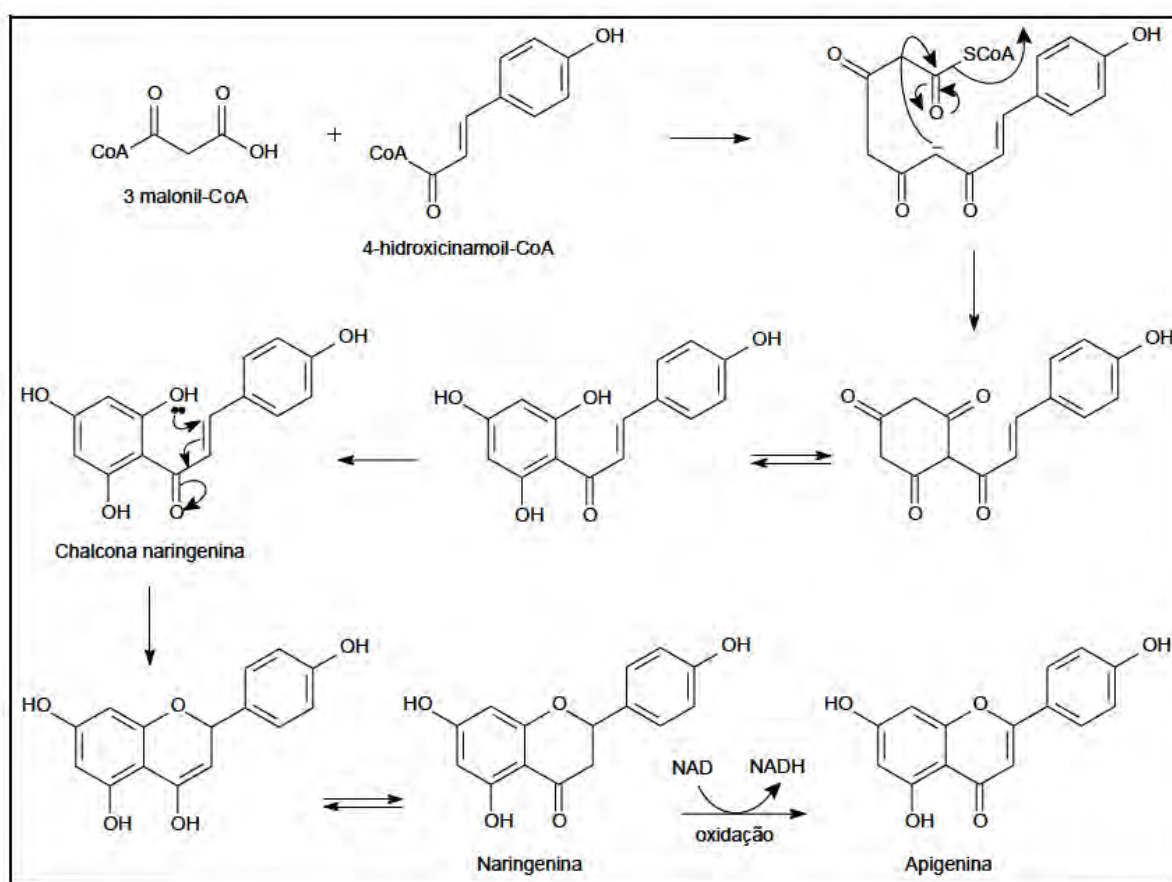


Figura 6 – Biossíntese de flavonoides (adaptação de DEWICK, 2001).

2.2.1 Os constituintes flavônicos: Composição Química

Os flavonoides estão divididos em oito subclasses: flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas, antocianidinas, flavanonols (flavan-3-ols ou catequinas), chalconas e dihidrochalconas as quais são formadas a partir das variações no arranjo estrutural e posições dos grupos funcionais (WANG; HUANG, 2004; LIN; HARNLY, 2008).

Consideram-se derivados da flavona (figura 7, A) e da flavanona (figura 7, B); a existência de uma hidroxila em C3 do ciclopirônico (o único que não é fenólico nas moléculas destes constituintes) dá lugar a dois novos compostos, flavonol (ou 3-hidroxiflavona) (figura 7, A) e flavononol (ou 3-idroxiflavanona) (figura 7,B) (COSTA, 2002).

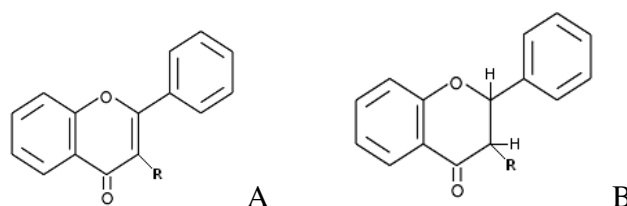


Figura 7 – A) Flavona, se R = H e Flavonol, se R = OH; B) Flavanona, se R = H e Flavanonol, se R = OH. (COSTA, 2002)

Por abertura dos núcleos oxigenados da flavona e flavanona resultam a chalcona (do Grego *chalcos*, cobre) (figura 8, A) e dihidrochalcona ou benzil-idroxiacetofenona. Por ciclização das chalconas resultam compostos flavônicos ou auronas (do Grego *aurum*, ouro) (figura 8, B). Conhecem-se, ainda, certos isômeros de posição, como as isoflavona ou 3-fenilbenzo- γ -pirona (figura 8,C). Identificaram inúmeros derivados destes constituintes fundamentais, distintos pelo número e posição de grupos hidroxilas e metoxilas correspondentes. Na Figura 09 estão as principais classes dos flavonoides.

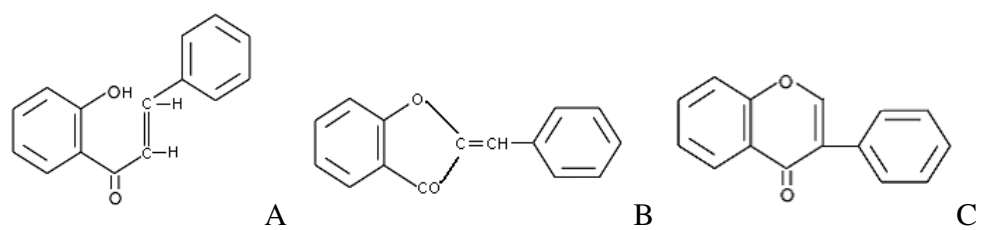


Figura 8 – A) Chalconas; B) Auronas; C) Isoflavonas. (COSTA, 2002).

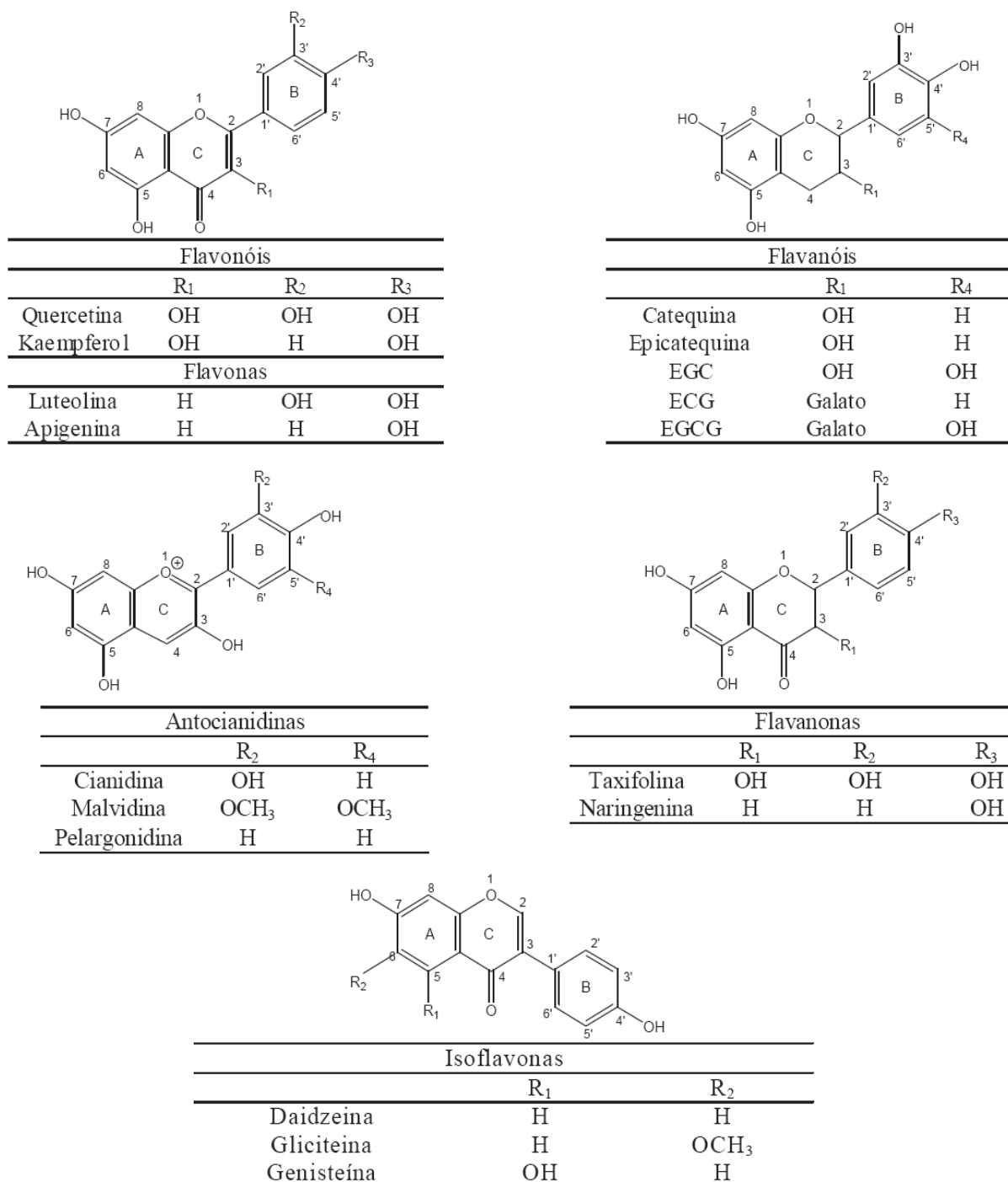


Figura 9– Principais classes de flavonoides (HUBER E RODRIGUES-AMAYA, 2008).

Os **flavonois** são encontrados como co-pigmentos das antocianidinas nas pétalas e folhas de plantas superiores. Caracterizam-se por apresentar uma hidroxila ligada na posição 3. Embora seja uma classe de flavonoides bastante rica, três agliconas são as mais comuns (canferol, quercetina e miricetina), sendo a maioria dos flavonóis existentes variações dessas três estruturas. Alguns flavonóis podem apresentar glicosídeos ligados a sua estrutura, sendo o mais comum a quercetina-3-rutinosídeo, mais conhecido como rutina (HARBORNE, 1984; HAHLBROCK, 1981).

As **flavonas** diferem dos flavonóis por não apresentarem hidroxila ligada à posição 3, o que altera o espectro na região do ultravioleta, mobilidade cromatográfica e reações colorimétricas. Pode apresentar glicosídeos ligados a molécula. As flavonas mais comuns são luteolina e apigenina. Um grupo especial de flavonas são os biflavonóis que são compostos diméricos (formado por 2 flavonas) ligados através de ligação carbono-carbono ou ligação carbono-oxigênio. Ocorrem especialmente nas gimnospermas (HARBORNE, 1984; HAHLBROCK, 1981).

As **isoflavonas** são isômeros das flavonas, porém de ocorrência muito mais restrita (subfamília Papilonoidea – Fabaceae), em relação à atividade fisiológica, são subdivididas em três grupos, compostos que mimetizam atividade estrogênica, compostos com atividade inseticida e fitoalexinas (HARBORNE, 1984; HAHLBROCK, 1981).

As **chalconas** e **auronas** são grupos pequenos de metabólitos que ocorrem especialmente na Família Asteraceae. Possuem coloração amarelada, a qual se torna vermelha quando exposta a vapor es alcalinos. Chalconas não apresentam anel central (anel C), enquanto que nas auronas há um, formado por 5 membros (HARBORNE, 1984; HAHLBROCK, 1981).

As **flavanonas** são isômeros das chalconas, podendo as moléculas apresentar interconversão em estudos *in vitro*. São flavonoides comuns nos frutos de *Citrus*, porém sem a ocorrência da chalcona análoga (HARBORNE, 1984; HAHLBROCK, 1981). Embora os flavonoides sejam geralmente relacionados como agentes não nutrientes, esta classe tem atraído grande atenção dos pesquisadores pelas propriedades fisiológicas, farmacológicas e seus benefícios a saúde humana (GATTUSO et al., 2007; ZHANG et al., 2008). O FDA

recomenda um consumo diário de 250 mg de flavonoides de diferentes fontes: frutas, vegetais, sucos, suplementos de vitaminas e minerais (LIN; HARNLY, 2008).

Em plantas, os flavonoides podem ocorrer de várias formas modificadas com adições correspondentes à hidroxilação, metilação e glicosilação. Ocasionalmente, ácidos alifáticos e aromáticos, sulfato, prenila, metilenodioxila ou grupo isoprenila também podem compor o núcleo flavonoídico e seus glicosídeos (DEWICK, 2001).

As subclasses flavonoídicas e os padrões de glicosilação são fortemente correlacionados com a taxonomia da planta e fornecem uma ampla gama de diferentes propriedades químicas (LIN; HARNLY, 2008). As oito subclasses combinadas com glicosilação em múltiplos sítios e com uma grande variedade de sacarídeos produzem cerca de 4000 diferentes flavonoides já identificados, cuja lista ainda continua crescendo (ZHANG et al., 2005; LIN; HARNLY, 2008).

A princípio qualquer grupo hidroxila pode ser glicosilado, mas algumas posições são favorecidas: em flavonas, flavanonas e isoflavanonas a posição C-7; o grupo hidroxila da posição C-3 e C-5 em flavonols e flavanols e para antocianidinas as hidroxilas C-3 e C-5 são sítios de glicosilação (CUYCKENS; CLAEYS, 2004).

Os 5-*O*-glicosídeos são raros para compostos com um grupo carbonila na posição C-4, uma vez que o hidrogênio da hidroxila faz uma ligação de hidrogênio com o grupo carbonila adjacente. Os dissacarídeos mais encontrados são rutinose e neohesperidose e ocasionalmente tri e tetrassacarídeos (MA et al., 2001). Podem ser encontrados também glicosídeos acilados em que um ou mais grupos hidroxila do glicosídeo são esterificados com um ácido. A acilação é geralmente um evento tardio na biossíntese de flavonoides. Esta modificação é particularmente importante, pois diminui a solubilidade dos vários metabólitos em água, e pode servir como proteção para os glicosídeos contra a degradação pelas glucosidases, ou ainda para estabilizar as estruturas das antocianinas (DEWICK, 2001).

A glicosilação também pode ocorrer de forma direta no núcleo do flavonóide, por uma ligação C-C a qual é resistente à hidrólise ácida. Até o presente momento foram encontrados apenas C-glicosilação nas posições C-6 e/ou C-8 do esqueleto flavonoídico (CUYCKENS; CLAEYS, 2004).

2.2.2 Propriedades Físico-Químicas dos Flavonoides

Geralmente, os flavonoides agliconas aparecem sob a forma de cristais amarelos e parcialmente insolúveis em água, apresentando boa solubilidade em solventes orgânicos apolares, suas estruturas fenólicas lhe permitem solubilidade em soluções aquosas alcalinas. Os compostos heterosídeos são geralmente solúveis em água e alcoóis diluídos, mas insolúveis em solventes orgânicos. (SIMÕES et al., 2007; SOARES, 2002).

As flavonas e flavonóis apresentam pouca solubilidade em água, enquanto que os di-hidroflavonóis são mais solúveis. Os 3-hidroxi-flavanos (catequinas) e os 3,4-flavonóis são hidrossolúveis, mas o 3-hidroxi-flavano apresenta boa solubilidade em éter etílico e os 3,4-flavonodióis, em acetato e etila. As antocianinas são estáveis com o sais, essa propriedade confere uma maior solubilidade em meio ácido, como cloridrato (SIMÕES et al., 2007). São passíveis de serem extraídos com etanol 70% permanecendo na fase aquosa após partição com éter de petróleo (HARBORNE, 1984; HAHLBROCK, 1981).

O aquecimento pode levar à hidrólise dos *O*-heterosídeos e em muitas vezes interferir na estrutura e análise dos flavonoides. A hidrólise ácida ou alcalina é empregada na identificação dos núcleos flavônicos. (SIMÕES et al., 2007)

2.2.3 Propriedades biológicas mais relevantes

Diante dos benefícios do uso de flavonoides, existem aproximadamente 13000 relatos (artigos científicos e livros) descrevendo as propriedades químicas, bioquímicas, o papel farmacológico e nutricional dos flavonoides desde 1990 (GATTUSO et al., 2007).

Diversas são as funções atribuídas aos flavonoides de plantas, dentre elas podemos citar:
i) proteção dos vegetais contra incidência dos raios ultravioletas e visíveis, além de proteção

contra ataque de insetos, fungos, vírus e bactérias; ii) atração de animais com finalidade de polinização ; iii) atividade antioxidante; agentes alelopáticos, e iv) inibidores de enzimas (SIMÕES et al., 2007; HARBONE, 1989; HARBONE; WILLIAMS, 2000).

Os flavonoides são usados em alguns remédios devido as suas propriedades antioxidante, antiplaquetária, antiinflamatória, vasodilatadora, antialergênicas, espasmolítica, e diurética, podendo também inibir certas enzimas ligadas a tumorigênese como a lipoxigenase e a ciclooxigenase (HANASAKI et al., 1994; DUARTE et al., 1993). Os flavonoides atuam também como quelantes de metais. Flavonas e flavonóis são as duas principais classes de flavonoides encontradas universalmente na natureza. As **flavonas** e os **flavonóis** são flavonoides de especial importância por apresentarem **atividade antioxidante** em alimentos, além disso, estudos epidemiológicos indicaram que seu consumo diário assegura redução do risco de câncer e doenças cardiovasculares (WANG; HUANG, 2004). Os mais comuns flavonóis antioxidantes são canferol, quercetina e miricetina (HARBORNE; WILLIAMS, 2000). Na tabela 01 estão expressos as principais classes de flavonoides e um resumo das suas propriedades biológicas e farmacológicas mais relevantes.

Tabela 1 – Classe de flavonoides e algumas características biológicas e farmacológicas conhecidas (adaptada de SIMÕES et al., 2007).

Classe de flavonoides	Principais Características biológicas e farmacológicas
Flavonas, flavonóis e seus <i>O</i> -heterosídeos	Co-pigmentação em flores (do branco ao amarelo), protetores contra raios UV nas folhas (antioxidantes).
Antocianos	Pigmentos que vão do vermelho até ao azul; atividade inibidora do crescimento de larvas e insetos; possuem atividade antiinflamatória e antiedematogênica.
Chalconas	Pigmentos amarelos; edulcorantes e proteção contra luz e calor.
Auronas	Pigmentos amarelos
Di-hidro-flavonóis	Presentes nos tecidos duros (madeira), protetores contra doenças causadas por microorganismo em plantas, inibidores enzimáticos e alimento dissuasivo para insetos.
Flavanonas	Podem apresentar sabor amargo
Di-hidro-Chalconas	Podem apresentar sabor amargo
Flavanas, leucoantocianidinas e proantocianidinas	Propriedade adstringente
Isoflavonoides	Propriedades estrogênicas (isoflavonas e cumestanos), antifúngica e antibacteriana (filoalexinas), e inseticida (rotenóides).
Biflavonoides	Propriedades antifúngicas, alimento dissuasivo para insetos.

2.2.4 Relação Estrutura atividade e propriedade antioxidante dos flavonoides

Muitos fatores influenciam a atividade antioxidante dos compostos de natureza fenólica, em especial a posição de substituição e o número de grupos hidroxila (OH), as propriedades de outros grupos substituintes e a possibilidade de formação de ligações de hidrogênio (Figura 10).

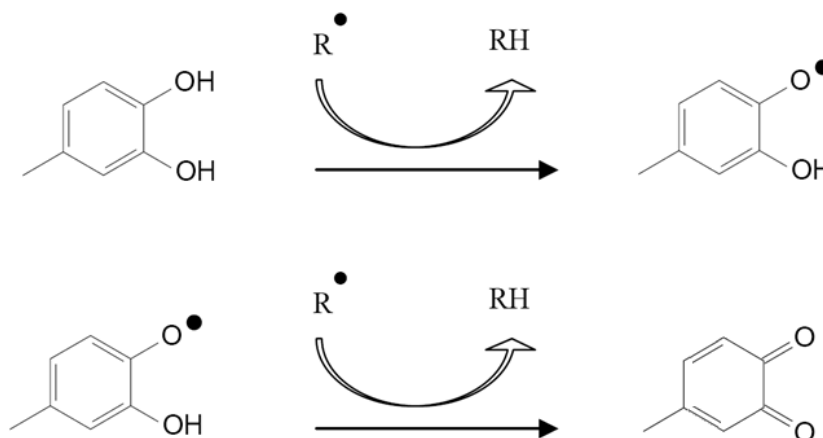


Figura 10 – Captura/supressão de radicais livres pelos fenóis e polifenóis (BRAND-WILLIANS et al., 1995).

A posição de substituição da hidroxila no anel fenólico, considerada em relação a uma posição fixa, influencia diretamente a atividade antioxidante. Compostos contendo a hidroxila em *para* são mais ativos do que aqueles substituídos em *orto* ou *meta*. Compostos com dois (mais comum) ou três grupos hidroxilas no anel aromático possuem maior atividade antioxidante do que os mono-hidroxilados, de acordo com a relação apresentada na Figura 11 (PANNALA et al. 2001; CHENG et al., 2002, 2003).

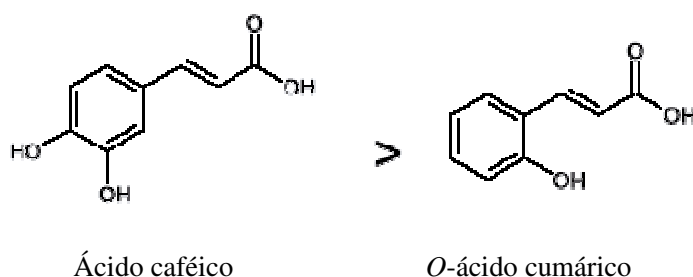


Figura 11 – Relação da atividade antioxidante de acordo com o número e posição dos grupos hidroxilas (CHENG et al., 2002).

Na presença de grupo hidroxila substituído em posição *orto* e/ou *para* em anel contendo heteroátomo nitrogênio ou oxigênio, a atividade antioxidante é potencializada por efeito de ressonância entre o par de elétrons do tipo p do heteroátomo e o radical fenóxi formado. As moléculas apresentadas na Figura 12 possuem atividade antioxidante comprovada por apresentarem heteroátomo oxigênio em *orto* (ZHANG, 1999; PANNALA et al., 2001):

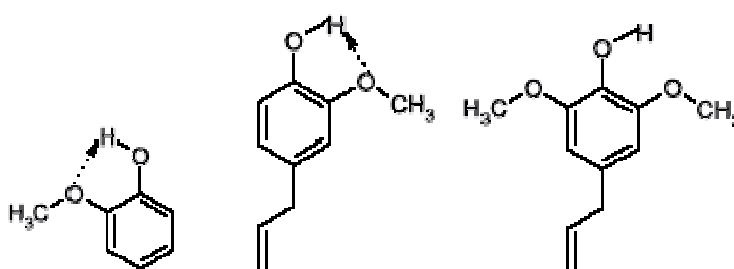


Figura 12 – Ligações de hidrogênio na espécie neutra de substâncias contendo oxigênio em grupo substituinte (ZHANG, 1999).

Em 2001, por meio de estudo cinético, Pannala e colaboradores (2001) avaliaram a capacidade antioxidante de substâncias derivadas de flavonoides, verificando as seguintes características estruturais em relação à estrutura protótipo apresentada na Figura 13:

- A posição do grupo hidroxila no anel B tem papel importante na presença da atividade antioxidante. Assim, a posição *para* (C4') favorece essa ação, sendo que será reduzida ou ausente quando o grupo hidroxila estiver em posições *orto* e *meta*. A presença de um segundo grupo hidroxila no anel B potencializa a atividade antioxidante;
- A presença de dissustituição *o*-diidroxil no anel B e da dupla ligação C2-C3, conjugada ao grupo 4-oxo (C4), no anel C (como observado nas flavonas) é essencial à atividade antioxidante;
- A presença de grupo hidroxila na posição 3 do anel heterocíclico C (C3) contribui na atividade antioxidante;
- Grupos hidroxila nas posições 5 e 7 do anel A são de menor importância;
- Compostos diidroxilados possuem maior atividade quando comparados com outros compostos monoidroxilados estudados, mostrando maior conjugação entre o grupo hidroxila da posição 4' e o presente na posição 3 do anel C;
- Compostos com três grupos hidroxilas são mais ativos que os diidroxilados.

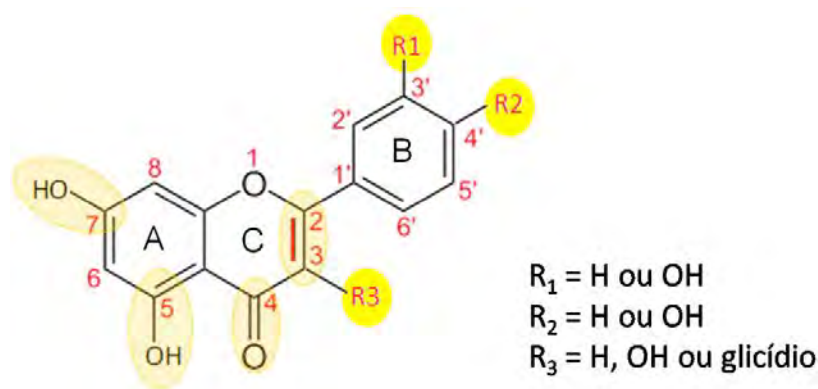


Figura 13 – Relação estrutura atividade de flavonol e flavona - As hidroxilas em C5 e C7 são substituintes menos importantes à atividade antioxidante; carbonila em C4, insaturação entre C2 e C3 e hidroxilas em C3' e C4' são substituintes importantes à atividade antioxidante. (LIEN et al., 1999; PANNALA et al., 2001).

3 Espécies Reativas e Radicais Livres

Espécies reativas é um termo que engloba qualquer composto que seja potencialment reativo, podendo ser de natureza radicalar (Radicais livres) ou não radicalar. As espécies não radicalares são agentes oxidantes e podem se converter em radicais livres. Todo radical livre é uma espécie reativa, mas nem toda espécie reativa é um radical livre (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). A descoberta de radicais livres em materiais biológicos ocorreu na década de 50 por COMMONER e colaboradores (1954) e desde então, vem sendo estudada sua importância na biologia celular.

Radicais livres (RL) são quimicamente definidos como as moléculas orgânicas, inorgânicas e átomos que, por **fissão homolítica** ou **transferência eletrônica**, contêm um ou mais elétrons não pareados nos orbitais mais externos (paramagnéticos), e existência independente (HALLIWELL, 1994; JANSEN, 2003; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Essa configuração faz com que os RL sejam moléculas altamente instáveis, com meia-vida muito curta, de minutos a nanossegundos, muito reativas, pois são capazes de reagir rapidamente com vários compostos ou atingir alvos celulares, como as membranas.

Uma molécula pode tornar-se um RL ganhando ou perdendo um elétron em reação química, bem como por fissão homogênea de uma ligação química. Normalmente o rompimento de uma ligação ocorre de maneira heterogênea (fissão heterolítica), onde um dos átomos retém ambos os elétrons compartilhados, tornando-se negativamente carregado (ânion), enquanto o outro átomo perde ambos os elétrons tornando-se um íon positivamente carregado (cátion). Na fissão homolítica, a ligação química é rompida de maneira que ambos os átomos retenham um dos elétrons compartilhados na ligação, tornando-se RL (Figura 14). A energia necessária para romper uma ligação covalente pode ser fornecida pelo calor, radiação eletromagnética ou outras fontes (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

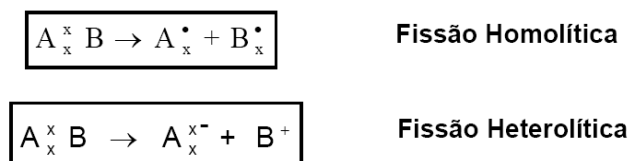


Figura 14 – Esquema de fissão homolítica e fissão heterolítica.

As espécies reativas e ou RL mais estudadas em sistemas biológicos incluem as espécies reativas do oxigênio (ERO), as espécies reativas do nitrogênio (ERN), os radicais derivados dos tióis ($RS^\bullet$), as espécies reativas do cloro, as espécies reativas do carbono e complexos de metais de transição, principalmente íons Fe^{++} , Cu^{++} , Mn^{++} e Cr^{++} (FINKEL,T.; HOLBROOK, N. J., 2000; PEETTA, P. G., 2000; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; VASCONCELOS et al., 2007).

Outros íons metálicos, sem atividade redox direta, como metais pesados (Pb, Hg e Cd) e trivalentes (Bi, Al) são capazes de promover peroxidação de fosfolipídios, diminuindo a fluidez de membranas celulares. Íons divalentes (Mg^{++} , Ca^{++} , Zn^{++}) são cofatores de enzimas envolvidas na manutenção redox da célula, afetando o balanço oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; VASCONCELOS et al., 2007).

3.1 Espécies Reativas do Oxigênio (ERO)

Exceto em micro-organismos anaeróbios, em todos os sistemas biológicos, desde os mais simples, como os procariontes aeróbicos facultativos, até os mais especializados como os mamíferos e as plantas, utilizam o oxigênio em seus processos bioquímicos (SORG, 2004).

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são geradas em um panorama de reações de oxido-redução, isto é, ou cedem o elétron desemparelhado, oxidando-se, ou recebem outro, reduzindo-se (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). Os principais radicais livres de importância biológica, oriundos do oxigênio molecular (O_2) e formados a partir da redução monoeletrônica, são o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxila ($HO^\bullet$), conforme

apresentado na Figura 15 (CHABOT; MITCHELL; GUTTERIDGE, 1998; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

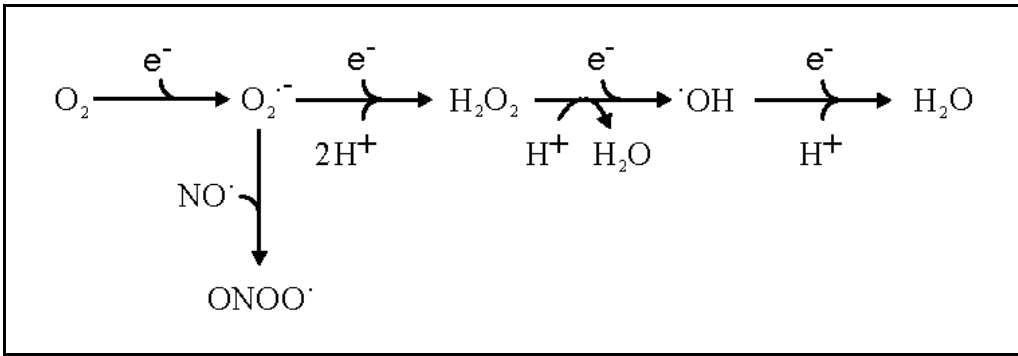


Figura 15 – Formação das ERO. (adaptada de CHABOT; MITCHELL; GUTTERIDGE, 1998).

A Tabela 2 mostra as formas radiculares e não radiculares das principais espécies reativas do oxigênio.

Tabela 2 – Classificação e nomenclatura das espécies reativas derivadas do oxigênio (HALLIWELL E WHITEMAN , 2004).

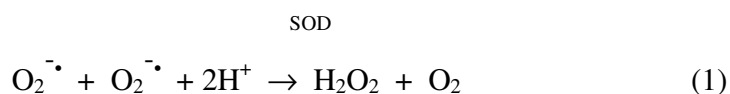
Radicais livres	Não Radicais
Espécies Reativas do Oxigênio (ERO)	
Ânion radical superóxido (O ₂ ^{•-})	Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂)
Radical hidroxila (OH [•])	Ácido Hipobromoso (HOBr)
Radical hidroperoxila (HO ₂ [•])	Ácido Hipocloroso (HOCl)
Radical peroxila (RO ₂ [•])	Ozônio (O ₃)
Radical alcoxila (RO [•])	Oxigênio <i>singlet</i> (¹ O ₂)
Radical carbonato (CO ₃ [•])	Peróxidos orgânicos (ROOH)
Radical dióxido de Carbono (CO ₂ [•])	Peroxinitrito (ONOO)
	Ácido Peroxinitrito (ONOOH)

A geração de ERO pode ser gerada por fontes endógenas como a respiração aeróbica celular, processos de inflamação, nos peroxissomos, por enzimas da citocromo P450 e xantina oxidase, bem como ser gerada por fontes exógenas, como radiações gama e ultravioleta, dieta, cigarro e exposição ao gás ozônio (BIANCHI ; ANTUNES,1999).

3.1.1 Ânion-radical Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

Gerado continuamente por diversos processos celulares, como na cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, no microssomo (via Cit. P450), por enzimas como xantina oxidase, NADPH oxidase, lipooxigenase e ciclooxigenase, o $O_2^{\cdot-}$ ocorre em quase todas as células aeróbicas e é ainda produzido durante a ativação de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos (HALLIWELL, 1994; VASCONCELOS et al., 2007).

Durante o metabolismo normal, o oxigênio molecular sofre redução monoeletrônica formando o $O_2^{\cdot-}$, passando a apresentar a configuração eletrônica com número ímpar de elétrons (13) na última camada de valência (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). O $O_2^{\cdot-}$ rapidamente desaparece em solução aquosa, sofrendo dismutação espontânea à peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ou catalisada pela superóxido dismutase (SOD), (VASCONCELOS et al., 2007), (Equação 1):



Também em solução aquosa é considerado um agente oxidante fraco, sendo responsável juntamente com o óxido nítrico pela formação do peroxinitrito (VASCONCELOS et al., 2007), (Equação 2):



O $O_2^{\cdot-}$ é permeável às membranas biológicas e em fagócitos, como neutrófilos e macrófagos, é um dos seus agentes microbicidas mais importantes (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; VASCONCELOS et al., 2007).

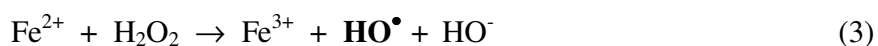
3.1.2 Radical Hidroxila ($HO^{\cdot}$)

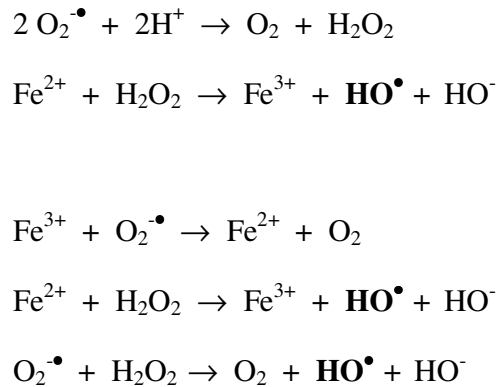
O $HO^{\cdot}$ é considerado a ERO mais reativa dos sistemas biológicos, é responsável pela indução de lesões nas moléculas celulares e é considerado a ERO mais deletéria ao organismo, pois tais sistemas não dispõem de mecanismos de defesa (VASCONCELOS et al., 2007). Devido a sua meia-vida muito curta, 10^{-9} segundos, sendo dificilmente pode ser sequestrado (VANNUCHI et al., 1998).

A combinação do $HO^{\cdot}$ com metais ou outros radicais *in situ* confirmam sua reatividade (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Segundo HALLIWELL; GUTTERIDGE (1986), este radical frequentemente interage com as moléculas por abstração de hidrogênio e por adição às insaturações, promovendo a lipoperoxidação; causa modificações no DNA (com modificações nas bases nitrogenadas levando mutações e até mesmo a quebra das fitas; inativam proteínas e enzimas por oxidar seus grupos sulfidrilas (-SH) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

O $HO^{\cdot}$ pode ser formado *in vivo* principalmente por dois mecanismos:

i) Reação do H_2O_2 com metais de transição (Fe^{+2} e Cu^{+2}), conhecida como reação de Fenton, apresentada de maneira simplificada na Equação 3 (ou representada de forma mais complexa nas equações 4) e/ou pela reações de Haber-Weiss, Equações 5.





(5)

ii) Fissão homolítica (homólise) da água na exposição à radiação ionizante (UV, raios Gama e X), representada pela Equação 6 (BARREIROS, DAVID; DAVID, 2006).



3.1.3 Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂)

O H₂O₂ é gerado *in vivo* pela dismutação do O₂^{•-}, espontaneamente ou catalisada pela superóxido dismutase (SOD) ou ainda por pela β-oxidação de ácidos graxos (HALLIWELL, 2000). As mitocôndrias são importantes fontes de O₂^{•-} e, como a presença deste ânion-radical pode causar sérios danos, elas são ricas em SOD que o converte em H₂O₂. O peróxido de hidrogênio gerado é então parcialmente eliminado por catalases, glutathione peroxidase e peroxidases ligadas à tioredoxina (HALLIWELL, 2000). Pode também ser produzido por bactérias presentes na boca, sendo utilizado pela peroxidase salivar para oxidar o tiocianeto (SCN⁻) em tiocianato (OSCN⁻), um produto tóxico para certas bactérias. Ele é utilizado pelos fagócitos na produção de ácidos hipoalogenosos como o HOCl, que são oxidantes muito efetivos no combate a vírus, bactérias e outros corpos estranhos, mas que por outro lado podem apresentar efeitos deletérios às moléculas biológicas, dependendo do grau de exposição (HALLIWELL, 2000, BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

O H₂O₂ isoladamente é praticamente inócuo, porém de vida longa, pode se difundir facilmente através das membranas celulares. É um fraco agente oxidante e um fraco agente

reductor, reage com grupos tiol ($-\text{SH}$; glutathiona por ex.), com proteínas heme e peroxidases para iniciar reações radicalares e peroxidação lipídica. Devido ao fato das células possuírem metais de transição, principalmente com Fe^{+2} , o H_2O_2 é responsável pela geração do radical $\text{HO}^\bullet$, como na reação de Fenton (BARREIROS, DAVID; DAVID, 2006; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; VASCONCELOS et al., 2007).

3.1.4 Oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$)

Compreende a molécula de oxigênio em um estado eletronicamente excitado, produzido por reações fotoquímicas ou por outras reações. Reage com inúmeras moléculas biológicas, incluindo lipídeos de membrana, inicializando o processo de peroxidação lipídica (VASCONCELOS et al., 2007).

Oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) é como são conhecidos os três estados eletronicamente excitados imediatamente superiores ao oxigênio molecular no estado fundamental (triplete, ^3S) (FRIMER, 1989). Segundo a Teoria do Orbital Molecular, a configuração eletrônica do oxigênio no estado fundamental possui dois elétrons desemparelhados nos orbitais moleculares degenerados $p_x^\bullet$ e $p_y^\bullet$. Esses elétrons tendem a possuir o mesmo *spin* de forma a produzir multiplicidade máxima e assim um estado eletrônico de menor energia. Essa é a razão pela qual o estado fundamental do oxigênio molecular é um triplete. A Tabela 03 apresenta as formas de ocupação nesses orbitais moleculares antiligantes, para o oxigênio no estado fundamental, assim como para os estados excitados imediatamente superiores.

Tabela 3 – Ocupação dos orbitais moleculares antiligantes para os estados eletrônicos do O_2 (MACHADO, 2000).

Estado	Orbital molecular antiligante	Energia ^a , kJmol^{-1}
$^3\Sigma_g$	$[\uparrow] \pi_x^* [\uparrow] \pi_y^*$	0
$^1\Delta_x$	$[\uparrow\downarrow] \pi_x^* [\] \pi_y^*$	92,4
$^1\Delta_y$	$[] \pi_x^* [\uparrow\downarrow] \pi_y^*$	92,4
$^1\Sigma_g$	$[\uparrow] \pi_x^* [\downarrow] \pi_y^*$	159,6

^a relativa ao estado fundamental

Desses estados, os que possuem energia intermediária ($^1\Delta_x$ e $^1\Delta_y$; 92,4 kJ mol⁻¹) são os responsáveis pela reatividade química do oxigênio singlete. A simetria dessas moléculas, diferente da do estado fundamental, lhes garante um considerável tempo de vida quando comparado com a forma de maior energia ($^1\Sigma$; 159,6 kJ mol⁻¹), que possui a mesma simetria do estado fundamental. Os estados $^1\Delta_x$ e $^1\Delta_y$ são degenerados e possuem uma distribuição eletrônica onde os elétrons que ocupam um dos orbitais antiligantes π^* se encontram em um dos planos mutuamente perpendiculares. Por serem degenerados, os estados $^1\Delta_x$ e $^1\Delta_y$ são, por conveniência, representados como sendo o estado $^1\Delta_g$. O orbital molecular vazio no estado $^1\Delta_g$ garante ao oxigênio singlete essa espécie caráter eletrofílico, o que favorece sua participação mais efetiva em reações químicas, principalmente no caso em que os substratos possuem sítios ricos em elétrons (MACHADO, 2000).

1O_2 pode ser gerado por transferência de energia a partir de um sensibilizador (S), no estado excitado triplete ($^3S^*$) (ex: porfirinas, clorofila ou riboflavina) para o oxigênio. O sensibilizador S absorve energia e do estado fundamental singlete (S), passa para o estado excitado singlete ($^1S^*$), a partir do qual é convertido, por cruzamento intersistema, para o estado excitado triplete ($^3S^*$) (MACHADO, 2000).

O tempo de vida do oxigênio singlete em solução é profundamente influenciado pela natureza do solvente (FRIMER, 1989): em água, por exemplo, é de cerca de 4,0 μ s (OCHSNER, 1997). Em sistemas biológicos, o oxigênio singlete apresenta tempos de vida extremamente baixos, inferiores a 0,04 μ s. Em função disso, seu raio de ação é extremamente reduzido (<0,02 μ m) (OCHSNER, 1997).

A ação fotodinâmica provoca a oxidação de substratos biológicos através da geração de espécies reativas de oxigênio produzidas pela associação entre a luz (de um determinado comprimento de onda), um fotossensibilizador e oxigênio. Existem dois caminhos que levam a morte celular pelo processo de fotooxidação conhecidos como mecanismo do tipo I e tipo II. No mecanismo tipo I, o fotossensibilizador excitado pela luz, interage com alvos biológicos e em combinação com o O_2 do meio, geram radicais como o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e radical hidroxila ($HO^{\bullet}$). No mecanismo do tipo II ocorre transferência de energia do fotossensibilizador excitado para o O_2 no estado triplete (3O_2), gerando o 1O_2 , uma espécie extremamente reativa que, por sua vez, atuará nos alvos biológicos. O mecanismo do tipo II

destrói muitos compostos no meio intra e extra celular, enquanto que o tipo I necessita da penetração do fotossensibilizador no invólucro celular (FOOTE, 1991; HENDERSON; DOUGHERTY, 1992).

3.1.5 Produção ERO pela mitocôndria

A mitocôndria é considerada a mais importante fonte de radicais livres, bem como o principal alvo para o processo regulatório dos radicais livres e suas ações tóxicas (CADENAS, 2004). A taxa de produção de ERO mitocondrial está elevada em diversas condições patológicas, incluindo hipóxia, isquemia, reperfusão e inibição da respiração mitocondrial (CHEN et al., 2003).

As ERO são produzidas nas mitocôndrias como um subproduto do metabolismo energético normal (FRIDIVITCH, 1999; SORG, 2004; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Na membrana interna das mitocôndrias estão localizadas as proteínas que são essenciais para a fosforilação oxidativa que incluem os complexos I-IV da cadeia de transporte de elétrons, a ATP sintase (complexo V) e o translocador adenina de nucleotídeos (NICHOLLS; FERGUNSON, 2002b). Durante a fosforilação oxidativa há um bombeamento de prótons pela cadeia respiratória, criando um fluxo da matriz para a membrana mitocondrial interna que, por ser impermeável a prótons, impede o retorno destes à matriz, criando-se um gradiente eletroquímico ($\Delta\Psi$). Trabalhos realizados por Chen e colaboradores (2003) e Zmijewski e colaboradores (2005) demonstraram que geração de ERO pela cadeia de transporte de elétrons mitocondrial se dá nos complexos I, II e III (Figura 16).

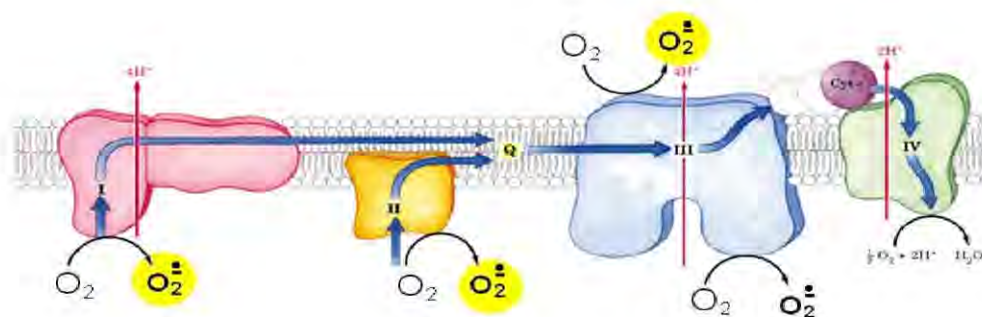
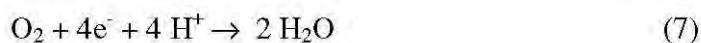


Figura 16 – Complexos da cadeia respiratória mitocondrial e mecanismo de geração e desintoxicação de ERO, em especial o ânion radical superóxido (adaptado de FLINT BEAL, 2005).

A redução completa do oxigênio à água requer quatro elétrons, como vista na Equação 7:



A **redução tetraeletrônica** do O_2 evita as reações intermediárias e ocorre na cadeia respiratória acoplada à fosforilação oxidativa, pelo sistema citocromo-oxidase (KOWALTOWSKI et al., 2001).

É preciso, porém, salientar que nem sempre o oxigênio transforma-se completamente em água. Em cerca de 5% do processo, o O_2 tem forte tendência a receber um elétron de cada vez, **redução monoeletrônica** do oxigênio, gerando assim ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), como observado na Figuras 16 e 17. Devido ao contínuo funcionamento da cadeia respiratória, o vazamento de 1 a 5% de elétrons é suficiente para fazer com que a geração de $\text{O}_2^{\bullet-}$ mitocondrial seja a maior fonte celular de ERO na maioria dos tecidos (LIU, 1997; TURRENS, 1997; DEL MAESTRO, 1980; KOWALTOWSKI et al., 2001). O $\text{O}_2^{\bullet-}$ também será gerado pela NADH desidrogenase e pela coenzima Q_{10} (BOVERIS; CHANCE, 1973; CADENAS et al., 1977; TURRENS; BOVERIS, 1980; TURRENS et al., 1985). Na reação de redução de oxigênio pela citocromo oxidase não ocorre produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ porque esta enzima liga-se fortemente aos intermediários de oxigênio reduzidos parcialmente, prevenindo a liberação destes intermediários antes da redução total ser alcançada (TURRENS, 1997).

As ERO geradas pelas mitocôndrias têm sido implicadas em muitos processos degenerativos, incluindo envelhecimento e morte celular necrótica ou apoptótica (GREEN; REED, 1998; KOWALTOWSKI; VERCESI, 1999; LEMASTERS et al., 1998; ZAMZAMI et al., 1996).

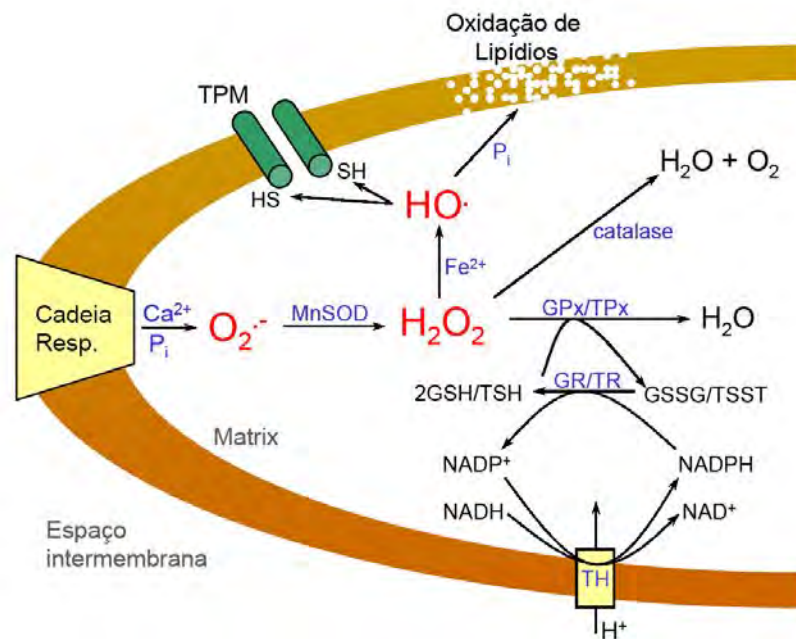


Figura 17 – Geração de ERO na mitocôndria (KOWALTOWSKI et al., 2001).

Além das mitocôndrias, as ERO também podem ser geradas por enzimas da classe das oxirredutases, em especial as oxidases, no citoplasma ou na membrana (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). O alvo celular (proteína, lipídeo, carboidrato e/ou DNA) está relacionado com o sítio de formação (ANDERSON, 1996; YU; ANDERSON, 1997).

O fenômeno de isquemia e reperfusão também é um importante fator no processo de produção de ERO. Este fenômeno pode ocorrer durante eventos de apnéia e/ou após um trauma ou durante o exercício físico, onde a circulação sanguínea é desviada para o músculo em atividade, enquanto outros tecidos podem sofrer uma hipóxia temporária que, após o exercício, recebem uma grande quantidade de oxigênio, o que pode favorecer a formação de ERO (FINALD; LAC; FILAIRE, 2006). A Xantina desidrogenase, XDH (EC 1.17.1.4),

enzima importante na conversão de purinas degradadas em ácido úrico, participa do processo. Nos tecidos em hipóxia, por ocasião da isquemia, devido à descompartmentalização do cálcio (Ca^{2+}) intracelular, ocorre ativação de proteases, as quais convertem a xantina desidrogenase em xantina oxidase, XO (EC 1.17.3.2) (Figura 18), que na presença de xantina ou hipoxantina, ocorre a redução do oxigênio a $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 e $\text{HO}^\bullet$ (FINALD; LAC; FILAIRE, 2006).

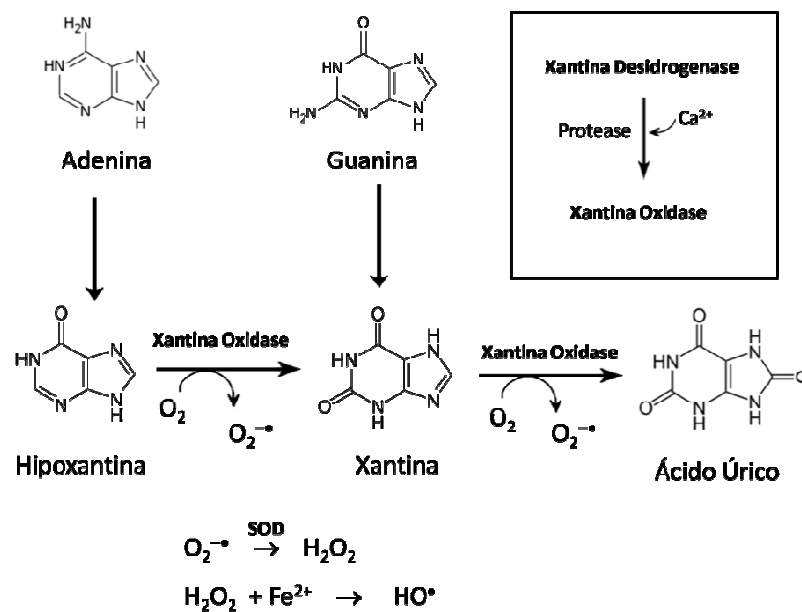


Figura 18 – Síntese intracelular de ERO derivadas da ação catalítica da xantina oxidase (GALLEY et al., 1995).

3.2 Espécies Reativas do Nitrogênio (ERN)

Em meio biológico as diferentes ERN (Tabela 04) formam-se rapidamente a partir do momento que a hemoproteína da família citocromo P450-like, chamada de óxido nítrico sintase (NOS) torna-se cataliticamente ativa (MACMICKING et al., 1997). A NOS é a enzima responsável pela produção endógena de óxido nítrico (Figura 19), através da oxidação de uma molécula de L-arginina em óxido nítrico e L-citrulina (MACMICKING et al., 1997). NOS são

dependentes de O_2 , NADPH, flavinas e biopterinas para exercer sua atividade. Até o momento, foram isoladas e clonadas três isoenzimas, sendo duas constitutivas em determinadas células e uma induzível, recebendo as siglas respectivas de cNOS e iNOS. Todas as três isoenzimas são semelhantes estruturalmente, porém reguladas de modo diverso e induzidas a partir de genes localizados nos cromossomos 7 (isoforma I), 12 (isoforma II) e 17 (isoforma III) (WANG; MARDSEN, 1995; FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000). A NOS tipo constitutiva apresenta baixa atividade, está presente no endotélio vascular e sistema nervoso central e produz baixas quantidades de óxido nítrico ($NO^\bullet$), que atua como molécula sinalizadora; a tipo indutiva possui alta atividade e é produzida por fagócitos quando estes são estimulados (BABIOR, 2000).

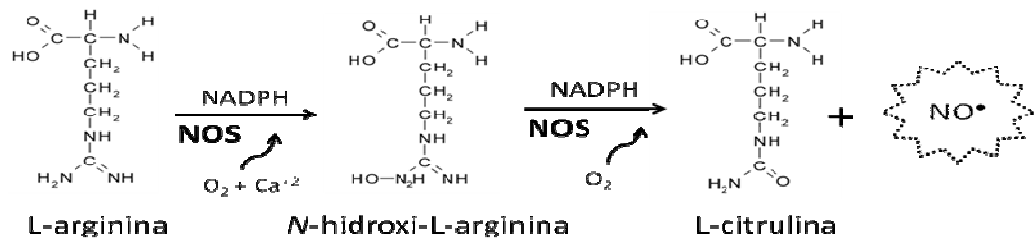


Figura 19 – Síntese de óxido nítrico via oxidação da L-arginina, catalisada pela NOS (adaptada de FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000).

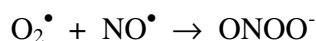
Tabela 4 – Classificação e nomenclatura das espécies reativas derivadas do nitrogênio (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

Espécies Reativas do Nitrogênio (ERN)	
Radicais livres	Não Radicais
Óxido Nítrico ($NO^\bullet$)	Ácido Nitroso (HNO_2)
Dióxido e Nitrogênio ($NO_2^\bullet$)	Cátion Nitroxil (NO^+)
	Ânion Nitroxil (NO^-)
	Trióxido de Dinitrogênio (N_2O_3)
	Teróxido de Dinitrogênio (N_3O_4)
	Peroxinitrito ($ONOO$)
	Ácido Peroxinitrito ($ONOOH$)
	Cátion Nítril (NO_2^+)
	Peroxinitrito Axil ($ROONO$)

3.2.1 Óxido nítrico (NO•) e derivados

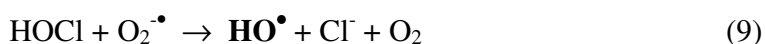
O óxido nítrico (NO•) ou monóxido de nitrogênio é um radical gasoso lipossolúvel e hidrossolúvel, apresenta uma meia vida de 1 a 10 segundos, é uma ERN que, em meio aquoso, reage com o oxigênio para formar outras espécies reativas (MACMICKING et al., 1997; VANNUCHI et al., 1998). É um radical abundante que age em varios processos biológicos, tais como relaxamento muscular, neurotransmissão e regulação imune (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000). Originalmente identificado como fator relaxante derivado do endotélio (*endothelium-derived relaxing factor* – EDRF) é um potente vasodilatador, envolvido na regulação da pressão arterial (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000; VASCONCELOS et al., 2007).

O NO• não é suficientemente reativo para atacar membranas e o DNA diretamente. O peróxinitrito (OONO•), produto formado pela reação entre o O₂•⁻ e o NO•, é um potente oxidante, com propriedades similares ao radical hidroxil, e reage com íon H⁺ formando ONOOH que se decompõe em HO• e radical dióxido de nitrogênio (NO₂•) (Equações 8), esse último, por sua vez, pode sofrer reações secundárias formando agentes capazes de nitrar aminoácidos, aromáticos, a exemplo da tirosina gerando nitrotirosina e as bases do DNA, em particular a guanina, na qual o produto principal é a 8-nitroguanina (EISERICH et al., 1996; HALLIWELL, 2000).



3.2.2 Ácido hipocloroso (HOCl)

O HOCl é uma espécie não radicalar, podendo ser considerado como o mais abundante oxidante gerado por leucócitos do sangue (LAPENNA E CUCCURULLO, 1996). O HOCl é um oxidante extremamente forte e além de atacar biomoléculas de importância fisiológica, tais como tióis, tioéteres, aminas, fenóis, compostos insaturados, complexos de ferro, aminoácidos, proteínas, nucleotídeos e ascorbato, sendo mais seletivo que o radical hidroxil (WEISS, 1989; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989; EATON, 1993; VELLOSA, 2005; VASCONCELOS et al., 2007). É capaz de gerar outras ERO, tais como, oxigênio singlete e radical hidroxil (Equação 9) via sua reação com peróxido de hidrogênio e ânion superóxido, respectivamente (WEISS, 1989; LAPENNA; CUCCURULLO, 1996; VELLOSA, 2005; VASCONCELOS et al., 2007).



O HOCl apresenta ações adversas como: i) protetora do organismo, à medida que participa do processo de destruição de microrganismos, mas, ao mesmo tempo, ii) agressor aos tecidos, pois nem as células de mamíferos nem as de bactérias podem detoxicar-se do HOCl por via catalítica, visto que estão ausentes defesas enzimáticas contra oxidantes clorados (LAPENNA; CUCCURULLO, 1996).

O HOCl é formado pela oxidação de íons cloreto, catalisada pela mieloperoxidase (MPO, presente em fagócitos) em presença de peróxido de hidrogênio, como esquematizado na Figura 20 (LAPENNA; CUCCURULLO, 1996; HAMPTON et al., 1998; VELLOSA, 2005).

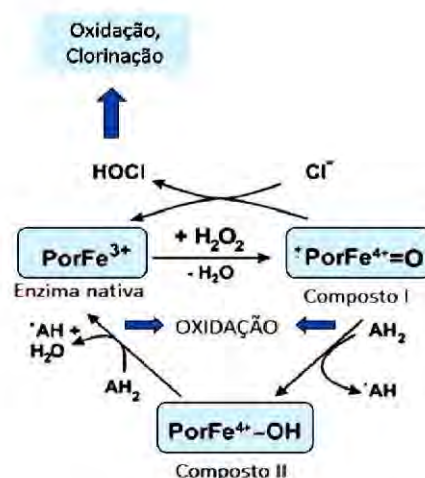


Figura 20 – Ciclos de halogenação e peroxidação via mieloperoxidase. Ambos os ciclos utilizam peróxido de hidrogênio para oxidar a enzima inativa para formar o complexo I. Ao transferir elétrons ao substrato (AH_2) e formar o produto radicalar ($^*\text{AH}$), a enzima oxidada passa para o complexo II, que novamente oxida outra molécula de substrato, regenerando-se para a forma nativa. Outros halogênios, como Br^- , I^- e SCN^- , também podem ser oxidados pelo composto I (adaptado de HAMPTON et al., 1998).

3.2.3 Cloraminas

O HOCl forma grupos de oxidantes conhecidos como cloraminas, através da sua reação com aminas primárias ou secundárias, prontamente disponíveis em sistemas biológicos (THOMAS et al., 1986; WEISS, 1989; VELLOSA, 2005;). Tais cloraminas são oxidantes de vida longa e sua reatividade depende de sua lipossolubilidade. A monocloramina (NH_2Cl), formada pela reação entre HOCl e amônia, é muito lipossolúvel e mais reativa do que o próprio HOCl (BABIOR, 2000). O β -aminoácido taurina, de maior abundância em neutrófilos (ZGLICZYNSKI et al., 1971) e assim um alvo importante nestas células, reage com o HOCl formando taurina cloramina (TauCl). As cloraminas, particularmente a monocloramina, estão relacionadas à injúria gástrica observada na presença de *Helicobacter pylori*, que produz elevadas quantidades de amônia e ativa os neutrófilos que produzem ácido hipocloroso (LAPENNA; CUCCURULLO, 1996;). As cloraminas de β -aminoácidos sofrem degradação para aldeídos potencialmente tóxicos (VASCONCELOS et al., 2007).

3.3 Radicais livres sintéticos utilizados nos ensaios de atividade antioxidante

3.3.1 Radical DPPH•

As metodologias mais comuns para se determinar a atividade antioxidante de modo prático, rápido e sensível são as que envolvem um radical cromóforo, simulando as ERO, como o radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazina (DPPH) um dos mais utilizados (ARNAO; CANO; ACOSTA., 2000). O radical livre DPPH• é um cromóforo muito estável, com um pico de absorção em 517 nm, em meio etanólico, apresentando coloração violeta intensa (BLOIS, 1958; ARNAO; CANO; ACOSTA., 2000). À medida que o DPPH sofre redução pelos componentes presentes nas amostras (antioxidante), observa-se mudança da coloração da solução original de violeta intensa para amarela, proporcional à concentração do composto com potencial antioxidante em teste, com monitoramento pela diminuição de absorbância a 517 nm (BLOIS, 1958). Na Figura 21 está ilustrada a reação do radical DPPH antes e após sua redução pela quercetina (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007)

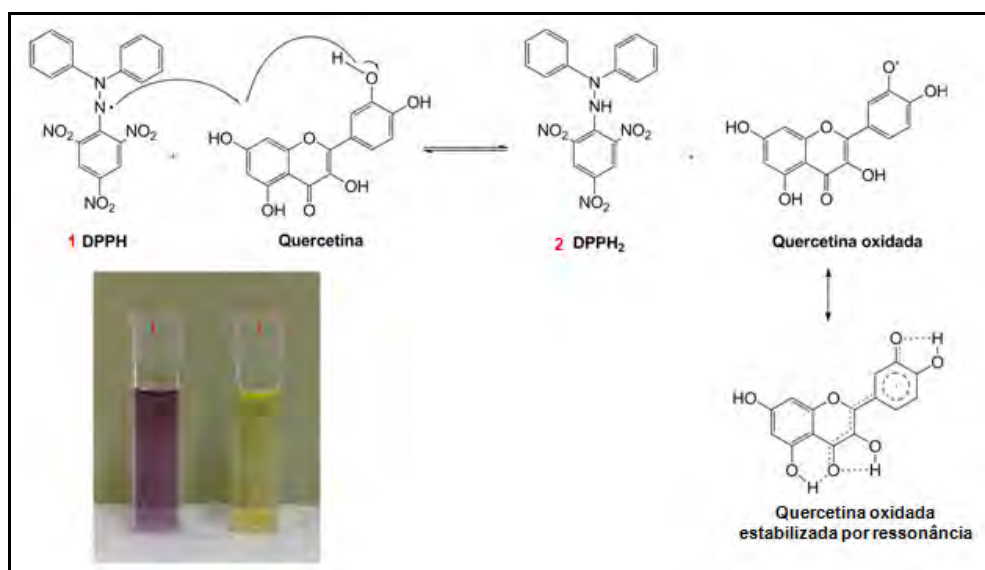


Figura 21– Estrutura do DPPH antes e após reação com antioxidante (quercetina); (<http://qnint.s bq.org.br/qni/>).

3.3.2 Cátion radical ABTS^{•+}

Uma opção relativamente econômica e prática para avaliar a atividade antioxidante são via captura do radical ácido 2,2'-azinobis(3-eilbenzotiazolinico-6-sulfônico), (ABTS^{•+}) (MILLER; RICE-EVANS, 1997), indicado para ensaios de compostos coloridos, como o caso das antocianinas, por apresentar absorção máxima próxima a região do infravermelho (734nm) reduzindo possibilidade de interferência de compostos coloridos que absorvem na região do visível (TSUDA et al., 1994). O composto cromógeno ABTS apresenta coloração clara de azul esverdeado com máximo de absorção a 342 nm, é solúvel em água e quimicamente estável (ANTOLOVICH et al., 2002).

O radical ABTS^{•+} (Figura 22) pode ser gerado através de uma reação química do ABTS com persulfato de potássio (K₂S₂O₈), por eletroquímica, pela ação das peroxidases e mioglobina, passando a apresentar coloração verde esmeralda escuro, com absorção em 414, 645, 734 e 815 nm (RE et al, 1999; ROBARDS et al., 1999; VAN DER BERG et al., 1999; SELLAPPAN et al., 2002). A forma radicalar do ABTS sofre ação redutora de compostos antioxidante permanecendo na forma incolor. Este efeito pode ser observado espectrofotometricamente pelo decréscimo da absorvância a 735 nm, sendo um método utilizado para determinar a atividade antioxidante de compostos com natureza hidrofílica e lipofílica (PELLEGRINI et al., 1998; RE et al., 1999; KUSKOSKI et al., 2005; HALLIWELL et al., 2007).

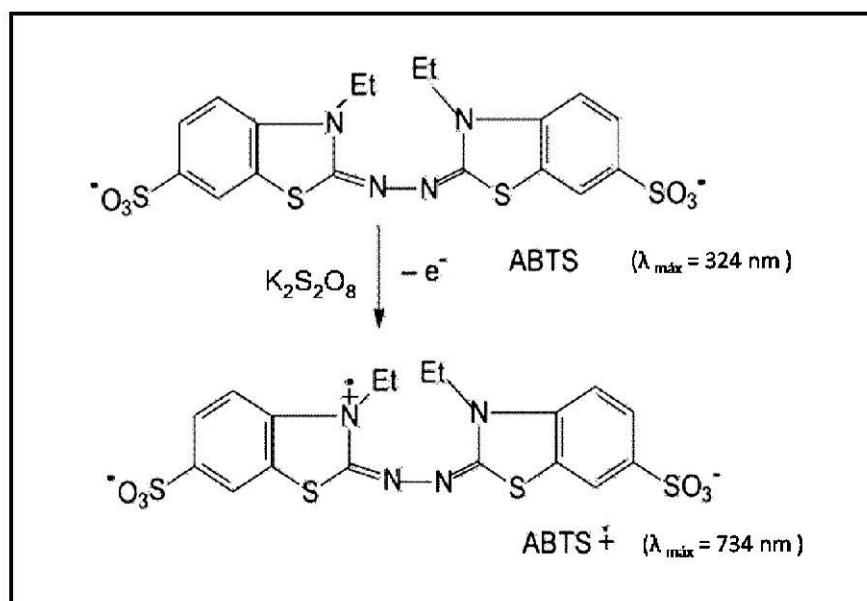


Figura 22 – Oxidação do ABTS pelo $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (PELLEGRINI et al., 1998).

3.3.3 Radical AAPH

Um sistema químico bastante utilizado para simular um processo oxidativo e, dessa forma, avaliar o potencial antioxidantes *in vitro* é a termólise do azo composto 2,2'-azobis-(2-amidinopropano) (AAPH). Trata-se de um azo composto solúvel em água e amplamente utilizado como um gerador não enzimático de radicais livres quando submetido à termólise (Figura 23). A sua decomposição leva a liberação do gás nitrogênio (N_2) e formação de radicais livres centrado em carbono, o 2-amidinopropil (C-radical). Estes radicais, por sua vez, reagem instantaneamente com o oxigênio dissolvido no meio de reação levando à produção de radicais peroxila ($\text{ROO}^\bullet$), (TANG; LIU, 2008; LIÉGEOIS et al, 2000).

A incubação de AAPH com eritrócitos a 37°C provoca sua hemólise de forma lenta e dependente da concentração deste gerador de radicais peroxila. Com esse princípio, a técnica de AAPH tem sido utilizada como um meio de simular um processo de lipoperoxidação da membrana celular associado à ERO (BANERJEE et al, 2008; LIÉGEOIS et al, 2000; NIKI, 1990).

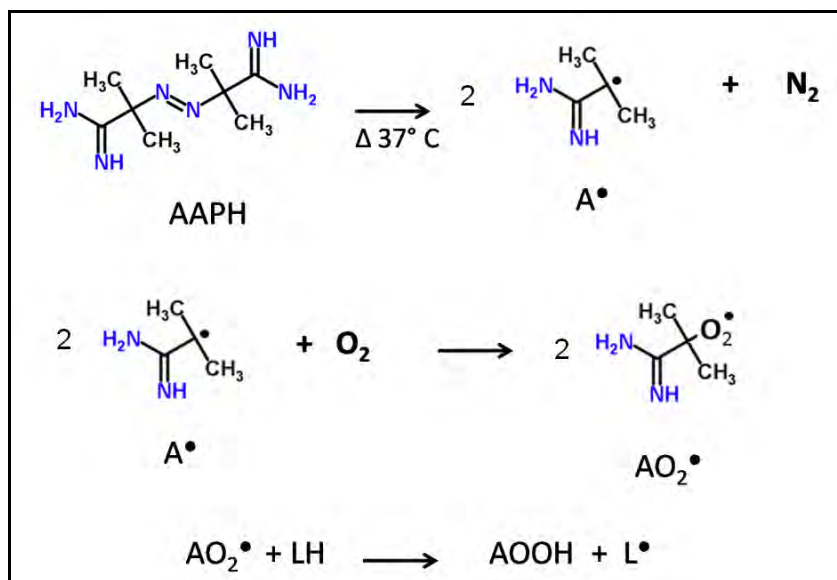


Figura 23 – Termólise do 2,2'-azobis(2-amidinopropano), APPH, e geração de radicais peroxilas (AOOH) e lipídicos ($\text{L}^\bullet$), (adaptado de PRYOR et al, 1993).

3.4 Antioxidantes

Os antioxidantes são um grupo de compostos que, se presentes em concentrações ideais em relação aos substratos oxidáveis, inibem ou atrasam significativamente os processos oxidativos, retardando e/ou prevenindo a oxidação de biomoléculas e assim os processos de reação em cadeia (AL-MAMARY et al., 2002; MOREIRA et al., 2001; CHANWITHEESUK et al., 2005; WU et al., 2005; LIMA et al., 2006), e consequentemente prevenir e/ou reparar os danos ocasionados às células pelas ERO (CHANWITHEESUK et al., 2005).

Em função dos possíveis problemas com o consumo de antioxidantes sintéticos, as pesquisas têm-se voltado no sentido de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante. A utilização de compostos naturais antioxidantes ou mesmo sintéticos encontrados na dieta é um dos mecanismos de defesa contra os radicais livres que tem sido

empregado nas indústrias de alimentos, cosméticos, bebidas e também na medicina, sendo que muitas vezes os próprios medicamentos aumentam a geração intracelular desses radicais (DOROSHOW, 1983; WEIJL et al., 1997; SOARES, 2002; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Os compostos com núcleo fenólico, como tocoferol, flavonoides e ácidos fenólicos se destacam por atuarem como eficientes captadores de ERO, além de reduzirem ou quelarem íons férrico que catalisam a peroxidação lipídica (AL-MAMARY et al., 2002; NAHAR; SARKER, 2005; DELAZAR et al., 2006).

Segundo Bianchi e Antunes (1999), os antioxidantes atuam em diferentes níveis na proteção dos organismos: impedindo a formação dos radicais livres - principalmente pela inibição das reações em cadeia promovidas pelo ferro ou cobre, interceptando os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou de fontes exógenas.

Os organismos eucariotos possuem enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase que reagem com oxidantes e protegem as células e os tecidos do estresse oxidativo (TRABER, 1997). Em adição aos efeitos protetores dos antioxidantes endógenos, a inclusão de antioxidantes na dieta é de grande importância assim como o consumo de frutas e vegetais está relacionado com a diminuição do risco do desenvolvimento de doenças associadas ao acúmulo de radicais livres (POMPELLA, 1997). A eficácia da ação antioxidante dos componentes bioativos naturais depende de sua estrutura e da sua concentração nos alimentos. Por sua vez, o teor destes compostos em vegetais é influenciado por fatores genéticos e ambientais, além do grau de maturação e variedade da planta, entre outros (MELO et al., 2006).

3.4.1 Antioxidantes presentes no organismo

3.4.1.1 Superóxido Dismutase (SOD)

A SOD (EC 1.15.1.1), catalisa a dismutação do $O_2^{\cdot-}$, convertendo-o em oxigênio e peróxido de hidrogênio. A decomposição do $O_2^{\cdot-}$ ocorre espontaneamente porém, por ser uma reação de segunda ordem, necessita da colisão entre duas moléculas de $O_2^{\cdot-}$, de forma que há necessidade de maior concentração do $O_2^{\cdot-}$. A presença da enzima SOD favorece essa dismutação tornando a reação de primeira ordem, eliminando a necessidade de colisão entre moléculas. A ação desta enzima permite a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ mesmo em baixas concentrações. Existem duas formas de SOD no organismo, a primeira contém Cu^{2+} e Zn^{2+} como centros redox e ocorre no citosol, sendo que sua atividade não é afetada pelo estresse oxidativo. A segunda contém Mn^{2+} como centro redox, ocorre na mitocôndria e sua atividade aumenta com o estresse oxidativo (BABIOR, 2000).

3.4.1.2 Catalase (CAT)

A CAT (EC 1.11.1.6) é uma hemoproteína citoplasmática que catalisa a redução do H_2O_2 a H_2O e O_2 . É encontrada no sangue, medula óssea, mucosas, rim e fígado (MAYES, 1990). Sua atividade é dependente de NADPH (SCOTT et al, 1991). A suplementação de CAT exógena previne a oxidação da GSH mediada pelo H_2O_2 , em eritrócitos, e também inibe as lesões oxidativas do DNA devido à sobrecarga de Fe^{3+} (ARUOMA et al., 1989). Em modelo de estresse oxidativo decorrente de agressão térmica, os eritrócitos exibem diminuição da atividade da catalase durante o processo hemolítico termodependente (HATHERILL et al., 1991).

3.4.1.3 Glutathione Peroxidase (GSH-Px)

A GSH-Px (EC 1.11.1.9) catalisa a redução do peróxido de H_2O_2 e peróxidos orgânicos para seus correspondentes alcoóis às custas da conversão da glutathione reduzida (GSH) a sua forma oxidada (GSSG) (HERSHKO, 1989; ROVER JUNIOR et al., 2001; BARREIROS ; DAVID; DAVID, 2006) , como mostra a Figura 31. Embora a GSH-Px tenha ação fundamentalmente citosólica, *in vitro* ela é capaz de reduzir hidroperóxidos de membrana (HEBBEL, 1986). Em modelo de hemocromatose experimental, Galleno e Puntarulo (1994) demonstraram redução de 36% na atividade da GSHPx em fígado de ratos.

3.4.1.4 Glutathione Redutase (GSH-Rd)

Após exposição da GSH ao agente oxidante, ocorre sua oxidação a GSSG (HERSHKO, 1989) (Figura 32). A recuperação da GSH é feita pela enzima GSH-Rd (EC 1.8.1.7), uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular (GILBERT; MC LEAN, 1990; ROVER JUNIOR et al., 2001; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; VASCONCELOS et al, 2007). Habitualmente, a reserva intracelular de GSH-Rd é alta e somente uma grave deficiência desta enzima resultará em sinais clínicos (FRISCHER; AHMAD, 1987). A GSH-Rd é uma flavoproteína dependente da nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida (NADPH) e, portanto, também dependente da integridade da via das pentoses (ROSS; MOLDEUS, 1991). Sob condições de diminuição do fornecimento de NADPH, como no jejum e na deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD, EC 1.1.1.49), há prejuízo da função da GSH-Rd (SHAN et al, 1990).

3.4.1.5 Glutathione Reduzida (GSH)

A glutathione reduzida (GSH, L-g-glutamyl-L-cisteinyl-glicina), Figura 24, presente na maioria das células, é o tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular (HEBBEL, 1986;

FERREIRA; MATSUBARA, 1997; ROVER JUNIOR et al., 2001; BARREIROS ; DAVID; DAVID, 2006; VASCONCELOS et al, 2007). Sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento -SH, presente na cisteína. A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra a lesão resultante da exposição a agentes como íons ferro, oxigênio hiperbárico, ozônio e radiação (luz ultravioleta). Além disto, diminui a suscetibilidade à lesão renal decorrente da isquemia e reperfusão; atua como transportadora e reservatório da cisteína e participa da detoxificação de agentes químicos e da eliminação de produtos da lipoperoxidação. Ainda, é requerida para a síntese de DNA, de proteínas e de algumas prostaglandinas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

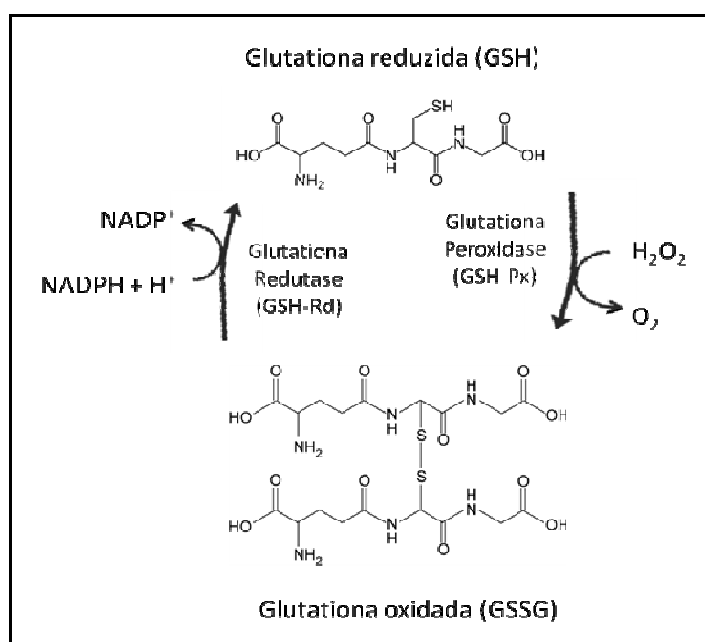


Figura 24 – interconversão da glutatona nas suas formas reduzidas (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas glutatona peroxidase (GSH-Px) e glutatona redutase (GSH-Rd) (adaptação de ROVER JUNIOR et al., 2001).

3.4.1.6 Ácido Ascórbico

O ácido ascórbico, vitamina C, possui fórmula química $C_6H_8O_6$, é comumente encontrado em nosso organismo na forma de ascorbato. Por ser muito solúvel em água, está localizado nos compartimentos aquosos dos tecidos orgânicos. O ascorbato desempenha papéis metabólicos fundamentais no organismo humano, atuando como agente redutor, reduzindo metais de transição (em particular Fe^{3+} e Cu^{2+}) presentes nos sítios ativos das enzimas ou nas formas livres no organismo (HALLIWELL, 1999; BARREIROS ; DAVID; DAVID, 2006).

O ácido ascórbico (I) é uma cetolactona de seis carbonos, sendo um potente agente redutor que se oxida facilmente e de modo reversível a ácido dehidroascórbico (II) que possui ainda propriedades de vitamina C. A atividade biológica da vitamina C se perde quando o ácido dehidroascórbico se transforma, pela quebra do anel lactônico, em ácido 2,3-dicetogulônico (III), (SILVA et al, 1995; BARREIROS ; DAVID; DAVID, 2006), como observado na Figura 25.

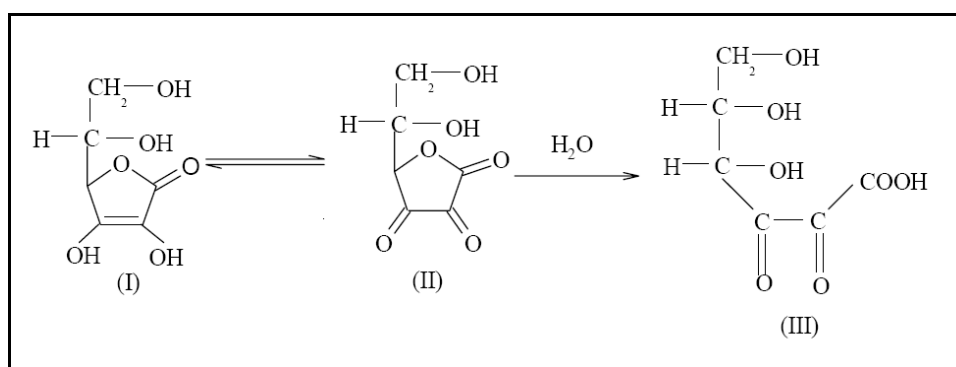


Figura 25 – Mecanismo de conversão do ácido ascórbico em ácido dehidroascórbico.

A transformação de ácido ascórbico (I) em dehidroascórbico (II) e em produtos subsequentes varia com as condições existentes, sendo o fator de maior influência a pressão parcial do oxigênio, o pH, temperatura e radicais livres ($RL^\bullet$), como mostra a Figura 26 (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

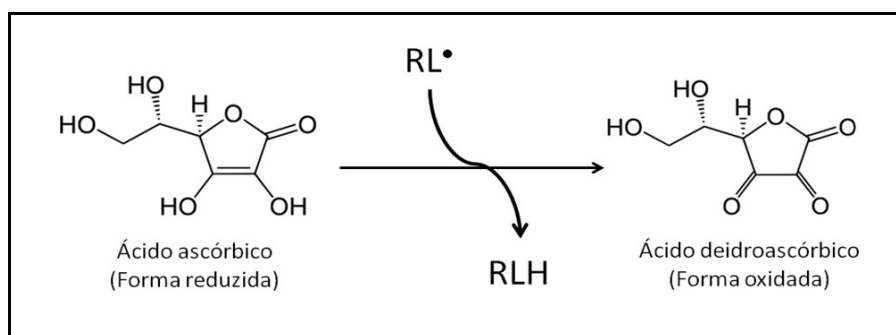


Figura 26 – Oxidação do ácido ascórbico à deidroascórbico na redução de radicais livres (baseado de BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

O ascorbato possui também a propriedade pró-oxidante onde indiretamente, na presença de ferro livre, pode induzir a geração de radicais livres. Porém, em função do ferro estar complexado às proteínas, em situação normal, as propriedades antioxidantes do ascorbato suplantam suas propriedades pró-oxidantes (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Ascorbato pode atuar contra a peroxidação de lipídios de duas maneiras: no plasma sanguíneo, atuando na prevenção através da reação com as ERO e ERN presentes, ou na restauração doando hidrogênio ao radical lipídico, propagador da peroxidação lipídica. Por outro lado, nas membranas celulares ele atua em parceria com o α -tocoferol. O radical livre normalmente abstrai um próton do carbono metilênico alílico, e o radical lipídico formado rapidamente adiciona oxigênio tripleto gerando o radical lipídico-peroxila. Nesta etapa, o tocoferol age doando um hidrogênio para esse radical formando o lipídio-hidroperóxido e o radical tocoferoxila. O ascorbato na interface da membrana celular regenera o tocoferol doando um hidrogênio, transformando-se em semidesidroascorbato (Figura 27) (MAY, 1998; HALLIWELL, 1999; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

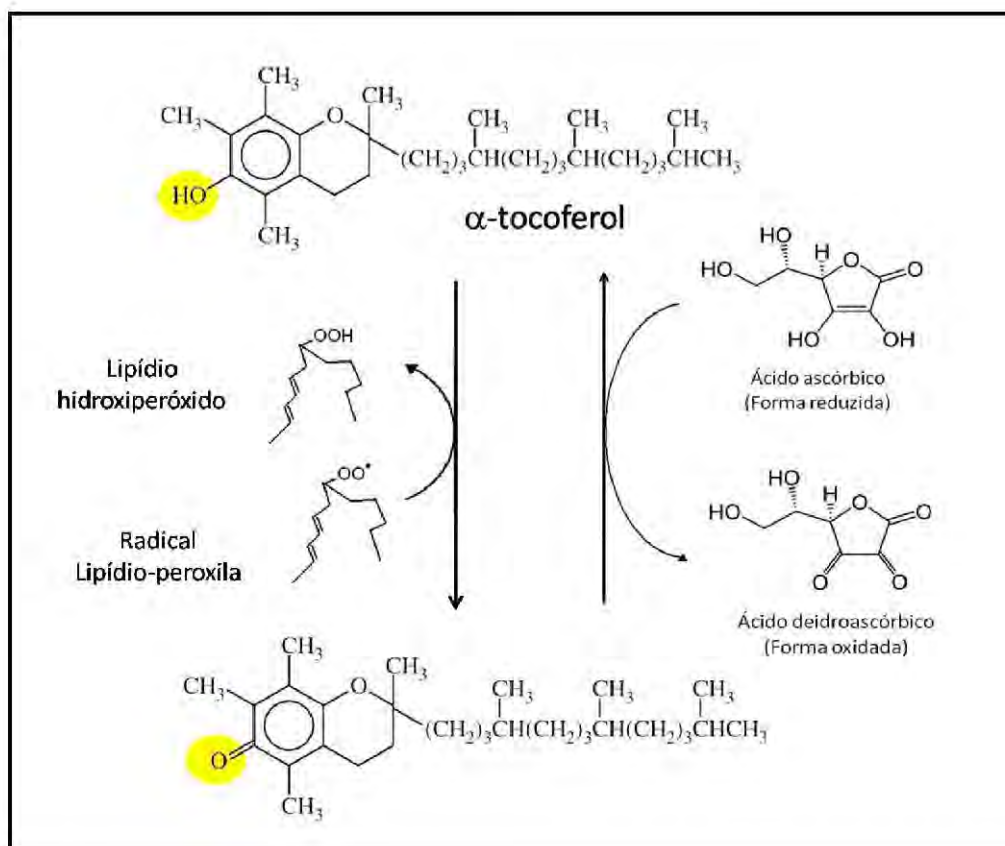


Figura 27 – Reciclagem do radical lipídio-peroxila pelo α -tocoferol e do α -tocoferol pelo ácido ascórbico (adaptado de MAY, 1998)

3.4.1.7 Carotenoides

Os carotenoides são pigmentos intensamente coloridos, lipossolúveis, sintetizados por vegetais e microorganismos. Dentre os carotenoides, o β -caroteno (Figura 28) é a mais importante fonte de vitamina A (retinol, produto da hidrólise) (DEVLIN, 1992; LEHNINGER et al., 1993; VASCONCELOS et al., 2007). Eles formam um tipo incomum de agentes redutores biológicos, pois são mais eficazes na presença de baixos níveis de oxigênio, pois altos níveis de oxigênio levam à destruição dos carotenóides (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; VASCONCELOS et al., 2007).

Os carotenóides agem *in vivo* como supressores do oxigênio singlete ou como sequestradores dos radicais peroxila, reduzindo a oxidação do DNA e lipídios, o que está

associada a doenças degenerativas, como câncer e doenças cardíacas (BARREIRO; DAVID; DAVID, 2006; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

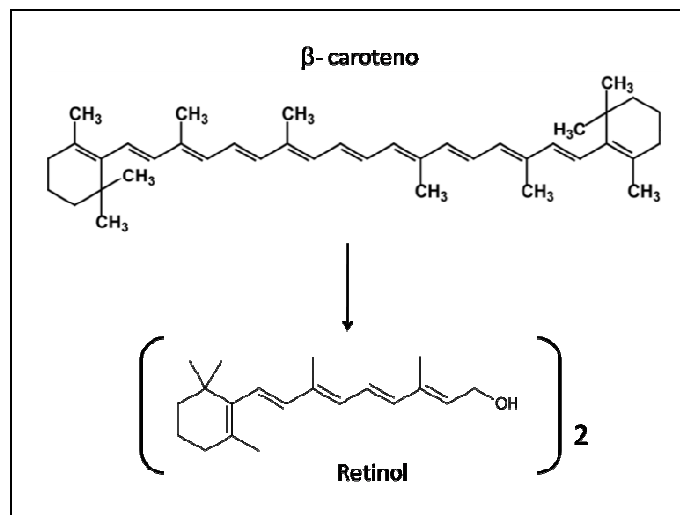


Figura 28 – Hidrólise do caroteno em retinol (VASCONCELOS et al., 2007)

3.4.1.8 Coenzima Q_{10}

A coenzima Q_{10} é uma ubiquinona lipossolúvel que possui uma longa cadeia isoprenóide lateral. A ubiquinona é o único lipídio endogenamente sintetizado que apresenta função redox (DEVLIN, 1992; LEHNINGER et al., 1993; VASCONCELOS et al., 2007).

Sua forma reduzida ubiquinol-10 ($CoQH_2$), ocorre predominantemente no coração, rins e fígado e a forma oxidada ubiquinona (CoQ_{10}) é abundante no cérebro e intestino (VASCONCELOS et al., 2007). A principal função da ubiquinona acontece na membrana mitocondrial interna, onde participa da cadeia de transporte de elétrons e translocação de prótons H^+ na mitocôndria, juntamente com os citocromos e as desidrogenases mitocondriais. As desidrogenases oxidam os NADH, NADPH e $FADH_2$ e transferem prótons e elétrons para a ubiquinona, convertendo-a em ubiquinol. Este por sua vez transfere prótons para a matriz mitocondrial e elétrons para os citocromos. Dessa forma, citocromos reduzem o O_2 para H_2O .

com esses elétrons e prótons da matriz. Todo esse processo é indispensável para produção de ATP (DEVLIN, 1992; LEHNINGER et al., 1993; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Outra importante função da ubiquinona é a regeneração do tocoferol na membrana mitocondrial, onde exerce a mesma função regenerativa que o ascorbato exerce na membrana celular. O ubiquinol doa um hidrogênio radicalar para o radical tocoferil, gerando ubiquinona semiquinona e α -tocoferol. O prosseguimento dessa reação gera ubiquinona e regenera mais uma molécula de α -tocoferol (Figura 29) (VASCONCELOS et al., 2007; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

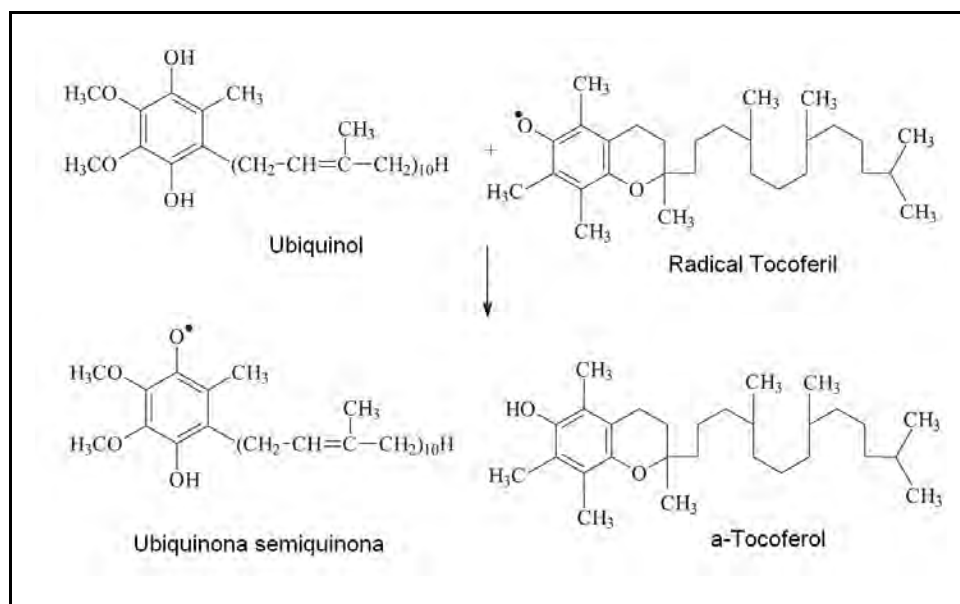


Figura 29 – Regeneração do tocoferol pelo ubiquinol (BARREIROS ; DAVID; DAVID, 2006).

A ubiquinona apresenta propriedades de desativação do $O_2^{\bullet-}$ (pois este após ser gerado na mitocôndria é imediatamente oxidado pela ubiquinona formando O_2 e a forma reduzida ubiquinol). As insaturações presentes na cadeia lateral da ubiquinona e ubiquinol participam na desativação do oxigênio singlete 1O_2 . Uma última atividade relevante da ubiquinona na mitocôndria é a redução do nitrito (NO_2^-) a óxido nítrico ($NO^{\bullet}$), que é um agente bioregulador (VASCONCELOS et al., 2007).

3.4.1.9 Ácido úrico

O ácido úrico é a principal forma de excreção de nitrogênio de répteis e de aves. Nos mamíferos, é produto secundário de excreção, derivado do metabolismo das bases purínicas (adenina e guanina). Na maioria dos tecidos orgânicos encontra-se na forma de ânion urato (DEVLIN, 1992; LEHNINGER et al., 1993; HENRY, 2002).

Nos anos 80 foi demonstrado que é um antioxidante efetivo nos sistemas biológicos, capaz de proteger o DNA e lipídios de ERO e ERN. A alta polaridade do ácido úrico restringe sua atividade ao meio aquoso. A sua concentração nos compartimentos aquosos do organismo encontra-se muito próxima do limite de solubilidade (300 μM). Indivíduos com aterosclerose podem apresentar nível elevado de ácido úrico no sangue, que é indicativo da existência de um mecanismo compensatório encontrado pelo organismo para controlar o estresse oxidativo (NIETO et al., 2000).

No mecanismo antioxidante do urato há formação do radical urato estabilizado (Figura 30). Devido ao baixo $\text{pK}_a=3,1$ do radical urato, esse se encontra na forma de ânion radical urato, o que facilita a doação de um próton em conjunto com o elétron (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; VASCONCELOS et al., 2007).

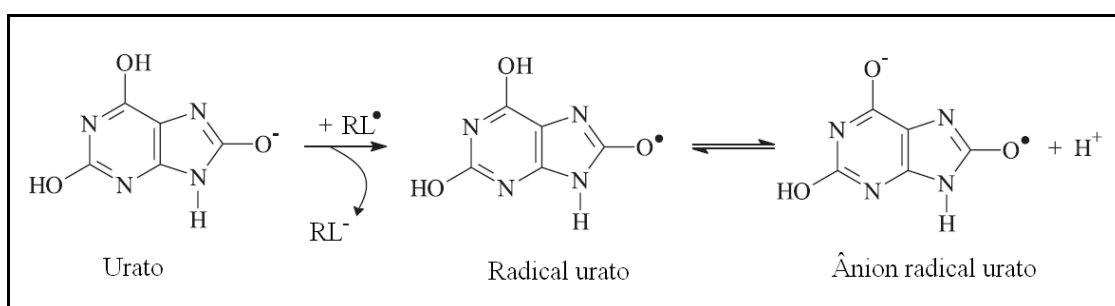


Figura 30 – Mecanismo antioxidante dos uratos (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006)

O urato reage rapidamente com o radical hidroxila ($\text{HO}^\bullet$), porém é inerte às espécies superóxido ($\text{HOO}^\bullet$), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), oxigênio inglete ($^1\text{O}_2$), peróxidos orgânicos (ROOH) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Sua reação mais importante é com os radicais

peroxila ($\text{ROO}\bullet$) e $\text{NO}_2\bullet$ (gerando NO_2^-), sendo estas as bases do seu efeito antioxidante e protetor de DNA e lipídios. O urato é capaz de recuperar estruturas já atacadas que se tornaram radicais livres através da doação de um elétron e um próton. Ele também é responsável pela estabilização do ascorbato no plasma sanguíneo, inibindo a reação de Fenton através de sua capacidade de quelar íons metálicos como Fe^{+3} , Fe^{+2} , Cu^{+2} e Cu^{+} (Figura 31). O ânion radical urato pode ser regenerado a urato pelo ascorbato, gerando semidesidroascorbato (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; VASCONCELOS et al., 2007).

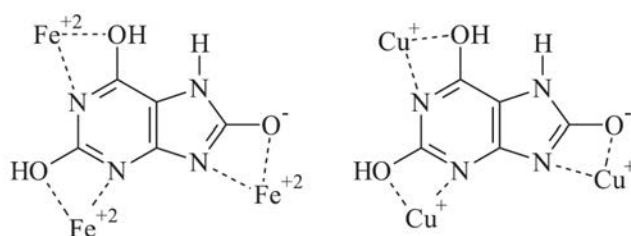


Figura 31 – Ação quelante de metais pelos uratos (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006)

O ácido úrico apresenta atividade antioxidante significativa e sua concentração no plasma é maior que a de outros antioxidantes, como vitaminas C e E (VASCONCELOS et al., 2007).

3.5 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo (EO) corresponde a um desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes que resulta na indução de danos celulares pelos radicais livres (SIES, 1993). Ocorre quando a produção de ERO e/ou ERN estão aceleradas ou quando os mecanismos envolvidos na proteção contra estas espécies encontram-se deteriorados (GLASSON et al., 2002). Predisposição genética, fatores ambientais como radiação UV e as propriedades

intrínsecas específicas de grupos celulares podem exacerbar o dano oxidativo ou diminuir a capacidade das células de se defender destes agentes agressores (GIASSON et al., 2002).

A ocorrência de um estresse oxidativo moderado frequentemente é acompanhada do aumento da defesa antioxidante enzimática, mas a produção de uma grande quantidade de radicais livres pode causar danos e morte celular (ANDERSON, 1996). A peroxidação lipídica é a principal consequência do estresse oxidativo e resultando em, dano às membranas e aumento da fluidez da mesma, comprometimento da sua integridade e inativação das interações entre membrana/receptor ou membrana/enzima. Ocorrendo na membrana celular, a oxidação de lipídios interfere no transporte ativo e passivo normal e ainda pode ocasionar a ruptura desta, levando à morte celular. A oxidação de lipídeos no sangue (principalmente a LDL) facilita o acúmulo desses lipídios na parede dos vasos, com consequente aterosclerose, trombose, infarto ou acidente vascular cerebral (BARREIROS, DAVID e DAVID, 2006).

Postula-se que as doenças degenerativas crônicas como aterosclerose, diabetes melito, câncer, envelhecimento celular precoce e patologias como mal de Alzheimer e mal de Parkinson, estejam relacionadas com o estresse oxidativo (SORG, 2004; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Evidências indicam que o estresse oxidativo está relacionado com a oxidação lipídica, protéica e do DNA, responsáveis pelas complicações mais tardias do diabetes (RÖSEN et al., 2001; BROWNLEE, 2001). Para além desta capacidade de infligir dano macromolecular, as ERO podem funcionar como moléculas sinalizadoras que ativam vários processos bioquímicos sensíveis ao estresse tendo, por exemplo, como consequência a insulinoresistência e/ou a diminuição da secreção de insulina (EVANS et al., 2003).

Entende-se que indivíduos portadores da Síndrome de Down possuem maiores susceptibilidades ao estresse oxidativo (AGUIAR-da-SILVA; MORAES; MORAES, 2003). A Síndrome de Down, doença cromossômica que apresenta trissomia do cromossomo 21, apresenta a região 21q22, onde se localiza o gene que codifica a superóxido dismutase-1 (SOD-1). A cópia extra do gene da superóxido dismutase-1 (SOD-1) confere aos portadores da Síndrome de Down uma atividade da enzima aumentada em 50% em diferentes tipos de células – eritrócitos, leucócitos, plaquetas e fibroblastos. Isto proporcionaria um quadro de agressão endógena constante, dada a aceleração da reação de formação de peróxido de

hidrogênio (H_2O_2) e pelo desequilíbrio entre a atividade da SOD-1 e glutathiona peroxidase (GSH-Px) (YIM, CHOCK, STADTMAN, 1990; GRONER et al., 1994), com a conseqüente oxidação dos grupos sulfidrílas e peroxidação dos lipídios insaturados causando danos celulares (WOLF; GARNER; DEAN, 1986). Estes pacientes trissômicos possuem algumas características como envelhecimento precoce, dano cerebral e modificações bioquímicas que são secundárias ao dano oxidativo intracelular, o que tem sido atribuído ao desequilíbrio genético-bioquímico.

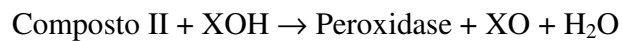
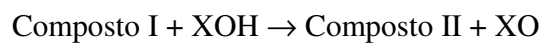
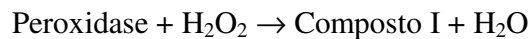
3.6 Enzimas como ferramentas para o estudo antioxidante

3.6.1 Peroxidases

As peroxidases são enzimas que oxidam varios substratos utilizando peróxido de hidrogênio como co-substrato (SAUNDERS, 1973). A enzima nativa contém um grupamento heme, geralmente ferroprotoporfirina IX, com quatro nitrogênios pirrólicos ligados ao Fe(III). A quinta posição de coordenação na porção proximal do heme está ocupada por um resíduo de histidina. A sexta posição de coordenação permanece livre na enzima nativa na porção distal do heme (O'BRIEN, 2000). Peroxidases são encontradas tanto em animais como em vegetais, sugerindo que tais enzimas devam ser uma parte essencial de todos os seres vivos (BRUNETTI; FARIA-OLIVEIRA, 1995). As peroxidases de plantas, como a peroxidase de raiz forte, "*horseradish peroxidase*" (HRP, EC 1.11.1.7), consistem de cadeias polipeptídicas contendo cerca de 300 resíduos de aminoácidos (42,1 KDa de massa molecular) e o heme ligado não covalentemente (O'BRIEN, 2000). A HRP é provavelmente, a peroxidase mais estudada e pode ser facilmente extraída da planta "rábano silvestre ou raiz forte", da qual provém seu nome. As peroxidases de mamíferos são muito maiores (576-738 aminoácidos) e apresentam o grupamento heme ligado covalentemente (O'BRIEN, 2000).

O mecanismo pelo qual a HRP age na oxidação de seus substratos ocorre com uma interação inicial da enzima nativa (pico máximo de absorbância em 403nm) com peróxido de

hidrogênio promovendo alteração conformacional na enzima de tal forma a expor o sítio ativo e originando o composto I (HRP I), o que pode imediatamente interagir com um substrato redutor gerando a enzima na forma de composto II – HRP II (pico máximo de absorbância em 420 nm) e capaz de converter uma outra molécula do substrato em produto e retornar à forma nativa (O'BRIEN, 2000). A oxidação de xenobióticos (XOH) por peroxidases pode ser representada pelo ciclo de reações a seguir (DUNFORD, 1991):



Berglund e colaboradores deduziam que a HRP apresenta cinco estados de oxidação, como ilustrados na Figura 32.

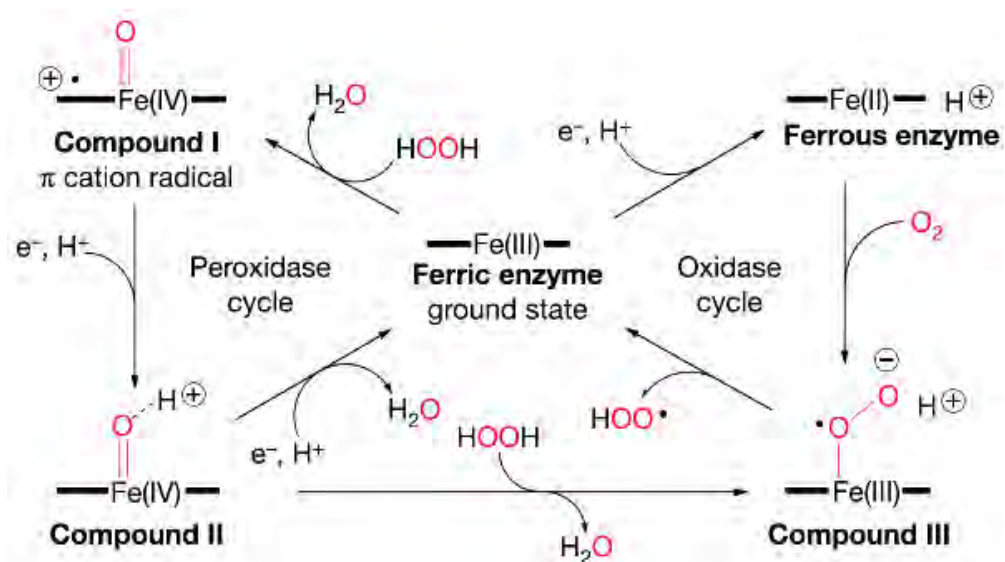


Figura 32 – Mecanismo catalítico da *horseradish peroxidase* (BERGLUND et al, 2002)

A família de peroxidases humanas inclui a mieloperoxidase (MPO), peroxidase eosinofílica (EPO), lactoperoxidase (LPO), peroxidase salivar (SPO), peroxidase da tireóide (TPO) e a prostaglandina endoperoxídeo sintase (PGHS). A histidina distal das peroxidases de mamíferos age como um catalisador do tipo ácido/básico auxiliando a desprotonação do hidroperóxido e a protonação da água após a clivagem da ligação “oxigênio-oxigênio” (O'BRIEN, 2000).

A MPO (E.C. 1.11.1.7) é uma proteína catiônica em pH fisiológico e, portanto, capaz de se ligar a estruturas biológicas aniônicas, tais como fosfolipídeos de membranas celulares, o que em conjunto com sua propriedade de catalisar a geração de HOCl pode favorecer a injúria celular (WEISS, 1989; HAMPTON et al., 1998). Assim em especial, o mecanismo de reação da MPO envolve a reação da forma férrica (MPO^{3+}) com H_2O_2 para formar um intermediário redox – composto I, o qual oxida íon cloreto produzindo ácido hipocloroso (HOCl) (ou SCN^- , formado tiocianato, $^-\text{OSCN}$). Substratos redutores (RH) reduziriam o composto II e inibiriam a produção de HOCl a não ser que $\text{O}_2^{\bullet-}$ ou outra molécula do substrato redutor esteja presente para reciclar a enzima (HAMPTON et al., 1998), como observado Figura 33.

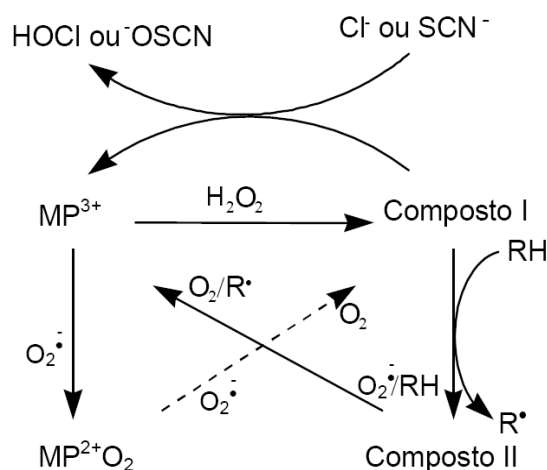


Figura 33 – Ciclos conhecidos para MPO (HAMPTON et al., 1998).

A MPO já foi encontrada em lesões de aterosclerose humana (DAUGHERTY et al., 1994), sugerindo uma possível participação de oxidantes clorados nos processos aterogênicos (LAPENNA E CUCCURULLO, 1996). Neste contexto, o HOCl pode modificar lipoproteínas de baixa densidade para uma forma mais aterogênica, aparentemente como resultado da oxidação de resíduos de lisina da apoproteína B-100 (HAZEL; STOCKER, 1993; HAZEL et al., 1994). O desenvolvimento de substâncias farmacologicamente capazes de antagonizar o HOCl, como sugerem alguns autores sobre alguns fármacos anti-inflamatórios (WASIL et al., 1987), rifampicina e tetraciclina (WASIL et al., 1988) e captopril (ARUOMA et al., 1991), podem ajudar no combate à injúria tecidual (LAPENNA; CUCCURULLO, 1996). A captura farmacológica do HOCl será terapeuticamente significativo se, na concentração do fármaco *in vivo*, a reação com o ácido hipocloroso for rápida o bastante para proteger as moléculas-alvo biologicamente importantes do seu ataque (LAPENNA; CUCCURULLO, 1996).



4 Objetivos

4 Objetivos

Considerando o crescente uso de produtos naturais na terapêutica, a participação da mieloperoxidase (MPO) em processos patológicos e os resultados promissores alcançados em estudos anteriores foi proposta deste trabalho o estudo do extrato bruto de *M. nigra* e de frações após partição (com diferentes compostos fenólicos e flavonoides).

No estudo do extrato e frações buscou-se:

- i) Estudar a ação antioxidante dos extratos e frações, traçando um perfil de ação supressora sobre diferentes ERRO, determinando os valores de IC₅₀;
- ii) Verificar a ação dos extratos e frações em ensaios enzimáticos cinéticos com *horseradish* peroxidase (HRP).
- iii) Avaliar o potencial citoprotetor e/ou citotóxico em eritrócitos humanos, na presença do extrato e das frações, observando seu papel hemolítico ou anti-hemolítico.
- iv) Verificar o potencial antimicrobiano do extrato bruto e frações sobre as cepas bacterianas e fúngicas.
- v) Realizar a partição e purificação por cromatografia em coluna e por CLAE-preparativa das FAcOEt, FBuOH e FAq.
- vi) Identificar por RMN os compostos fitoquímicos isolados e elucidar suas estruturas moleculares.
- vii) Deduzir as prováveis correlações entre os compostos fitoquímicos isolados e identificados com as atividades antioxidantes apresentadas nas frações de *M. nigra*.



5 Materiais e Métodos

5 Materiais e Métodos

5.1 Material vegetal

As folhas de *M. nigra* L. foram coletadas no Campus da UNESP de Araraquara – SP (21° 48' 51,42" S e 48° 12' 0,6" W), durante os meses de setembro a outubro de 2009.

A exsicata de *M. nigra* L. (Anexo 01) encontra-se depositada no Herbário Rioclarense do Instituto de Biociências da UNESP, Campus de Rio Claro, sob o número 51999 e supervisão do Prof. Dr. Júlio Antônio Lombardi.

5.2 Reagentes e Solventes

Os solventes e reagentes utilizados no presente trabalho estão apresentados a seguir:

Etanol (Merck)	NADH (Sigma)
Hexano (Merck)	Fosfato monobásico e dibásico de potássio (Merck)
DPPH (Sigma)	Pirofosfato de sódio (Merck)
Acetato de etila (Merck)	PMS (Sigma)
<i>n</i> -butanol (Merck)	NBT (Sigma)
Quercetina (Sigma)	MOPS
Ácido Gálico (Sigma)	Caldo <i>Müller Hinton</i> (Difco)
Metanol (Merck)	Ágar Sabouraud (Difco)
DMSO (Sigma)	Salina (NaCl) (Synth)
Reagente <i>Folin-Ciocalteu</i> (Sigma)	Ciprofloxacino
Carbonato de sódio 4% (Merck)	Fluconazol
Cloreto de alumínio 10% (Merck)	Caldo RPMI-1640 com L-glutamina sem bicarbonato de sódio
Acetato de sódio 1,0 M (Merck)	Glicose (Synth)
TMB (Sigma)	
ABTS (Sigma)	
Persulfato de potássio (Merck)	

Solventes utilizados no fracionamento e identificação dos compostos:

- Solventes comerciais BRENTAGLA, SINTH, VETEC, LABSYNTH e outros destilados na sala de destilação do Departamento de Química da UFSCar para obtenção de extratos e fracionamento dos mesmos.
- Solventes grau HPLC da JTB.
- Solventes deuterados da ALDRICH CHEMICAL COMPANY, ACROS ORGANICS, CIL - CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES, Inc. para obtenção de espectros de RMN.

5.3 Preparo do extrato hidroalcoólico de *Morus nigra* L.

A técnica de extração por maceração utilizou etanol a 70° GL como solvente extrator por apresentar uma boa matriz para a extração de fenóis e polifenóis e devido à sua propriedade antimicrobiana nesta concentração (COSTA, 2002; SIMÕES et al., 2007) o que se mostra interessante já que se empregou um tempo prolongado de extração.

As folhas de *M. nigra* L. foram secas em estufa a 40 °C e trituradas em moinho de facas. Uma massa de 400 g de folhas secas e trituradas foi submetida à extração com 4 L de solvente extrator etanol/água 70° GL durante um período de 72 horas, sob temperatura ambiente e abrigo da luz. O processo de maceração e filtração do sobrenadante foi realizado em quatro etapas (M1, M2, M3 e M4) e após 72 horas de maceração foi retirado apenas o solvente, mantendo-se a mesma massa de folhas, substituindo o solvente a cada 72 h (maceração exaustiva) e sendo os extratos reunidos, conforme fluxograma apresentado na Figura 34.

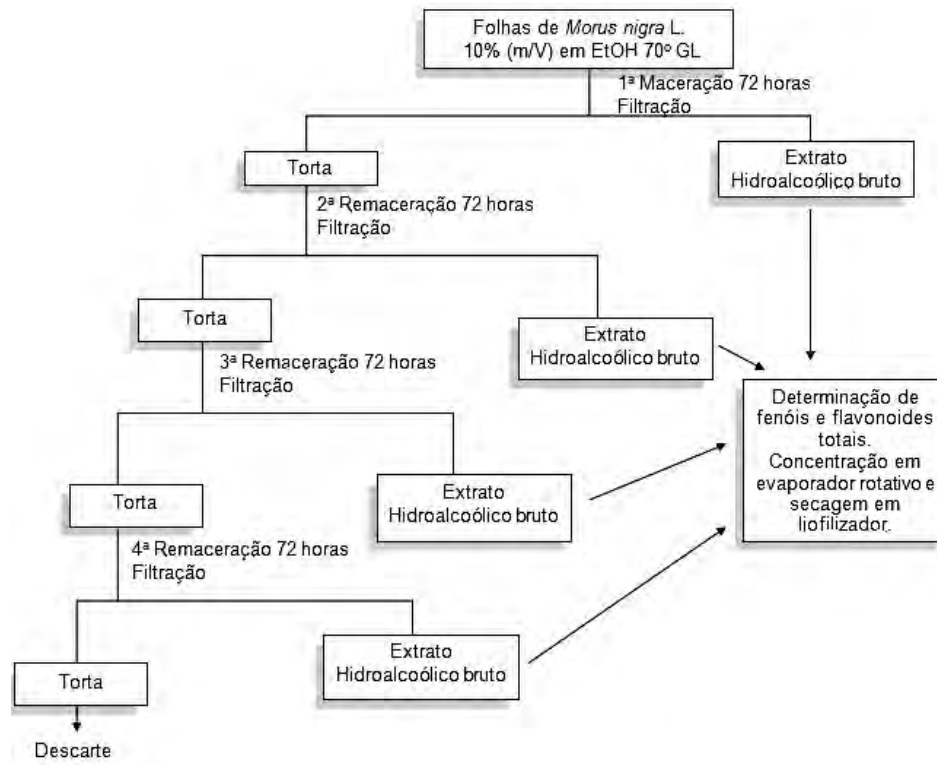


Figura 34 - Fluxograma da obtenção do extrato hidroalcoólico de folhas de *Morus nigra* L. por maceração.

5.4 Obtenção do extrato bruto etanólico seco

A solução extrativa etanólica, obtida na maceração, foi concentrada em evaporador rotativo MA 120 (Marconi[®]) a temperatura máxima de 40° C até a máxima retirada do etanol. O concentrado aquoso obtido foi liofilizado e seco em estufa a 37° C para a obtenção do extrato bruto etanólico seco (EBEtOH).

5.5 Fracionamento do extrato bruto etanólico (EBEtOH)

O EBEtOH seco (81,3 g) foi dissolvido em 500 mL água deionizada e fracionado por partição líquido-líquido, com igual volume de solventes extratores de polaridade crescente, inicialmente com hexano (Hex), seguido de acetato de etila (AcOEt) e finalizado com *n*-butanol (BuOH). Cada solvente extrator foi adicionado em volume igual ao da solução aquosa, até a observação da fase sobrenadante apresentar aspecto claro. Após cada partição, as fases correspondentes foram concentradas em evaporador rotativo, fornecendo as frações hexânica (FHex), acetato de etila (FAcOEt), *n*-butanólica (FBuOH) e aquosa final (FAq). Estas frações foram submetidas à pressão de N₂ até a máxima secura possível, e finalizada a completa secagem em estufa a 37° C. A Figura 35 mostra o fluxograma da partição.

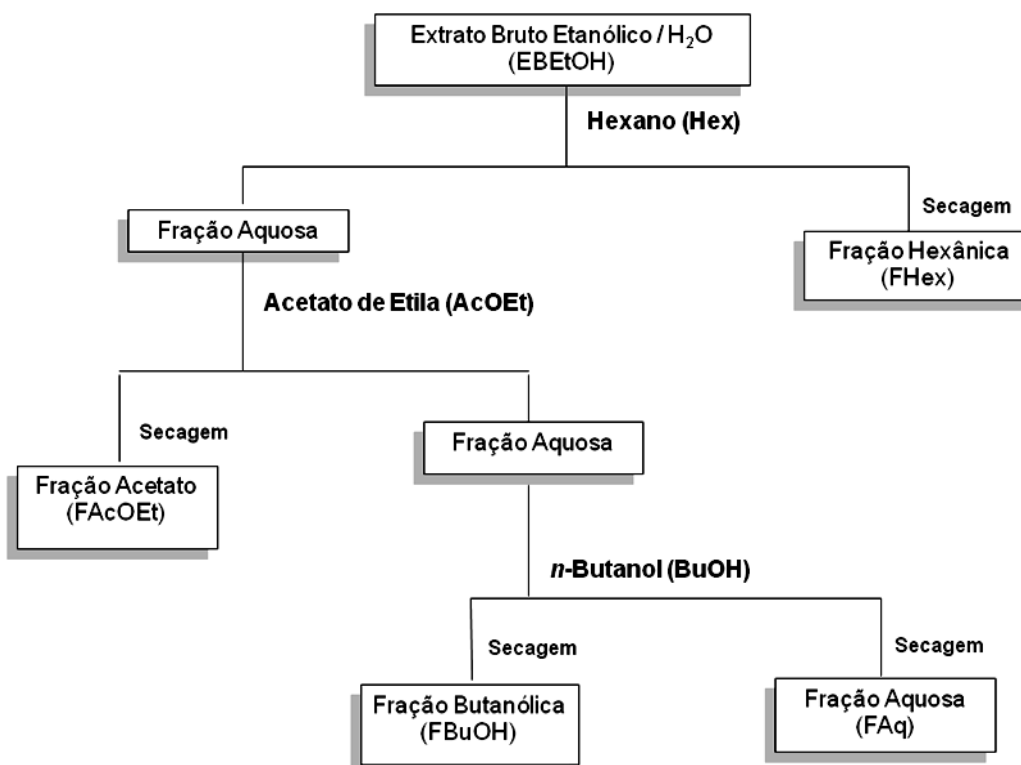


Figura 35 – Fluxograma da partição do extrato bruto etanólico de folhas de *Morus nigra* L.

5.6 Separação cromatográfica e purificação dos compostos fenólicos

Com o intuito de purificar e identificar os metabólitos secundários majoritários presentes nas frações das folhas de *M. nigra* utilizou-se as técnicas de cromatografia em coluna (CC), cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), e para a elucidação molecular dos compostos isolados, utilizou-se a técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN). Esses procedimentos só foram possível graças à parceria realizada com a equipe de pesquisa do prof. Dr. João Batista Fernandes (UFSCar).

5.6.1 Cromatografia em Camada Delgada – CCD

As frações FAcOEt, FBuOH e FAq foram submetidas à Cromatografia em Camada Delgada (CCD), visando uma análise para atividade antioxidante e fitoquímica preliminar. Para estes procedimentos foram utilizados placas de sílica Gel 60 F₂₅₄ (Merck) (0,25 mm) como fase estacionária, e como eluentes, misturas de diferentes proporções com os solventes hexano, clorofórmio, acetona, acetato de etila e metanol.

Para revelação das cromatoplas, foram utilizados reveladores específicos como solução metanólica de DPPH a 0,2 mg/mL, para determinação da atividade antioxidante (CAVIN et al., 1998; CERUKS et al., 2007) e revelação com luz Ultra-Violeta (254 e 365 nm) para detectar ligações duplas conjugadas (UGAZ, 1994).

5.7 Cromatografia, purificação e identificação das subfrações isoladas de *M. nigra*.

Após eluições em cromatografia líquida em coluna com Sephadex LH-20 e Sílica C-18, as frações foram avaliadas por CCD e reunidas e acordo com a semelhança antirradicalar ao DPPH. Sob a CCD, foi pulverizada solução metanólica do radical DPPH e a atividade

antioxidante foi verificada através do aparecimento de manchas amarelas sob o fundo violeta, de acordo com a literatura (BONDET et al., 1997; CAVIN et al., 1998; CERUSK et al., 2007).

5.7.1 Cromatografia em coluna da FAcOEt

A FAcOEt pós partição apresentou elevado teor de clorofila, que inviabilizavam o reconhecimento das bandas na CCD. Por este motivo, utilizamos uma cromatografia em coluna com sílica gel C18 (60 Å, 40 µm, *Sobent Technologies*), utilizando-se como fases móveis solventes orgânicos de polaridade decrescente: MeOH/H₂O (1:1), MeOH puro, MeOH/Acetona (1:1) e com acetona pura. As eluições cromatográficas (30 ml) foram coletadas e após secagem em capela, foram realizadas CCD para o agrupamento das subfrações de forma qualitativa (visual) mediante a mobilidade cromatográfica das bandas, observadas pela fluorescência a 254 e 365 nm, além da atividade supressora do radical DPPH. De acordo com essas propriedades, obtivemos seis subfrações, mas somente duas subfrações, denominadas FAcOEt-1 e FAcOEt-2 apresentaram atividade na CCD, conforme a Figura 36, que ilustra o fluxograma da cromatografia. As subfrações FAcOEt-3, FAcOEt-4, FAcOEt-5 e FAcOEt-6 não apresentaram atividade frente supressão do radical DPPH em CCD.

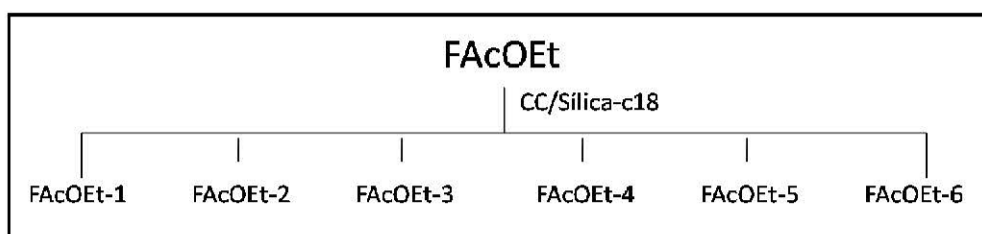


Figura 36 – Fluxograma da cromatografia em coluna com Sílica C18 para retirada da clorofila da FAcOEt.

As subfrações FAcOEt-1 e a FAcOEt-2 foram novamente submetidas a uma cromatografia em coluna, utilizando Sephadex LH-20, onde obtivemos, mediante as reuniões e identificação por UV e DPPH em CCD, as subfrações: para a FAcOEt-1 seis subfrações denominadas (FAc1.1, FAc1.2, FAc1.3, FAc1.4, FAc1.5, FAc1.6) e para a FAcOEt-2, obtivemos três subfrações (FAc2.1, FAc2.2 e FAc2.3). As subfrações FAc1.1 e FAc2.1 não apresentaram atividade de supressão do radical DPPH em CCD, sendo excluídas dos processos de purificação.

As subfrações FAc1.2, FAc1.3 e a FAc2.2 foram reunidas formando uma única subfração denominada FAc-1. As subfrações FAc1.4, FAc1.5 e FAc2.3, também foram reunidas em uma única subfração denominada FAc-2.

Tanto as subfrações FAc-1, quanto a FAc-2, foram precipitadas com MeOH puro, centrifugadas e separados os sobrenadantes dos precipitados. Esse procedimento foi realizado para a retirada de carboidratos insolúveis no MeOH. O sobrenadante e o precipitado das subfrações foram identificados como FAc-1 e FAc-2, precip-FAc-1 e precip-FAc-2.

As subfrações FAc-1 e FAc-2 foram submetidas a CLAE-preparativa C18. Inicialmente foi passado pelo CLAE a subfração FAc-2, obtendo dois picos, denominados FAc-2.1 e FAc-2.2. Logo em seguida foi passado a subfração FAc-1 onde foi possível isolar e coletar 4 picos, denominados FAc-1.1, FAc-1.2, FAc-1.3 e FAc-1.4, sendo que o último pico refere-se a limpeza da coluna com MeOH puro para a retirada de algum composto adsorvido na C18. Todos os picos isolados foram submetidos a análise por RMN.

O fluxograma das cromatografias realizadas com a fração FAcOEt estão ilustrados na Figura 37.

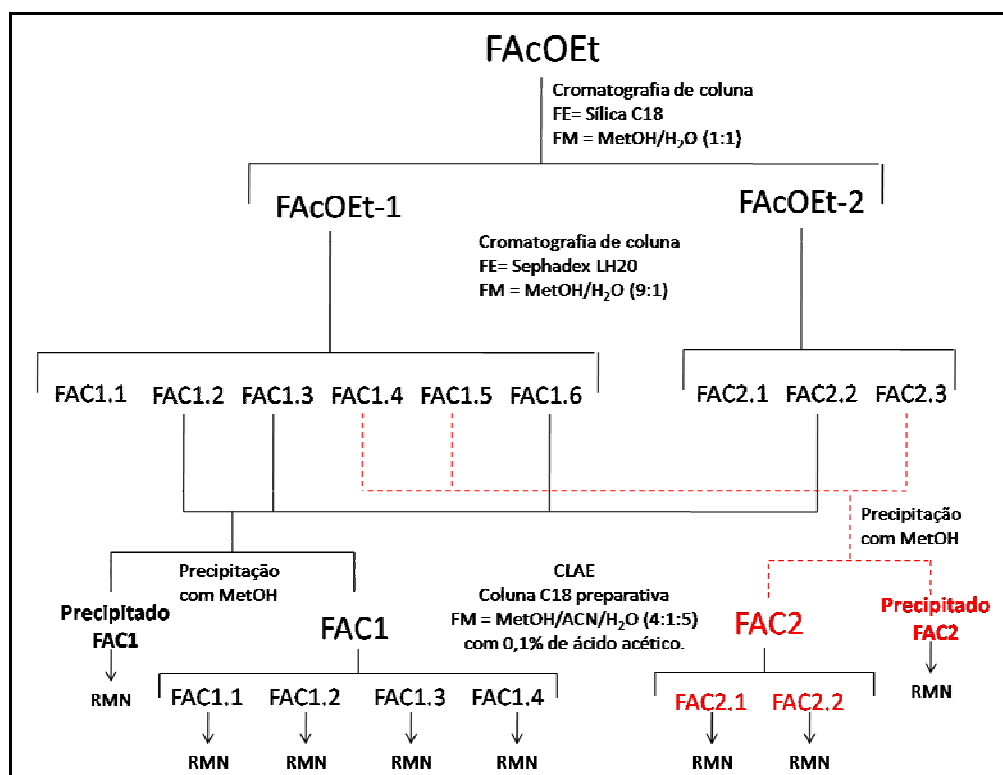


Figura 37 – Fluxograma das cromatografias realizadas com a fração FAcOEt.

5.7.2 Cromatografia em coluna da FbuOH

A massa da FbuOH (3,0 g) foi dividida em duas partes (com 1,5 g cada) e assim denominamos FbuOH-1 e FbuOH-2 para cada parte submetida à cromatografia em coluna com Sephadex LH-20 (Amersham Pharmacia Biotech AB), para uma purificação parcial.

A fração FbuOH-1, após reunião dos frascos que apresentavam semelhanças de mobilidade em CCD (frente à fluorescência a 265 e 365 nm, além da atividade supressora do radical DPPH), obtivemos cinco subfrações, denominadas FbuOH-1.1, FbuOH-1.2, FbuOH-1.3, FbuOH-1.4 e FbuOH-1.5.

A fração FbuOH-2, nas mesmas condições da anterior, foi possível obter seis subfrações, nomeadas FbuOH-2.1, FbuOH-2.2, FbuOH-2.3, FbuOH-2.4, FbuOH-2.5, FbuOH-2.6 e

FBuOH-2.7. As subfrações FBuOH-1.1 e FBuOH-2.7 não apresentaram supressão do radical DPPH em CCD, sendo excluídas dos processos de purificação.

A Figura 38 ilustra o fluxograma da cromatografia em Sephadex LH-20 da FBuOH.

Foram reunidas as subfrações de FBuOH-1 e FBuOH-2, formando uma única subfração, FBuOH, com massa de 0,05933 g, sendo novamente submetida a cromatografia em coluna com sílica Gel Flech (fase normal, 70 - 230 mesh e 230 – 400 mesh) da Merck, com fase móvel $\text{CCl}_2\text{H}_2/\text{AcOEt}$ (4:6) e obtida seis subfrações: FBuOH-1, FBuOH-2, FBuOH-3, FBuOH-4, FBuOH-5 E FBuOH-6.

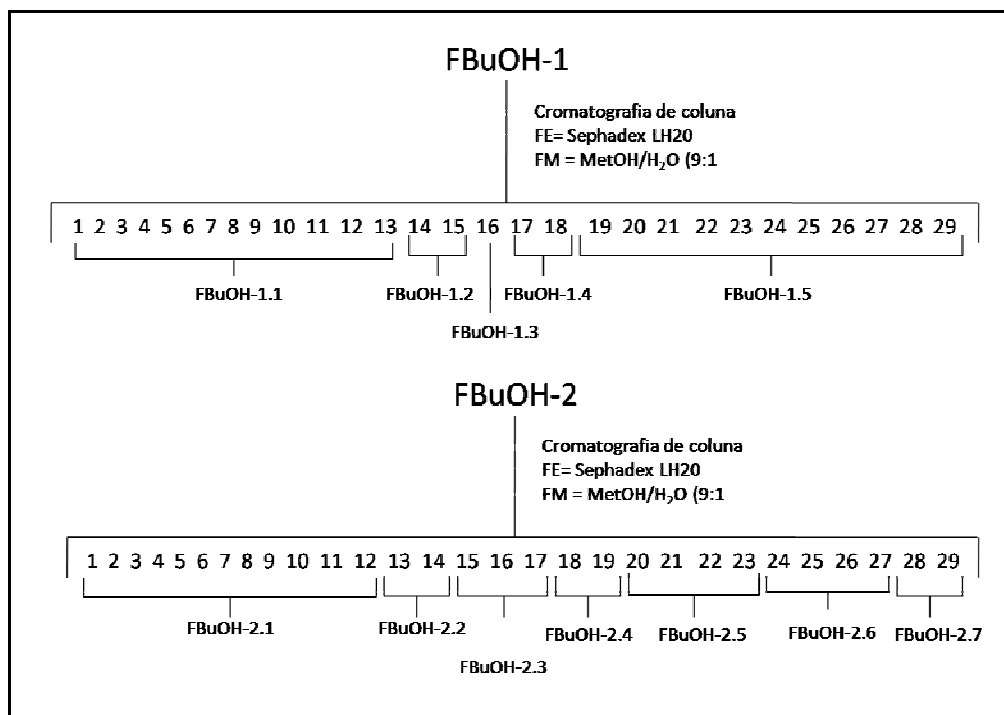


Figura 38 – Fluxograma das cromatografias em Sephadex LH-20 da fração FBuOH

As subfrações FBuOH-3, FBuOH-4, FBuOH-5 não apresentaram atividade frente a UV e nem ao DPPH, sendo descartadas dos ensaios subsequentes.

As subfrações FBuOH-1 e FBuOH-2, por estarem praticamente purificadas, quando observadas em CCD, foram submetidas a análise por RMN.

A subfração FBuOH-6 por apresentar várias bandas na CCD, foi submetida a CLAE-preparativa para purificação e separação de seus picos cromatográficos. Com essa técnica foi possível isolar três picos, denominados FBuOH-6.1, FBuOH-6.2 e FBuOH-6.3. Todos esses picos foram secos e analisados por RMN.

Na Figura 39 é possível observar o fluxograma da cromatografia com Sílica Gel Flech e por CLAE-preparativa, realizadas com a fração FBuOH.

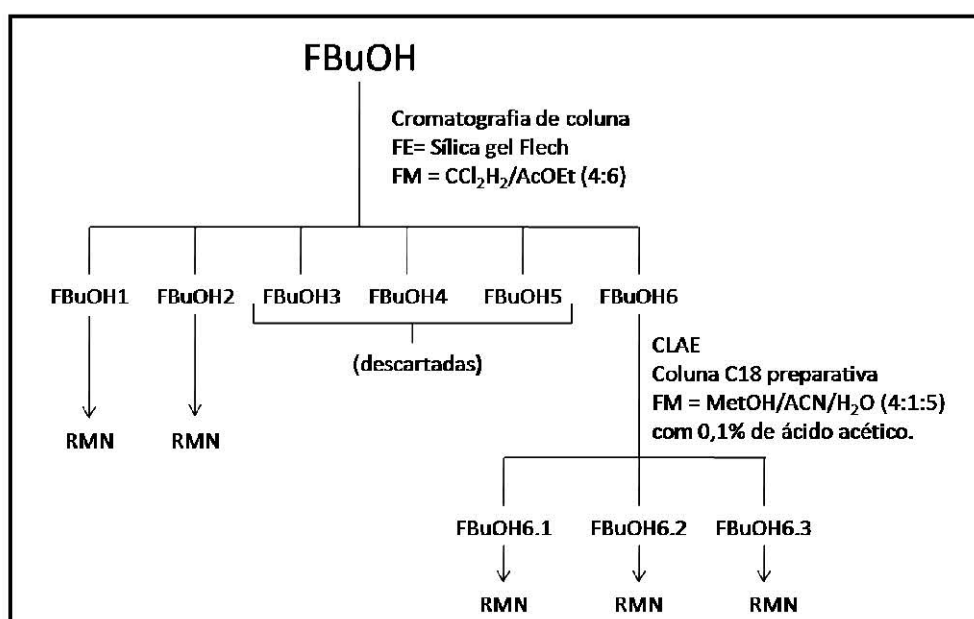


Figura 39 – Fluxograma das cromatografias em Sílica Gel Flech e CLAE-preparativa da subfração FBuOH..

5.7.3 Cromatografia em coluna da FAq

Duas partes da FAq, denominadas FAq1 e FAq2 (contendo cada 1,5 g), foram submetidas a cromatografia em coluna com Sephadex LH-20, conforme ilustrado pela Figura 40.

A FAq1 rendeu quatro subfrações, FAq-1.1, FAq-1.2, FAq-1.3, e FAq-1.4. A FAq2 rendeu duas subfrações, a FAq-2.1 e FAq-2.2. As subfrações FAq-1.1, FAq-1.4 e FAq-2.1

não apresentaram atividade de supressão do radical DPPH em CCD, sendo descartadas do processo de purificação.

As subfrações FAq-1.2 e FAq-1.3, juntamente com a FAq-2.2, foram reunidas e com a adição de MeOH puro, com posterior centrifugação, foram separadas em FAq (sobrenadante) e precipFAq, para a retirada de carboidratos precipitados.

A subfração FAq foi submetida a CLAE, em modo preparativo, obtendo cinco picos cromatográficos: FAq1, FAq2, FAq3, FAq4 e FAq-5. Estas duas últimas se referem aos picos obtidos após a limpeza da coluna com MeOH.

Na Figura 41 é possível observar o fluxograma da cromatografia por CLAE. Note que todas as subfrações foram submetidas à análise por RMN.

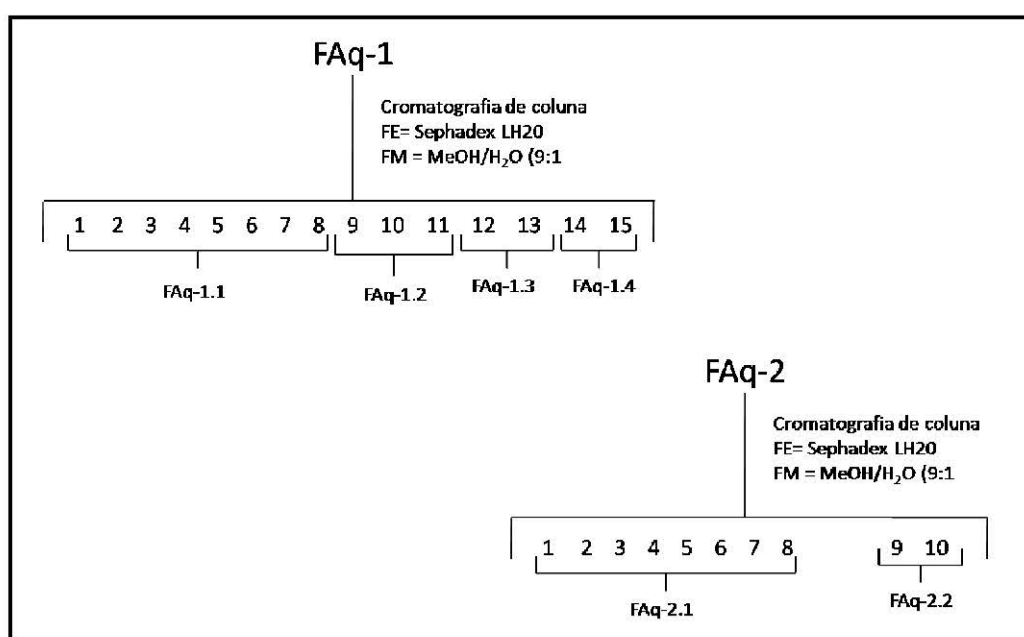


Figura 40 – Fluxograma da cromatografia em Sephadex LH-20 com a fração FAq

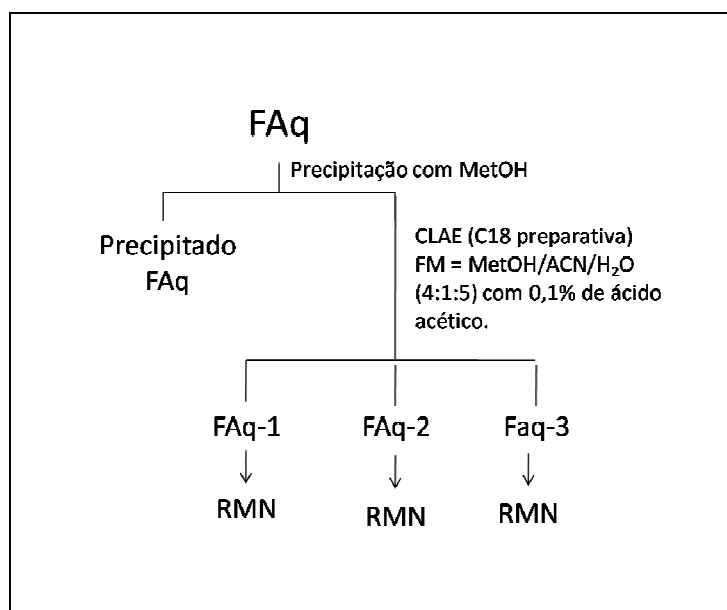


Figura 41 – Fluxograma da cromatografia em CLAE-preparativa com a FAq

5.7.4 Separação por CLAE da FAcOEt e FAq

A partir das frações FAcOEt e FAq foram possíveis isolar picos cromatográficos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), modo preparativo, utilizando coluna C18 preparativa (250 x 4,6 mm), e com eluição isocrática MeOH/ACN/H₂O (4:1:5) com 0,1% de ácido acético. O equipamento utilizado foi um cromatógrafo Shimadzu LC-10A com válvula de reciclo, injetor Rheodyne 7123 com loop de 400 µL e detector UV/VIS Shimadzu SPD-10AV ($\lambda_{\text{máx}}$ de 256 e 364 nm).

5.8 Identificação de metabólitos secundários das folhas de *M. nigra* por RMN.

Para a identificação dos metabólitos secundários presentes nas subfrações de *M. nigra*, obtidas após cromatografia e por CLAE, foi realizado análises por RMN de ^1H , ^{13}C e RMN-2D como o *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (^1H - ^{13}C HSQC; $^1J_{\text{C-H}}$: correlação heteronucleares ^1H x ^{13}C a curta distância), *Heteronuclear Multiple Bond Coherence* (^1H - ^{13}C HMBC; $^{2,3}J_{\text{C-H}}$: correlação heteronucleares ^1H x ^{13}C a longa distância) e *Correlated Spectroscopy* (^1H - ^1H COSY: correlações homonucleares ^1H x ^1H). Os espectros foram registrados em espectrômetro Bruker, modelo DRX-400, em 400 MHz para RMN ^1H e 100 MHz para RMN ^{13}C (Departamento de Química da UFScar). As amostras foram solubilizadas em solventes DMSO- d_6 , MeOD, CDCl_3 e D_2O . Como referência interna foi utilizado o sinal do tetrametilsilano (TMS).

5.9 Análise Fitoquímica

5.9.1 Preparo das soluções padrão de fenóis e flavonoides

A solução padrão de quercetina e a de ácido gálico utilizadas como padrões nos testes antioxidantes foram preparadas em metanol nas concentrações de 5 mg/mL, pesando-se 0,025 g e diluindo em q.s.p. 5 mL final com etanol 70%.

5.9.2 Preparo das soluções teste do extrato e frações

Para realização dos ensaios de atividade antioxidante foi utilizado o extrato bruto etanólico (EBEtOH) e as frações hexânica (FHex), acetato (FAcOEt), butanólica (FBuOH) e

aquosa (FAq). Os extratos e frações foram preparados inicialmente na concentração 5 mg/mL em etanol 70% (para as frações EBEtOH, FAcOEt, FBuOH e FAq) e 5% de dimetilsulfóxido – DMSO (para FHex).

5.9.3 Análise quantitativa de fenóis totais

Um dos métodos mais empregados para determinação dos compostos fenólicos utiliza o Reagente de *Folin Ciocalteu*. Este reagente consiste na mistura dos ácidos fosfomolibdídico e fosfotúngstico, sendo que o molibdênio encontra-se oxidado (cor amarela). Na presença de agentes redutores como os compostos fenólicos, são formados complexos molibdênio-tungstênio (cor azul). O número de grupos hidroxilas (ou grupos oxidáveis) determina a quantidade de cor formada (IKAWA et al., 2003; MEDA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2009; ANGELO; JORGE, 2007). Na Figura 42 está indicando o processo de oxi-redução entre compostos fenólicos e o complexo molibdênio-tungstênio.

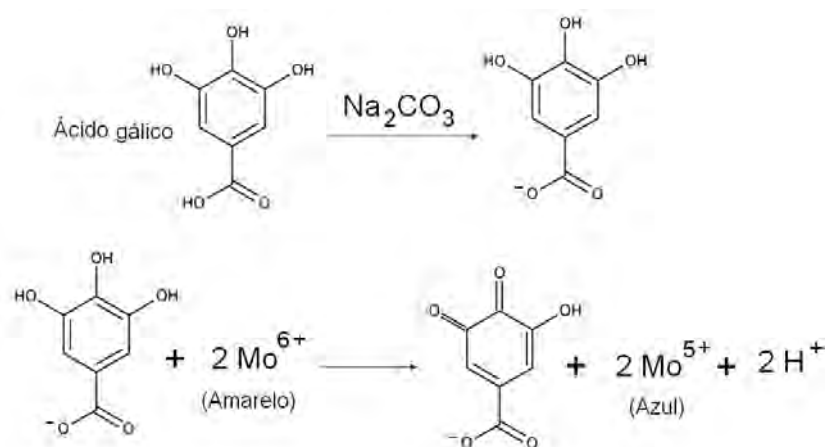


Figura 42 - Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de *Folin-Ciocalteu* (SINGLETON et al., 1999).

A concentração de fenóis totais (FT) dos extratos foi determinada como descrito por JAYAPRAKASHA e colaboradores (2001). O procedimento foi realizado em microplaca de 96 poços. Um volume de 0,025 mL da solução teste diluído em água destilada na proporção 1:100 foi misturado com 0,125 mL do reagente *Folin-Ciocalteu* também diluído em água destilada (proporção de 1:10). Após 5 minutos, adicionou-se à mistura 0,1 mL de solução de carbonato de sódio 4% (m/v) e a microplaca foi mantida no escuro à temperatura ambiente por 60 minutos. Decorrido o tempo, a absorvância foi determinada a 735 nm, utilizando espectrofotômetro de microplaca Biotek® (modelo Power Wave XS2).

O teor de fenóis totais foi determinado por interpolação da absorvância das amostras na curva analítica construída com padrão de ácido gálico. Para a elaboração da curva analítica (Figura 43), foi utilizado o ácido gálico nas concentrações de 5,0 a 50,0 µg/mL diluído em metanol. As concentrações de fenóis totais nas amostras foram obtidas a partir da equação da reta ($y = a + b.x$) e os valores foram expressos em µg/mL de equivalentes de ácido gálico. Para a determinação do rendimento, depois das devidas conversões, o teor de fenóis totais foi expresso em miligramas equivalentes de ácido gálico/grama da fração.

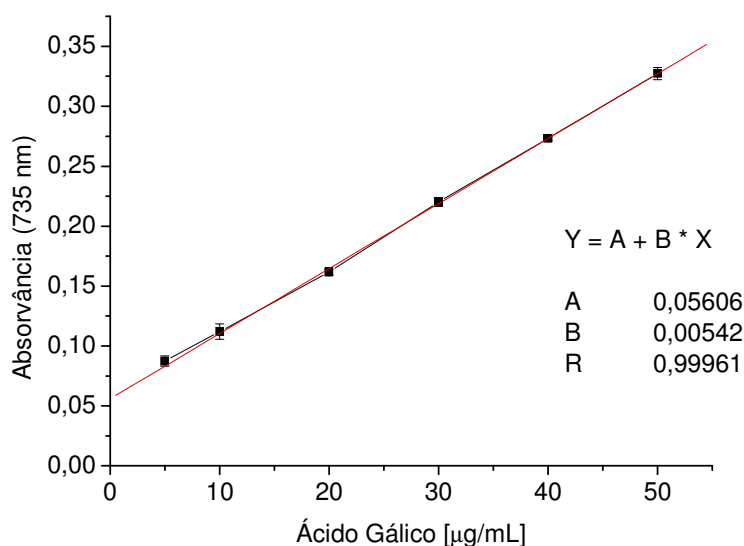


Figura 43 - Curva analítica de ácido gálico para determinação de fenóis totais pelo método de *Folin-Ciocalteu*.
Leitura da DO a 735 nm (n = 3).

5.9.4 Análise quantitativa de flavonoides totais

A técnica de quantificação de flavonoides por complexação com íons alumínio é frequentemente empregada (Farmacopéia Brasileira, 1988; WOISKY; SALATINO, 1998; CHANG et al., 2002). O método se baseia no fato do cloreto de alumínio em solução alcoólica se complexar com os flavonoides formando um cromóforo amarelo que apresenta absorção máxima a 415-425 nm (MARCUCCI et al., 1998; WOISKY; SALATINO, 1998). Na Figura 44 está apresentado, como exemplo, a complexação do flavonoide quercetina com íons alumínio.

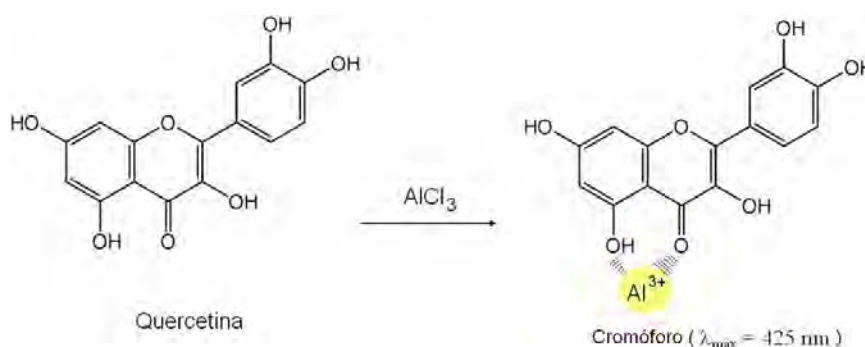


Figura 44– Formação do cromóforo flavonóide-alumínio (MARCUCCI et al., 1998).

A dosagem de flavonoides totais dos extratos de *M. nigra* foi determinada utilizando o método colorimétrico do cloreto de alumínio, descrito por Chang e colaboradores (2002), com algumas modificações.

A um volume de 0,500 mL de solução teste diluída em etanol 99% na proporção de 1:100, foi adicionado 0,250 mL de solução de cloreto de alumínio 10% em etanol e 0,250 mL de solução de acetato de sódio 1,0 M em etanol. Após incubação por 30 minutos a temperatura ambiente, a absorbância da mistura de reação foi determinada a 425 nm contra um branco de 0,250 mL de acetato de sódio, 0,500 mL do extrato diluído 1:100 e 0,250 mL de etanol 99%. Foi construída a curva analítica com quercetina nas concentrações de 0,5 a 10,0 $\mu\text{g/mL}$

(Figura 45). A concentração de flavonoides totais foi calculada utilizando a equação da reta $X = ((y-a)/b)*100$, onde x foi expresso em $\mu\text{g/mL}$ equivalente em quercetina. Cada determinação foi realizada em triplicata. Para a determinação do rendimento, depois das devidas conversões, o teor de flavonoides totais foi expresso em miligramas equivalentes de ácido gálico/grama da fração.

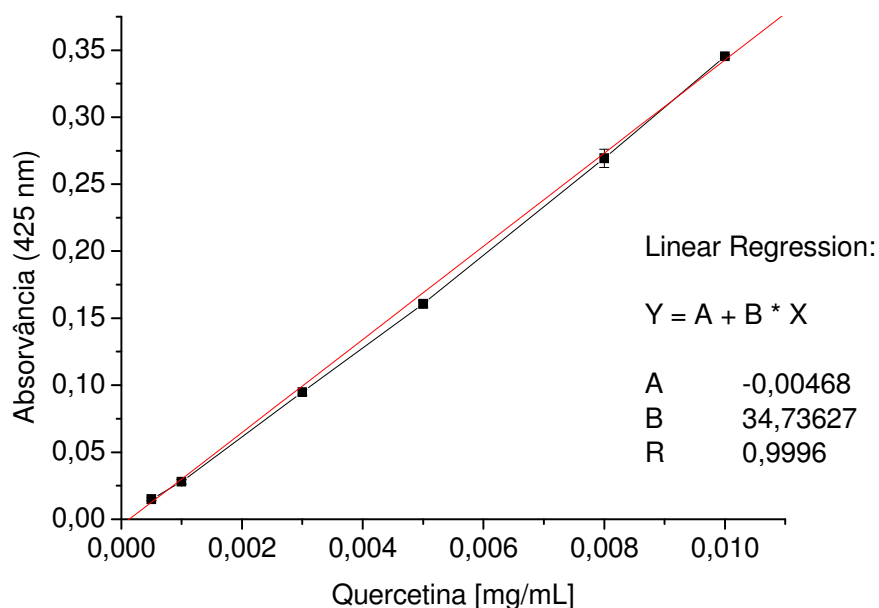


Figura 45 - Curva analítica de quercetina para determinação de flavonoides totais por complexação com alumínio. Leitura da DO a 425 nm (n = 3).

5.10 Atividade antioxidante do extrato bruto e frações de *M. nigra*.

Para expressar a atividade antioxidante, relacionamos a quantidade de extrato e frações de *M. nigra* ($\mu\text{g/mL}$) necessária para decrescer a concentração inicial do agente oxidante em 50%, denominada concentração inibitória 50% (IC_{50}).

5.10.1 Atividade antioxidante total sobre radical ABTS^{•+}

O ensaio de supressão do radical ABTS foi realizado segundo Pellegrini e colaboradores (1999), com algumas modificações.

Em microplacas de 96 poços, adicionou-se 0,25 mL da solução de ABTS radical (preparado utilizando solução de ABTS a 0,007 mol/L e persulfato de potássio a 0,051 mol/L). Utilizou-se soluções teste diluídas na proporção de 1:10 em etanol, variando o volume de 0,005 a 0,050 mL. O volume final de 0,3 mL foi ajustado com solução tampão fosfato de potássio 50 mM e pH 7,4. Após incubação por 15 minutos, a leitura da microplaca foi realizada a 734 nm, utilizando o espectrofotômetro de microplaca Biotek[®] (modelo Power Wave XS2). Cada determinação foi realizada em triplicata.

A quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial ABTS radical em 50% é denominada concentração inibitória 50% (IC₅₀). A porcentagem de supressão do radical ABTS foi obtida pela seguinte equação:

$$\% \text{ supressão} = \left[\frac{A.\text{controle} - (A.\text{amostra} - A.\text{branco})}{A.\text{controle}} \right] \times 100$$

Onde: **A.controle** é a absorvância inicial da solução de ABTS e **A.amostra** é a absorvância da mistura reacional (ABTS + amostra + Tampão). **A.branco** é absorvância da amostra sem ABTS (somente Tampão e amostra).

5.10.2 Atividade supressora sobre o radical DPPH[•]

Vários métodos são utilizados para determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas. O método mais utilizado consiste em avaliar a atividade supressora do radical livre, 2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH[•]), de coloração púrpura e que absorve no

comprimento de onda de 515 nm. Por ação de um antioxidante, o DPPH[•] é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com consequente decréscimo da absorção a 517 nm (BONDET; BRANDWILLIANS; BERSSET, 1997).

Para este ensaio, utilizou-se solução teste diluída na proporção de 1:10 em etanol com volumes variando de 0,01 a 0,50 mL. À solução, adicionou-se 0,09 mL de solução de DPPH a 480 mol/L e o volume de 0,90 mL final foi completado com metanol. A leitura a 517 nm foi realizada em espectrofotômetro FENTO[®] (600 Plus).

A partir dos resultados obtidos, determinou-se a porcentagem de atividade supressora do radical DPPH[•] remanescente no meio reacional, ou seja, que não foi consumida pelo antioxidante supostamente presente na amostra (BRAND-WILLIANS et al., 1995; SANCHEZ-MORENO et al., 1998).

A quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração inibitória 50% (IC₅₀). A porcentagem de supressão do radical DPPH foi obtida pela seguinte equação:

$$\% \text{ supressão} = \left[\frac{A.\text{controle} - (A.\text{amostra} - A.\text{branco})}{A.\text{controle}} \right] \times 100$$

Onde: **A controle** é a absorvância inicial da solução de DPPH e **A amostra** é a absorvância da mistura reacional (DPPH + amostra + Tampão). O branco é absorvância da amostra e tampão apenas.

5.10.3 Atividade supressora do ácido hipocloroso (HOCl)

A atividade de supressão de ácido hipocloroso (HOCl) foi determinada utilizando o cromógeno TMB (3,5,3',5'-tetrametilbenzidina), proposto por Costa e colaboradores (2004). O TMB é oxidado pelo HOCl formando um cromóforo de absorção máxima a 655 nm. O

emprego de substâncias supressora de HOCl impede a oxidação do TMB que é observada pela não formação do cromóforo (Figura 46).

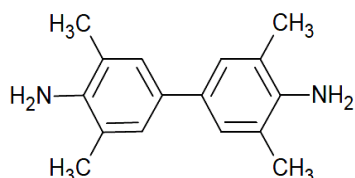


Figura 46 - Oxidação do TMB por agentes oxidantes

As reações foram efetuadas em tampão fosfato de sódio 50 mM e pH 7,4 a 25°C. O ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços, utilizando solução teste diluída na proporção de 1:10 em etanol 99% e em volumes variando de 0,0025 a 0,0400 mL, solução de TMB a 7 mmol/L e solução tampão fosfato de potássio 50 mmol/L completando para 0,30 mL. A leitura a 655 nm foi realizada em espectrofotômetro de microplaca Biotek® (modelo Power Wave XS2). Cada determinação foi realizada em triplicata.

O cálculo para determinação da porcentagem de supressão de HOCl foi realizado de acordo com a equação:

$$\% \text{ supressão} = \left[1 - \frac{(A_A - A_0)}{A_{RT}} \right] \times 100$$

Onde: A_0 = absorvância a 655 nm do TMB + Tampão + Amostra (sem HOCl); A_{RT} = absorvância a 655 nm do TMB + HOCl (sem amostra); A_A = absorvância a 655 nm do TMB + HOCl + amostra.

5.10.4 Atividade supressora do ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

A reação de formação do ânion radical superóxido tem início com a adição de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) à mistura de fenazina metassulfato (PMS) e azul de nitrotetrazólio (NBT), com formação do ânion radical superóxido. Em seguida, dois radicais superóxido são capazes de doar um elétron cada para o NBT, que se reduz a formazana monitorada em um comprimento de onda de 560 nm, em espectrofotômetro visível. Quando algum antioxidante é adicionado ao meio, ele é capaz de competir com o NBT pelo ânion radical superóxido gerado, diminuindo, desta forma, a redução do NBT e, conseqüentemente, a formação do cromóforo formazana (OLIVEIRA, 2009; EWING; JANERO, 1995).

O ensaio foi realizado em solução de pirofosfato de sódio 25 mM e pH 8,3, segundo Kakkar e colaboradores (1984). Este ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços, utilizando solução teste diluída na proporção de 1:10 em etanol 99% e em volumes variando de 0,05 a 0,05 mL, 0,031 mL de NADH 1560 mol/L, 0,02 mL de NBT 600 mol/L, 0,02 mL de PMS 72 mol/L e solução tampão fosfato 50 mM e pH a 7,4 q.s.p 0,30 mL.

A intensidade de cor é diretamente proporcional à concentração do radical e foi determinada a 560 nm utilizando espectrofotômetro de microplaca Biotek® (modelo Power Wave XS2). Cada determinação foi realizada em triplicata.

O cálculo para a determinação do percentual de supressão foi realizado pela seguinte equação:

$$\% \text{ supressão} = \left(\frac{A_c - (A_a - b_a)}{A_c} \right) \times 100$$

Onde: **Aa** = absorvância do ânion superóxido + amostra; **ba** = branco da amostra;

A_C = absorvância do controle (reação total sem amostra).

5.10.5 Atividade supressora de óxido nítrico.

O efeito supressor das amostras em estudo sobre o óxido nítrico foi determinado de acordo com Yen e colaboradores (2001), em tampão fosfato 50 mM, pH 7,0 e nitroprussiato de sódio 25 mM. O NO presente em solução é revelado pela reação com o Reagente de Griess formando um cromóforo com pico de absorvância em 570 nm, utilizando espectrofotômetro de microplaca Biotek[®] (modelo Power Wave XS2). O cálculo para a determinação do percentual de supressão foi realizado pela seguinte equação:

$$\% \text{ supressão} = \left(\frac{A_c - (A_a - b_a)}{A_c} \right) \times 100$$

Onde: **Aa** = absorvância da reação + amostra; **ba** = branco da amostra;

A_C = absorvância do controle (reação total sem amostra).

5.11 Estudo do potencial anti-hemolítico do extrato e frções de *M. nigra* sobre eritrócitos humanos

5.11.1 Obtenção de eritrócitos e determinação da hemólise

Eritrócitos humanos foram obtidos de um único doador, aparentemente saudável, que não faziam uso de medicamentos e/ou suplementos vitamínicos que pudessem interferir no estresse oxidativo. Esse trabalho foi submetido ao comitê de ética da FCFAR/Unesp e autorizada pelo protocolo CEP/FCF/CAr nº 19/2009. Foi preparada uma suspensão final de eritrócitos 5% em tampão fosfato de potássio 10 mM pH 7.4 com NaCl a 150 mM, p.s.p. 3000

μL , utilizando eritrócitos recém-colhidos com EDTA, e esta foi incubada com AAPH 25 mM a 37°C com agitação constante 4 horas. O grau de hemólise (%) foi determinado pela medida da absorbância a 514 nm (SIMÃO et al., 2005; YANG et al., 2006).

A ação hemolítica do extrato bruto e frações de *M. nigra* foi estudada pela liberação de hemoglobina das células (VISSERS et al., 1998), utilizando espectrofotômetro de microplaca Biotek® (modelo Power Wave XS2). Cada determinação foi realizada em triplicata.

5.11.2 Proteção sobre dano provocado pelo radical AAPH em eritrócitos

A ação dos compostos naturais sobre a hemólise promovida pelo radical AAPH 25 mM (YANG et al., 2006) em suspensão de eritrócitos 5% (tampão fosfato de sódio 10 mM/NaCl 150 mM, pH 7,4; 37°C) foi avaliada pela liberação de hemoglobina pelas células após 3 horas de incubação através das leituras das absorbâncias em 414 nm.

5.11.3 Proteção sobre dano provocado pelo ânion hipoclorito (OCl^-) em eritrócitos.

A ação dos compostos naturais sobre a lise promovida pelo OCl^- 16,5 μM em suspensão de eritrócitos 5% (tampão fosfato de sódio 10 mM/NaCl 150 mM, pH 7,4; 37°C) foi avaliada pela liberação de hemoglobina pelas células após 3 horas de incubação através das leituras das absorbâncias em 414 nm.

5.12 Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica do extrato bruto etanólico das folhas de *M. nigra* e suas frações.

5.12.1 Preparo do inóculo

O inóculo de bactérias foi adaptado e padronizado segundo o documento do CLSI (2003 – M7A6). Culturas foram obtidas através do repique em caldo *Müller Hinton* (MH). Após 24 horas, a cultura foi ressuspensa em salina até a obtenção de turvação equivalente a escala 0,5 de *Mac Farland* (aproximadamente $1,5 \times 10^6$ UFC/mL) - confirmada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 625 nm, cuja leitura de absorvância deveria estar entre 0,08 e 0,10.

O inóculo dos fungos foi adaptado e padronizado segundo CLSI (2002-M27A2). A cultura foi obtida após repique em tubos com ágar Sabouraud e incubação a $30^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. Após 24 horas, uma alçada das leveduras foi suspensa em solução de salina, sendo ajustada a contagem de leveduras para 0,5 na escala de Mac Farland - confirmada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 nm, cuja leitura de absorvância deveria estar entre 0,08 e 0,10.

5.12.2 Agente antibacteriano e antifúngico

O agente antibacteriano utilizado no teste foi o ciprofloxacino. A solução do fármaco foi preparada seguindo recomendações da CLSI (2003 – M7A6) com algumas modificações para bactérias. Para o teste de microdiluição, foram preparadas 10 concentrações a serem utilizadas no testes de microdiluição variando de 250 µg/mL a 0,49 µg/mL.

Para fungos, foi utilizado o antifúngico fluconazol preparado considerando sua potência, seguindo recomendações do CLSI (M27-A2, 2002 e M38-A, 2002) com algumas modificações para leveduras e fungos filamentosos, respectivamente. Para o teste de microdiluição, a solução de fluconazol foi diluída para a obtenção do gradiente com

concentração de 32 a 0,06 µg/mL (CLSI M27-A2, 2002 e M38-A, 2002). A concentração do extrato e frações de *M. nigra* variou de 0,50 a 250 µg/mL.

5.12.3 Verificação da Atividade Antibacteriana e Antifúngica do extrato bruto etanólico e frações de folhas de *M. nigra* pelo método da microdiluição

A metodologia utilizada para bactérias aeróbias facultativas foi baseada no documento CLSI M07-A6 (2003) com adaptações segundo Felmingham e Farrell (2006) e a metodologia utilizada para leveduras foi baseada no documento M27-A2 (2002) e Scorzoni e colaboradores (2007).

Em placa de 96 poços com fundo chato, pipetou-se caldo Müller Hinton (MH) (bactérias) e caldo RPMI-1640 com L-glutamina sem bicarbonato de sódio acrescido de 2,0% de glicose tamponado em MOPS 0,165 M (fungos) para cada poço utilizado, de acordo com o número de diluições realizadas (foram realizadas 10 diluições).

Na primeira coluna foram adicionados 200 µL de meio de cultura como controle negativo (controle de esterilidade), na última coluna foi pipetado 100 µL de caldo contendo o micro-organismo testado. A partir da segunda até a penúltima coluna foram pipetados 150 µL de caldo. Partiu-se do volume 50 µL do extrato e frações. O EBEtOH, FAcOET, FBuOH e FAq foram dissolvidas em solução hidroalcoólica com etanol 70° GL. As concentrações finais dos extratos testados variaram de 250 a 0,49 µg/mL.

Assim, a partir da segunda coluna foram realizadas diluições seriadas 1:2, homogeneizando e transferindo 100 µL da primeira até a penúltima coluna, de forma subsequente, até obter as 10 diluições propostas. Após a diluição, foram pipetados 100 µL de uma suspensão 10^4 UFC/mL de bactérias e fungos em cada poço, com exceção da primeira coluna, de maneira que ao final o volume em cada poço foi de 200 µL.

Ensaio prévios de controles, contendo apenas solventes nas concentrações finais empregadas nas diluições do extrato e frações, foram realizados nas mesmas condições laboratoriais e não foram observadas interferências nos ensaios.

A microplaca foi incubada em estufa a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Para esta metodologia foram utilizados os seguintes micro-organismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 26923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Salmonella* sp. ATCC 19196, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Candida albicans* ATCC 64548, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Cryptococcus neoformans* ATCC 90012.

5.12.4 Determinação da Concentração Bactericida e Fungicida Mínima (CBM/CFM) do extrato e frações de *M. nigra*.

A CBM/CFM foi pesquisada em todos os poços da microplaca. Para cada poço foi realizada uma subcultura transferindo-se, por meio de hastes estéreis, material de cada poço da microplaca, para uma placa com ágar Müller Hinton (bactérias) e ágar Sabouraud (fungos) previamente demarcada. As placas foram incubadas em estufa a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Após a incubação, as microplacas foram lidas espectrofotometricamente em leitor de Elisa a 490 nm e os resultados foram registrados. A CBM/CFM foi definida como a menor concentração que apresentou inibição do crescimento.

5.13 Cinética de oxidação do guaiacol pela HRP

Para os ensaios de cinética com HRP (KHALIL, 2002), a concentração da enzima em solução foi determinada através de seu coeficiente de extinção molar em 403 nm ($1,02 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; OHLSON; PAUL, 1976). A cinética foi realizada em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7.4, a 37°C , HRP 10 nM e guaiacol 0,5 a 5 mM). Para a cinética de inibição da HRP, as mesmas condições foram realizadas com e sem amostras (no valor do IC_{50} , previamente

determinado, para o extrato bruto e frações de *M. nigra*). A reação foi iniciada com a adição de peróxido de hidrogênio (0,1mM) e monitorada em 470 nm por 1 minuto. Determinou-se a velocidade de reação quando o tempo tende a zero (velocidade inicial - v_0) na ausência e na presença das amostras, utilizando o espectrofotômetro OceanOptics USB 4000 com agitação magnética e termostatização com *peltier*.

5.14 Análise Estatística

Os gráficos dose-resposta foram construídos no programa Microcal Origin® 7.0 onde buscou-se estabelecer os valores de concentração que promovessem 50% de inibição (IC₅₀) das formas radicalares.

Nesse estudo, os estudos antioxidantes foram feitos em triplicatas e expressos como média $\pm$ desvio padrão. Para comparação das médias, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) e o teste de *Tukey*, através do software Sigma Start® 2.0. Adotou-se o nível de significância como $p < 0,05$.

5.15 Descarte de resíduos

Os resíduos gerados durante o estudo foram descartados de acordo com o planejamento de gerenciamento de resíduos organizado pela Coordenadoria de Análises Clínicas e Hemoterapias e pela Coordenadoria de Gerenciamento de Resíduos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP de acordo com a RDC número 306 de 7 de dezembro de 2004, a qual trata do Regulamento Técnico para o Gerenciamento de Resíduos de Serviço de Saúde (BRASIL, 2004). Resíduos químicos não tóxicos foram descartados na pia sob água abundante. Os resíduos químicos tóxicos orgânicos foram tratados com hipoclorito e descartados em recipientes inertes. Os resíduos microbiológicos foram esterilizados em autoclave a 121° C por 45 minutos. Resíduos químicos tóxicos foram armazenados em recipientes de plástico inertes.



6 Resultados e Discussão

6 Resultados e Discussão

6.1 Determinação do solvente extrator e da melhor técnica extrativa

A seletividade química desejada para uma extração pode ser alcançada através do solvente ou mistura de solventes eleitos para o processo. Uma simples variação da concentração do etanol utilizado como solvente confere diferentes valores de constantes dielétricas alterando, portanto, o poder dissolvente para numerosas substâncias. Desta forma, escolhemos trabalhar com uma solução extrativa hidroalcoólica com etanol 70° GL, que apresentou excelente propriedade antimicrobiana e extrativa de compostos polares como os fenólicos (p.ex. taninos e flavonoides).

A maceração foi escolhida após a comparação dos resultados obtidos no ensaio de rendimento em fenóis totais pelas técnicas de maceração, turbólise (turbo extração) e percolação. O ensaio mostrou que o rendimento da maceração foi semelhante às técnicas de turbólise e próxima a da percolação. A Figura 47 mostra o rendimento em mg/mL de fenóis totais pelas técnicas comparadas no ensaio. Na Tabela 05 estão expostas as médias e desvios padrão obtidos.

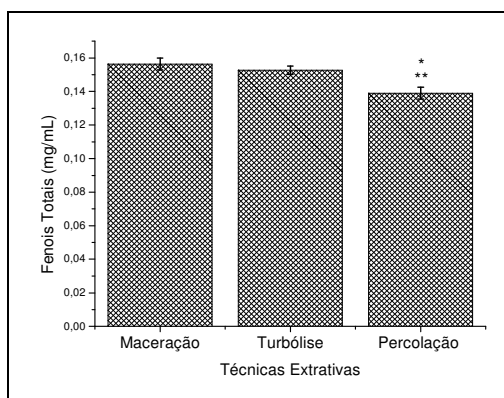


Figura 47 – Determinação de fenóis totais das técnicas extrativas pelo método de *Folin-Ciocalteu* (média $\pm$ desvio padrão, n = 3) * p $\leq$ 0,002 quando maceração comparado com percolação; ** p $\leq$ 0,005 quando turbólise comparado com percolação.

Tabela 5 - Médias e desvios padrão do rendimento em fenóis totais obtidos pelas diversas técnicas extrativas

Extração	Média (mg/mL)	Desvio Padrão (n = 3)
Maceração	0,156	0,003
Turbólise	0,153	0,002
Percolação	0,139	0,003

Como é possível observar, as técnicas de maceração e turbólise mostraram-se interessantes pela garantia do rendimento extrativo frente à percolação permitindo a obtenção de uma grande massa. As massas extraídas nas duas técnicas são semelhantes, no entanto, a maceração é um processo mais simples que a turbólise, embora necessite de mais tempo para a sua realização.

6.2 Rendimento da extração pela técnica de maceração

Ao final da maceração, obtivemos 16 litros de solução extrativa, que após secagem nos forneceu uma massa de 106,31 g de extrato bruto etanólico seco (EBEtOH), o que representou um rendimento de 26,58% em massa.

Nas Figuras 48 e 49 estão representados os rendimentos de fenóis totais e flavonoides totais equivalentes aos 4 litros de solução extrativa, das quatro etapas da maceração, bem como a do *pool* total de 16 litros.

Nas Tabelas 6 e 7 estão expostas as médias e desvios padrão obtidos durante a determinação dos teores de fenóis e flavonoides totais, respectivamente.

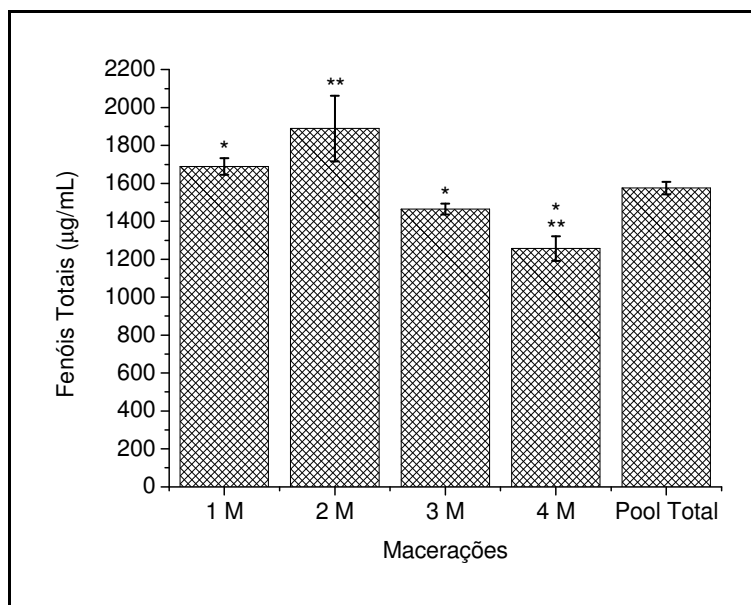


Figura 48 - Rendimento de fenóis totais ($\mu\text{g/mL}$ equivalentes em ácido gálico) determinada pelo método de *Folin-Ciocalteu* durante cada etapa de maceração (média $\pm$ desvio padrão, $n = 3$)

* $p < 0,05$ quando 1M comparado às macerações 3M e 4M.

** $p < 0,05$ quando *Pool* Total comparado às macerações 1M, 2M e 4M.

Tabela 6 - Médias e desvios padrão das determinações de fenóis totais obtidos durante as etapas de maceração

Extração	Média ($\mu\text{g/mL}$)	Desvio Padrão ($n = 3$)
1 M	1689,583	43,898
2 M	1889,583	73,355
3 M	1464,583	28,867
4 M	1256,250	64,951
<i>Pool</i> Total	1575,000	33,072

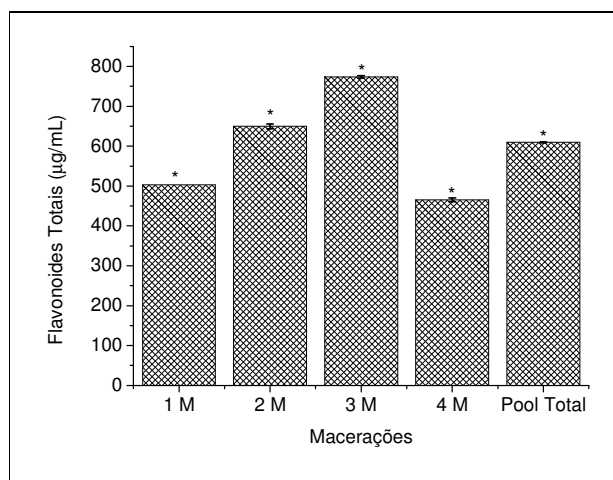


Figura 49 - Flavonoides totais (µg/mL equivalentes em quercetina), determinada por complexação com lunínio, das etapas de maceração (média ± desvio padrão, n = 3)

* Todas as extrações são estatisticamente diferentes com $p \leq 0,001$

Tabela 7 – Médias e desvios padrão das determinações de flavonoides totais obtidos durante as etapas de maceração

Extração	Média (µg/mL)	Desvio Padrão (n = 3)
1 M	502,917	0,000
2 M	649,861	6,043
3 M	773,750	3,004
4 M	465,139	4,739
Pool Total	609,583	1,102

6.3 Rendimento dos extratos após a partição

A partição realizada através da extração líquido/líquido, utilizando-se solventes de polaridades crescentes, implica na dissolução e distribuição seletiva dos componentes

presentes entre as fases compostas por dois solventes imiscíveis. A concentração de cada um dos componentes nas fases está relacionada com o coeficiente de partição de cada substância.

Foram reservados 25 g dos 106,31 g do EBEtOH para os ensaios relativos ao extrato bruto. Foram dissolvidos 81,4 g em 500 mL de água destilada e submetidos à partição fracionada com os solventes hexano, acetato de etila e *n*-butanol. Após partição, obtivemos a fração hexânica (FHex) com 3,26 g, equivalente a 4%; a fração acetato (FACOEt) contendo 6,0 g (6%); a fração butanólica (FBuOH) com 4,86 g (6%) e a fração aquosa final (FAq) com 66,7 g (82%)

Segundo Simões (2007), empregando-se o solvente hexano, há extração de substâncias lipídicas e pigmentos. Empregando-se o solvente acetato de etila, extraem-se preferencialmente flavonoides e cumarinas simples. Na fração aquosa deve predominar as saponinas e taninos e compostos com maior polaridade.

6.4 Determinação de fenóis e flavonoides totais nas frações fenólicas

Visando determinar o rendimento em fenóis e flavonoides totais nas frações obtidas após a partição, obteve-se os gráficos de fenóis totais, expresso em $\mu\text{g/mL}$ equivalentes em ácido gálico – EqAG (Figura 50) e o gráfico de flavonoides totais, expresso em $\mu\text{g/mL}$ equivalentes em quercetina – EqQ (Figura 51).

As frações FACOEt e FBuOH foram as que apresentaram maior teor de fenóis totais, com 1777,78, 1975,308 e 1388,89 $\mu\text{g/mL}$ EqAG, respectivamente. A fração Hex apresenta vestígios de fenóis, supostamente presente por contaminação na separação da fase etérea. O mesmo aconteceu com relação aos flavonoides já que não se espera encontrar compostos fenólicos e/ou flavonoides na fase hexânica devido à sua baixíssima polaridade. A FAq apresentou valores de fenóis totais elevados, mas note que não necessariamente se trate de fenóis, pois acreditamos que essa fração seja rica em carboidrato. Essa lógica torna-se coerente quando analisamos a baixa concentração de flavonoides totais na amostra. Nas Tabelas 8 e 9 estão apresentadas as respectivas médias e desvios padrão obtidos.

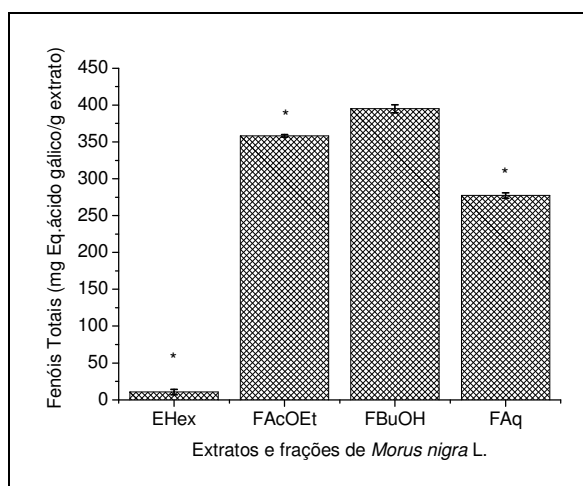


Figura 50 - Fenóis totais (método de *Folin-Ciocalteu*) expresso em miligramas equivalentes em ácido gálico por grama das frações de *M. nigra* L. (média $\pm$ desvio padrão, $n = 3$).

* $p < 0,001$ quando FBUOH comparado com FHex, FAcOEt e FAq.

Tabela 8 - Médias e desvios padrão das determinações de fenóis totais dos extratos pós-partição

Fração	Média ($\mu\text{g/mL}$)	Desvio Padrão ($n = 3$)
FHex	10,667	3,607
FAcOEt	358,133	1,847
FBUOH	395,000	5,568
FAq	277,333	3,607

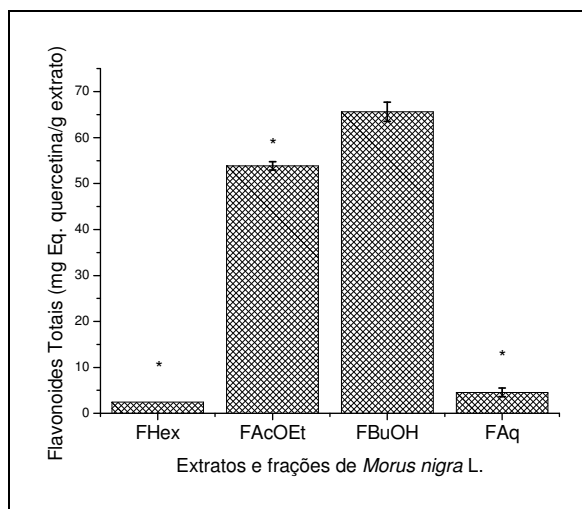


Figura 51 - Flavonoides totais (método de complexação com alumínio) expresso em miligramas equivalentes em quercetina por grama das frações de *M. nigra* (média $\pm$ desvio padrão, n = 3)

* p < 0,001 quando FBUOH comparado com FHex, FAcOEt e FAq.

Tabela 9 - Médias e desvios padrão das determinações de flavonoides totais dos extratos pós-partição

Fração	Média ($\mu\text{g/mL}$)	Desvio Padrão (n = 3)
FHex	2,400	0,000
FAcOEt	53,867	0,924
FBUOH	65,600	2,117
FAq	4,533	0,924

O alumínio (Al_3^+), como cátion, forma um anel de seis membros estável com o flavonóide, complexando-se com a hidroxila em C-5 e o grupo carbonila em C-4 (WOISKY; SALATINO, 1998; MARCUCCI et al., 1998; MEDA et al., 2005). Nessas condições, o complexo flavonóide-Al absorve mais intensamente e em comprimento de onda maior do que o flavonóide sem a presença do agente complexante. Os ácidos fenólicos, mesmo os que formam complexos com AlCl_3 , absorvem em comprimentos de onda muito inferiores, evitando-se dessa maneira interferências nas medidas de absorbância (LIANDA; CASTRO,

2008). Os complexos dos outros flavonóis com alumínio absorvem bem próximo de 425 nm, mas os complexos derivados de flavonas absorvem em comprimentos de onda inferiores, o que causa uma subestimativa nas determinações de misturas muito ricas em flavonas (LIANDA; CASTRO, 2008).

A maneira mais precisa e exata de se identificar e quantificar flavonoides em produtos naturais é a análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Porém, uma das técnicas que se enquadra bem para a determinação de flavonoides totais é a espectrometria no ultravioleta (MEDA et al., 2005). Duas bandas de absorção são características dos flavonoides; banda I, com máximo de absorção em 300-350 nm, presume-se ser resultado do anel flavônico B e banda II, com máximo de absorção em 250-285 nm, acredita-se ser resultante do anel A (ROBARDS; ANTOLOVICH, 1997)

Flavonas, flavonóis e flavonóis glicosilados são usualmente detectados em comprimento de onda de 270nm, 365nm ou 370nm, embora também detecções em 280 nm (CROZIER et al., 1997; BROLIS et al., 1998; EWALD et al., 1999). O detector de arranjo de diodos é o mais utilizado nas publicações acerca de flavonoides em que se usa CLAE como técnica analítica (CROZIER et al., 1997).

6.5 Atividade antioxidante do extrato e frações de *M. nigra*.

Como descritos anteriormente, muitos fatores influenciam a atividade antioxidante dos compostos de natureza fenólica, em especial a posição de substituição dos grupos hidroxila (OH) no anel aromático de fenís e flavonoides, as propriedades de outros grupos substituintes e a possibilidade de formação de ligações de hidrogênio e quelação com metais (BRAND-WILLIAMS et al., 1995; PANNALA et al. 2001; CHENG et al., 2002, 2003). Para os favonóides em especial, algumas características químicas são de grande importância apar sua atividade antioxidante, como a posição do grupo hidroxila no anel B, presença de dissstituição *o*-diidroxí no anel B e da dupla ligação C2-C3, conjugada ao grupo 4-oxo (C4),

e a presença de grupo hidroxila na posição 3 do anel heterocíclico C (C3) contribui na atividade antioxidante (PANNALA et al. 2001).

A evidência da atividade supressora da amostra foi determinada pelo cálculo da concentração inibitória (IC_{50}) capaz de suprimir 50 % da forma radicalar no sistema é inversamente proporcional ao valor numérico do IC_{50} .

Os padrões ácido gálico e quercetina foram empregados como comparação do potencial supressor para fenóis e flavonoides, respectivamente.

Como se trata de extrato bruto e frações de folhas de *M. nigra*, torna-se relevante salientar que os ensaios aqui propostos não foram realizados com subfrações purificadas. Nesse contexto, os resultados aqui obtidos são baseados no perfil que apresenta maior potencial supressor das formas radicalares ou oxidantes estudadas, ou seja, os menores IC_{50} .

6.5.1 Determinação do potencial supressor do radical $ABTS^{\bullet+}$

Os resultados obtidos nos ensaios de captura do $ABTS^{\bullet+}$, ilustrados na Figura 52, demonstraram que o EBEtOH, FAcOEt e FBuOH apresentam boa atividade supressora do radical (atividade antioxidante), quando comparados aos padrões ácido gálico (AG) e quercetina (Q), com IC_{50} de 1,543, 5,283 e 5,997 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, em relação aos padrões, na mesma matriz (0,349 $\mu\text{g/mL}$ para o ácido gálico e de 0,444 $\mu\text{g/mL}$ para a quercetina). A FHex e FAq não apresentou boa atividade frente aos padrões, com IC_{50} de 68,03 e 20,157 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Na Tabela 10 estão expostas as médias e desvios padrão obtidos nos ensaios.

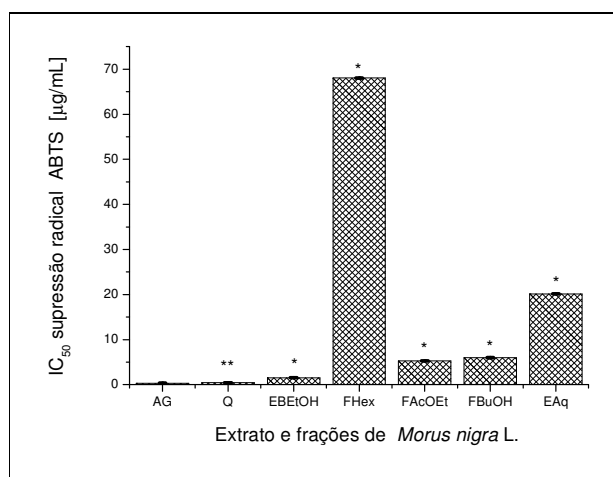


Figura 52 - IC₅₀ para supressão de radical ABTS (média ± desvio padrão, n = 3)

* $p \leq 0,001$ quando ácido gálico (AG) e quercetina (Q) comparado com EBEtOH, FHex, FAcOEt, FBuOH e FAq.

** $p < 0,05$ quando ácido gálico (AG) comparado com quercetina (Q).

Tabela 10 - Médias e desvios padrão das determinações do IC₅₀ para o ABTS^{•+} com extrato bruto e frações de *M. nigra*.

Fração	Média (μg/mL)	Desvio Padrão (n = 3)
Ácido gálico	0,349	0,006
Quercetina	0,444	0,006
EBEtOH	1,543	0,051
FHex	68,037	0,029
FAcOEt	5,283	0,011
FBuOH	5,997	0,035
FAq	20,157	0,030

6.5.2 Determinação do potencial supressor do radical DPPH

Quanto a atividade supressora do radical DPPH, ilustrada na Figura 53, a fração que apresentou menor valor de IC₅₀ foi a FAcOEt, com um IC₅₀ de 35,95 µg/mL. Em segundo plano destacou-se o EBEtOH e a FBUOH, com IC₅₀ de 74,93 e 71,06 µg/mL, respectivamente.

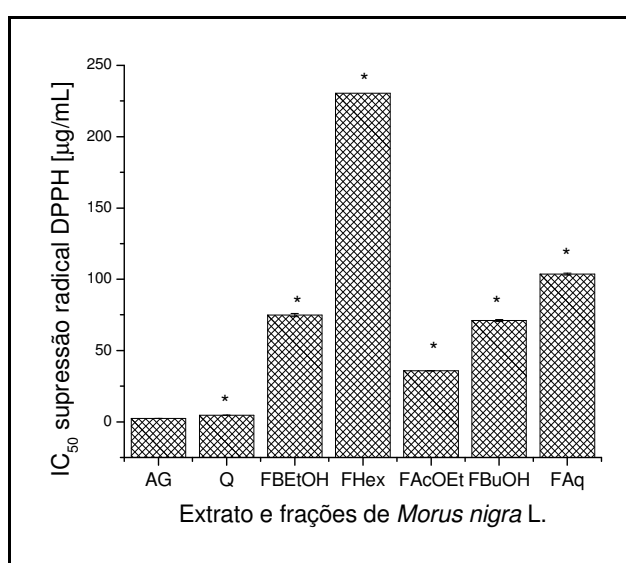


Figura 53 - Potencial de supressão do radical DPPH pelo extrato bruto e frações obtidos de *Morus nigra*, expressos em IC₅₀ (média ± desvio padrão, n = 3). * p ≤ 0,002 quando ácido gálico (AG) comparado com quercetina, EBEtOH, FHex, FAcOEt, FBUOH e FAq.

Tabela 11 - Médias e desvios padrão das determinações do IC₅₀ para o DPPH com extrato bruto e frações de *M. nigra*.

Fração	Média (µg/mL)	Desvio Padrão (n = 3)
Ácido gálico	2,360	0,003
Quercetina	4,710	0,000
EBEtOH	74,930	1,064
FHex	230,470	0,000
FAcOEt	35,947	0,006
FBUOH	71,063	0,709
FAq	103,647	0,647

O melhor desempenho demonstrado pela FAcOEt possivelmente se refere ao maior teor de flavonoides, quando comparado com EBEtOH e FBuOH.(Figura 51, p. 97) Na Tabela 11 estão expostas as médias e desvios padrão obtidos.

6.5.3 Atividade supressora do ácido hipocloroso (HOCl)

Nos ensaios para a determinação da supressão de HOCl, expostos na Figura 54, observa-se que as FAcOEt e FBuOH foram as que apresentaram melhor desempenho como supressoras de HOCl, indicado pelo IC_{50} de 3,440 e 4,380 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Mesmo assim, estas são inferiores ao padrão quercetina, que apresentou um IC_{50} de 1,550 $\mu\text{g/mL}$. Essa diferença supostamente se deve ao fato do padrão ser uma substância pura diferente dos extratos. Na Tabela 12 estão expostas as médias e desvios padrão obtidos.

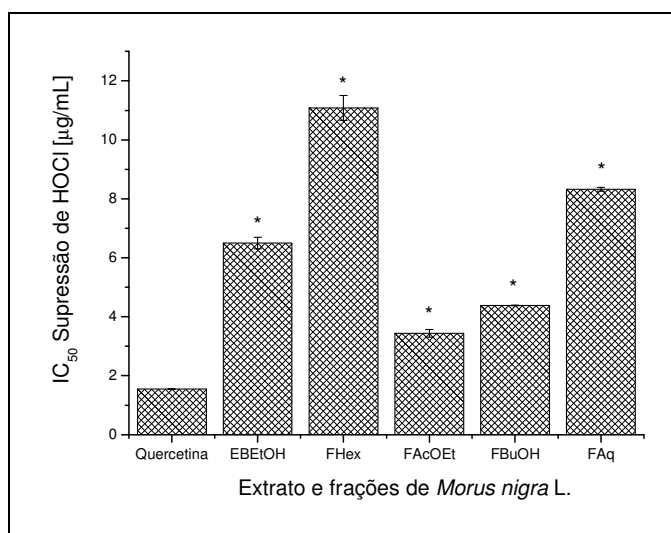


Figura 54 - IC_{50} para supressão do ácido hipocloroso (HOCl) (média $\pm$ desvio padrão, $n = 3$)

* $p \leq 0,001$ quando quercetina comparada com EBEtOH, FHex, FAcOEt, FBuOH e FAq.

Tabela 12 - Médias e desvios padrão das determinações da capacidade de supressão de HOCl pelos extratos bruto e pós-partição

Fração	Média ($\mu\text{g/mL}$)	Desvio Padrão (n = 3)
Quercetina	1,550	0,007
EBEtOH	6,500	0,199
FHex	11,080	0,425
FAcOEt	3,440	0,130
FBuOH	4,380	0,011
FAq	8,320	0,062

6.5.4 Atividade supressora do ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$)

Durante explosão oxidativa, a NADPH oxidase catalisa a redução univalente do oxigênio levando à formação de $\text{O}_2^{\bullet-}$, ocorrendo simultaneamente um aumento do consumo de oxigênio. O $\text{O}_2^{\bullet-}$ não é um potente oxidante, mas participa em uma série de reações formando diferentes espécies oxidantes e radicalares, deletérias ou não (BABIOR, 2000; HAMPTON et al., 1998). Portanto, o ânion superóxido é um alvo farmacológico importante no que se refere à prevenção e tratamento de patologias associadas ao estresse oxidativo. Compostos que possuem efetiva ação supressora sobre o $\text{O}_2^{\bullet-}$ podem levar a uma menor formação de ERO como H_2O_2 e HOCl (BABIOR, 2000).

Os resultados obtidos nos ensaios de supressão do $\text{O}_2^{\bullet-}$, expostos na Figura 55 demonstram que o FAq e EBUOH apresentaram atividade antioxidante promissora, com IC_{50} de 36,33 e 90,77 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, entretanto foi a fração aquosa que melhor apresentou potencial de supressão do ânion superóxido. Estes resultados foram melhores que os padrões quercetina ($\text{IC}_{50} = 242,33 \mu\text{g/mL}$) e ácido gálico ($\text{IC}_{50} = 346,66 \mu\text{g/mL}$). Este fato estimula a continuidade da pesquisa, a fim de obter o isolamento e a identificação dos constituintes destas frações nas quais foram fracionados compostos de maior polaridade. Na Tabela 13 estão expostas as médias e desvios padrão obtidos durante os ensaios.

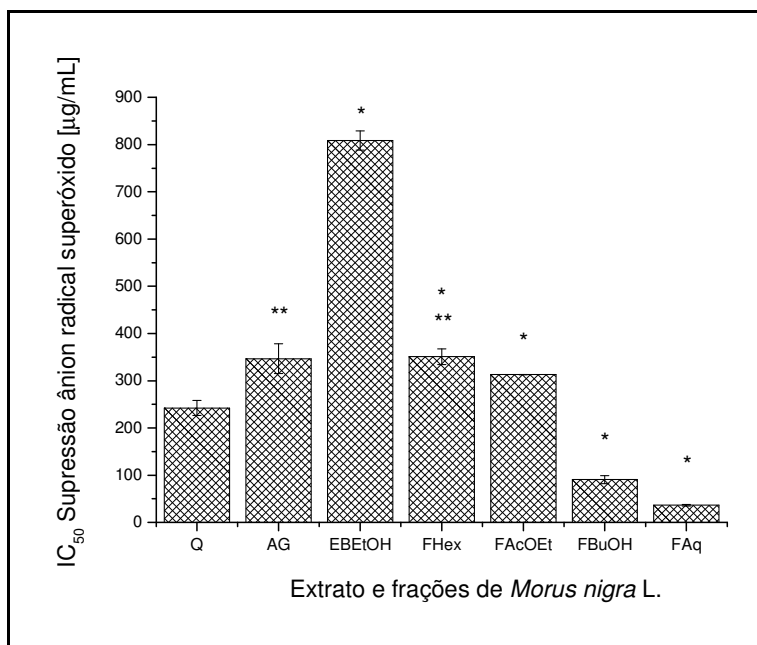


Figura 55 - IC₅₀ para supressão de ânion radical superóxido (O₂^{•-}) (média ± desvio padrão, n = 3)

* p ≤ 0,001 quando quercetina comparado a ácido gálico, EBEtOH, FHex, FAcOEt, FBuOH e FAq.

** p < 0,05 quando: FAcOEt comparado com FHex e ácido gálico.

Tabela 13- Médias e desvios padrão das determinações da capacidade de supressão de O₂^{•-} pelos extratos bruto e pós-partição

Fração	Média (µg/mL)	Desvio Padrão (n = 3)
Ácido gálico	346,666	31,501
Quercetina	242,333	15,822
EBEtOH	808,967	20,298
FHex	351,000	16,664
FAcOEt	313,167	0,404
FBuOH	90,767	8,603
FAq	36,333	1,557

6.5.5 Atividade supressora de Óxido Nítrico (NO[•])

De acordo com Beda e Nedospasov (2005), o método oficial para determinação do nitrito envolve, geralmente, os procedimentos espectrofotométricos baseados na reação de Griess, na qual o nitrito reage com a sulfanilamida em meio ácido. O diazo composto formado (ácido azo- α -aminonafitaleno-parabenzeno-sulfônico) reage com o cloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina (NED), gerando um composto de coloração rosa intensa ($\lambda = 540$ nm).

Os resultados obtidos nos ensaios de supressão do NO[•], expostos na Figura 56 demonstram que o EBuOH e FAq apresentaram boa atividade antioxidante, com IC₅₀ de 3,33 e 1,74 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Estes resultados foram mais intensos que os padrões quercetina (IC₅₀ = 11,07 $\mu\text{g/mL}$) e ácido gálico (IC₅₀ = 10,53 $\mu\text{g/mL}$). A fração aquosa foi a que melhor apresentou potencial de supressão de NO[•]. A partir do fracionamento cromatográfico e identificação fitoquímica, novos ensaios serão realizados para melhor elucidar esse potencial supressor. Na Tabela 14 estão expostas as médias e desvios padrão obtidos durante os ensaios.

Tabela 14 - Médias e desvios padrão das determinações da capacidade de supressão do óxido nítrico pelos extratos bruto e pós-partição

Fração	Média ($\mu\text{g/mL}$)	Desvio Padrão (n = 3)
Quercetina	11,070	0,153
Ácido Gálico	10,533	0,252
EBEtOH	9,960	0,017
FHex	11,883	0,144
FAcOEt	11,827	0,136
FBuOH	3,330	0,053
FAq	1,740	0,052

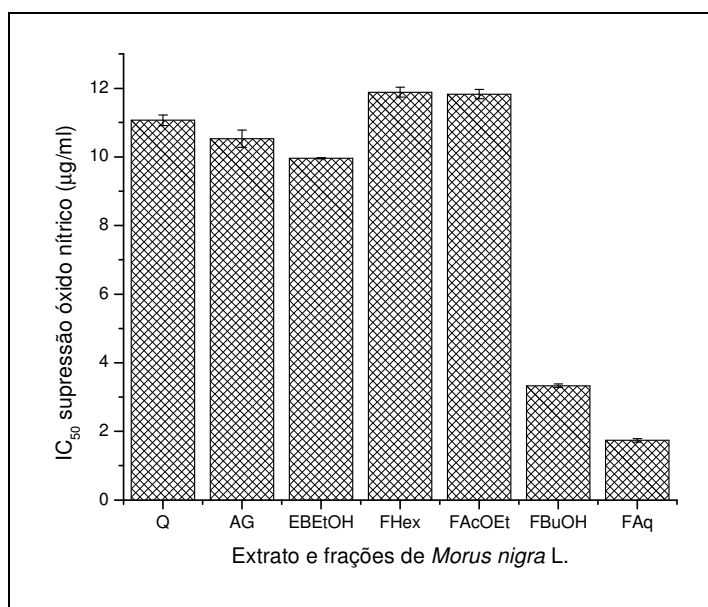


Figura 56 – IC₅₀ para supressão de óxido nítrico (ON). Os valores apresentados são média $\pm$ desvio padrão (n = 3).

6.6 Atividade Anti-hemolítica de Eritrócitos

A princípio não foi observado *in vitro* o potencial hemolítico significativo do extrato bruto e frações de *M. nigra* sobre os eritrócitos, evidenciando a não influência das amostras (em concentrações superiores ao IC₅₀) nos ensaios anti-hemolíticos. A Figura 57 ilustra o percentual de hemólise frente as amostras. Observe que a FAcOEt e FHex, mesmo sendo insignificante, são as que mais apresentaram potencial hemolítico, 2,6 % a 22,4 µg/mL e 3,5 % a 82,5 µg/mL, respectivamente.

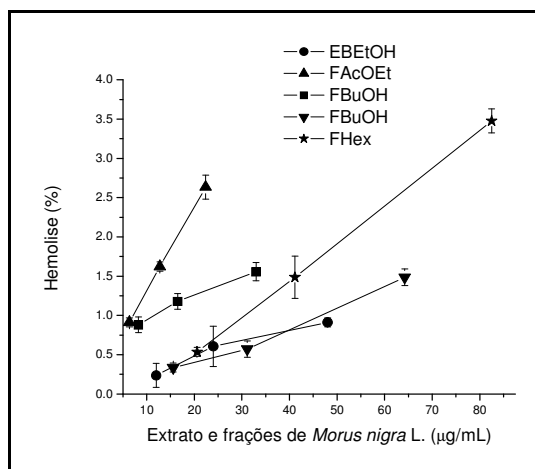


Figura 57 – Porcentagem de hemólise frente ao extrato bruto e frações de *M. nigra* (média $\pm$ desvio padrão, $n = 3$)

Os parâmetros de IC_{50} para inibição do estresse oxidativo em eritrócitos promovido pelo radical AAPH foram determinados e está na Figura 58. Nesse contexto as frações FAcOEt e FBuOH (com IC_{50} de $2,37 \pm 0,035$ e $8,017 \pm 0,212$, respectivamente) foram as melhores que desempenharam o papel citoprotetor de membranas. Esse efeito confere com potencial de supressão de formas radicalares evidenciados nos ensaios de supressão de ABTS e DPPH. Na Tabela 15 estão as médias e desvio padrão dessas determinações.

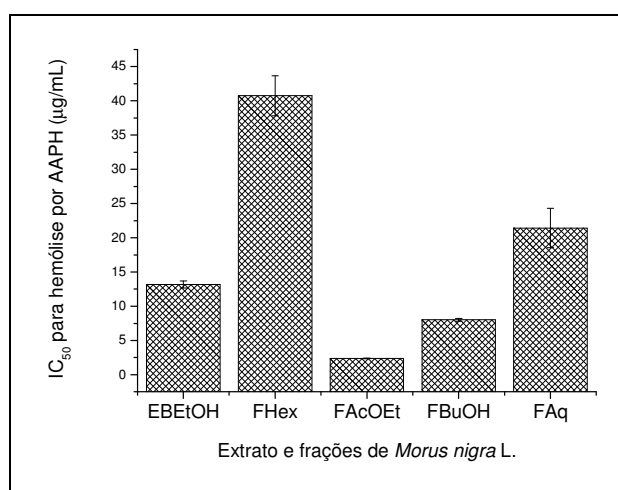


Figura 58 – IC_{50} para supressão da hemólise induzida por AAPH frente ao extrato bruto e frações de *M. nigra* (média $\pm$ desvio padrão, $n = 3$)

Tabela 15 - Médias e desvios padrão das determinações de IC₅₀ para supressão da hemólise promovida por AAPH.

Extrato e Frações	Média (µg/mL)	Desvio Padrão (n = 3)
EBEtOH	13,187	0,505
FHex	40,743	2,921
FAcOEt	2,370	0,035
FBuOH	8,017	0,212
FAq	21,423	2,866

Para o ensaio de inibição do estresse oxidativo em eritrócitos promovido pelo ácido hipocloroso (HOCl) foram determinados os IC₅₀ do extrato e frações (Figura 59). A análise mostra que as frações FAcOEt e FBuOH (com IC₅₀ de $2,6 \pm 0,055$ e $5,55 \pm 0,07$, respectivamente) foram novamente as que melhores desempenharam o papel citoprotetor dos eritrócitos. Na Tabela 16 estão as medias e desvio padrão das determinações. Esse ensaio é validado pela capacidade das respectivas frações em suprimir o HOCl, observado na Figura 56.

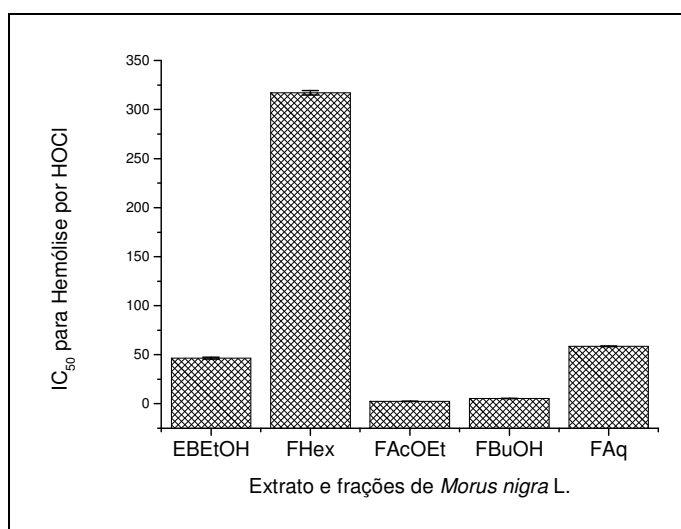


Figura 59 – IC₅₀ para supressão da hemólise induzida por HOCl frente ao extrato bruto e frações de *M. nigra* (média ± desvio padrão, n = 3)

Tabela 16 - Médias e desvios padrão das determinações de IC₅₀ para supressão da hemólise promovida por HOCl.

Extrato e Frações	Média (µg/mL)	Desvio Padrão (n = 3)
EBEtOH	46,510	1,0064
FHex	317,053	2,3095
FAcOEt	2,603	0,0551
FBuOH	5,550	0,0700
FAq	58,593	0,3163

6.7 Atividade antimicrobiana

Muitas espécies vegetais têm sido usadas pelas características antimicrobianas através de compostos sintetizados pelo metabolismo secundário da planta. Estes produtos são reconhecidos por suas substâncias ativas, como é o caso dos compostos fenólicos e polifenóis (OSTROSKY et al., 2008).

Para assegurar a segurança e eficácia da metodologia, do meio de cultura e das leveduras utilizadas, foi realizado o controle de fármaco nas mesmas condições do experimento apenas para certificar-se da eficiência do método da atividade antimicrobiana através da microdiluição.

Pelo método espectrofotométrico, a CIM foi definida como sendo a menor concentração de amostra em que a densidade óptica (490 nm) foi reduzida a 90% daquela observada para a solução controle (sem amostra).

Considerando as concentrações determinadas para avaliação da atividade antimicrobiana de 250 µg/mL a 0,5 µg/mL, utilizando as bactérias *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Salmonella* sp. e os fungos *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. neoformans*.

A Tabela 17 apresenta o comportamento dos micro-organismos utilizados frente aos fármacos ciprofloxacino e fluconazol, bem como a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato bruto hidroalcoólico e suas frações das folhas de *M. nigra*, observando sua eficácia frente aos micro-organismos estudados.

De acordo com Scorzoni e colaboradores (2007), nos extratos que apresentam CIM menor que 75 µg/mL a atividade antifúngica é considerada forte, entre 75 a 150 µg/mL, moderada e entre 150 a 250 µg/mL, fraca e maior que 250 µg/mL sem atividade.

Mediante os dados obtidos na Tabela 21, a fração acetato de *M. nigra* apresentou atividade antifúngica frente a *C. albicans* e *C. krusei*, mesmo sendo considerada moderada. A fração aquosa (FAq) apresentou fraca atividade frente a *C. krusei* e nenhuma atividade para as demais. Para os demais micro-organismos, o extrato bruto e frações não apresentaram atividade antimicrobiana nos ensaios realizados nas concentrações de 250 µg/mL.

Tabela 17 - Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para o controles (ciprofloxacino e fluconazol) e para o extrato bruto e suas frações dos frutos de *M. nigra* frente aos micro-organismos (Determinado pó D.O. a 490 nm).

Microrganismos	CIM (µg/mL) ciprofloxacino	CIM (µg/mL) fluconazol	CIM EBEtOH (µg/mL)	CIM FacOEt (µg/mL)	CIM FBuOH (µg/mL)	CIM FAq (µg/mL)
<i>S. aureus</i>	31,25		*	*	*	*
<i>E. coli</i>	3,9		*	*	*	*
<i>P. aeruginosa</i>	7,8		*	*	*	*
<i>S. epidermidis</i>	3,9		*	*	*	*
<i>Salmonella</i> sp.	1,9		*	*	*	*
<i>C. krusei</i>		16,0	*	125	*	250
<i>C. albicans</i>		0,0625	*	125	*	*
<i>C. parapsilosis</i>		1,0	*	250	*	*
<i>C. neoformans</i>		16,0	*	*	*	*

* Não houve atividade nas concentrações testadas (0,49 a 250 µg/mL).

Yi e colaboradores (2007) investigaram a atividade do extrato aquoso e metanólico dos frutos de *M. nigra*, que apresentaram atividade antifúngica contra *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. geotricum*.

A candidíase caracteriza-se como a infecção fúngica mais comum de mucosas, produzidas por diversas espécies de *Candida*, sendo *C. albicans* seu agente etiológico mais freqüente. Ainda, outras espécies inseridas no gênero *Candida* (e.g. *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. stellatoidea*, *C. tropicalis*) também podem estar envolvidas na etiologia da candidíase (LIMA et al., 2006).

6.8 Avaliação do extrato bruto e frações de *M. nigra* sobre a cinética enzimática da HRP

A fim de investigar a ação do extrato bruto e frações pós partição sobre a cinética das peroxidases, utilizamos a HRP (Tipo I), uma enzima clássica em estudos de oxidação de xenobióticos por peroxidases.

Realizou-se estudo de inibição da HRP através do ensaio de oxidação do guaiacol na presença de peróxido de hidrogênio, baseando-se no protocolo de Khalil (2002). As velocidades iniciais (V_0) foram obtidas por ajuste linear entre concentrações variadas de guaiacol (de 0,5 a 5 mM) e absorbância (a 470 nm) obtida pela reação em um tempo de 1 minuto; a velocidade máxima ($V_{\text{máx}}$) e o constante de Michaelis-Menten (K_M), foram obtidas a partir da inclinação do ajuste linear dos gráficos de duplo-recíproco (Lineweaver-Burke), demonstradas nas Figura 60 e 61.

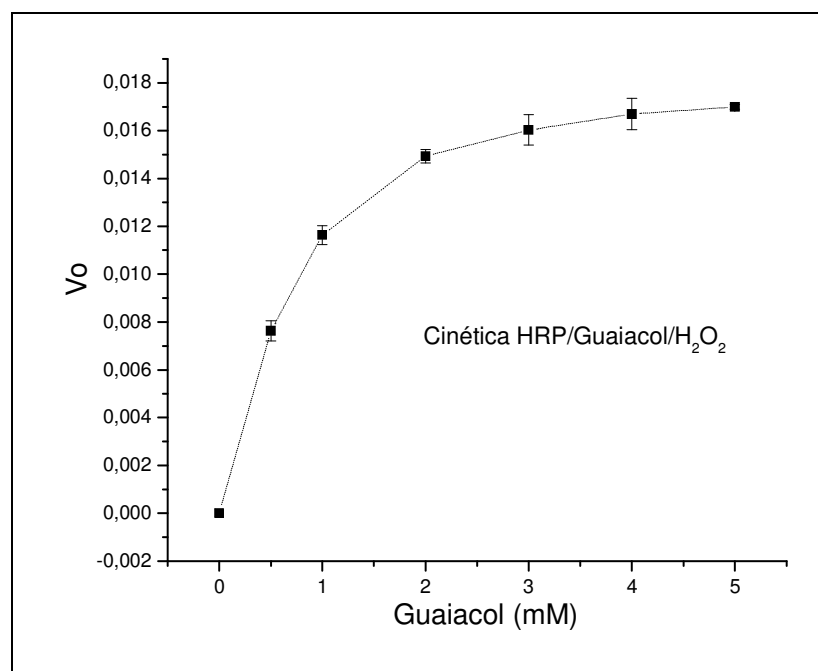


Figura 60 – Gráfico da cinética da oxidação do guaiacol (0,5 a 5 mM) pela HRP (10 nM); tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4; 37°C; H_2O_2 0,1 mM; 1 minutos de reação; leitura a 470 nm.

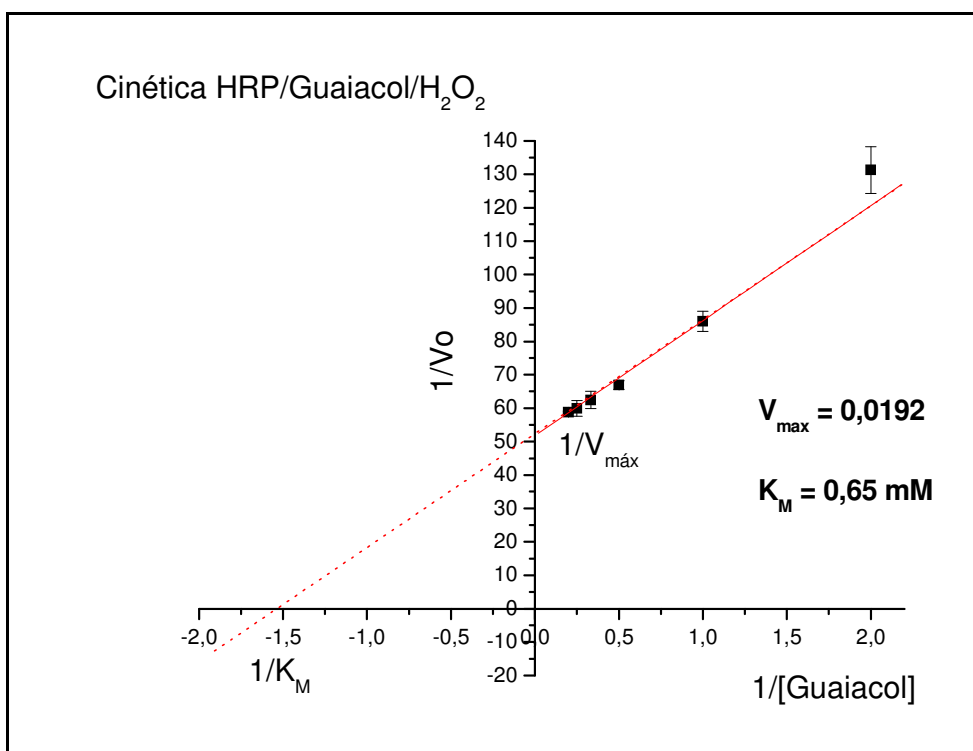


Figura 61 – Gráfico duplo recíproco da cinética da oxidação do guaiacol (0,5 a 5 mM) pela HRP (10 nM); tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4; 37°C; H₂O₂ 0,1 mM; 1 minutos de reação; leitura a 470 nm.

Como pode ser observado na Figura 62, a cinética da HRP (Tipo I) apresentou uma $V_{\max}$ de 0,0192 e um K_M de 0,65 M para o guaiacol.

Iniciamos o estudo de inibição da cinética, frente o modelo HRP/guaiacol/H₂O₂, onde determinamos os valores de o IC₅₀ para o extrato bruto e frações de *M. nigra* (Figura 60)

As frações que apresentaram menor valor de IC₅₀ e conseqüentemente maior poder de inibição da cinética da HRP foram a FAcOEt e FBuOH, com valores de 0,077 mg/mL e 0,095 mg/mL, respectivamente. Os demais valores estão ilustrados na Tabela 18.

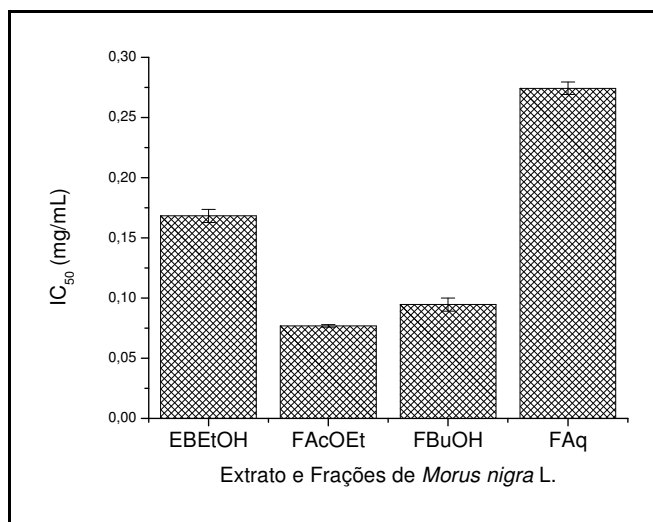


Figura 62 – IC₅₀ para a cinética da oxidação do guaiacol (5 mM) pela HRP (10 nM) com o extrato bruto e frações de *M. nigra*; tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4; 37°C; H₂O₂ 0,1 mM; 1 minutos de reação; leitura a 470 nm.

Tabela 18 – Média e desvio padrão dos valores de IC₅₀ obtidos pela inibição da cinética de HRP frente ao extrato bruto e frações de *M. nigra*.

Extrato e Frações	Média (µg/mL)	Desvio Padrão (n = 3)
EBEtOH	0,168	0,005
FAcOEt	0,077	0,001
FBuOH	0,095	0,005
FAq	0,274	0,005

A partir desses valores, foram realizadas os estudos cinéticos da inibição da HRP com a FAcEt e FBuOH nas concentrações equivalentes a uma vez o IC₅₀ e duas vezes o IC₅₀ (ou seja, de 0,077 mg/mL e 0,154 mg/mL para a FAcOEt; 0,095 mg/mL e 0,190 mg/mL para a FBuOH).

Nas Figuras 63 e 645 estão representados os gráficos de Michaelis-Menten e o duplo-recíproco para as cinéticas de inibição da FAcOEt.

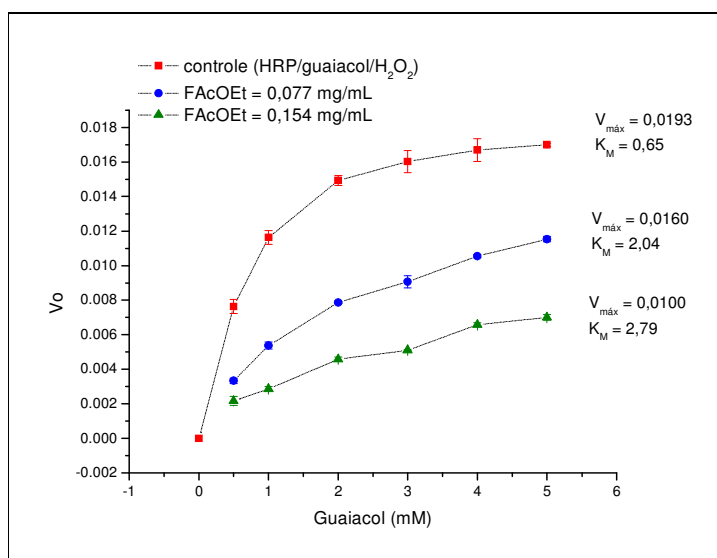


Figura 63 – Gráfico de Michaelis-Menten representando a cinéticas da oxidação do guaiacol pela HRP, na ausência e presença da FAcOEt (0,077 mg/mL e 0,154 mg/mL).

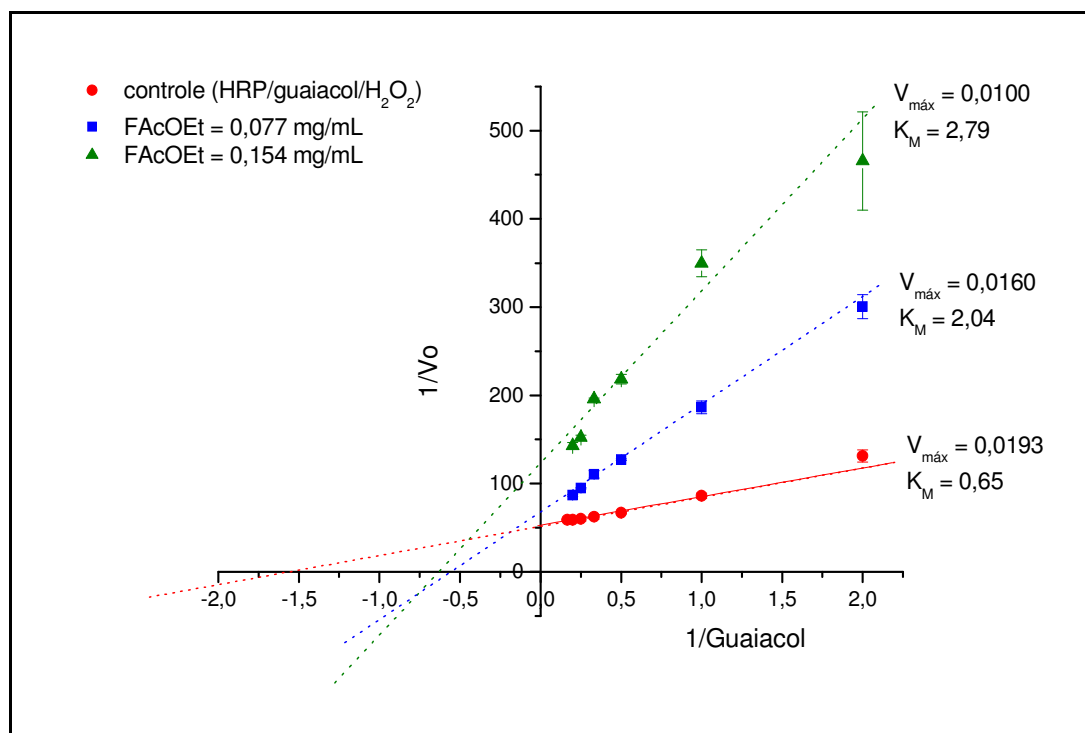


Figura 64 – Gráfico duplo-recíproco representando a cinéticas da oxidação do guaiacol pela HRP, na ausência e presença da FAcOEt (0,077 mg/mL e 0,154 mg/mL).

A interpretação dos gráficos evidencia o potencial inibidor das frações. Pelos dados do gráfico duplo-recíproco, o valor da $V_{\text{máx}}$ para a cinética da HRP decai na proporção que é adicionada as FAcOEt, de 0,0193 (cinética sem fração) para 0,0160 (quando é adicionado 0,077 mg/mL) e 0,0100 (quando adiciona 0,154 mg/mL). O mesmo é observado para os valores de K_M , onde ocorre o aumento de 0,65 mM (cinética sem FAcOEt) para 2,04 mM (FAcOEt, 0,077 mg/mL) e 2,79 mM (FAcOEt, 0,154 mg/mL).

Com esses dados pode-se supor, que nas concentrações utilizadas de FAcOEt, ocorra uma inibição do tipo mista, evidenciada pela variação na $V_{\text{máx}}$ e K_M das cinéticas.

Os mesmos ensaios foram realizados com a FBuOH e estão ilustrados na Figura 65 e 66.

Os gráficos evidenciam o potencial inibidor das frações. A partir dos dados do gráfico duplo-recíproco (Figura 66), observamos que o valor da $V_{\text{máx}}$ para a cinética da HRP também decai na proporção que é adicionada as FBuOH, de 0,0195 (cinética sem FBuOH) para 0,0180 (FBuOH, 0,095 mg/mL) e 0,0076 (FBuOH, 0,190 mg/mL). O mesmo é observado para os valores de K_M , onde ocorre o aumento de 0,67 mM (cinética sem FBuOH) para 6,58 mM (FBuOH, 0,095 mg/mL) e ocorre uma leve queda de 4,76 mM quando adiciona-se 0,190 mg/mL da FBuOH. Isto nos evidencia dois mecanismos de inibição: i) uma inibição do tipo competitiva (quando FBuOH = 0,095 mg/mL), pois a $V_{\text{máx}}$ permanece constante, ocorrendo apenas a mudança na K_M ; e ii) uma inibição do tipo mista, (quando FBuOH = 0,190 mg/mL) em que $V_{\text{máx}}$ e a K_M variam.

Certos de que, durante os ensaios cinéticos, as frações FAcOEt e FBuOH não estavam puras, e possuindo compostos fenólicos não identificados. Ensaios futuros com compostos puros, isolados dessas frações, serão necessários para assim poder concluir tais evidências.

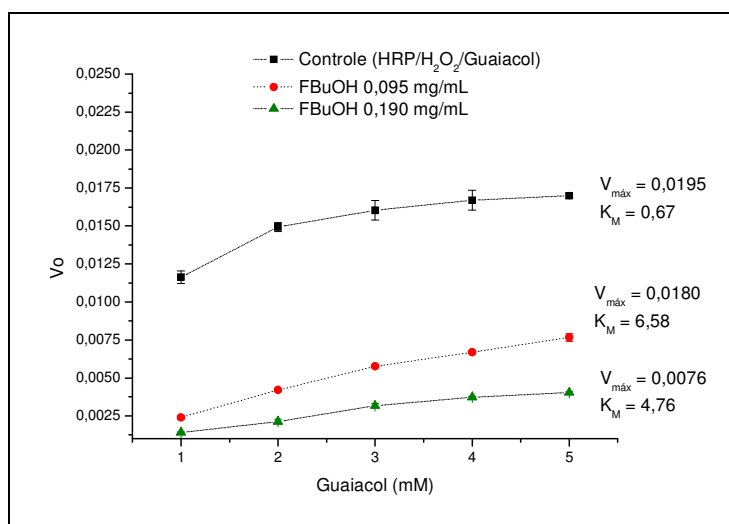


Figura 65 – Gráfico de Michaelis-Menten representando a cinética da oxidação do guaiacol pela HRP, na ausência e presença da FBuOH (0,095 mg/mL e 0,190 mg/mL).

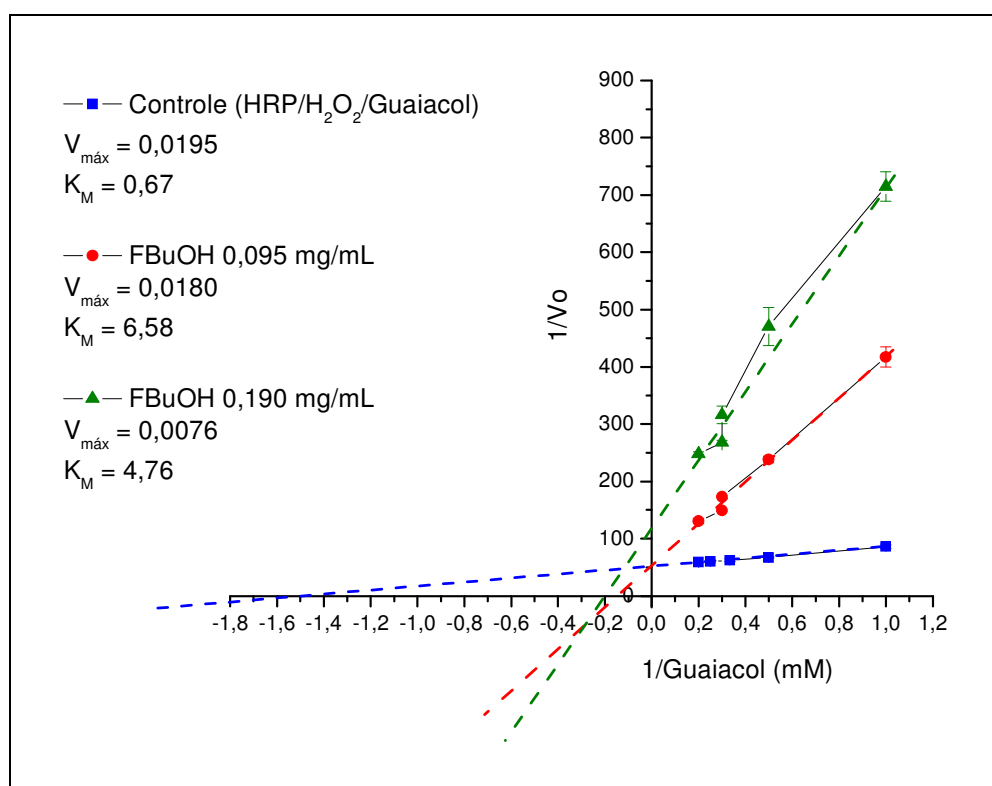


Figura 66 – Gráfico de duplo-recíproco representando a cinética da oxidação do guaiacol pela HRP, na ausência e presença da FBuOH (0,095 mg/mL e 0,190 mg/mL).

6.9 Identificação por RMN das subfrações isoladas da FAcOEt.

6.9.1 Identificação do flavonóide FAc-1.1

A partir da fração FAcOEt isolada de *M. nigra* (Figura 37, Página 70), a subfração FAc-1.1, foi identificada por RMN como sendo um composto flavônico. O espectro de RMN de ^1H da FAc-1.1 (Figura 68) apresentou sinais característicos dos flavonoides. Observam-se neste espectro dois sinais de dupletos em δ 6,13 e δ 6,30 referentes a H-6 e H-8, respectivamente, com constante de acoplamento de 2,1 Hz característicos dos hidrogênios acoplando em meta relacionado ao anel A dos flavonoides.

Verificou-se ainda neste espectro quatro sinais de dupletos integrando cada um para dois hidrogênios em alfa e com a maior constante de acoplamento em 9,0 Hz, sugerindo a presença de dois anéis aromáticos *p*-di-substituídos na estrutura de FAc-1.1. Dada a presença de dois sinais de dupletos de hidrogênios olefínicos α,β carbonílicos em δ 6,07 (H-8'') e δ 7,40 (H-7'') com constante de acoplamento de 15,60 Hz, sugeriu-se a presença de uma unidade *trans-p*-cumaroila na estrutura de FAc-1.1. Este espectro apresentou ainda sinais de hidrogênios ligados a carbonos oxigenados entre δ 3,4 – 4,4, correspondentes a H-2'' e H-3'' respectivamente, que aliado ao sinal de duplete em δ 5,24 (*d*; 7,4 Hz) de H-1'' sugeriu-se a presença de um *O*- β -glicosídeo na estrutura de FAc-1.1. Na Tabela 19 encontra-se o resumo dos deslocamentos em ppm do espectro de RMN ^1H e ^{13}C para substâncias isoladas.

No espectro de COSY de FAc-1.1 (Figura 70) verificou-se cinco sistemas de spins de acordo com os cálculos das constantes de acoplamento a partir da análise do espectro de RMN de ^1H .

Através do mapa de contorno HSQC de FAc-1.1 (Figura 71) foi possível atribuir todos os valores de deslocamento químicos dos carbonos hidrogenados facilitando a análise do espectro de HMBC (figura 72).

O mapa de contorno HMBC apresentou importantes correlações de sinais hidrogênio com carbonos a múltiplas ligações (J_{1-3}). O sinal de hidrogênio em δ 8,0 (H-2) apresentou

importante correlação com o sinal de carbono em δ 158,0 (C-3), enquanto que o sinal integrando para dois hidrogênios em δ 6,81 apresentou importante correlação com o sinal de carbono fenólico em δ 161, sendo possível atribuir estes sinais ao anel B *p-di*-substituído do flavonóide.

Observou-se ainda no espectro de HMBC de FAc-1.1 que o sinal em δ 7,30 (H-2) apresentou correlação com o sinal de carbono olefínico β -carbonílico em δ 146,69; enquanto que o sinal integrando para dois hidrogênios em δ 6,81 (H-3' e H-5') apresentou correlação com o sinal de carbono fenólico em δ 161,31, dado o acoplamento spin-spin entre dois sinais de hidrogênios foi possível caracterizar a unidade de *trans-p*-cumaroila atribuindo-se todos os sinais de deslocamento químico dos carbonos.

O sinal de α -hidrogênio anomérico em δ 5,24 (H-1'') apresentou correlação no HMBC com o sinal de carbono em δ 135,33; característico do carbono C-3 dos flavonóis (HARBORNE, 1998), sendo possível atribuir a β -D-glucopirranose ligada ao carbono C-3 da unidade aglicona Kaempferol (canferol), quando comparado com dados anteriormente relatados na literatura.

Ainda de acordo com a literatura (HARBORNE, 1988) o deslocamento do carbono C-6'' da unidade de glicose, apresenta deslocamento químico na faixa de 60,50 – 62,00, uma desblindagem deste carbono é sugestiva de uma possível esterificação; sendo assim, foi possível sugerir que a unidade de *trans-p*-cumaroila encontra-se esterificada com a hidroxila da glicose na posição C-6''.

O espectro de RMN de ^{13}C de FAc-1.1 (Figura 76) foi obtido de modo a comparar os dados obtidos com modelos da literatura. Sendo assim, através da análise dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C de FAc-1.1 e comparação com a literatura (CORNELIUS et al., 2004; COSTA et al., 2007), o flavonoide FAc-1.1 foi identificado inequivocamente como sendo o **tilirosídeo**, ambém nomeado como sendo o Kaempferol-3-Glucosídeo-6''-*p*-coumaroil, como ilustrado na Figura 67.

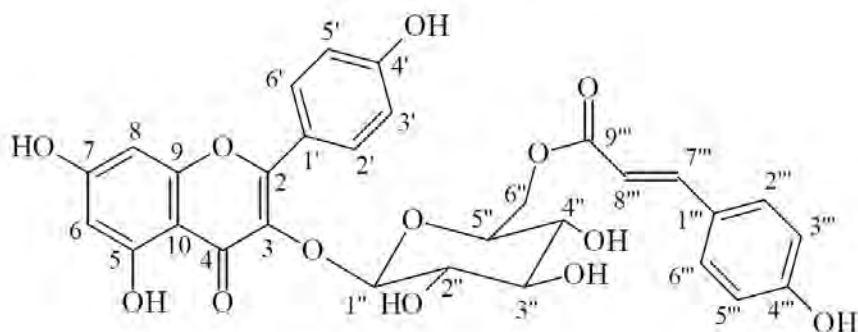


Figura 67 – Estrutura química do flavonoide tilirosídeo

Devido a presença de radical hidroxila na posição *para* do anel B, hidroxila em C5 e grupo cetoxi em C4 do anel A no flavonóide, e a presença de grupo cafeicilquínico, podemos deduzir que o flavonóide tilirosídeo apresenta fortes evidências de ser uma molécula antioxidante. Trabalhos anteriores confirmam que o flavonóide tilirosídeo apresenta atividade antiradicalar, utilizando o DPPH, antiinflamatória e inibição de peroxidação lipídica de lipoproteínas humanas (SALA et al., 2003; SCHINELLA et al., 2007).

Tabela 19 – Deslocamentos em ppm do espectro de RMN ^{13}C e ^1H para substâncias isoladas da subfração FAc-1.1 de *M. nigra*.

Posição	FAc-1.1 (400/100 MHz, MeOD)		tilirosídeo (Lit ^{*2}) (300/75 MHz, DMSO- d_6)		tilirosídeo (Lit ^{*3}) (200/50 MHz, CD 3OD)	
<i>H/C</i>	$\delta^1\text{H}$ (ppm) <i>J</i> (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm) <i>J</i> (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm) <i>J</i> (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
2	-	158,56	-	156,50	-	159,25
3	-	135,33	-	133,15	-	135,26
4	-	179,57	-	178,00	-	179,32
4a	-	105,72	-	104,80	-	105,54
5	-	161,66	-	162,65	-	162,82
6	6,13 (<i>d</i> ; 2,1)	100,16	6,48 (<i>d</i> ; 2,1)	99,93	6,10 (<i>d</i> ; 2,2)	99,92
7	-	166,93	-	165,25	-	165,81
8	6,30 (<i>d</i> ; 2,1)	94,99	6,75 (<i>d</i> ; 2,1)	94,85	6,25 (<i>d</i> 2,2)	94,85
8a	-	159,49	-	158,00	-	158,27
1'	-	122,87	-	122,64	-	122,63
2'/6'	8,00 (<i>d</i> ; 9,0)	132,34	8,35 (<i>d</i> ; 9,0)	131,20	7,96 (<i>d</i> ; 8,9)	132,21
3'/5'	6,81 (<i>d</i> ; 9,0)	116,18	7,23 (<i>d</i> ; 9,0)	116,10	6,79 (<i>d</i> ; 8,9)	115,98
4'	-	161,66	-	161,25	-	161,46
1''	5,24 (<i>d</i> ; 7,4)	104,16	5,84 (<i>d</i> ; 7,2)	102,02	5,24 (<i>d</i> ; 7,6)	104,03
2'' a 5''	3,40 – 4,30	75,86; 78,15; 71,86; 75,94	3,30 – 4,00	75,71; 77,96;71,60; 75,71	3,5	77,96 75,73; 75,73 71,68
6''	4,19/4,30	64,45	Não especifica	63,43	4,31/4,19	64,37
1'''	-	127,23	-	126,00	-	127,02
2'''/6'''	7,30 (<i>d</i> ; 9,0)	131,32	7,47 (<i>d</i> ; 8,7)	131,45	7,6 (<i>d</i> ; 8,5)	131,15
3'''/5'''	6,80 (<i>d</i> ; 9,0)	116,93	7,12 (<i>d</i> ; 8,7)	116,80	6,75 (<i>d</i> ; 8,5)	116,74
4'''	-	161,31	-	160,02	-	161,12
7'''	7,40 (<i>d</i> ; 15,6)	146,69	7,28 (<i>d</i> ; 15,6)	145,52	Não especifica	Não especifica
8'''	6,07 (<i>d</i> ; 15,6)	114,88	6,48 (<i>d</i> ; 15,6)	114,00	Não especifica	Não especifica
9'''	-	168,93	-	167,20	-	64,35

* 2 (CORNELIUS et. al., 2004); 3 (COSTA et al., 2007)

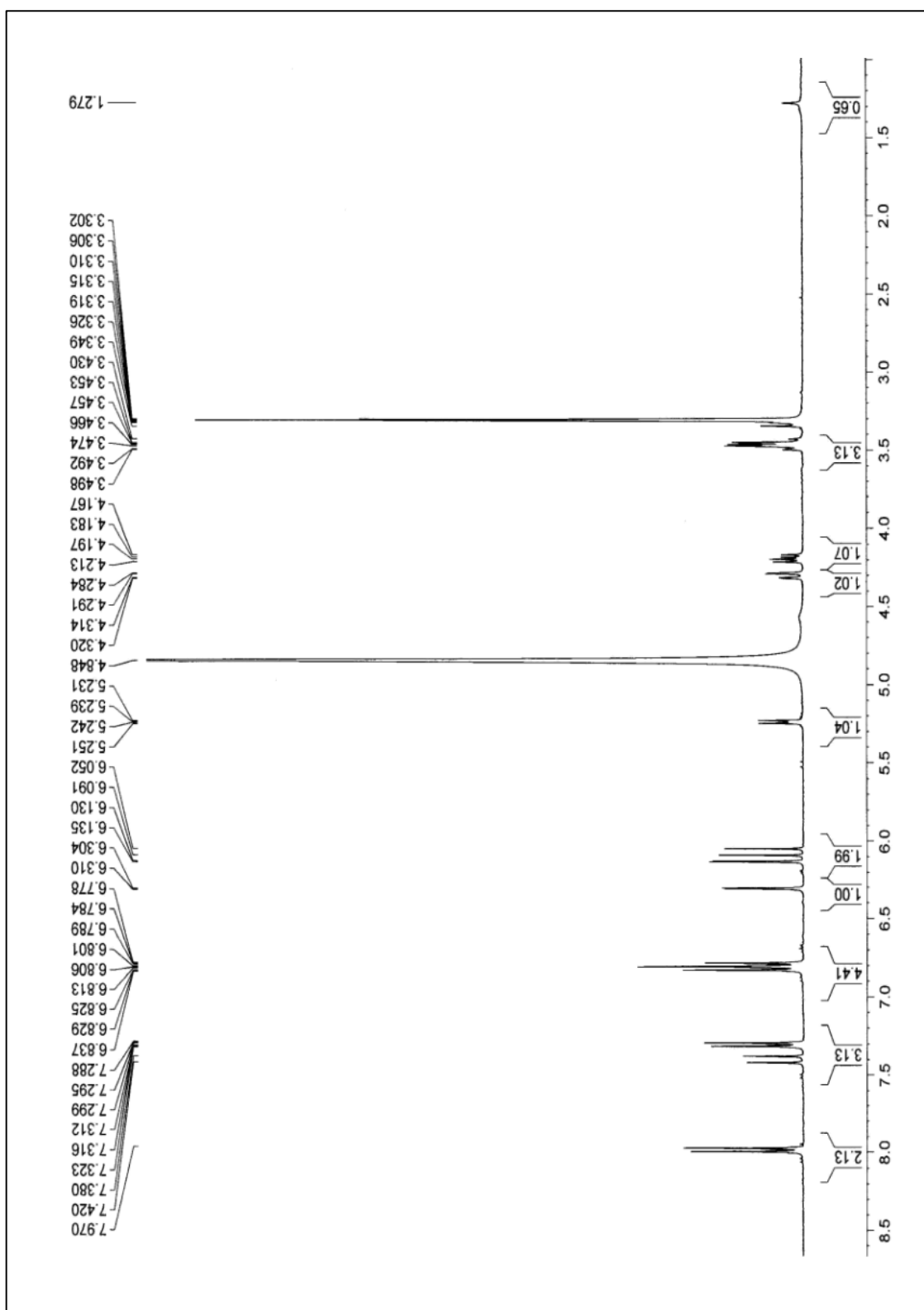


Figura 68 – Espectro de RMN de ^1H de FAc-1.1 [400 MHz, MeOD, δ (ppm), J (Hz)]

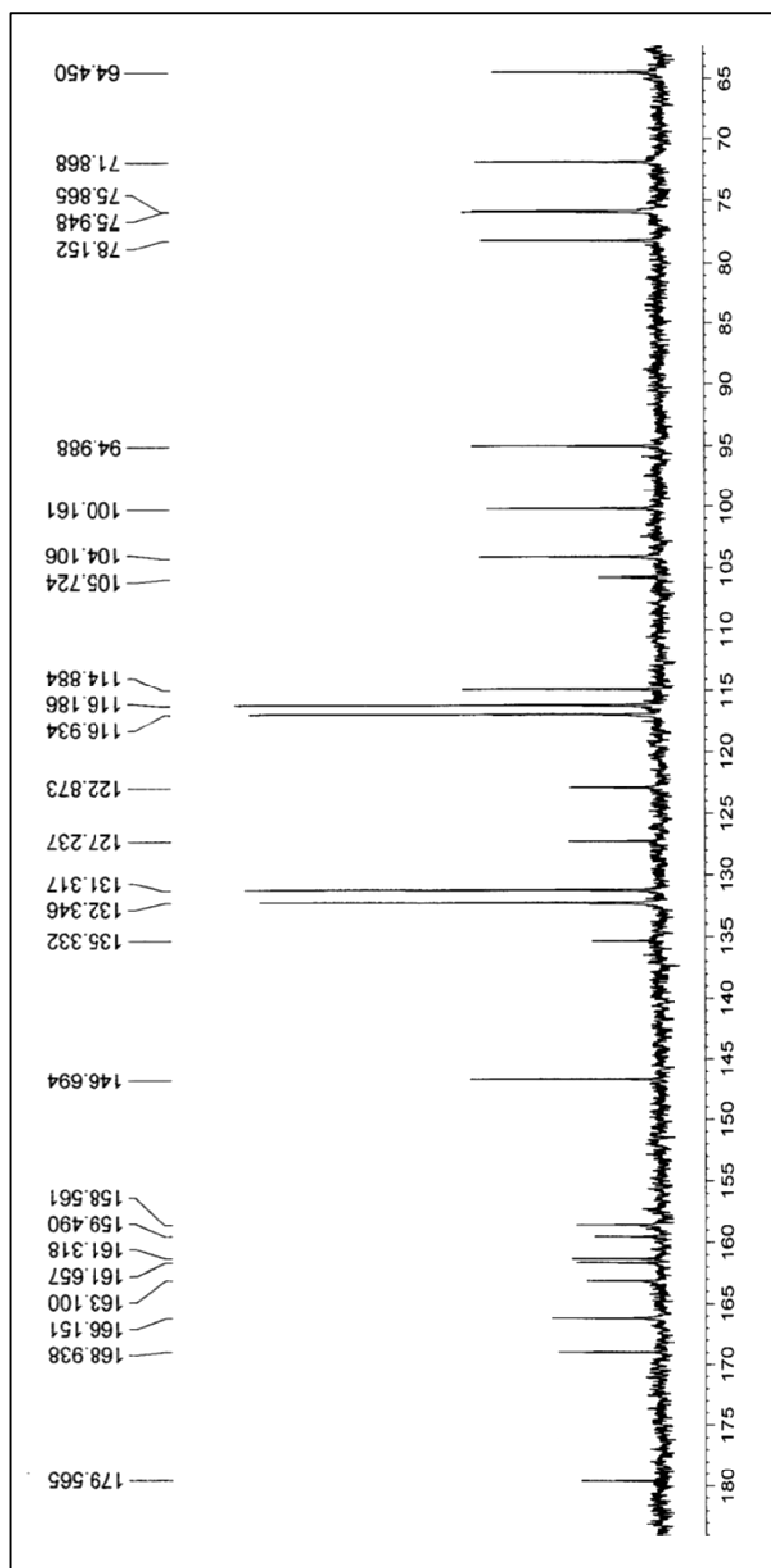


Figura 69 – Espectro de RMN de ^{13}C de FAc-1.1[100 MHz, MeOD, δ (ppm), J (Hz)]

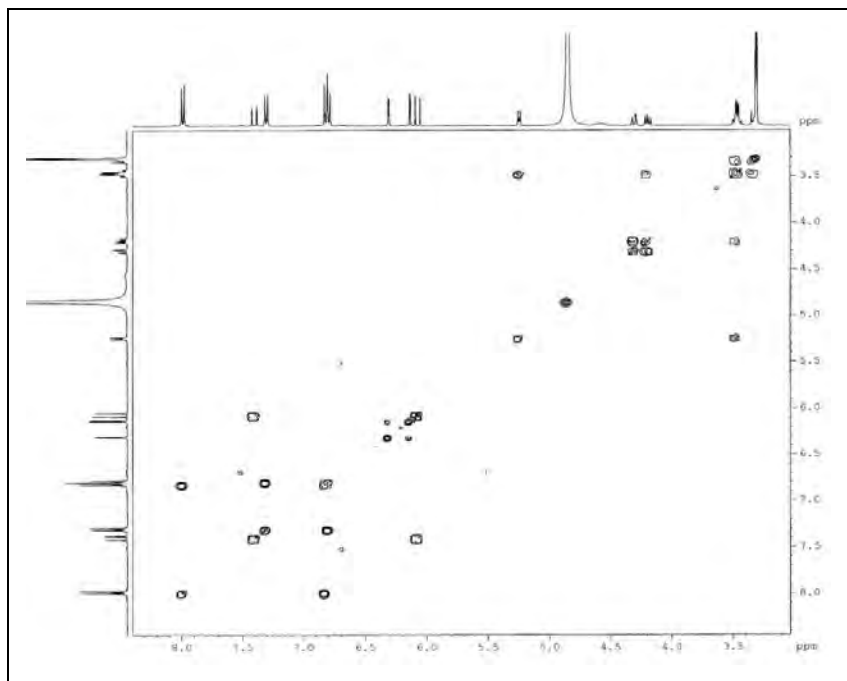


Figura 70 – Espectro de COSY de FAC-1.1 (400 MHz, MeOD)

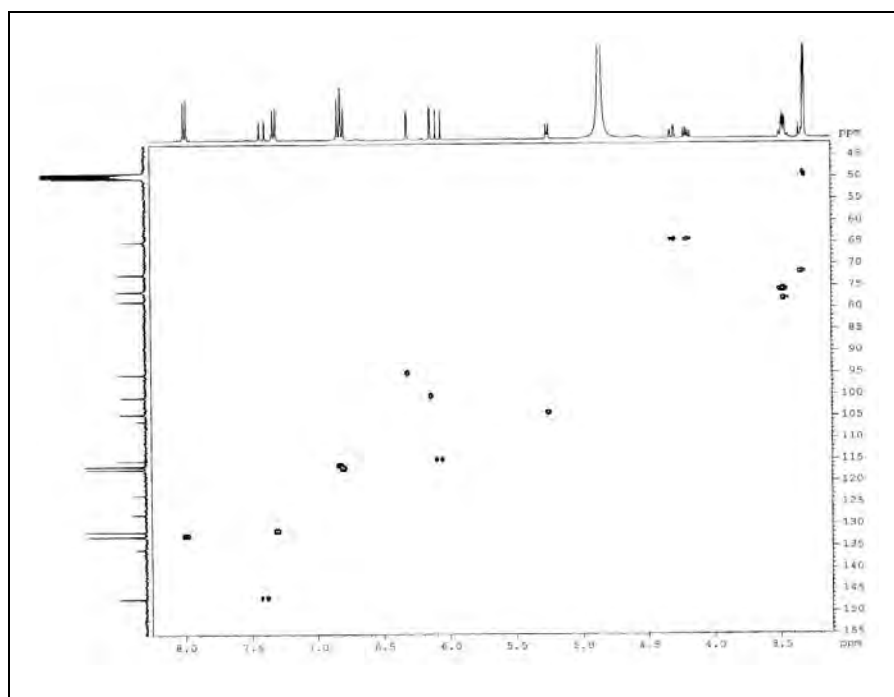


Figura 71 – Mapa de contorno HSQC de FAC-1.1 (400/100 MHz; $^1\text{H}/^{13}\text{C}$, MeOD)

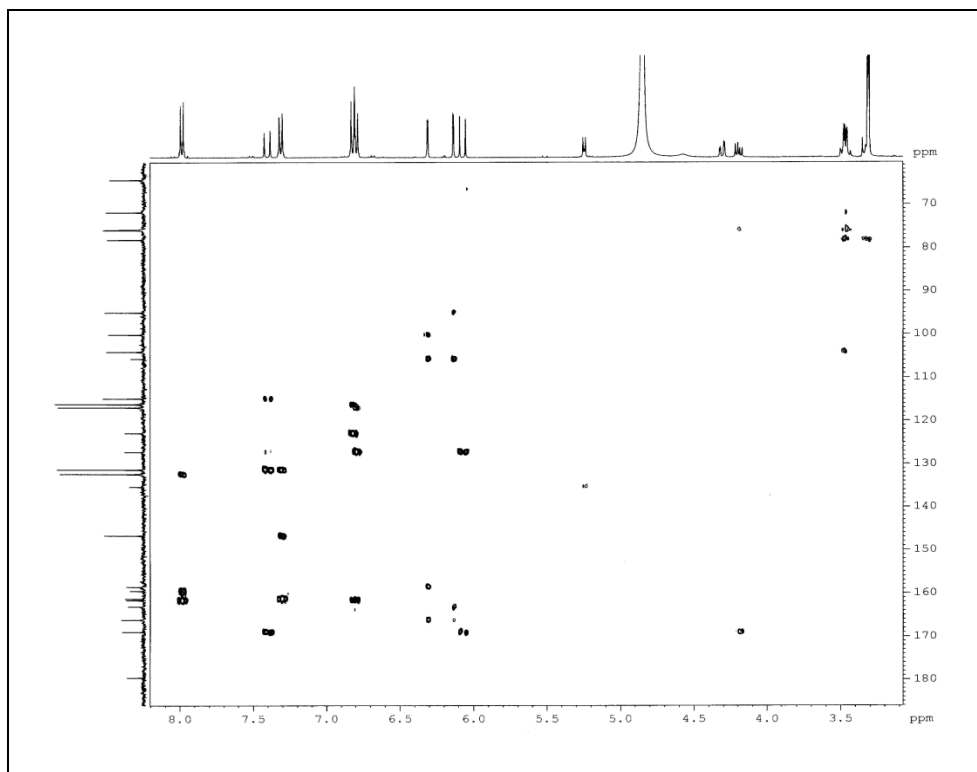


Figura 72 – Mapa de contorno HMBC de FAc-1.1 (400/100 MHz; $^1\text{H}/^{13}\text{C}$, MeOD)

6.9.2 Identificação do derivado de ácido quínico da FAc-1.2

A substância FAc-1.2 isolada de *M. nigra* foi identificada por RMN ^{13}C e ^1H uni e bidimensional como sendo um derivado do ácido clorogênico.

O espectro de RMN de ^1H da FAc-1.2 (Figura 74) apresentou sinais característicos de uma unidade de cafeoíla, destacando-se os sinais referentes a dois dupletos com constante de acoplamento *trans* ($J = 15,8$ Hz) em δ 6,22 e δ 7,45 característicos de hidrogênios olefínicos α,β carbonílicos H-8' e H-7' respectivamente, além de três sinais de hidrogênios aromáticos em δ 6,77 (*d*; $J = 8,4$ Hz) de H-5', 6,97 (*dd*; $J = 1,8; 8,4$ Hz) de H-6' e δ 7,08 (*d*; $J = 1,8$) de H-2', cujas multiplicidades caracterizam o anel aromático com *o*-di-substituição, sendo possível identificar a unidade de ácido cafeico. Observou-se ainda neste espectro sinais característicos

do ácido quínico, como o multipeto em δ 5,15 (H-5) característico do hidrogênico oxi-metínico ao qual encontra-se ligado o grupo ácido carboxílico. Verificam-se os sinais de hidrogênios oxi-metínicos em δ 3,94 (d; $J = 2,8$ Hz) e δ 3,50 (dd; $J = 2,8; 11,2$ Hz) referentes as posições H-3 e H-4, além de sinais de hidrogênios metilênicosdiasterotópicos entre δ 1,65 – 2,02 característicos dos hidrogênios nas posição 2 e 6 vizinhas a centros estereogênicos. Na Tabela 24 encontra-se o resumo dos deslocamentos em ppm do espectro de RMN ^{13}C e ^1H para substâncias isoladas.

Através do mapa de contorno HSQC de FAc-1.2 (Figura 75) foi possível atribuir os valores de deslocamentos químicos dos carbonos hidrogenados, enquanto que a análise do mapa de contorno HMBC (Figura 76) foi fundamental para atribuir os deslocamentos químicos dos carbonos quaternários e localizar inequivocamente a esterificação do ácido cafeico com o ácido quínico na posição 5, devido a correlação de H-5 com o sinal de carbonila conjugada em δ 168.

A análise dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C (1D e 2D) e a comparação destes com dados previamente reportados na literatura (VALENTE et. al.; 2003) foram suficientes para propor que FAc-1.2 trata-se do ácido clorogênico **5-O-cafeoilquínico**, observado na Figura 73.

O ACG foi observado por Payen em 1846, primeiramente extraído de grãos de café. Posteriormente, essa substância foi identificada como o ácido 5-O-cafeoilquímico, éster do ácido 3,4-di-hidróxi-cinâmico, denominado ácido caféico, e ácido químico, através da esterificação da hidroxila em C-3 desse último (SIMÕES et al., 2007). Os ácidos clorogênicos (ACG) apresentam propriedades antioxidantes (YEN et al., 1997; SIMÕES et al., 2007), HYNES e O'COINCEANAINN (2004) mostraram que o ACG apresenta propriedade de complexar com íon Fe^{+2} , contribuindo para o potencial antioxidante.

Compostos catecólicos não flavonoídicos como o ácido clorogênico (ácido 5-O-cafeoilquínico) e seus derivados estão presentes em frutas, chás, café e vinho, apresentando propriedades biológicas e farmacológicas como atividades antiinflamatórias, antimutagênica e anticarcinogênica para estes compostos, além da atividade antioxidante já conhecida (MORIDANI et al, 2001).

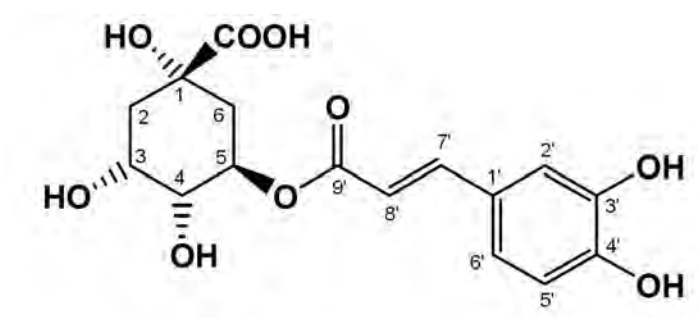


Figura 73 – ácido clorogênico 5-*O*-cafeoilquínico

Tabela 20 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de FAc-1.2

Posição			Posição		
FAc-1.2			Literatura* ²		
DMSO- d_6			MeOD		
400/100 MHz			400/100 MHz		
<i>H/C</i>	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}^{*1}$ (ppm)	<i>H/C</i>	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1	-	78,70	1	-	79,90
2	1,65 / 2,02 (<i>m</i>)	39,70	2	1,96 / 2,05	40,20
3	3,94 (<i>d</i> ; 2,8)	73,00	3	4,26 (<i>d</i>)	73,80
4	3,50 (<i>dd</i> ; 2,8; 11,2)	75,00	4	3,87 (<i>d</i>)	75,90
5	5,15 (<i>m</i>)	73,00	5	5,33 (<i>m</i>)	74,20
6	1,83 (<i>m</i>)	41,40	6	2,15 (<i>m</i>)	41,40
9'	-	168,0	9'	-	172,0
8'	6,22 (<i>d</i> ; 15,7)	116,3	8'	6,34 (<i>d</i>)	117,8
7'	7,45 (<i>d</i> ; 15,7)	146,5	7'	7,60 (<i>d</i>)	149,2
1'	-	128,0	1'	-	130,1
2'	7,08 (<i>d</i> ; 1,8)	116,4	2'	7,15 (<i>d</i>)	118,2
3'	-	147,8	3'	-	147,4
4'	-	150,5	4'	-	150,2
5'	6,77 (<i>d</i> ; 8,4)	117,9	5'	6,91 (<i>d</i>)	119,3
6'	6,97 <i>dd</i> (8,4; 1,8)	123,0	6'	7,06 (<i>dd</i>)	125,7

*¹Dados atribuídos via HSQC e HMBC. *² (VALENTE et. al.; 2003).

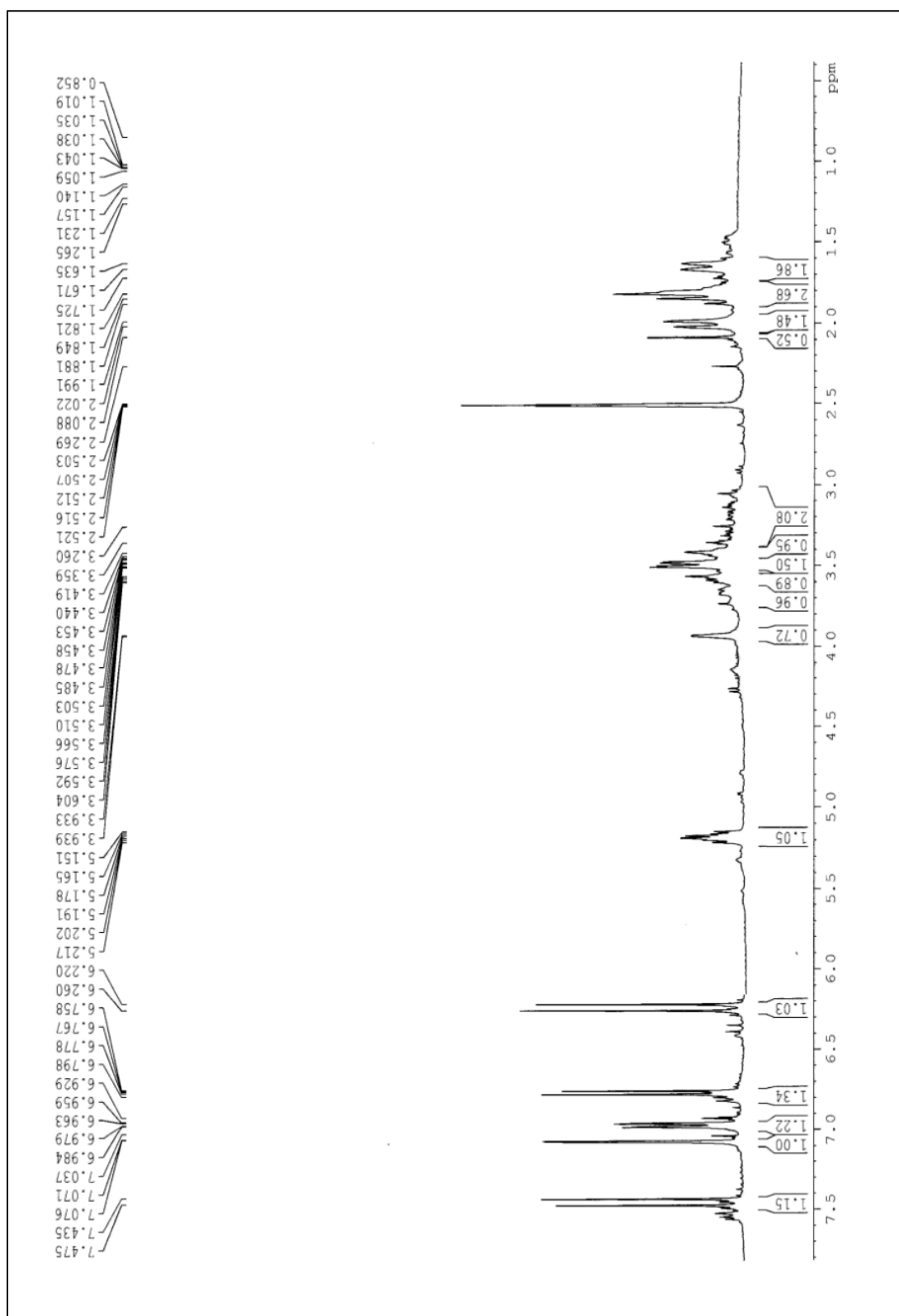


Figura 74 – Espectro de RMN de ^1H da FAc-1.2 [400 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm), J (Hz)]

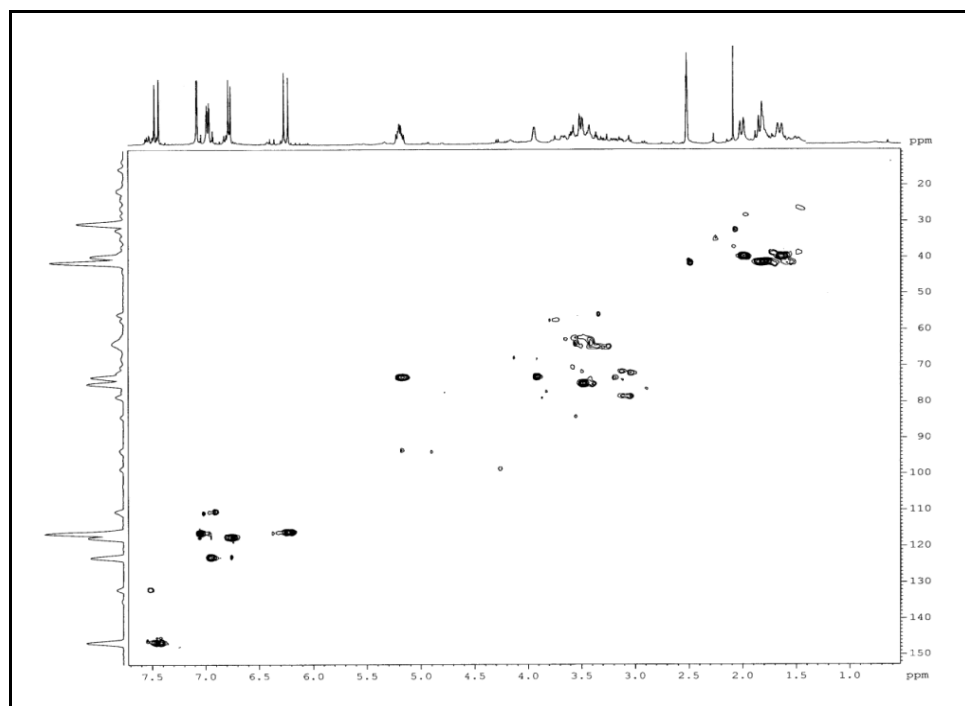


Figura 75 – Mapa de contorno HSQC da FAc-1.2 (DMSO- d_6 ; 400/100 MHz; ^1H / ^{13}C)

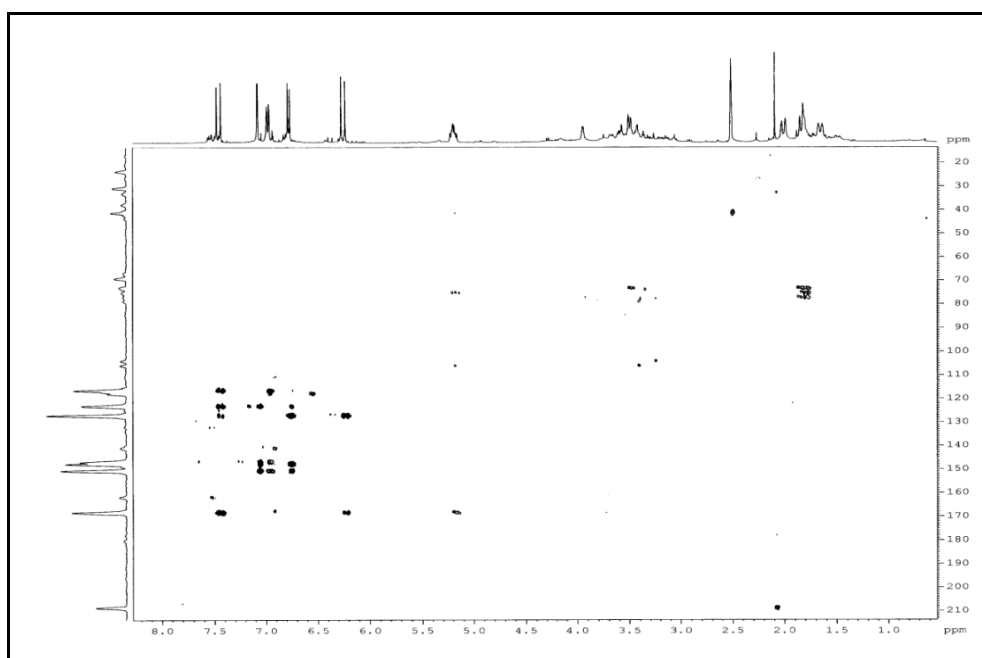


Figura 76 – Mapa de contorno HMBC da FAc-1.2 (DMSO- d_6 ; 400/100 MHz; ^1H / ^{13}C)

6.10 Identificação por RMN das subfrações isoladas da FBuOH.

6.10.1 Identificação da cumarina presente na FBuOH-1

A substância FBuOH-1, isolada a partir da purificação da fase butanólica das folhas de *Morus nigra*, foi identificada por RMN como sendo pertencente a classe das cumarinas.

O espectro de RMN de ^1H da FBuOH-1 (Figura 78) apresentou sinais característicos do anel lactônico das cumarinas, através de dois sinais de dupletos com constante de acoplamento de 9,6 Hz (*cis*) em δ 6,17 e δ 7,85 referente aos hidrogênios H-3 e H-4 respectivamente. A ausência de um singlete em aproximadamente δ 3,96 indica a ausência da metoxila na posição 7 e sugere a presença de um grupo hidroxila nesta posição. hidroxilação apenas na posição H-7 do anel B da cumarina, devido aos sinais de duplete (*J-meta*), duplete (*J-orto*) e duplo-duplete (*J-orto,meta*) em δ 6,70 (H-8), δ 7,45 (H-5) e δ 6,79 (H-6).

Através da análise dos dados e comparação com dados previamente reportados na literatura (LIU; TIAN, 2004; MÜLLER, 1994), a substância FBuOH-1 foi identificada inequivocamente como sendo a cumarina **umbeliferona** (Figura 77). Na Tabela 21 encontra-se o resumo dos deslocamentos em ppm do espectro de RMN ^{13}C e ^1H para substâncias isoladas.

As cumarinas encontram-se distribuídas predominantemente em angiospermas, sendo as estruturas mais simples as mais encontradas. As famílias mais citadas na literatura pelo conteúdo de cumarinas são: Apiaceae, Rutaceae, Asteraceae, Fabaceae, Oleaceae, Moraceae e Thymeleaceae (SIMÕES et al, 2007).

As cumarinas podem ser encontradas em todas as partes de uma planta, frequentemente como misturas. A 7-hidróxicumarina, também conhecida como umbeliferona, é a precursora das cumarinas 6,7-di-hidroxiladas e 6,7,8-tri-hidroxiladas. Esses grupos hidroxilas podem ser metilados ou glicosilados. (SIMÕES et al, 2007).

Estudos evidenciam a atividade farmacológica como citotóxica, antinociceptiva, antitumoral, antiviral, antiaminésica, antibacteriana, antiagregadora de plaquetas e ativadora da proteína C

quinase (KANG et al., 2005; MELLIU et al., 2005; KUSTER; ROCHA, 2004). Tovama e colaboradores (2011) estudaram o efeito inibidor da umbeliferona sobre a fosfolipase A2 (PLA2), levando a elucidações do mecanismo antiinflamatório. Marshall e colaboradores (1994) observaram a atividade inibitória, bem como a atividade imunomodulatória in vitro e in vivo, da 7-hidroxicumarina (7-HC), mostrando atividade citotóxica sobre as seguintes células malignas humanas.

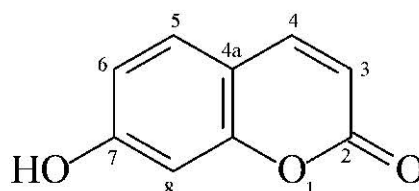


Figura 77 – 7-hidroxicumarina (umbeliferona)

Tabela 21 – Dados de RMN de ^1H da FBUOH-1

Posição	FBUOH MeOD/400 MHz	Posição	Literatura* ¹ Me ₂ CO/400 MHz	Posição	Literatura* ² CDCl ₃ /400 MHz
H	δ ^1H (ppm)	H	δ ^1H (ppm)	H	δ ^1H (ppm)
1	-----	1	-----	1	-----
2	-----	2	-----	2	-----
3	6,17 (<i>d</i> ; 9,5)	3	6,14 (<i>d</i> ; 9,2)	3	6,26 (<i>d</i> ; 9,6)
4	7,85 (<i>d</i> ; 9,5)	4	7,85 (<i>d</i> ; 9,2)	4	7,64 (<i>d</i> ; 9,6)
5	7,45 (<i>d</i> ; 8,5)	5	7,48 (<i>d</i> ; 8,4)	5	7,36 (<i>d</i> ; 8,4)
6	6,79 (<i>dd</i> ; 8,5 e 2,3)	6	6,82 (<i>dd</i> ; 8,5 e 2,3)	6	6,77 (<i>dd</i> ; 8,4 e 2,0)
7	-----	7	-----	7	-----
8	6,70 (<i>d</i> ; 2,3)	8	6,73 (<i>d</i> ; 2,3)	8	6,83 (<i>d</i> ; 2,0)

*1 = (LIU; TIAN, 2004)

*2 = (MÜLLER, 1994)

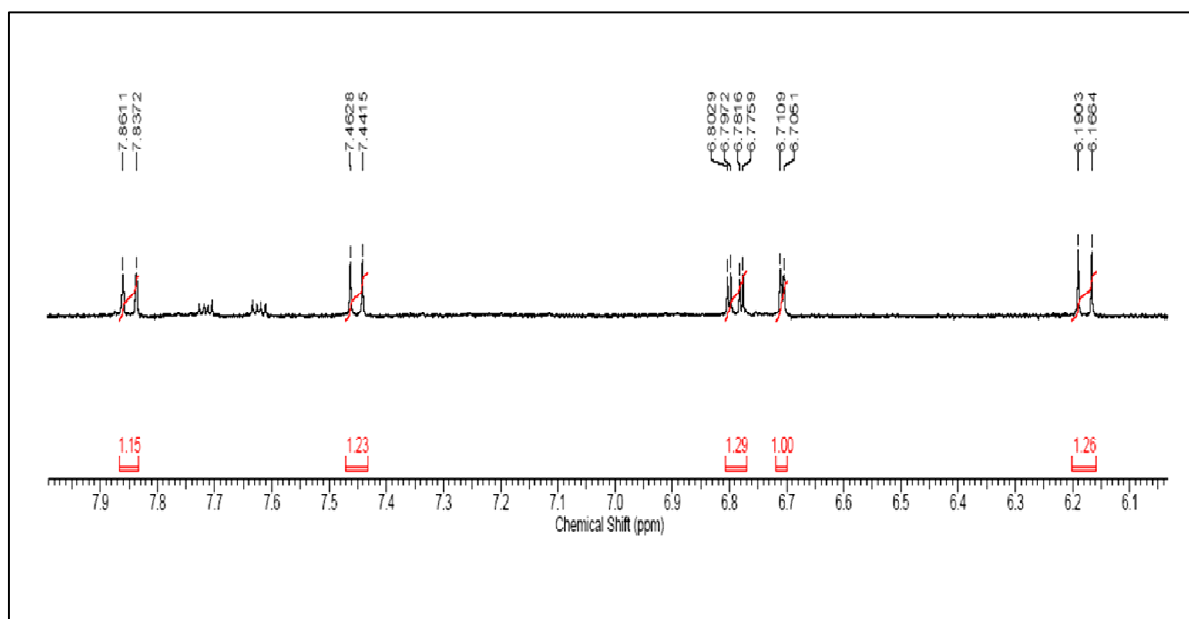


Figura 78 – Espectro de RMN de ^1H de FbuOH-1 [400 MHz, MeOD, δ (ppm), J (Hz)]

6.10.2 Identificação da subfração FbuOH-2 e FbuOH-6.1

Devido a escassez em massa e impurezas presentes nas amostras isoladas da FbuOH-2 e FbuOH-6.1, não foi possível até o presente momento elucidar com clareza a composição química dessas subfrações. Novas técnicas serão empregadas para a purificação e determinação dos metabólitos presentes nessas amostras.

6.10.3 Identificação do Flavan-3-ol FbuOH-6.2

A substância FbuOH-6.2 foi isolada da fase butanólica das folhas de *Morus nigra* L. CLAE. O espectro de RMN de ^1H desta substância (Figura 80) apresentou sinais característicos dos flavonoides, destacando-se os sinais de dupletos em δ 6,05 e δ 6,13 ($J = 2,4$ Hz), característicos dos hidrogênios H-6 e H-8 do anel A, oriundo da rota biossintética do

acetato. Observou-se ainda neste espectro três sinais adicionais em δ 6,85 (*d*; $J = 8,0$), δ 6,98 (*dd*; $J = 8,0$ e $1,2$ Hz) e δ 6,99 (*d*; $J = 1,2$ Hz) característicos do anel B dos flavonoides com substituição nas posições 3' e 4'.

O espectro de RMN de ^1H apresentou dois sinais de hidrogênios oximetínicos em δ 4,90 (*sl*) e δ 4,22 (*m*), sugerindo-se então a ausência da dupla ligação entre posições 2 e 3 do anel C. Dois sinais de duplos-dupletos são observados em δ 2,85 e δ 2,86; estes referem-se aos hidrogênios na posição 4 caracterizando a ausência da carbonila nesta posição e sugerindo-se que este flavonóide trata-se de uma catequina. Por fim, são verificados quatro sinais de simpletos integrando para três hidrogênios, caracterizando metoxilação em quatro posições oxigenadas da catequina. Na Tabela 22 encontra-se o resumo dos deslocamentos em ppm do espectro de RMN ^{13}C e ^1H para substâncias isoladas.

Os valores de deslocamento químico dos carbonos hidrogenados foram atribuídos através do mapa de contorno HSQC (Figura 81). Através do mapa de contorno HMBC (Figura 82) foi possível atribuir os demais sinais de carbonos quaternários e atribuir inequivocamente as posições das metoxilas.

Através da análise dos dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C e comparação com a literatura (NAHRTEDT, 1987) foi possível identificar de forma inequívoca a substância C-1 como sendo **5,7, 3', 4'-tetra-metoxi-catequina** (Figura 79). Uma vez que o valor de $[\alpha]_D^{25} = 0^\circ$ (1,5 M; MeOH), sugeriu-se a mistura racêmica dos enantiômeros 3R e 3S.

Devido a ausência de grupos hidroxilas no Anel B, insaturações em C2-C3 e carbonila em C4 (PANNALA et al., 2001), é pouco provável que a 5,7,3',4'-tetra-metoxicatequina apresente atividade antioxidante porém, devido a sua característica lipossolúvel porerá apresentar atividade antimicrobiana.

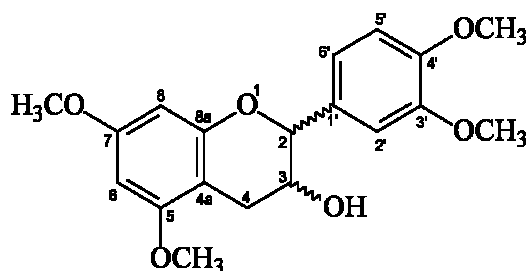


Figura 79 – 5,7,3',4'-tetra-metoxi-catequina

Tabela 22 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de FBUOH-6.2

FBUOH-6.2			Literatura* ²		
Posição	CDCl_3		Posição	$(\text{CD}_3)_2\text{CO}$	
	400/100 MHz			400/100 MHz	
H/C	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}^{*1}$	H/C	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
	(ppm)	(ppm)			
1	-	-	1		
2	4,90 (sl)	78,06	2	4,54 (d; 7,8)	82,90
3	4,22 (m)	66,48	3	3,98 (m)	68,50
4	2,85 (dd, 16; 8,0)	27,92	4	2,52 (dd, 16; 8,0)	28,50
4''	2,86 (dd, 16; 5,4)			2,86 (dd, 16; 5,4)	28,50
4a	-	100,29	4a	-	100,90
5	-	159,74	5	-	157,90
6	6,13 (d; 2,4)	92,12	6	6,02 (d; 2,4)	96,40
7	-	158,98	7	5,87 (d; 2,4)	157,60
8	6,05 (d; 2,4)	93,64	8	-	95,60
8a	-	154,04	8a	-	156,90
1'	-	130,68	1'	-	132,60
2'	6,99 (d; 1,2)	109,60	2'	6,77 (d; 1,2)	120,1
3'	-	149,10	3'	-	146,20
4'	-	149,10	4'	-	146,20
5'	6,85 (d; 8,0)	111,50	5'	6,87 (d; 8,0)	116,20
6'	6,98 (dd, 8,0; 1,2)	118,53	6'	6,72 (dd, 8,0; 1,2)	120,00
5-OCH ₃	3,83 (s)	56,00	5-OCH ₃		-
7-OCH ₃	3,85 (s)	56,00	7-OCH ₃		-
3'-OCH ₃	3,71 (s)	56,00	3'-OCH ₃		-
4'-OCH ₃	3,73 (s)	56,00	4'-OCH ₃		-

*¹Dados obtidos através da análise dos mapas de contorno HSQC e HNMBC.

*²(NAHRTEDT, 1987), dados referentes a ent-catequina.

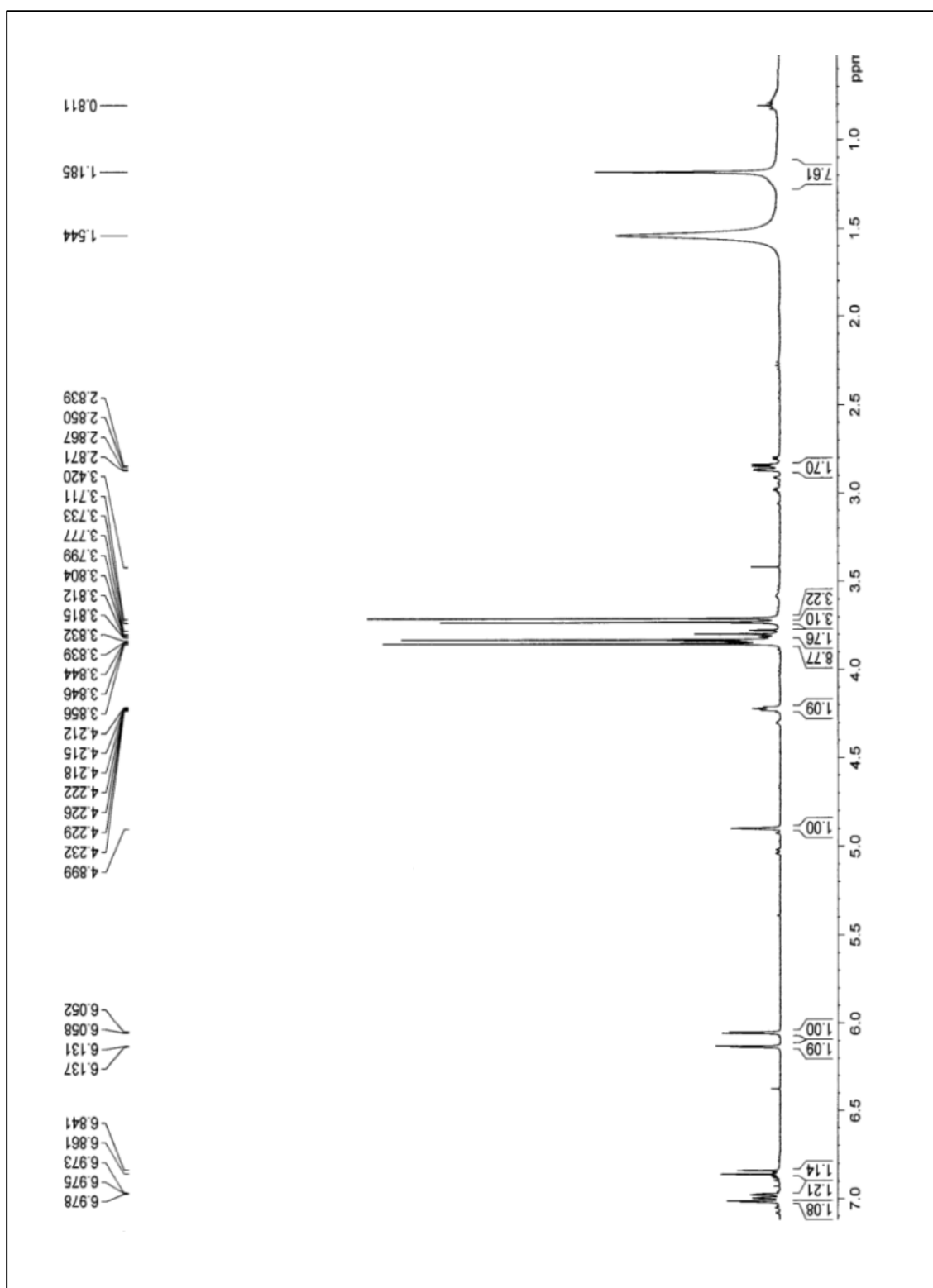


Figura 80 – Espectro de RMN de ^1H de FBuOH-6.2 [400 MHz, CHCl_3 , δ (ppm), J (Hz)]

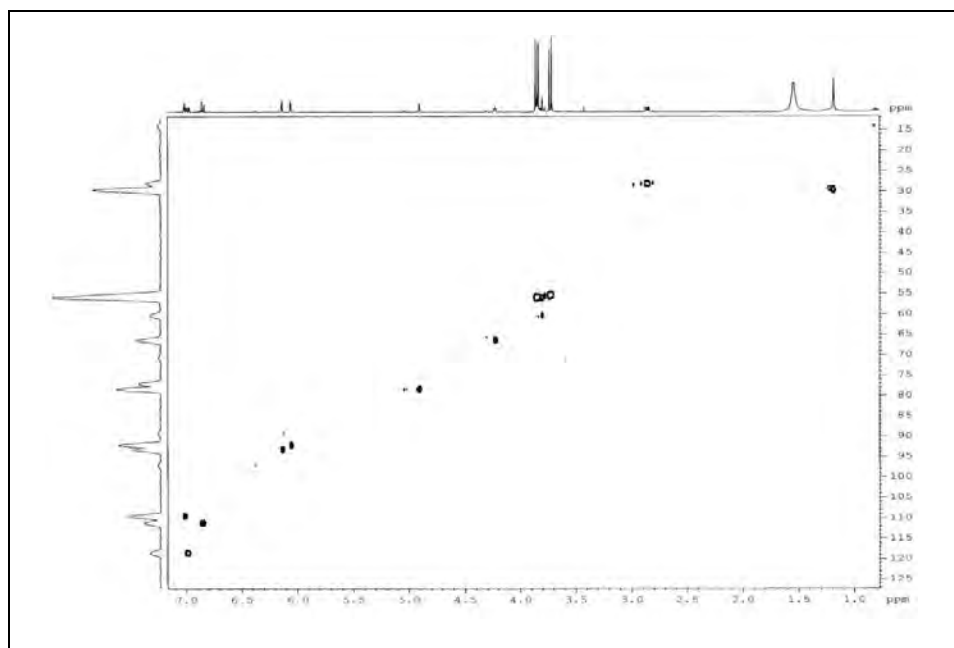


Figura 81 – Mapa de contorno HSQC de FBuOH-6.2 (400/100 MHz; CHCl_3 , $^1\text{H}/^{13}\text{C}$)

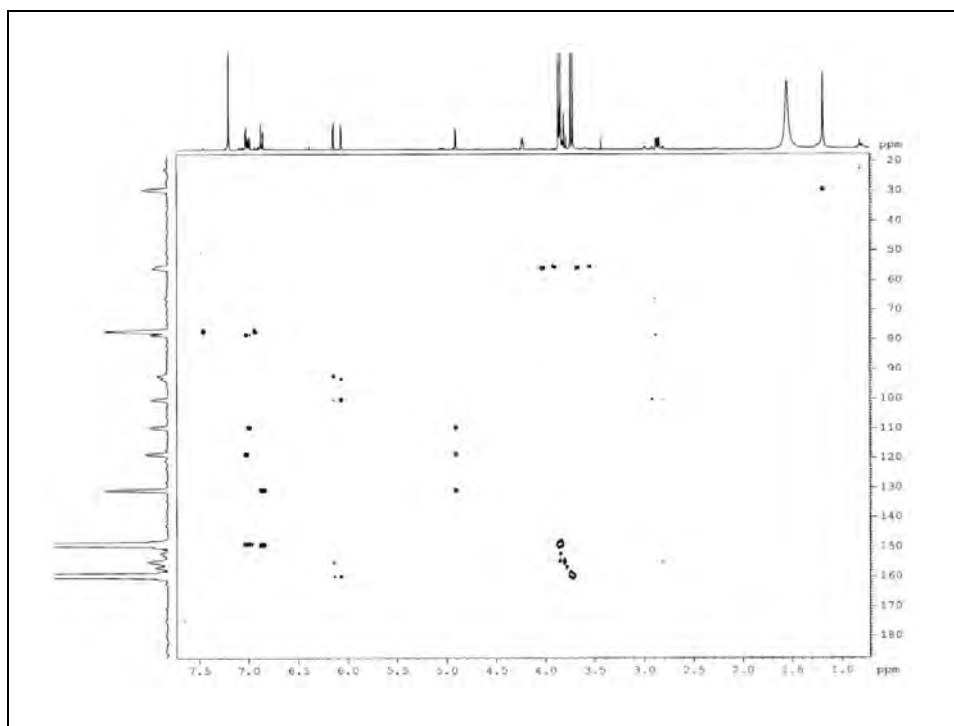


Figura 82 – Mapa de contorno HMBC de FBuOH-6.2 (400/100 MHz; $^1\text{H}/^{13}\text{C}$, CHCl_3)

6.11 Identificação por RMN das subfrações isoladas da FAq.

6.11.1 Identificação do Flavan-3-ol da FAq-3

O espectro de RMN de ^1H de FAq-3 (Figura 84) apresentou sinais característicos do anel C de flavan-3-ol, destacando-se os sinais de hidrogênios oxi-metínicos em δ 4,56 (*d*; 7,52 Hz) e δ 4,00 (*ddd*; 5,01; 8,0; 7,52 Hz) referentes aos hidrogênios H-2 e H-3, respectivamente e os sinais de duplo-duplete em δ 2,53 ($J = 8,0; 16,0$ Hz) e δ 2,84 ($J = 5,0; 16,0$ Hz) referentes aos hidrogênios metilênicos diasterotópicos H-4a e H-4b, caracterizando a ausência da carbonila nesta posição. Observou-se ainda no espectro de RMN de ^1H de FAq-3 dois dupletos com constante de acoplamento de meta ($J = 2,5$ Hz) em δ 5,98 e δ 5,86 atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-8 do anel A, respectivamente. Por fim, observou-se um sinal de simpleto integrando para dois hidrogênios em δ 6,44 caracterizando oxigenações no anel B nas posições 3', 4' e 5'. Na Tabela 23 encontra-se o resumo dos deslocamentos em ppm do espectro de RMN ^{13}C e ^1H para substâncias isoladas.

Através do mapa de contorno HSQC de FAq-3 (Figura 85) foi possível atribuir os valores de deslocamento químico dos carbonos hidrogenados e através do mapa de contorno HMBC (Figura 86) foi possível atribuir os sinais dos carbonos quaternários (com exceção de C-5 e C-7) através de correlações entre sinais de hidrogênio e carbono a múltiplas ligações (J_{1-3}).

Através da análise dos dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C (1D e 2D) e comparação com a literatura (NAHRTEDT, 1987) foi possível identificar de forma inequívoca a substância C-1 como sendo a **galocatequina** (Figura 83). Uma vez que o valor de $[\alpha]_D^{25^\circ} = 0^\circ$ (1,5 M; MeOH), sugeriu-se a mistura racêmica dos enantiômeros 3R e 3S.

As catequinas (como a galocatequina) demonstram forte efeito antioxidante contra a peroxidação lipídica (KONDO et al., 1999), e efeitos protetores contra doenças cardiovasculares e contra o cancer (HERTLOG et al., 1993; MIDDETON; KONDASMAMI, 1992). Someya e colaboradores (2002) e Emaga e colaboradores (2007), estudaram compostos fenólicos isolados da casca de banana (*Musa cavendish*) e verificou o potencial contra

peroxidação lipídica, utilizando o método ferro-tiocianato no qual identificou a galocatequina como sendo o composto responsável pelo potencial antioxidante do extrato.

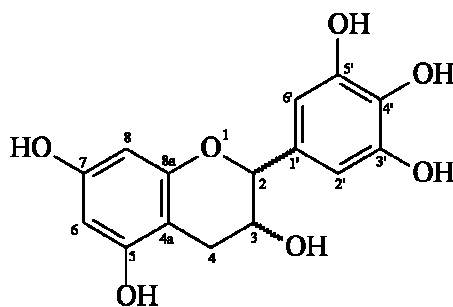


Figura 83 – galocatequina

Tabela 23 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da FAq-3

Posição	FAq-3 MeOD 400/100 MHz		Posição	Literatura* ² MeOD 400/100 MHz	
H/C	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}^{*1}$ (ppm)	H/C	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1	-	-	1	-	-
2	4,56 (<i>d</i> ; 7,5)	81,29	2	4,55 (<i>d</i> ; 7,6)	81,30
3	4,00 (<i>ddd</i> ; 5,0; 8,0; 7,5)	67,24	3	4,00 (<i>ddd</i> ; 5,1; 8,0; 7,6)	67,20
4	2,84 (<i>dd</i> , 5,0; 16,0)	26,59	4'	2,85 (<i>dd</i> ; 5,0; 16,0)	26,60
4''	2,53 (<i>dd</i> , 8,0; 16,0)		4''	2,55 (<i>dd</i> ; 8,0; 16,0)	26,60
4 ^a	-	100,65	4 ^a	-	100,70
5	-	ND* ³	5	-	159,00
6	5,98 (<i>d</i> ; 2,5)	95,16	6	5,99 (<i>d</i> ; 2,5)	95,00
7	-	ND* ³	7	-	159,00
8	5,96 (<i>d</i> ; 2,5)	93,83	8	5,97 (<i>d</i> ; 2,5)	94,00
8 ^a	-	156,93	8 ^a	-	157,00
1'	-	133,77	1'	-	134,00
2'	6,44 (<i>s</i>)	105,61	2'	6,45 (<i>s</i>)	105,50
3'	-	146,75	3'	-	147,00
4'	-	146,75	4'	-	147,00
5'	-	146,75	5'	-	147,00
6'	6,44 (<i>s</i>)	105,61	6'	6,45 (<i>s</i>)	105,50

*¹Dados obtidos através da análise dos mapas de contorno HSQC e HMBC.

*²(NAHRTEDT, 1987).

*³ Valor não encontrado ou não determinado.

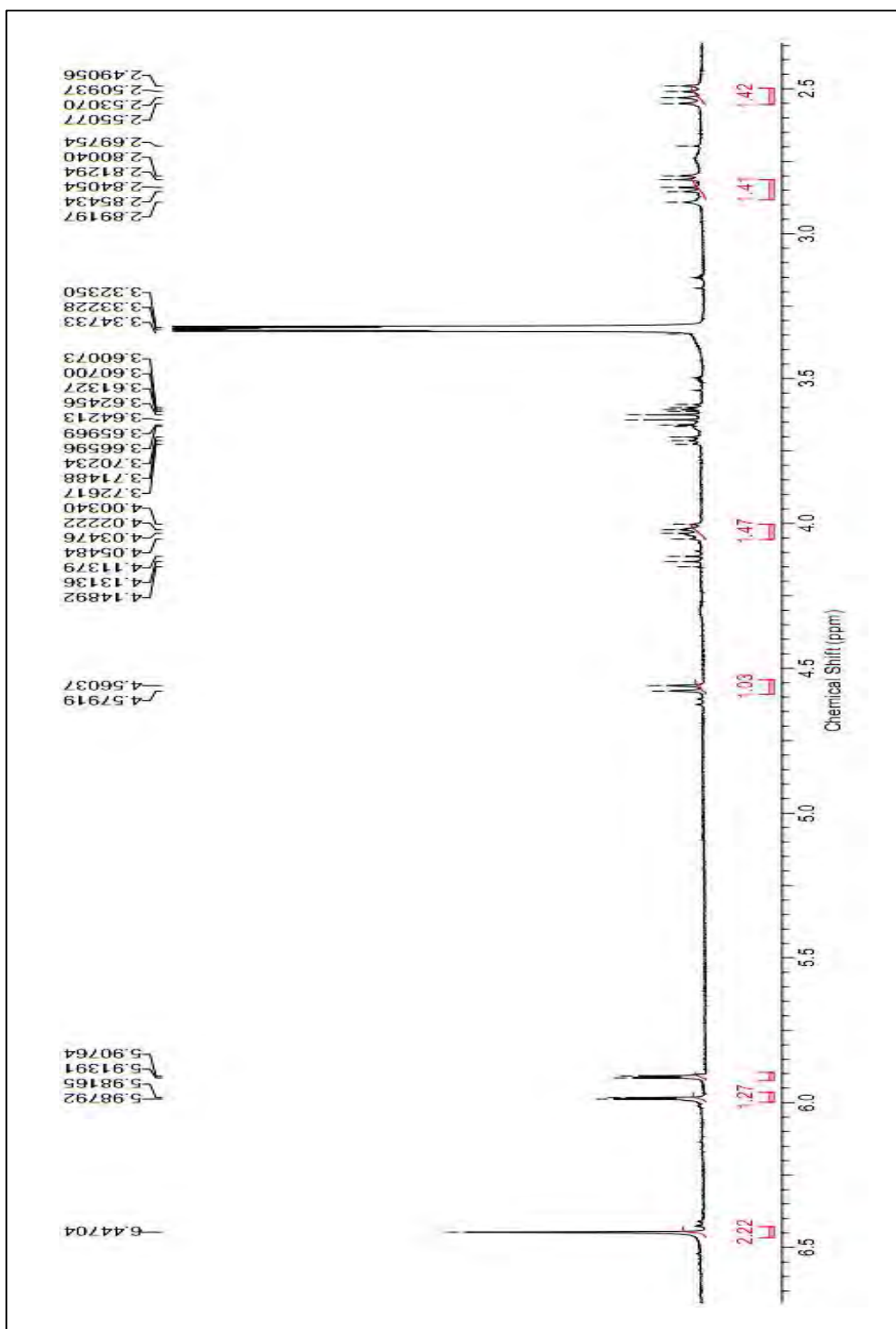


Figura 84 – Espectro de RMN de ^1H da FAq-3 [400 MHz, MeOD, δ (ppm), J (Hz)]

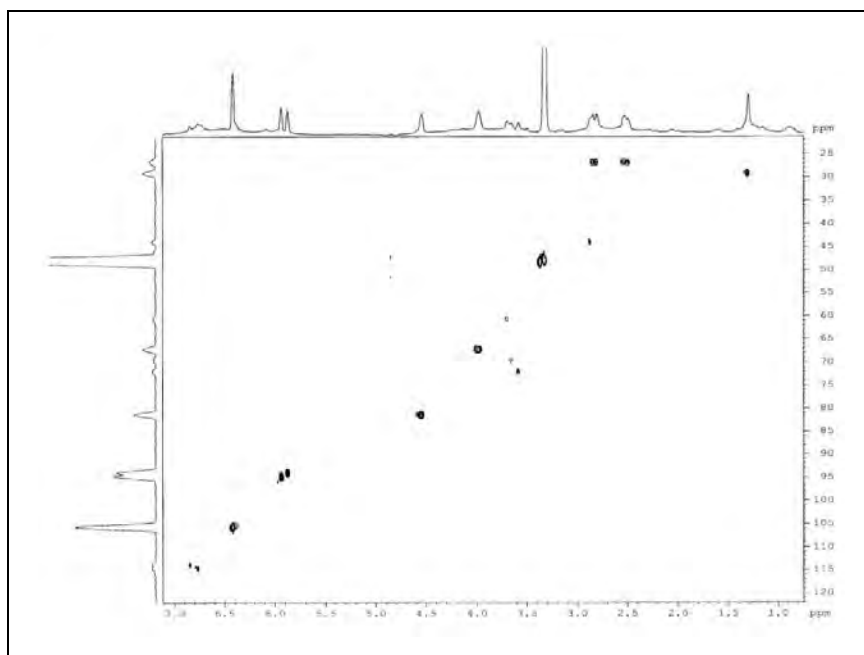


Figura 85 – Mapa de contorno HSQC da FAq-3 (MeOD; 400/100 MHz; ^1H / ^{13}C)

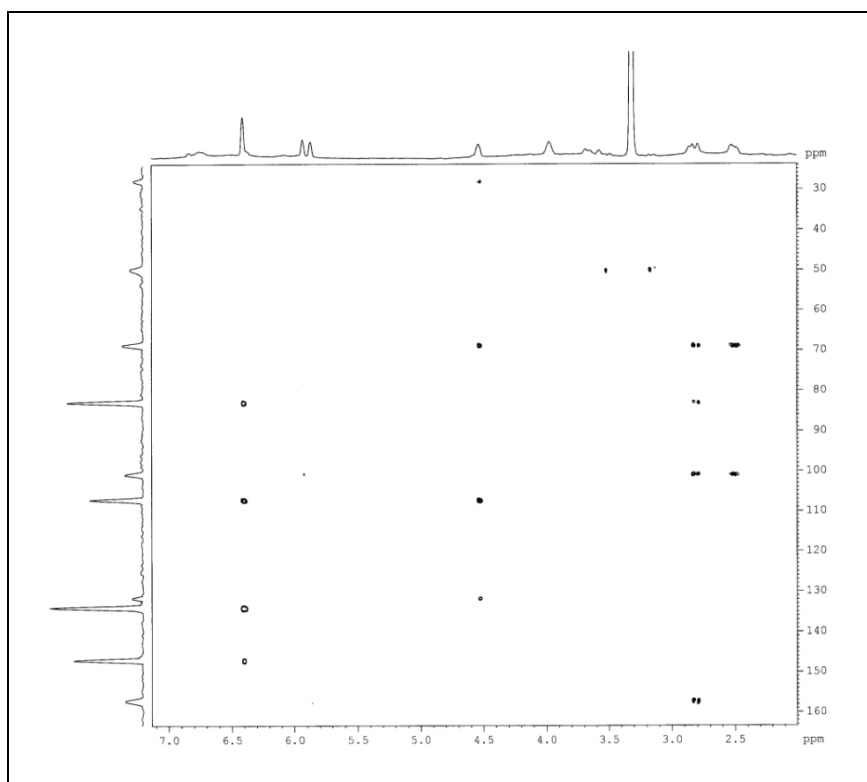


Figura 86 – Mapa de contorno HMBC da FAq-3 (MeOD; 400/100 MHz; ^1H / ^{13}C)

6.12 Identificação de carboidratos por RMN nas subfrações: FAc-1.3 e FAc-1.4, FAc-2.1 e FAc-2.2, FBuOH-6.3, FAq-1 e FAq-2, precipFAc e precipFAq.

A partir do espectro de RMN ^1H das subfrações FAc-1.3 e FAc-1.4, FAc-2.1 e FAc-2.2, FBuOH-6.3, FAq-1 e FAq-2, e os precipitados das FAc-1, FAc-2 e FAq, não foram possíveis observar presença significativas de sinais referentes a grupos aromáticos nas regiões característica (δ 5 a 9 ppm, HARBONE, 1994), mas apenas presença de ligações glicosídicas (região δ 3 a 5 ppm, HARBONE, 1994). As Figuras 87 até 96 ilustram os espectros de RMN ^1H das respectivas subfrações isoladas.

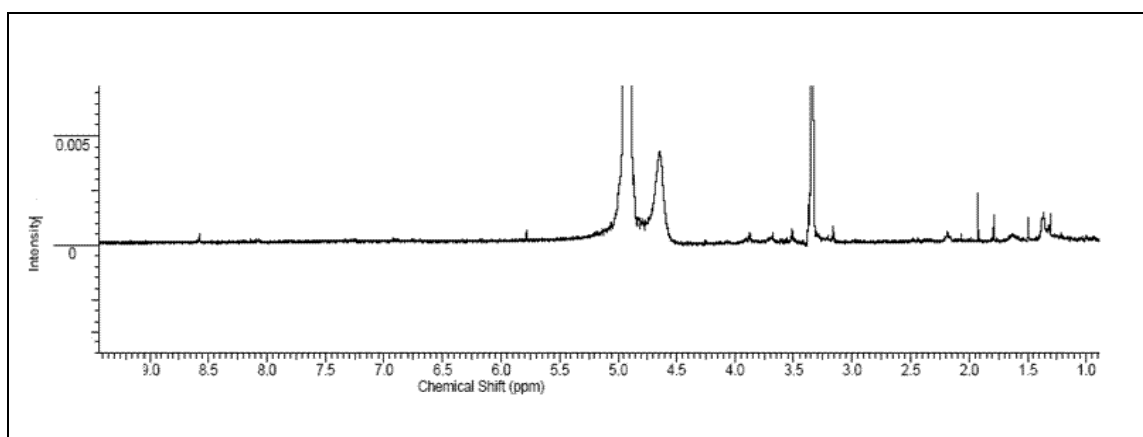


Figura 87 – Espectro de RMN ^1H da subfração FAc-1.3 [400 MHz, DMSO- d_6]

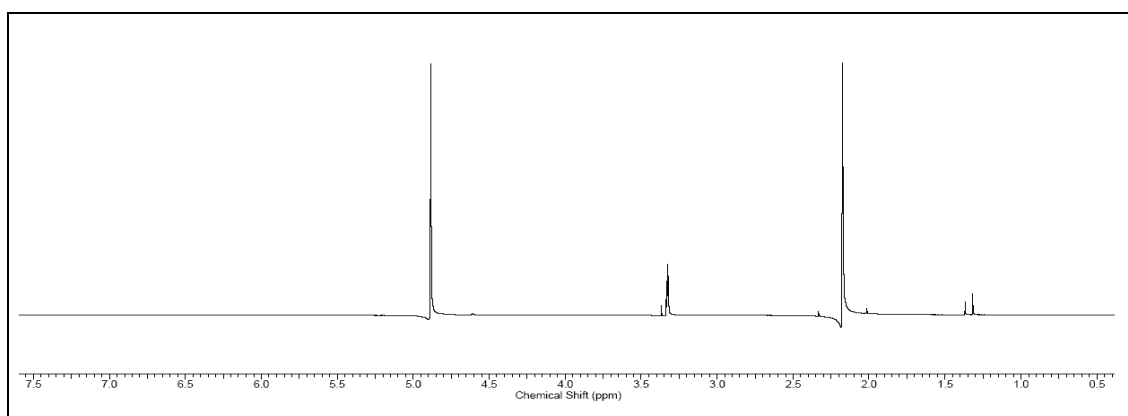


Figura 88 – Espectro de RMN ^1H da subfração FAc-1.4 [400 MHz, DMSO- d_6]

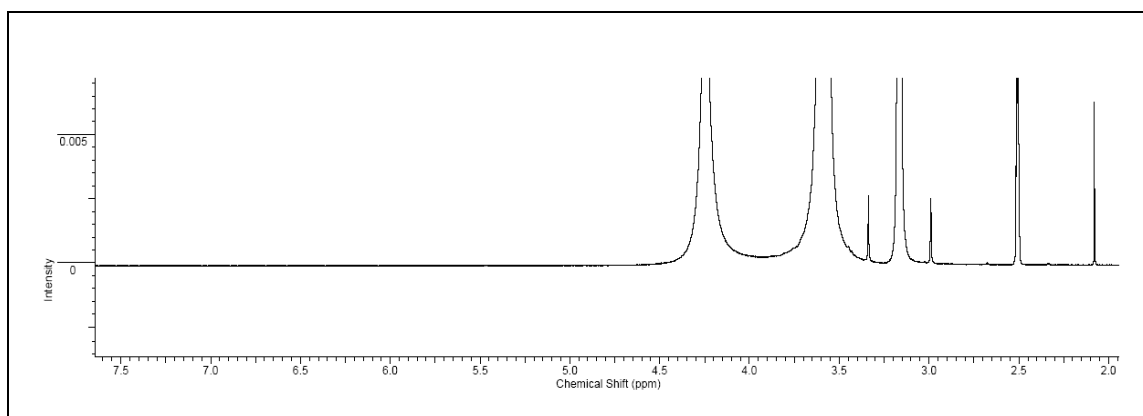


Figura 89 – Espectro de RMN ^1H da subfração FAc-2.1 [400 MHz, DMSO- d_6]

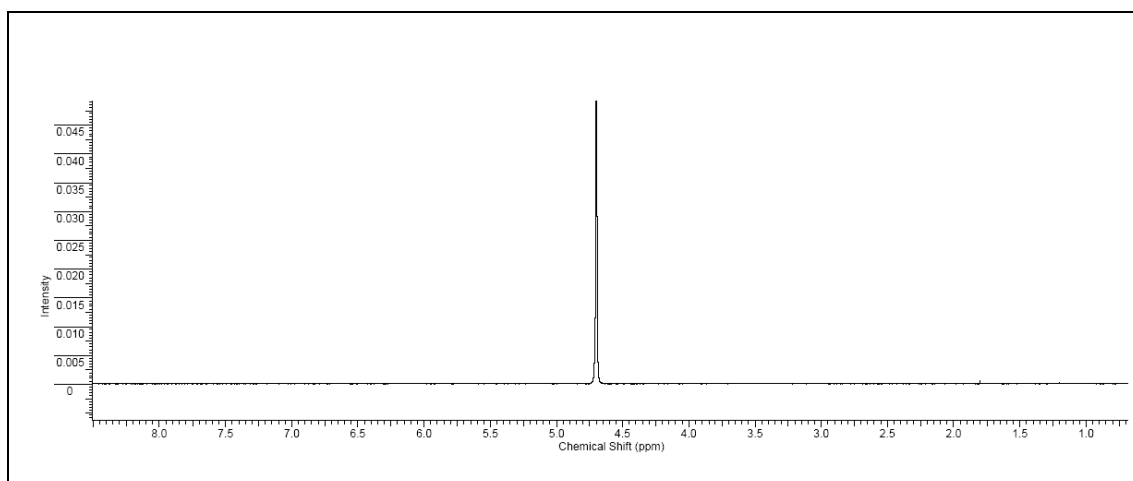


Figura 90 – Espectro de RMN ^1H da subfração FAc-2.2 [400 MHz, DMSO- d_6]

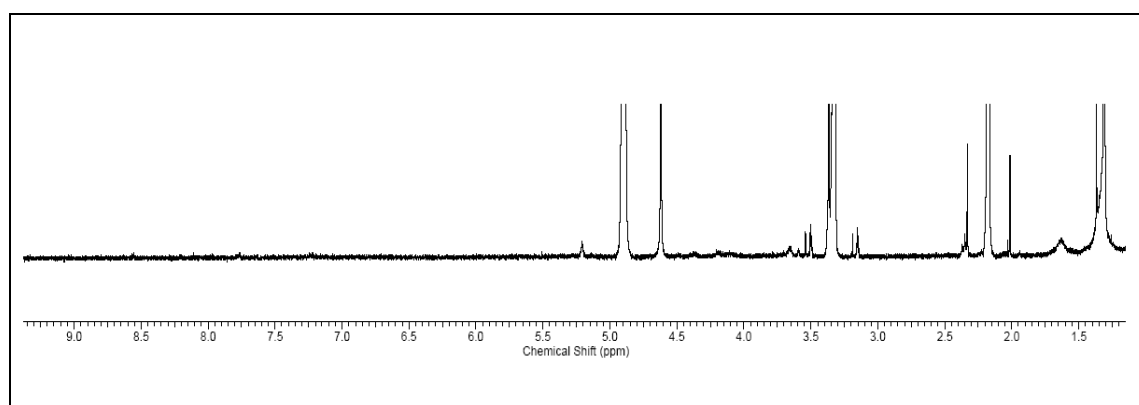


Figura 91 – Espectro de RMN ^1H da subfração FBuOH-6.3 [400 MHz, MeOD]

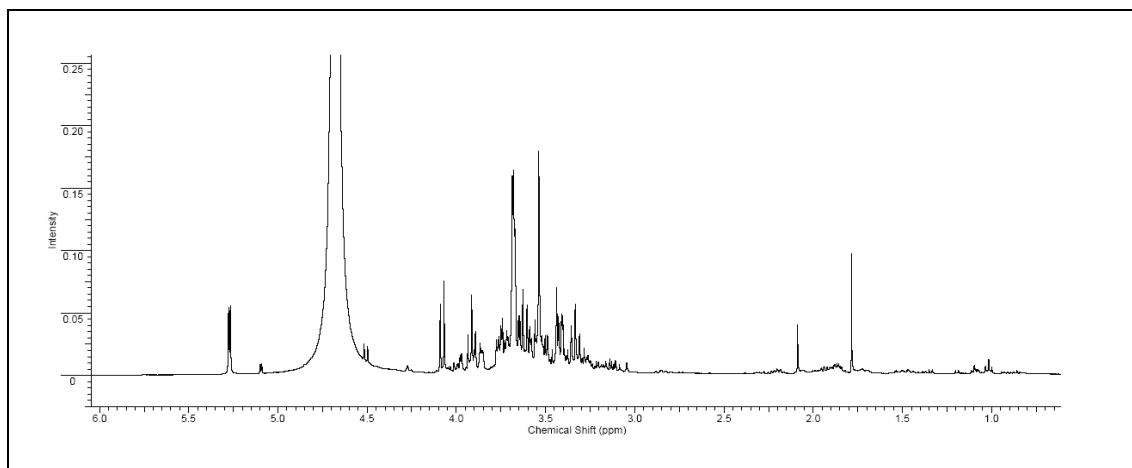


Figura 92 – Espectro de RMN ^1H da subfração FAq-1 [400 MHz, D₂O]

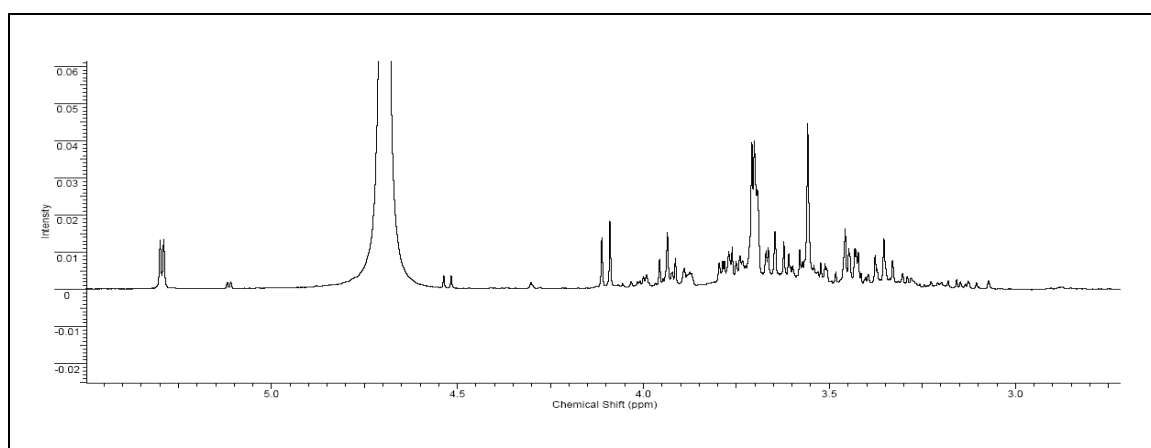


Figura 93 – Espectro de RMN ^1H da subfração FAq-2 [400 MHz, D₂O]

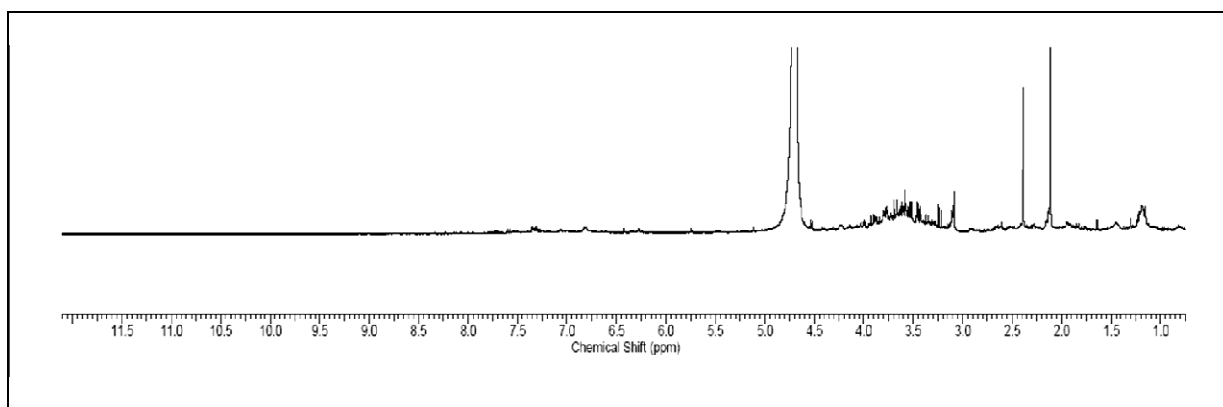


Figura 94 – Espectro de RMN de ^1H do precip-FAc-1 [400 MHz, D₂O]

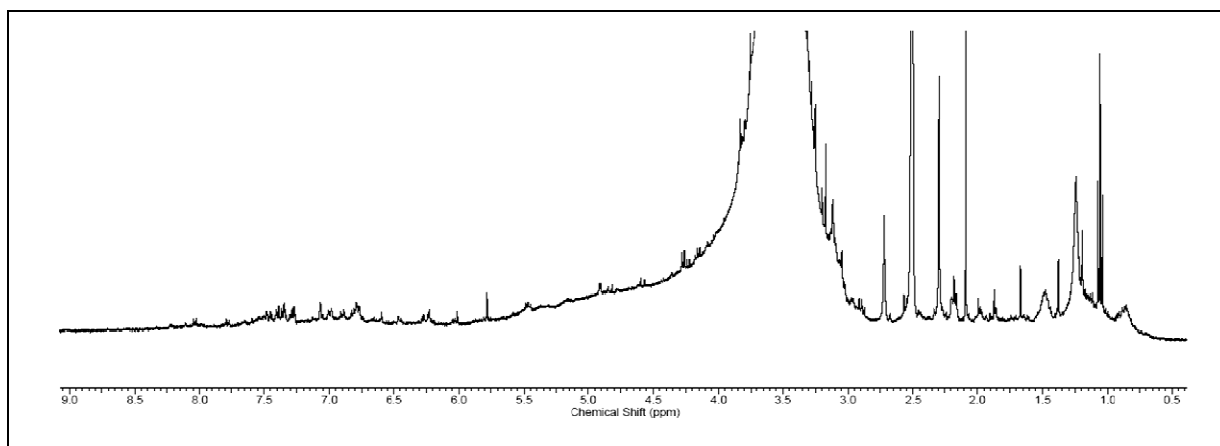


Figura 95 – Espectro de RMN de ^1H do precip-FAc-2 [400 MHz, D₂O]

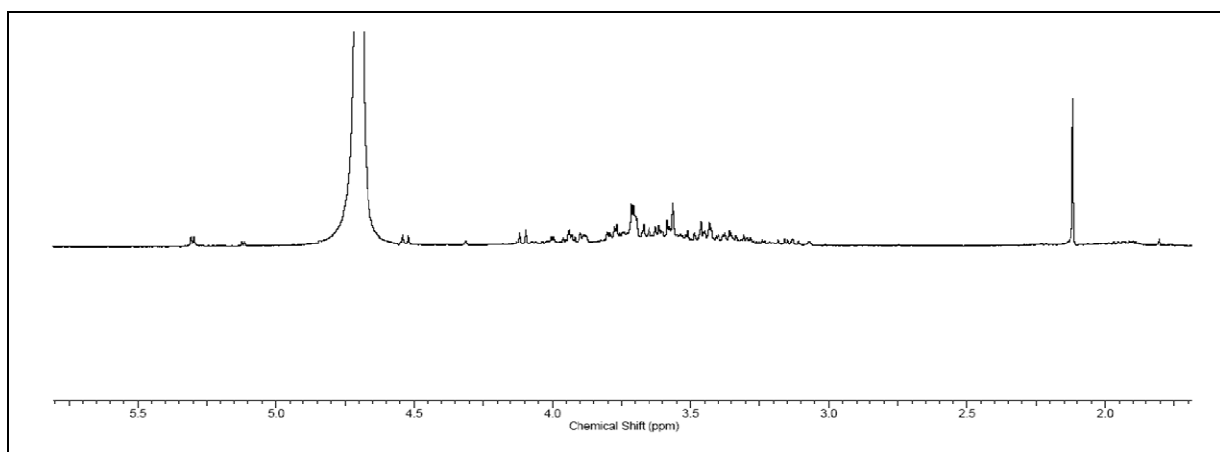


Figura 96 – Espectro de RMN de ^1H do precip-FAq [400 MHz, D₂O]

6.13 Resumo dos resultados

- Pela técnica e maceração obtivemos um rendimento de 26,58% em massa;
- Após partição líquido-líquido, o rendimento foi de 4% par FHex, 6% FAcOEt, 6% FBuOH e 82% FAq;
- As frações que mais apresentaram fenóis totais foram FBuOH, FAcOEt e FAq;
- As frações que mais apresentaram flavonoides foram FBuOH e FAcOEt;
- FAcOEt e FBuOH foram as frações que melhor suprimiram o radicais ABTS, DPPH e HOCL;
- As frações que melhor suprimiram o radical ânion superóxido e óxido nítrico foram FAq e FBuOH;
- FAcOEt e FBuOH foram as que apresentaram atividade anti-hemolítica frente aos agentes hemolizantes AAPH e HOCL;
- A fração FAcOEt apresentou propriedade antifúngica com atividade moderada frente a *C. albicans* e *C. krusei* (125 µg/mL). A fração FAq apresentou fraca atividade frente a *C. kursei* (250 µg/mL);
- A fração FAcOEt (0,077 e 0,154 mg/mL) apresentou perfil de inibição do tipo mista sobre a cinética HRP/Guaiacol/H₂O₂. A fração FBuOH (0,095 e 0,190 mg/mL) apresentou respectivamente dois tipos de inibição, competitiva e mista para a mesma cinética;
- Após cromatografia em coluna e separação dos picos cromatográficos por CLAE, obtivemos os seguintes metabólitos secundários identificados:
 - FAc-1.1 = tilirosídeo
 - FAc-1.2 = ác. Clorogênico
 - FBuOH-1 = umbeliferona
 - FBuOH-6.2 = tetrametoxicatequina
 - FAq-3 = galocatequina



7 Conclusão

7 Conclusão

Plantas medicinais populares com *M. nigra* tem sido cada vez mais empregada na fitoterapia popular. Com o intuito de avaliarmos seu potencial antioxidante e antimicrobiano, concluímos que a partir das frações isoladas das folhas de *M. nigra* foram possíveis identificar cinco metabólitos secundários, sendo os flavonoides tirosídeo, 5,7, 3', 4'-tetrametoxi-catequina, galocatequina, e os compostos fenólicos como ácido clorogênico e a cumarina umbileferona, todos comprovados por RMN- ^1H e ^{13}C , e validados pela literatura. Os flavonóides isolados e identificados são os possíveis responsáveis pelas seguintes propriedades evidenciadas:

i) O potencial supressor das formas radiculares sintéticas (DPPH e ABTS) e ERO, além de formas oxidantes como o HOCl; devido principalmente ao conteúdo de flavonoides presentes nas frações FAcOEte FBUOH. A posição e o número de hidroxilas presentes nessas moléculas são fatores relevantes para atividade antioxidante.

ii) Propriedades inibitórias de cinética enzimática sobre a oxirredutase HRP com inibição do tipo mista para a FAcOEte e competitiva para FBUOH.

iii) Apresentaram potencial antifúngico nas concentrações testadas. A fração acetato apresentou moderado efeito fungicida para *C. albicans* e *C. krusei*, porém a fração aquosa apresentou fraca atividade fungicida contra *C. krusei*. Tanto o extrato bruto como as frações não apresentaram atividade antibacteriana nas condições ensaiadas.

Com exceção da cumarina, todos estes compostos fenólicos identificados em nossa pesquisa apresentam atividade anti radicalar, sendo prováveis agentes supressores das espécies reativas estudadas, incluindo a atividade anti-hemolitica e antifúngica. Devido à baixa quantidade em massa obtida das biomoléculas isoladas, não foi possível reproduzir os principais ensaios anti-radicalares e antimicrobianos, para assim confirmar nossa teoria, porém baseado em estudo de outros pesquisadores referenciados nesta tese, foi possível chegar a estas conclusões.



8 Referências

8 Referências

- A. O. A. C. (Associaton of Official Analytical Chemists). **Official methods of analysis**. 14. ed. Arlington: A.O.A.C.,1984. 1141p.
- ABIFISA - Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde. Disponível em <http://www.abifisa.org.br/>. Acesso em 21.08.10.
- AGRAWAL, P. K.; **Carbon-13 NMR of Flavonoids, Elsevier Sc. Publishers**, Amsterdam: 444 p, 1989.
- AGUIAR-da-SILVA, R.H.; MORAES, T.P.; MORAES, G. Implicações do estresse oxidativo sobre o metabolismo eritrocitário de pessoas com Síndrome de Down. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.25, n.4, p.231-237, 2003.
- AHERNE, S.A.; O'BRIEN, N.M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and, metabolism. **Nutrition**, v.18, n.1, p.75-81, 2002.
- AKERELE O. Summary of WHO guidelines for assessment of herbal medicines. **Herbal Gram**. v.28, p.13-19,1993.
- AL-MAMARY, M.; AL-MEERI, A.; AL-HABORI, M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of Honey. **Nutrition Research**, v.22, p.1041-1047, 2002.
- ALZUGARAY, D.; ALZUGARAY, B. **As plantas que curam**. 2ª edição. Editora Três: São Paulo, 1983. 140p
- ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**, Amsterdam, v.350, n.1, p.103-108, 1996.
- ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. **Flavonoids – Chemistry, Biochemistry and Applications**; CRC Taylor & Francis: Boca Raton, 2006.
- ANDRADE, C.A.A.; COSTA, C.K.; BORA, K.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G; KERBER, V.A. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n.2, p.231-235, 2007.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, p. 232-240, 2007.
- ARNAO, M.B.; CANO, A.; ACOSTA, M. A method to measure antioxidant activity in organic media: application to lipophilic vitamins. **Redox Report**, v.5, p.365-370. 2000.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **The Analyst**, v. 127, p. 183-198, 2002.

ARUOMA OI, HALLIWELL B, GAJEWSKI E, DIZDAROGLU M. Damage to the bases in DNA induced by hydrogen peroxide and ferric ion chelates. **Journal Biologic Chemistry**, v. 264, n.20, p. 509-12, 1989.

ATOUI, A.K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, v. 89, p. 27-36, 2005.

BABIOR, B.M. Phagocytes and oxidative stress. **American Journal of Medicine**, v. 109, p.33-44. 2000.

BALASUNDRAM N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006.

BANERJEE, A.; KUNWAR A.; MISHRA, B.; PRIYADARSINI, K. I. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. **Chemistry Biological Interactive**. v. 174, n. 2, p. 134-9, 2008.

BANERJEE, A.K., MANDAL, A., CHANDA, D., CHAKRABORTI, S. Oxidant, antioxidant and physical exercise. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 253, p. 307-312, 2003.

BARATA, L.E.S.; QUEIROZ, S.R.R. **Contribuição Efetiva ou Potencial do PADCT para o Aproveitamento Econômico Sustentável da Biodiversidade**. Estudo elaborado para o Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT), Sub-Programa de Planejamento e Gestão em Ciência e Tecnologia (PGCT), do Ministério da Ciência e Tecnologia. Campinas, outubro de 1995.

BERGLUND, G.I.; CARLSSON, G.H.; SMITH, A.T.; SZÖKE, H.; HENRIKSEN, A.; HAJDU, J. The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. **Nature**, v.23, n.417(6887), p.463-8, 2002.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v.29, n.1, p. 113-123, 2006.

BARRETT, D. From natural products to clinically useful antifungals. **Biochemistry Biophysical Acta**, v.15, n.87, p. 224-233, 2002.

BASTOS, E. L.; ROMOFF, P.; ECKERT, C. R.; BAADER, W. J. Evaluation of antiradical capacity by H₂O₂-Hemin-induced luminol chemiluminescence. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 7481-7488, 2003

BRAVO L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-33, 1998.

BEDA, N. V.; NEDOSPASOV, A. A. NO-dependent modifications of nucleic acids. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v.33, n.2, p. 181-212, 2005.

BENNETT, G.J.; LEE, H.H. Xanthones from Guttiferae. **Phytochemistry**, v. 28, p. 967-998, 1989.

BEGUM, A. N.; TERAQ, J. Protective effects of alpha-tocotrienol against free radical induced impairment of erythrocyte deformability. **Biosc. Biothcnol. Biochem.** v. 66, n. 2, p. 398-403, 2002.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G.. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v.12, n.2. p.123-130,1999.

BLOIS, M.S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. **Nature**, v.181, p.1199-1200, 1958.

BOLZANI, V.S.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. The use of standart methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts Candida sp and Cryptococcus sp. **Brazil Journal Microbiology**, v. 38, p. 391-397, 2007.

BONACORSI, C.; RADDI, M.S., CARLOS, I.Z. Cytotoxicity of chlorhexidine digluconate to murine macrophages and its effect on hydrogen peroxide and nitric oxide induction. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 207-212, 2004.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSSET, C. Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH Free Radical Method. **Lebens,-Wiss. u.-Technol.**, v.30, p. 609-615, 1997

BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochemistry Journal**, v.134, p. 707-716, 1973.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, p. 813-820, 2001.

BROLIS, M. et al. Identification by high-performance liquid chromatography diode array detection mass spectrometry and quantification by high-performance liquid chromatography UV absorbance detection of active constituents of Hypericum perforatum. **Journal Chromatography Analytical**, v. 825, p. 9-16, 1998.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL, **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos, Brasília, 2003.

BRASIL, **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução de Diretoria Colegiada - RDC Nº 14, de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 5 abr. 2010. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis>.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução RDC n.48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos, 2004.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**. 4. ed. São Paulo, Atheneu.1988.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Reviews**, v.56, n.11, p.317-333, 1998

BRESTEL, E.P. Co-oxidation of luminol and hydrogen peroxide. Implications for eutrophil chemiluminescence. **Biochemical Biophysical Research Communication**, v. 126, p. 482-488, 1985.

BRUNETTI, I. L.; FARIA-OLIVEIRA, O. M. M. Sistemas quimiluminescentes com peroxidase (EC:1.11.1.7) e suas aplicações em análises clínicas. **Revista de Ciências Farmarmacêuticas**, v. 16, p. 55-77, 1995.

BURNS, J.; GARDNER, P.T.; MATTHEWS, D.; DUTHIE, G.G.; LEN, M.E.J.; CROZIER, A. Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.49, p.5797-5808, 2001.

CADENAS, E.; BOVERIS, A.; RAGAN, C. I.; STOPPANI, A. O. M. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and iquinolcytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. **Arch Biochemistry Biophysical**, 180:248-257, 1977.

CADENAS E. Mitochondrial free radical production and cell signaling. **Molecular Aspect of Medicine**, v. 25, p. 17-26, 2004.

CALDWELL, R. W., CALDWELL, R. B. Experimental diabetes causes breakdown of the blood-retina barrier mechanism involving tyrosine nitration and increases in expression of vascular endothelial growth factor and urokinase plasminogen activator receptor. **American Journal of Pathology**, v.162, p.1995-2004, 2003.

CARAGAY, A.B. Cancer preventive foods and ingredients. **Food Technology**, Chicago, v.46, p.65-68, 1992.

CARBONEZI, C.A. **Estudo Fitoquímico e Biológico de Uncaria guianensis (Aubl.) Gmel. E Chiococca alba Hitch. (RUBIACEAE)**. 1998. Dissertação de Mestrado – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita Filho”, Araraquara.

CARIBE, J.; CAMPOS, J.M. **Plantas que ajudam o homem**. São Paulo: Pensamento, 1991. 66 p.

CARR, A.C.; MYZAK, M.C.; STOCKER, R.; McCALL, M.R.; FREI, B. Myeloperoxidase binds to low-density lipoprotein: potential implications for atherosclerosis. **FEBS Letters**, v. 487, p. 176-180, 2000.

CARISTI, C., BELLOCCO, E., PANZERA, V., TOSCANO, G., VADALA, R., LEUZZI, U. "Flavonoids Detection by HPLC-DAD-MS-MS in Lemon Juices from Sicilian Cultivars". **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.51, p. 3528-3534, 2003.

CARVALHO, C. G.; PRUDENTE, L. R.; PEREIRA, A. C.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F. Avaliação da qualidade de extratos vegetais. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v.3, n. 2, p. 53 – 62, 2006.

CAVIN, A.; POTTERAT, O.; WOLFENDER, J. L.; HOSTETTMANN, K.; DYATMYKO, W.; J. Use of on-flow LC/1H NMR for the study of an antioxidant fraction from *Oropehea enneandra* and isolation of a polyacetylene, lignans, and a tocopherol derivative. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 1497, 1998.

CELEDÓN, G.; GONZÁLEZ, G.; LISSI, E.A.; HIDALGO, G. Free radical-induced protein degradation of erythrocyte membrane is influenced by localization of radical generation. **IUBMB Life**, v. 51, p. 377-80, 2001.

CERUTTI, P.A. Oxidant stress and carcinogenesis. **European Journal of Clinical Investigation**, Oxford, v.21, n.1, p.1-5, 1991.

CERUTTI, P.A. Oxy-radicals and cancer. **Lancet**, London, v.344, n. 8926, p.862-863, 1994.

CERUKS, M.; ROMOFF, P.; FÁVERO, O. A.; LAGO, J. H. G. Constituintes fenólicos polares de *Schinus terebinthifolius* raddi (Anacardiaceae). **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 597-599, 2007.

CHABOT,.; MITCHELL, J.A.; GUTTERIDGE, J.M.; VANS, T.W. Reactive oxygen species in acute lung injury. **The European Respiratory Journal**, v. 11, p. 745-57, 1998.

CHANG, C.C.; YANG, M.H.; WEN, H.M.; CHERN, J.C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, p. 178–182, 2002.

CHANWITHEESUK, A.; TEERAWUTGULRAG, A.; RAKARIYATHAM, N. Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. **Food Chemistry**, v. 92, p. 491-497, 2005.

CHARLES, P.E.; DALLE, F.; AUBE, H.; DOISE, J.M. *Candida* spp. Colonization significance in critically ill medical patients: a prospective study. **Journal of Intensive Care Medicine**, v.31, n.3, p.393-400, 2005.

CHEN, F.J.; NAKASHIMA, N.; KIMURA, I; KIMURA, M. Hypoglycemic activity and mechanism of extract from mulberry leaves and cortex mori radices in streptozotocin induced diabetic mice. **Yakugaku Zasshi**, v. 115, p. 476-482, 1995.

CHEN Q, VAZQUEZ EJ, MOGHADDAS S, HOPPEL CL, LESNEFSKY EJ. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. **Journal Biological Chemistry**, v. 278, n. 38, p. 36027-36031, 2003.

CHENG, Z.; REN, J.; LI, Y.; CHANG, W.; CHEN, Z. Study on the multiple mechanisms underlying the reaction between hydroxyl radical and phenolic compounds by qualitative structure and activity relationship. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v.10, n.12, p.4067-4073, 2002.

CHENG, Z.; REN, J.; YAN, G.; LI, Y.; CHANG, W.; CHEN, Z. Quantitative elucidation of the molecular mechanisms of hydroxyl radical quenching reactivity of phenolic compounds. **Bioorganic Chemistry**, v.31, n.2, p.149-162, 2003.

CHING, T.; JONG, J.; BAST, A. A method for screening hypochlorous acid scavengers by inhibition of the oxidation of 5-thio-2-nitrobenzoic acid: application to anti-asthmatic drugs. **Analytical Biochemistry**, v. 218, p. 377-381, 1994.

CHUN, S.S.; VATTEM, D.A.; LIN, Y.T.; SHETTY, K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter*. **Chromatography B**, v. 812, p. 53 - 70, 2004.

CLARKSON, P.M.; THOMPSON, H.S. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? **American Journal Clinical Nutrition**. v. 72, p.637-47, 2000.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Wayne, PA: CLSI; 2003 [document M07-A6].

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica das leveduras: Norma aprovada. Brasília, DF, 2002. p. 1-51. (CLSI Documento M27-A2. v. 22, n. 15).

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica de fungos filamentosos: Norma aprovada. Brasília, DF, 2002. p. 1-29. (CLSI Documento M38-A. v.22, n.16).

COLADO SIMÃO, A. N.; SUZUKAWA, A. A.; CASADO, M. F.; OLIVEIRA, R. D.; GUARNIER, F. A.; CECCHINI, R. Genistein abrogates pre-hemolytic and oxidative stress damage induced by 2,20-Azobis (Amidinopropane). **Life Sciences**, v. 78, p. 1202–1210, 2006.

COMMONER, B.; TOWNSE, J.; PAKE, G.E. Free Radical in Biological Materials. **Nature**, v.174, p. 689-691, 1954.

CORNELIUS, M. T. F.; ALVES, C. C. F.; SILVA, T. M. S.; ALVES, K. Z.; CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R.; AGRA, M. F.; olasonin and flavonoids isolated from *Solanum crinitum* Lam. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 85, p. 57-59, 2004.

CORTEZ, D.A.G.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K.; Separation of xanthenes and a biphenyl from *Kielmeyera coriacea* by centrifugal partition chromatography. **Chromatographia**, v.50, p.7, 1999.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 5ª. Edição, Lisboa: Calouste Gulbenkian, V. 2, p. 195 – 248, 2002.

COSTA, M., XIMENES, V.F., FONSECA, L.M. Hypochlorous acid inhibition by acetoacetate: implications on neutrophil functions. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.27, p.1183-1187, 2004.

COSTA, D. A.; SILVA, D. A.; CAVALCANTI, A. C.; MEDEIROS, M. A. A.; LIMA, J. T.; SOUZA, M. F. V. Chemical constituents from *Bakeridesia pickelii* Monteiro (Malvaceae) and the relaxant activity of kaempferol-3°-b-D-(6''-e-p-coumaroyl) glucopyranoside on guinea-pig ileum. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 901-903, 2007.

CROFT, K.D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. **Annals of the New York Academy of Science**, v.854, p.435-442, 1998.

CROZIER, A.; LEAN, M.E.J.; McDONALD, M.S.; BLACK, C. Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.45, p.590-595, 1997.

CUYCKENS F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal Mass Spectrometry**, v.39, p. 1-15, 2004.

DECKER, E A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? **Nutrition Reviews**, v.55, n.11, p. 396-407, 1997.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, n.1, p. 33-40, 2004.

DEL MESTRO, R. F. Na approach to free radical in medicine and biology. **Acta Physiologica Scandinavica Supplementum**, v. 492, p. 153-68, 1980.

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

DEVLIN, T.M. **Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations**. 3rd. edn. Wiley-Liss. New York, 1992.

Di STASI, L.C. **Plantas Medicinais: Arte e Ciência**. UNESP. Brasil. 1995. 230p.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. New York: John Wiley & Sons, 2^a ed., 507 p., 2001.

DIGNANI, D.F. **Peperomia blanda (PIPERACEAE): Avaliação das atividades antibacteriana e antioxidante**. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Araraquara, 2009.

DOEJARDO, D. D. Biodiversit prospecting and benefit-Sharimg: perspective from de field. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 51, p. 1-15, 1996.

DOI, K., KOJIMA, T., MAKINO, M., KIMURA, Y. & FUJIMOTO, Y. Studies on the constituents of the leaves of *Morus alba* L. **Chemistry Pharmacal Bulletin**, v. 49, p.151–153, 2001.

DOMINGO, D.; LÓPEZ-BREA, M. Plantas con acción antimicrobiana. **Revista española de Quimioterapia**, v. 16, n. 4, p. 385-393, 2003.

DOROSHOW, J.H. Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. **Cancer Research**, v.43, n.2, p.460-472, 1983.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema b-caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH•. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.2, p.446-52, 2006.

DUARTE, J.; PEREZ-VISCAINO, P.; JIMENES, J.; TAMARGO, J.; ZARZUELO, A. Vasodilator effects of quercetin on isolated rat vascular smooth muscle. **European Journal Pharmacology**, V. 3, p. 239, 1993.

DUNFORD, H.B. Horseradish peroxidase: Structure and Kinect Propierts. In: EVERSE, J.; EVERSE, K.; GRISHAM, M.B. **Peroxidases in chemistry and biology**. Boston: CRC, 1991. v. 2, p. 1-24.

EATON, J.W. Defenses against hypochlorous acid: Prying the neutrophil's rapier thrust. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicie**, v.121, p.197-198, 1993.

EISERICH, J. P.; CROOSS, C.E.; JONES, A. D. HALLIWEL, B.; VAN DER VLIET, A. Formation of nitrang and chlorination species by reaction of nitrite with hypochlorous acid. **Journal Biological Chemistry**, v. 271, n.32, p. 19199- 19208, 1996.

- ELOFF, J.N.A.A. Sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plants extract for bacteria. **Planta Medica**, v.64, 711-713 p, 1998.
- EL-REMESSY, A. B., BEHZADIAN, M. A., ABOU-MOHAMED, G., FRANKLIN, T. ERCISLI, S.; ORHAN, E. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. **Food Chemistry**, v. 103, p. 1380-1384, 2007.
- EMAGA, T, H; ANDRIANAIVO, R, H; WATHELET, B; TCHANGO, J, T; PAQUOT, M. Effects of the stage of maturation and varieties on the chemical composition of banana and plaintais peels. **Food Chemistry**. v.103, p. 590-600, 2007.
- ERCISLI, S.; ORHAN, E. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. **Food Chemistry**, London, v. 103, p. 1380-1384, 2007.
- EWALD, C.; FJELKNER-MODING, S.; JOHANSSON, K.; SJOHOLM, I. AKESSON, B. Effect of processing on major flavonoids in processed onions, green beans, and peas. **Food Chemistry**, v. 64, p. 231-235, 1999.
- EVANS, J. L.; GOLFINE, I. D.; MADDUX, B. A.; GRODSKY, G. M. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and β -cell dysfunction? **Diabetes**, v. 52, p. 1-8, 2002.
- EVANS, P.; HALLIWELL, B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. **The British Journal of Nutrition**, v.85, p.67-74. 2001.
- EWING, J.P.; JANERO, D.R. **Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator**. Analytical Biochemistry, v.232, p.243 – 248, 1995.
- FARMACOPÉIA brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988.
- FELLEGRINI, N., KE, R.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Screening of dietary Carotenoids and Carotenoid-Rich Fruit Extracts for Antioxidant Activities Applying 2,2'-Azinobis(3-ethylenebenzothiazoline-6sulfonic acid Radical Cation Decolorization Assay. **Methods in Enzymology**, v.299, p.379-389, 1998.
- FELMINGHAM D; FARRELL D J. In vitro activity of telithromycin against Gram-negative bacterial pathogens. **The Journal of infection**, v. 52, n.3, p. 178-80, 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, p.61-68, 1997.
- FERREIRA, Aurélio B. de Hollanda. **Novo Dicionário da Língua Portuguesa**. 2. ed. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1986. 1838 p.

FINALD, D.; LAC, G.; FILAIRE, E. Oxidative stress: relationship with exercise and training. **Sports med.**, v.36, n.4, p.327-358, 2006.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 239-247, 2000.

FLINT BEAL, M. Less stress, longer life. **Nature Medicine**, v.11, p.598 – 599, 2005.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Medica Brasileira**, v.46, n.3, p. 265-71, 2000.

FOOTE, C.S. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. **Photochemistry Photobiological**, v. 54, p. 659, 1991

FRANZOTTI, E.M. **Identificação de agonistas e antagonistas de receptores nucleares em extratos de plantas medicinais: Morus nigra L., Plectranthus ornatus CODD., Ipomoea cairica (L) sweet e Pouteria torta (Mart.) Radlk.** Tese de Doutorado. Universidade de Brasília. Brasília, 2006.

FRIDIVITCH, I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? **Annals of New York Academy of Sciences**, v.13, p.893, 1999.

FRIMER, A. A. (Ed.); **Singlet Oxygen**, CRC Press, Califórnia, 1989.

FRISCHER, H.; AHMAD, T. Consequences of erythrocytic glutathione reductase deficiency. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.109, p.583-588, 1987.

FUGLEVAND, G. JACKSON, J.A. & JENKINS, G.I.UV-B, UV-A and blue light signal transduction pathway interact synergistically to regulate chalcone synthase gene expression in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 8, p. 2347-2357, 1996.

GALLEANO, M.; PUNTARULO, S. Effect of mild iron overload on liver and kidney lipid peroxidation. **Brazil Journal Medicine Biological Residence**, v. 27, n. 2, p. 349-58, 1994.

GALLEY, H.F.; RICHARDSON, N; HOWDLE, P.D.; WALTER, B.E.; WEBSTER, N.R. Total antioxidant capacity and lipid peroxidation in liver transplantation. **Clinical Science**, v.89, p.329-32, 1995.

GATTUSO, G., BARRECA, D., GARGIULLI, C., LEUZZI, U., CARISTI, C. “Flavonoid Composition of Citrus Juices”. **Molecules**, v. 12, p. 1641-1673, 2007.

GATTUSO, G., CARISTI, C., GARGIULLI, C., BELLOCCO, E., TOSCANO, G. LEUZZI, U. Flavonoid Glycosides in Bergamot Juice (Citrus bergamia Risso). **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 54, p. 3929-3935, 2006.

GEMTCCHÚJNICOV, I. D. **Manual de taxonomia vegetal**: plantas de interesse econômico. São Paulo: Ed. Agronomia Ceres, p.129, 1976.

GIASSON, B.I.; ISCHIROPOULOS, H.; LEE, V.M.Y.; TROJANOWSKY, J.Q. The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Free Radical Biology and Medicine**. v.32, p.1264-1275, 2002.

GILBERT, H. F.; MC LEAN, V. M. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular**, v. 63, p. 69-172, 1990.

BERGLUND, G.I.; CARLSSON, G.H.; SMITH, .T.; SZÖKE, H.; HENRIKSEN, A.; HAJDU, J. The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. **Nature**, v. 417, p. 463-468, 2002.

GRONER, Y.; ELROY-STEIN, O.; AVRAHAM, K.B.; SCHICKLER, M.; KNOBLER, H.; MIN-GOLOMB, D.; BAR-PELED, O.; YAROM, R.; ROTSHENKER, S. Cell damage by excess CuZn SOD and Down's syndrome. **Biomed Pharmacother.**, v.48, n.5, p.231-240, 1994.

GRABELY, S., THIERICKE, R. The impact of natural products on drug discovery. **Drug Discovery from Nature**. Berlin, Springer, 1999.

GRAPE, U. **Drug Discovery from Nature**. Berlin, Springer, 1999.

GREEN, D. R.; REED, J. C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, v. 281, p. 1309-1312, 1998.

HADJIGOGOS, k. The role of free radicals in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Panminerva Médica*, v.45, p.7-13, 2003.

HAHLBROCK, J.B. **Flavonoids** In: CONN, E.E. **The biochemistry of plants**. A comprehensive treatise. Academic Press. Nova Iorque. 425-591p. 1981.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. **The Lancet**, v.355, n.9210, p.1179-1180, 2000.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, v.52, n.8, p.253-265, 1994.

HALLIWELL, B. Establishing the significance and optimal intake of dietary antioxidants: the biomarker concept. **Nutrition Reviews**, v. 57, p. 104–113, 1999.

HALLIWELL, B, GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Archives Biochemistry Biophysical**, v. 246, p. 501-14, 1986.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymology**, v. 186, p.1-85, 1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radical in biology and medicine. **Claredon Press**, v.33, p.543, 1991.

HALLIWELL, B.; WITERMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage n vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Brazilian Journal Pharmacology**, v. 142, n.2, p. 231-255, 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Fourth Edition; Oxford University Press; p. 268 – 340, 2007.

HAMBURGER, M; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v.30, p. 3864-3874, 1991.

HAMPTON, M.B.; KETTLE, A.J.; WINTERBOURN, C.C. Inside the neutrophils phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. **Blood**, v.92, p.3007-3017, 1998.

HANASAKI, Y.; OGAWA, S.; FUKUI, S. The correlation between active oxygen scavenging and antioxidative effects of flavonoides. **Free Radical Biological Medicine**..V. 16, p. 845-850, 1994.

HARBORNE, J. B. **The Flavonoids: Advances in Research**, Chapman & Hall, London: 57-87; 337-365; 441-471; 499-526p, 1994.

HARBORNE, J.B.; MABRY, T.J. **The Flavonoids: Advances in Research**. Chapman & Hall, London, p 1-131, 1992.

HARBORNE, J.B. **The Flavonoids: advances in research since**, Ed. Chapman and Hall, Ed. 6, New York, 1988.

HARBORNE, J.B. **Phytochemical methods**. A guide to modern techniques of plant analysis. Londres. Chapman and Hall. 288p. 1984.

HARBONE, J. B. (Ed.) **Methods in plant biochemistry**. Plant Phenolic. London:Aademic, v. 1, 1989.

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

HARTMAN, P.E., SHANKEL, D.M. Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.15, n.3, p.145-182, 1990.

HATHERILL JR, TILL GO, WARD PA. Mechanisms of oxidant-induced changes in erythrocytes. **Agents-Actions**, v. 32, p. 351-358, 1991.

HEBBEL, R. P. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. **Journal Laboratire Clinical Medical**, v. 107, p. 401-404, 1986.

HERTLOG, M. G. L., FESKENS, E. J. M., HOLLMAN, P. C. H., KATAN, M. B., & KROMHOUT, D. Dietary antioxidant flavonoides and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. **Lancet**, v. 342, p. 1007-1011, 1993.

HENDERSON B.W.; DOUGHERTY T.J., How does photodynamic therapy work? **Photochemistry Photobiological**, v.1, p. 145-157, 1992.

HENRY, J.B. **Diagnóstico Clínico e Tratamento**. 19ª ed. São Paulo: Ed. Manole, 2002.

HERSHKO C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Semin Hematol**, v.26, p.277-285, 1989.

HODEK, P.; TREFIL, P.; STIBOROVÁ, M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. **Chemico-biological Interactions**, v.139, n.1, p.1-21, 2002.

HUBER, L. S.; RODRIGUES-AMAYA, D. B. Flavonoides e Flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v.19, n.1, p. 97-108, 2008.

HYNES, M. J.; O'COINCEANAINN, M. The kinetics and mechanisms of reactions of iron (III) with caffeic acid, chlorogenic acid, ferulic acid and naringin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 98, p. 1457- 1464, 2004.

IKAWA M, SCHAPER TD, DOLLARD CA, SASNER JJ. Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. *Journal Agriculture Food Chemistry*. V. 51, p. 1811-1815, 2003.

IKEDA-SAITO, M.; SHELLEY, D.A.; LU, L.; BOOTH, K.S.; CAUGHEY, W.S.; KIMURA, S. Salicylhydroxamic acid inhibits myeloperoxidase activity. *The Journal of Biological Chemistry*, v.266, p.3611-3616, 1991.

IUPAQ - disponível em: www.chem.qmul.ac.uk/iupac/class/ONatP.html#12,

JANSEN, S.J.K. Oxidative stress and free radicals. **Journal of Molecular Structure**, v.666, p.382-387, 2003.

JAYAPRAKASHA, G.K.; SINGH, R.P.; SAKARIAH, K.K. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis Vinifera*) extracts on peroxidation models in Vitro. **Food Chemistry**, v.73, p.285-290, 2001.

JENNER, A.M.; RUIZ, J.E.; DUNSTER, C.; HALLIWELL, B.; MANN, G.E.; SLOW, R.C.M. Vitamin C protects against hypochlorous Acid-induced glutathione depletion and DNA base and protein damage in human vascular smooth muscle cells. **Vascular Biology**, v.22, p.574-580, 2002.

KÄHKÖNEN, M.P.; HOPIA, A.I.; HEINONEN, M. Berry phenolics and their antioxidant activity. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.49, p.4076-4082, 2001.

KAKKAR, P.; DAS, B.; VISWANATHAN, P.N. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase. **Journal of Biochemistry and Biophysics**, v.21, p.130-132, 1984.

KANG, S.Y.; LEE, K.Y.; SUNG, S. H.; KIM, Y.C. Four new neuroprotective Dihydropyranocoumarins from *Angelica gigas*. **Journal Natural Products**, v. 68, p. 56-59, 2005.

KATO, Y.; NAGAO, A.; TERAOKA, J.; OSAWA, T. Inhibition of myeloperoxidase-catalyzed tyrosylation by phenolic antioxidants in vitro. **Journal of Bioscience, biotechnology and Biochemistry**, v.67, p.1136-1139, 2003.

KETTLE, J.; GEDYE, C.A.; WINTERBOURN, C.C. Mechanism of inactivation of myeloperoxidase by 4-aminobenzoic acid hydrazide. **Biochemistry Journal**, v.321, p.503-508, 1997.

KHALIL, N.M. **Interação Nicotina-Peroxidases (Mieloperoxidase e Horseradish): Implicações no Burst Oxidativo de Leucócitos Polimorfonucleares**. Dissertação de Mestrado. FCFAR-UNESP, 2002.

KIM, S.Y.; GAO, J.J.; LEE, W.C.; RYU, K.S. LEE, K.R.; KIM, Y.C. Antioxidative flavonoids from the leaves of *Morus alba*. **Archives Pharmacal Research**, v. 22, n.1, p. 81-85, 1999.

KONDO, K., KURIHARA, M., MIYATA, N., SUZUKI, T., & TOYODA, M. Mechanistic studies of catechins as antioxidants against radical oxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 362, p 79-86, 1999.

KOWALTOWSKI, A. J.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Lett**, 495: 12–15, 2001.

KOWALTOWSKI, A. J.; VERCESI, A. E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Radical Biological Medicine**, v.26, p. 463-71, 1999.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; TRONCOSO, A.M.; FILHO, J.M.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v.25, n.4, p.726-732, 2005.

- KUSTER, R.M & ROCHA, L.M. Cumarinas, Cromonas e Xantonas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**, 5º ed., Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1102p., 2004.
- LARSON, R. A.; **Naturally Occurring Antioxidants**, Lewis Publishers: New York, 1997, p. 7.
- LAPENNA, D.; CUCCUROLLO, F. Hypochlorous acid and its Pharmacological Antagonism: An update picture. **Geneneral Pharmacology**, v.27, p. 1145-1147, 1996.
- LEHNINGER, A., NELSON, D. & COX, M. **Principles of Biochemistry**. 2nd edn. Worth Publishers, New York, 1993.
- LEMASTERS, J. J.; NIEMINEN, A. L.; QIAN, T.; TROST, L. C.; ELMORE, S. P.; NISHIMURA, Y.; CROWE, R. A.; CASCIO, W. E.; BRADHAM, C. A.; BRENNER, D. A.; HERMAN, B. Themitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis,apoptosis and autophagy. **Biochimesmistry Biophysical Acta**, v. 1366, p. 177-196, 1998.
- LIMA, I. O.; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.;FARIAS, N. M.P.; SOUZA, E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de Candida. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.2, p 197-201, 2006.
- LIANDA, R.L.P. & CASTRO, R.N. Isolamento e identificação da morina em mel brasileiro de Apis mellifera. **Química Nova**, v. 3, n. 6, p. 1472-1475, 2008.
- LIANDA, R.L.P. Tese. Perfil de substâncias fenólicas de méis brasileiros por cromatografia líquida de alta eficiência e avaliação do potencial antioxidante. PPGQO-UFRRJ, p.27, 2009.
- LIANG,Y.; XIE, P.; CHAN, K. Quality control of herbal medicines. **Journal Chromatography B Analyt ical Technologies Biomedical and Life Sciences**. v. 812, n(1-2), p.53-70, 2004.
- LIÉGEOIS, C., LERMUSIEAU, G., AND COLLIN, S. Measuring antioxidant efficiency of wort, malt, and hops against the 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride-induced oxidation of an aqueous dispersion of linoleic acid. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.48, p. 1129-1134, 2000.
- LIEN, E.J.; REN, S.; BUI, H. H.; WANG, R. Quantitative structureactivityrelationship analysis of phenolic antioxidants.**Free Radical Biolological Medica**, v. 26, n.3-4, p. 285-94, 1999.
- LIMA, A.R.; BARBOSA, V.C.; FILHO, P.R.S.; GOUVEIA, C.M.C.P. Avaliação in vitro da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p.531-536, 2006.

- LIN, M.; ANDERSON, H.; FLAVIN, M.T.; PAI, Y.S. In vitro anti-HIV activity of bioflavonoids isolated from rhus sucedanea and garciana multiflora. *Journal Natural Products*, v. 60 p. 884-888, 1997.
- LIN, L.; CHEN, P. E HARNLY, J. M. New phenolic components and chromatographic profiles of green and fermented teas. *Journal Agricultural Food Chemistry*, v.56, P. 8130-8140, 2008.
- LIU, S. S. Generating, partitioning, targeting and functioning of superoxide in mitochondria. *Bioscience Reports*, v.17, n. 3, p 259-272, 1997.
- LIU, Z.; TIAN, X. The components of *Cacalia tangutica*. *Bull. Korean Chemistry Sociedade*. v. 25, p. 1074 – 1080, 2004.
- LORENZI, H.; SOUZA, M.H.; TORRES, M.A.V. **Árvores exóticas no Brasil: madeiras, ornamentais e aromáticas**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2003. 384p.
- LUSINI, L.; ROSSI, R.; GIUSTARINI, D.; SIMPLICIO, P. The pro-oxidant role of protein SH groups of hemoglobin in rat erythrocytes exposed to menadione. *Chemico-Biological Interactions*, v.139, p.97–114, 2002.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA-JUNIOR., V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, vol. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.
- MACHADO, A. E. H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Química Nova* [online], vol.23, n.2, p. 237-243, 2000.
- MACMICKING, J.; XIE, Q.; NATHAN, C. Nitric oxide and Macrophage function. *Annual Review of Immunological*, v.15, p.323-350, 1997.
- MAY, J.M. Ascorbate function and metabolism in the human erythrocyte. *Frontiers in Bioscience*, v. 2, p.1-10, 1998.
- MAYES PA. Biologic oxidation. In MURRAY RK, GRANNER DK, MAYES PA, RODWELL VW (eds): *Harper's biochemistry*. San Mateo, Appleton & Lange, p.105-11, 1990.
- MARKHAM, K. R. **Techniques of flavonoid identification**. Academic Press; London, UK; 113p, 1982.
- MARSHALL, M. E.; KERVIN, K.; BENEFIELD, C.; UMERANI, A.; ALBAINY-JENEI, S.; ZHAO, Q.; KHAZAELI, M. B. J. Growth-inhibitory effects of coumarin (1,2-benzopyrone) and 7-hydroxycoumarin on human malignant cell lines in vitro. *Journal of Cancer Research Clinical Oncology* v. 120, S.3-10, 1994.
- MEDA, A.; LAMIEN, C.E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J.; NACOULMA, O.G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkin Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, v. 91, n.3, p. 571-577, 2005.

MELLIU, E.; MAGIATS, P.; MITAKU, S.; Natural and Synthetic 2,2-Dimethylpyranocoumarins with anticacterial activity. **Journal Natural Products**, v. 68, p.78-82, 2005.

MELO, A.E.; GUERRA, N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presente em alimentos. **Boletim SBCTA**, v.36, n.1, p.1-11, 2002.

MELO, E.A.; MACIEL, M.I.S.; LIMA, V.L.A.G.; LEAL, F.L.L.; CAETANO, A.C.S.; NASCIMENTO, R.J. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.3, p.639-644, 2006.

MERTENS, A.; HOLVOET, P. Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. **The FASEB Journal**, v.15, p.2073-2084, 2001.

METELITZA, D.I.; KARASYOVA, E.I.; GRINTSEVICH, E.E.; THORNELEY, R.N.F.; Peroxidase-catalyzed co-oxidation of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine in presence of substituted phenols and their polydisulfides. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.98, p.1-9, 2004.

MIAN, M.F.; KANG, C.; LEE, S.; CHOI, J.H.; BAE, S.S.; KIM, S.H.; KIM, Y.H.; RYU, S.H.; SUH, P.G.; KIM, J.S.; KIM, E. Cleavage of focal adhesion kinase is an early marker and modulator of oxidative stress-induced apoptosis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 171, p.57-66, 2008.

MIDDETON, E.. KONDASMAMI, C. Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. **Biochemical Pharmacology**. v. 43, p1167-1179, 1992.

MILLER, N.J.; RICE-EVANS, C.A. Factores influencing the antioxidant activity determined by the ABTS radical cation assay. **Free Radical Research**, v. 26, p. 195-199, 1997.

MIRANDA, M.A.; VIEIRA, G.D.; ALVES, M.S.; YAMAMOTO, C.H; PINHO, J.J.R.G.; SOUSA, O.V. Uso etnomedicinal do chá de *Morus nigra* L. no tratamento dos sintomas do climatério de mulheres de Muriaré, Minas Gerais, Brasil. **HU Revista**, v.36, p.61-68, 2010.

MONTALVO, R.V.; PARRA, A.L.; LOPEZ, A.G.; FERRER, J.P.; ROMERO, J.L.S.; RAMIREZ, T.G. Toxicidad de un extracto tánico de *Pinus caribaea* Morelet. **Revista Cubana Plantas Medicinai**s, v.10, n.2, p.1-8, 2005.

MOREIRA, R.R.D.; CARLOS, I.Z.; VILEGAS, W. Release of Intermediate Reactive Hydrogen Peroxide by Macrophage Cells Activated by Natural Products. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.24, p.201-204, 2001.

MORIDANI, M. Y.; SCOBIE, H.; JAMSHIDZADEH, A.; SALEHI, P.; O'BRIEN, P. J. Caffeic acid, chlorogenic acid and dihydrocaffeic acid metabolism: glutathione conjugate formation. **Drug Metab. Dispos.**, v. 29, n. 11, p. 1432-1439 , 2001.

MÜLLER, A. H. “Constituintes químicos de *Metrodorea* e *Pilocarpus*: contribuição à quimiossistemática de *Pilocarpinae*”. Tese de Doutorado, DQ, UFSCar, São Carlos, SP, 1994.

MUNTEAN, D. AND CSEDÖ, C. 2003. Isolation and identification of isoquercitrin from extracts obtained from leaves of morus alba (l.) and morus nigra (l.). **Acta Horticulturae** (ISHS) 597:105-114. http://www.actahort.org/books/597/597_13.htm

NACZK M, SHAHIDI F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal Chromatography**, v. A, p. 95-111, 2004.

NADERI, G.A.; ASGAY, S. Antioxidant activity of three extract of Morus nigra. **Phytotherapy Research**, v.18, n.5, p.365-369, 2004.

NAHAR, L.; SARKER, S.D. Chenoalbuside: an antioxidant phenolic glycoside from the seeds of *Chenopodium album* L. (Chenopodiaceae), **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 279-282, 2005.

NAKASHIMA, S.; MIZUTANI, T.; NAKANURA, Y.; TAKEMURA, O. S.; NAKAMURA, M.; MIYATA, H.; KATAGIRI, Y.; NOZAWA, Y. Effects of selective phosphodiesterase type IV inhibitor, rolipran, on transducing phospholipases in neutrophils. **Comparative Biochemistry Physiology**, v.112, p.137-143, 1995.

NAOWABOOT J, PANNANGPETCH P, KUKONGVIRIYAPAN V, KUKONGVIRIYAPAN U, NAKMAREONG S, ITHARAT A. Mulberry leaf extract restores arterial pressure in streptozotocin-induced chronic diabetic rats. **Nutrition Research**, v. 9, n. 8, p.602-608, 2009.

NAHRTEDT, A.; PROKSCH, P.; CONN, E. E.; Dührin, (-) cathequin, flavonol-glucosides and flavones from *Chamaebatiafoliosa*. **Phytochemistry**, v. 26, 1546, 1987.

NCCLS – NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobiana por diluição para bactéria de crescimento aeróbio. Norma aprovada 6ª ed. Brasília, DF: ANVISA, 2003. (NCCLS Document M7-A6, v. 23, nº 2, 2003).

NCCLS – NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: proposed Standard. New York, 1997. M27-A2.

NENADIS, N.; WANG, L.-F.; TSIMIDOU, M.; ZHANG, H.Y. Estimation of Scavenging Activity of Phenolic Compounds Using the ABTS^{•+} Assay. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 52, n.15, p. 4669–4674, 2004.

NIETO, F. J.; IRIBARREN, C.; GROSS, M. D.; COMSTOCK, G. W.; CUTLER, R. G.; Uric acid and serum antioxidant capacity: a reaction to atherosclerosis? **Atherosclerosis**, v. 148, n. 1, p. 131-9, 2000.

NIKI, E. Free radical initiators as source of water- or lipid-soluble peroxy radicals, **Methods Enzymol.** v. 186, p. 100–108, 1990.

NICHOLLS G, FERGUNSON SJ. Mitochondria in the cell. In: NICHOLLS G, FERGUNSON SJ. Bioenergetics 3. Second edition. London: **Academic Press Elsevier**; p. 250-70, 2002.

NOMURA, T.; HANO, Y. Isoprenoids-substituted phenolic compounds of moraceous plants. **Nature Products Report**, v.11, n.2, p.205-218, 1994.

NONAKA, C.F.W. et al. *Candida dubliniensis* – emergent yeast associated with oral candidosis. **Revista Odontologia UNESP**, v.7, p.125-31, 2008.

OCHSNER M., Photophysical and Photochemical processes in the photodynamic therapy of tumours, **Journal Photochemistry Photobiological**, v. 39, p. 1-18, 1997.

OHLSON, P.I.; PAUL, K.G. The molar absorptivity of horseradish peroxidase. **Acta chemica Scandinavica. Series B: Organic chemistry and biochemistry**, v. 31, p. 373-375, 1976.

OJASTI, J; JIMÉNEZ, E G; OTAHOLA, E S; ROMÁN, L B G. **Informe sobre las especies exóticas em Venezuela**. Caracas, Venezuela, Ministerio del Ambiente y de los Recursos Naturales, 2001.

OLIVEIRA, A.C.O.; VALENTIM, I.O.; GOULART, M.O.F; SILVAI, C.A; BECHARA, E.J.H.; TREVISAN, M.T.S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, p. 689-702, 2009.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia**. São Paulo: Atheneu, p.155-156, 1998.

OLIVEIRA, L.F.; JORGE A.O.C.; SANTOS, S.S.F. In vitro minocycline activity on superinfecting microorganisms isolated from chronic periodontitis patients. **Brazil Oral Research**, v.20, p. 202-6, 2006.

OMS-World Health Organization; **WHO Policy Perspectives on Medicine**. v.2, p.1, 2002.

O'BRIEN, P. J. Peroxidases. **Chemico-Biological Interactions**, v. 129, p. 113-139, 2000.

OSTROSKY, E.A.; MIZIMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L.; KANEKO, T.M.; NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B.R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18. n.2. p.301-307, 2008.

PADILHA, M.M.; MOREIRA, L.Q.; MORAIS, F.F.; ARAÚJO, T.H.; ALVES-DA-SILVA, G. Estudo farmacobotânico das folhas de amoreira-preta, *Morus nigra* L., Moraceae. *Revista Brasileira de farmacognosia*, v. 20, n.4, p. 221-226, 2010.

PANNALA, A.S.; CHAN, T.S.; O'BRIEN, P.J.; RICE-EVANS, C.A. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.282, n.5, p.1161-1168, 2001.

PAWLOWSKA AM, OLESZEK W, BRACA A. Quali-quantitative analyses of flavonoids of *Morus nigra* l. and *Morus alba* l. (Moraceae) fruits. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 56, p. 3377-3380, 2008.

PELLEGRINI, N.; RE, R.; YANG, M.; EVANS, C.R. Screening of dietary Carotenoids and Carotenoid-Rich Fruit Extracts for Antioxidant Activities Applying 2,2'-Azinobis(3-ethylenebenzothiazoline-6sulfonic acid Radical Cation Decolorization Assay. **Methods in Enzymology**, vol.299, p.379-389, 1998.

PENNA, C.; MARINO, S.. VIVOT, E.; CRUANES, M.C.; MUNOZ, J.D.; CRUANES, J.; FERRARO, G.; GUTKIND, G.; MARTINO, V. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. **Journal Ethnopharmacology**, v.77, p.37-40, 2001.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n.7, p.1035-1042, 2000.

PETERSON, J.; DWYER J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, v. 18, n.12, p. 1995-2018, 1998.

PINTO, T.J.A., KANEKO, T.M., OHARA, M.T. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 325 p.
 PRYOR, W.A., CORNICELLI, J.A., DEVALL, L.J., TAIT, B., TRIVEDI, B.K., WITIAK, D.T. & WU, M. A rapid screening test to determine the antioxidant potencies of natural and synthetic antioxidants. **Journal Organic Chemistry**, v. 58, p.3521- 3532, 1993.

POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. **International Journal of Vitamin and Nutrition Research**, v.67, n.5, p.289-297, 1997.

POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. **International Journal of Vitamin and Nutrition Research**, v.67, n.5, p.289-297, 1997.

QUER, P. F. **Plantas medicinales: el discórides renovado**. 6ª. Ed. Barcelona: Editorial Labor, p. 117-121, 2007.

RAYYAN, S.; FOSSEN, H.; NATELAND, H. S.; ANDERSEN, O. M. Isolation and Identification of Flavonoids, Including Flavone Rotamers, From The Herbal Drug "Crataegi Folium Cum Flore" (Hawthorn). **Phytochem Analitical**, v.16, p. 334-341, 2004.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v 26, n 9-10, p 1231-1237, 1999.

ROBARDS, K.; ANTOLOVICH, M. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids. **Analyst**, v.122, p.11R-34R, 1997.

ROBARDS, K.; PRENZLER, P.D.; TUCKER, G.; SWATSITANG, P.; GLOVER, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chemistry**, v. 66, p. 401-436, 1999.

ROGINSKY, V.; LISSI, E.A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v.92, p.235-254, 2005.

RÖSEN, P.; NAWROTH, P. P.; KING, G.; MÖLLER, W.; TRITSCHLER, H. J.; PACKER, L. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v.17, p.189-212, 2001.

ROSS, D.; MOLDEUS, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In Vigo-Pelfrey C (ed): **Membrane lipid oxidation**. 1th ed. Boca Raton, CRC Press, p.151-170, 1991.

ROVER JUNIOR, L.; HOEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; and KUBOTA, L. T.. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n.1, p. 112-119, 2001.

RÜCKER, G.; NEUGEBAUER, M.; WILLEMS, G. G. **Intrumentelle pharmazeutische Analutik**. Stuttgart: Wissenschaftliche, 2001.

SALA, A.; RECIO, M.C.; SCHINELLA, G.R.; MÁÑEZ, S.; GINER, R.M.; CERDÁ-NICOLÁS, M.; ROSÍ, J.L. Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside. **Europea Journal of Pharmacology**, v. 461, p. 53-61, 2003.

SALEH, N.A.M. The biosynthesis of flavonoid glycosides and their importance in chemosystematic. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.7, p. 37-45, 1979.

SANCHES, A.C.C. **Estudo farmacognóstico das cascas de Stryphnodendron obovatum Benth., atividade antioxidante, antimicrobiana e da ação cicatrizante dos seus extratos**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Araraquara, 2004.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F. Procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.76, p.270-276, 1998.

SANCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F. **New parameter for evaluation of free radical scavenging capacity of polyphenols.** 2nd International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ESCOC-2), 1998. Disponível em <http://www.mdpi.org/escoc/>, September 1-30, 1998 [dp130]; http://ecsoc2.hcc.ru/DP_TOP1/dp130/dp130.htm.

SCHINELLA, G.R.; TOURNIER, H.A.; MÁÑEZ, S.; DE BUSCHIAZZO, P.M.; RECIO, M.C.; RÍOS, J.L. Tiliroside and gnaphaliin inhibit human low density lipoprotein oxidation. **Fitoterapia**, v. 78, p.1-6, 2007.

SATO Y, KAMO S, TAKAHASHI T, SUZUKI Y. Mechanism of free radical-induced hemolysis of human erythrocytes: hemolysis by water-solution radical initiator. **Biochemistry**, v. 34, p.8940-8949, 1995.

SAUNDERS, B. C. Peroxidases and catalases. In: EICHHORN, G.L. (Ed.), **Inorganic Biochemistry**. Amsterdam: Elsevier, 1973, p. 988-1021.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v.30, n.12, p.3875-1883, 1991.

SCHMITZ, W. O.; SIMÃO, A. N. C.; CECCHINI, R.; SARIDAKIS, H. O. Estresse oxidativo em eritrócitos submetidos a 2,2-azobis amidinopropano (AAPH): efeito antioxidante e antihemolítico do chá verde (camellia sinensis). **Arquivo de Ciências e Saúde da Unipar**, Umuarama, v. 12, n. 3, p. 175-179, 2008.

SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. The use of standart methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts Candida sp and Cryptococcus sp. **Brazil Journal Microbiological**, v. 38, p. 391-397, 2007a.

SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeast Candida spp and Cryptococcus sp. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 28, p. 25-34, 2007b.

SCOTT MD, LUBIN BH, ZUO L, KUYPERS FA. Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase. **The Journal of Laboratory and Clinical Meicine**. v. 118, p. 7-16, 1991.

SELLAPPAN, S.; AKOH, C.C.; KREWER, G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.50, n.8, p.2432-2438, 2002.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. Phenolics in Foods and Nutraceuticals. Boca Raton, **CRC Press**, 2004.

SHAN, X.; AW, T.Y.; JONES, D. P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacol Ther**, v.47, p. 61-71, 1990.

SHEARY, B.; DAYAN, L. Recurrent vulvovaginal candidiasis. **Australian Family Physician**, v.34, n.3, p.147-50, 2005.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. **European Journal of Biochemistry**, v.215, n.2, p.213-219, 1993.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry**, v.215, n.2, p.213-219, 1993.

SIES, H., STAHL, W. Vitamins E and C, b-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.62, n.6, p.1315-1321, 1995.

SIGMA-ALDRICH, disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com>

SILVA, I.O.; SANTOS, I.C.; PETERS, V.M.; FARIA, R.E.; ANDRADE, A.T.A. Avaliação do potencial estrogênico de *Morus sp* em ratas Wistar. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v.22, p.49-57, 2003.

SILVA, K.J.; FILHO, V.C. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. **Química Nova**, v.25, p.449-454, 2002.

SILVA, R. R.; FERREIRA; G.A.L. E SILVA, S. L À Procura da Vitamina C, **Química Nova na Escola**, São Paulo, n.2, p. 1-2, nov. 1995.

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

SINGLETON VL, ORTHOFER R, LAMUELA-RAVENTÓS. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In PACKER L (ed) *Methods in enzymology, Oxidants and antioxidants*. **Academic Press**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SLUIS, A.A.; DEKKER, M.; JAGER, A. JONGEN, W.M.F. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.49, p.3606-3613, 2001.

SOARES, J.R.; DINIS, T.C.P.; CUNHA, A.P.; ALMEIDA, L.M. Antioxidant activities of some extracts of *Thymus zygis*. **Free Radical Research**, v.26, p.379-389, 1997.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.15. n.1, p. 71-8, 2002.

SOMEYA, S; YOCHIKI, Y; OKUBO, K Antioxidant compounds from bananas (*Musa Cavendish*). **Food Chemistry**. v. 79, p. 351-354, 2002.

SORG, O. Oxidative stress: a theoretical model or biological reality? **Comptes Rendus Biologies**, v.327, n.7, p.649-662, 2004.

SOUSA, C.M.M.S.; SILVA, H.R.; VIEIRA, G.M.JR.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.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. n.2. p.351-355, 2007.

SOUSA, M. P.; MATOS, M. E. O.; MATOS, F. J. A.; MACHADO, M. I. L.; CRAVEIRO, A. A. **Constituintes Químicos Ativos de Plantas Medicinais Brasileira**, Fortaleza - CE: Editora EUFC, Laboratório de Produtos Naturais, 1991.

SÝVACÝ A., SÖKMEN M. Seasonal changes in antioxidant activity, total phenolic and anthocyanin constituent of the stems of two *Morus* species (*Morus alba* L. and *Morus nigra* L.) **Plant Growth Regulation**, v. 44, p. 251–256, 2004.

TANG, Y. Z.; LIU, Z. Q. Chemical Kinetic Behavior of Chlorogenic Acid in Protecting Erythrocyte and DNA against Radical-Induced Oxidation. **Journal Agricultural Food Chemistry**. v. 56, n.22, p.11025-11029, 2008.

TAKEI, M.; YAMAGUCHI, Y.; FUKUDA, H.; YASUDA, M.; DEGUCHI, T. Cultivation of *Neisseria gonorrhoeae* in liquid media and determination of its in vitro susceptibilities to quinolones. **Journal Clinical Microbiology**., v. 43, n. 9, p. 4321–4327, 2005.

TAKEMURA, O. S.; BANNO, Y.; NOZAWA, Y. Inibition of N-formylmethionyl - leucyl - phenylalanine - stimulated tyrosine phosphorylation and phospholipase D activation by quercetin in rabbit neutrophils. **Biochemical Pharmacology**, v. 53, v.10, p. 1503-1510, 1997.

THOMAS, E.L.; GRISHAM, M.B; JEFFERSON, M.M. Preparation and characterization of chloramines. **Methods in Enzymology**, v.132, p.569-585, 1986.

TORRES, R.L.; TORRES, I.L.S.; GAMARO, G.D.; FONTELLA, F.U.; SILVEIRA, P.P.; MOREIRA, J.S.R.; LACERDA, M.; AMORETTI, J.R.; RECH, D.; DALMAZ, C.; BELLÓ, A.A. Lipid peroxidation and total radical-trapping potential of the lungs of rats submitted to chronic and sub-chronic stress. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p.185-192, 2004.

TOYAMA, D. D. E. O.; DIZ FILHO, E. B.; CAVADA, B. S.; DA ROCHA, B. A.; DE OLIVEIRA, S. C.; COTRIM, C. A.; SOARES, V. C.; DELATORRE, P. MARANGONI, S.; TOYAMA MH . Umbelliferone induces changes in the structure and pharmacological activities of Bn IV, a phospholipase A(2) isoform isolated from *Bothrops neuwiedii*. **Toxicology**. v. 57, n.6, p. 851-60, 2011.

TRABER, M.G. Cellular and molecular mechanisms of oxidants and antioxidants. *Mineral and Electrolyte Metabolism*, **Basel**, v.23, n.3/6, p.135-139, 1997.

TRABER, MG; PACKER, L. Vitamin E: beyond antioxidant function. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, n.6, p.1501S-1509S, 1995.

TSUDA, T.; WATANABE, M.; OHSHIMA, K.; NORINOBU, S.; CHOI, S.W.; KAWAKISHI, S.; OSAWA, T. Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O-b-D glucoside and cyanidin. **J. Agric. Food Chem.** v. 42, p. 2407-2410, 1994.

TURRENS, J. F. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. **Bioscience Reports**. v. 17 p. 3-8, 1997.

TURRENS, J. F.; ALEXANDRE, A.; LEHNINGER, A. L. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 237, n. 2, p. 408-414, 1985.

TURRENS, J. F.; BOVERIS, A. Generation of the superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. **Biochemistry Journal**, v.191, p. 421-427, 1980.

UGAZ, O. L. **Investigação Fitoquímica, métodos em el estudio de productos naturales**. 2 ed. Lima, Peru: Fonfo Editorial de La Pontificia Universidad, 1994.

VALENTÃO, P.; FERNANDES, E.; CARVALHO, F.; ANDRADE, P.B.; SEABRA, R.M.; BASTOS, M.L. Antioxidant activity of Hypericum androsaemum infusion: scavenging activity against superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. **Biological Pharmacie Bulletin**, v.25, p.1320-1323, 2002.

VALENTE, L. M. M.; ALVES, F. F.; BEZZERRA, G. M.; ALMEIDA, M. B. S.; ROSÁRIO, S. L.; MAZZEI, J. L.; AVILAR, L. A.; SIAN, A. C. Desenvolvimento e aplicação de metodologia por cromatografia em camada delgada para determinação do perfil de alcalóides oxindólicos pentacíclicos nas espécies sul- americanas do gênero Uncaria. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n. 2, p. 216-223, 2006.

VALENTE, A. M. M. P. **Análises de componentes fixos em produtos de *Coffeae arábica* e dos seus produtos de transformação**. São Carlos, Programa de Pós-graduação em Química, UFSCar, 2003. Dissertação de Mestrado, 189 p.

VAN DEN BERG, R.; HAENEN, G.R.M.M.; VAN DEN BERG, H.; BAST, A. Applicability of an improved trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. **Food Chemistry**, v. 66, p. 511-517, 1999.

VANUCCHI, H.; MOREIRA, E.A.M.; CUNHA, D.F.; JUNQUEIRA-FRANCO, M.V.M. BERNARDES, M.M.; JORDÃO-JR, A.A. **Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante**. Medicina, Ribeirão Preto, v. 31, p. 31-44, 1998.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; BENFATO, M. S. MANDREFFI, V.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio, antioxidante e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos pra sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n.5, p. 1323-1338, 2007.

VELLOSA, J.C.R. **Avaliação da capacidade antioxidante de extratos vegetais de plantas brasileiras e sua contribuição ao estudo de inibição da enzima mieloperoxidase.** Faculdade de Ciências Farmacêuticas -UNESP. Araraquara, 2005.

VELLOSA, J.C.R.; KHALIL, O.A.K.; KHALIL, N.M.; SANTOS, V.A.F.F.M.; SILVA, R.A.H.; FURLAN, M.; BRUNETTI, I.L.; OLIVEIRA, O.M.M.R. Maytenus ilicifolia as source of antioxidants and antiradicals agents and its action on neutrophils peroxidase (myeloperoxidase). **African Journal of Biochemistry Research**, v.2, n.12,p.232-239, 2008.

VENGLARIK, C.J.; CALLE, J.G.; WIGLEY, A.F.; MALLE, E.; WATANABE, N.; FORMAN, H.J. Hypochlorous acid alters bronchial epithelial cell membrane properties and prevention by extracellular glutathione. **Journal of Applied Physiology**, v.10, p.1152, 2003.

VICENTINO, A.R.R.; MENEZES, F.S. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.3. p.384-387, 2007.

VOLAK, J.; STODOLA, J. **Plantas Medicinais.** Ed. Inquérito, 1990. 319p.

WANASUNDARA U, AMAROWICZ R, SHAHIDI F. Isolation and identification of an antioxidative component in canola. **Journal Agricure Food Chemistry**, v. 42, n. 6, p. 1285-90, 1994.

WANG, S.; HUANG, K. Determination of Flavonoids by high-Performance Liquid Chromatography and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1032, p. 273-179, 2004.

WANG Y, MARDSEN PA. Nitric oxide synthases: Biochemical andmolecular regulation. **Current Opinion Nephrology Hypertension**, v.4, p. 12-22, 1995.

WANG, J.; ZHAO, H.; WU, F.; YANG, K. Separation and purification of total flavones from mulberry leaves. **Ion Exchange And Adsorption**. v. 24, n.2, p. 139-147, 2008.

WEIJL, N.I., CLETON, F.J., OSANTO, S. Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. **Cancer Treatment Reviews**, v.23, n.4, p.209-240, 1997.

WEISS, S.J. Tissue destruction by neutophils. **The New England journal of medicine**, v.320, p.365-376, 1989.

WILSON, A. P.; **Animal Cell Culture: A Practical Approach**; IRL Press: Oxford, cap. 8, p. 183, 1987.

WOISK, R. G. & SALATINO A. Analisis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal Apiculture Reserarch**. v. 37, p. 99-105,1998.

WOLF, S.P.; GARNER ,A.; DEAN, R.T. Free radicals, lipids and protein degradation. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 11, p.27-31, 1986.

WU, J.L.; LI, N.; HASEGAWA, T.; SAKAI, J.I.; KAKUTA, S.; TANG, W.; OKA, S.; KIUCHI, M.; OGURA, H.; KATAOKA, T.; TOMIDA, A.; TSURUO, T.; ANDO, M. Bioactive terahydrofuran lignans from *Peperomia dindygulensis*. **Journal Nature Products**, v.68, n.11, p.1656-1660, 2005.

YAMADA, C.S.B. Fitoterapia:sua história e importância. **Racine**, n.43, p.50-51, 1998.

YANG, H.L.; CHEN, S.C.; CHANG, N.W.; CHANG, J.M.; LEE, M.L.; TSAI, P.C.; FU, H.H.; KAO, W.W.; CHIANG, H.C.; WANG, H.H.; HSEU, Y.C. Protection from oxidative damage using *Bidens pilosa* extracts in normal human erythrocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v.44, p.1513-1521, 2006.

YEN, G. C.; CHEN, H. Y.; PENG, H. H. Antioxidant and pro-oxidant effects of various tea extract. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.45, p. 30-34, 1997.

YEN, G. C.; LAI, H. H.; CHOU, H. Y. Nitric oxide scavenging and antioxidant effects of *Uraria crinita* root. **Food Chemistry**, v. 74, p. 471-478, 2001.

YI, Z.; YU, Y.; LIANG, Y.; ZENG, B. In vitro antioxidant and antimicrobial activities of the extract of *Pericarpium Citri Reticulatae* of a new Citrus cultivar and its main flavonoids. **LWT - Food Science Technolgy**, v.41, n.4, p. 597-603, 2007.

YIGIT, N.; YIGIT, D.; OZGEN, U. AKTAS, A.E. Abnticandidal activity of black mulberry (*Morus nigra* L.). **Turk Mikrobiyoloji Cem Derg**, v.37 n.3, p. 169-73, 2007.

YIM, M.B.; CHOCK, P.B.; STADTMAN, E.R. Copper, zinc superoxide dismutase catalyzes hydroxyl radical production from hydrogen peroxide. **Proc Natl Acad Sci USA**, v87, n.13, p.5.006-5.010,1990.

YU, T.W.; ANDERSON, D. Reactive oxygen species-induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. **Mutation Research**, v.379, n.2, p.201-210, 1997.

YUNES, R. A; PEDROSA, R. C; CEVHINEL FILHO, V. Fármacos e Fititerápicos: A necessidade do desenvolvimento da industria de Fitoterápicos e Fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n.1, p. 147-152, 2001.

ZADERNOWSKI, R.; NACZK, M.; NESTEROWICZ, J. Phenolic Acid Profiles in Some Small Berries. **Journal Agricultural Food Chemistry**. v.53, p. 2118-2124, 2005.

ZAVODNIK, I.B. Hypochlorous acid-induced oxidative damage of human red blood cells: effects of tert-butyl hydroperoxide and nitrite on the HOCl reaction with erythrocytes. **Bioelectrochemistry**, v.58 , p.127– 135, 2002.

ZAMZAMI, N.; SUSIN, S. A.; MARCHETTI, P.; HIRSCH, T.; GOMEZ-MONTERREY, I.; CASTEDO, M.; KROEMER, G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. **Journal Experimental Medicine**, v. 183, p. 1533-1544, 1996.

ZGLICZYNSKI, T.J.M.; STELMASZYNSKA, T.; DOMANSKA, J.; OSTROWISKI, W. Chloramines as intermediates of oxidation reaction of amino acids by myeloperoxidase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 235, p. 419-424, 1971.

ZHANG, M.; CHEN, M.; ZHANG, H.; SUN, S.; XIA, B.; WU, H. In vivo hypoglycemic effects of phenolics from the root bark of *Morus alba*. **Fitoterapia**, v. 80, n.8, p. 475-477, 2009.

ZHANG Y.; JIAO J.; LIU C.; WU X.; ZHANG Y. Isolation and purification of four flavones C-glycosides from antioxidant of bamboo leaves by macroporous resin column chromatography and preparative high-performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 107, p. 1326-1336, 2008.

ZHANG, H.Y. Theoretical methods used in elucidating activity differences of phenolic antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.76, n. 6, p. 745-748, 1999.

ZHAO, W.; PAN, Y.; ZHANG, Z.; MIAO, X & HUANG, Y. Phylogeny of the genus *Morus*. **African Journal of Biotechnology**. v.4, n. 6, p. 563-569, 2005.

ZHENG, W.; WANG, S.Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.49, p.5165-5170, 2001.

ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A. Flavonoides. In: SIMÕES, et al., **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS; p.577 – 614, 2002.



ANEXOS

Anexo 1 Excicata de *Morus nigra* L.



Figura 108 – Excicata de *Morus nigra* L. (Arquivo pessoal).



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



Protocolo CEP/FCF/CAR nº 19/2009

Interessado: RICARDO ALEXANDRE HAKIME SILVA

Projeto: Estudo da Ação do Extrato Bruto de *Morus Nigra* L. e frações fenólicas sobre a ação antioxidante ou pro-oxidante em Hemácias humanas

Parecer nº 64/2009 – Comitê de Ética em Pesquisa

O projeto "Estudo da Ação do Extrato Bruto de *Morus Nigra* L. e frações fenólicas sobre a ação antioxidante ou pro-oxidante em Hemácias humanas", encontra-se adequado em conformidade com as orientações constantes da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS.

Por essa razão, o Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, considerou o referido projeto estruturado dentro de padrões éticos manifestando-se FAVORAVELMENTE à sua execução.

O relatório final do projeto de pesquisa deverá ser entregue em Janeiro de 2013, no qual deverá constar o Termo de Consentimento Livre Esclarecido dos sujeitos da pesquisa.

Araraquara, 20 de dezembro de 2009.


Profª. Drª. AURÉLUCE DEMONTE
Coordenadora do CEP