

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

YVANNA CARLA DE SOUZA SALGADO

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E
CITOTÓXICA DE *PSYCHOTRIA NUDA* (CHAM. & SCHLTDL.) WAWRA**

**PONTA GROSSA
2013**

YVANNA CARLA DE SOUZA SALGADO

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E
CITOTÓXICA DE *PSYCHOTRIA NUDA* (CHAM. & SCHLTDL.) WAWRA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, do curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de Concentração fármacos, medicamentos e biociências aplicadas à Farmácia da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação ampla com a Universidade Estadual do Centro-Oeste.

Orientador: Prof. Dr. Michel Otuki

Co-orientador: Prof. Dr. Sinvaldo Baglie

**PONTA GROSSA
2013**

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

S164 Salgado, Yvanna Carla de Souza
 Avaliação das atividades antioxidante,
 antimicrobiana e citotóxica de Psychotria
 Nuda (Cham. & Schltdl.) Wawra/ Yvanna
 Carla de Souza Salgado. Ponta Grossa,
 2013.
 86f.

 Dissertação (Mestrado em Ciências
 Farmacêuticas - Área de Concentração:
 Fármacos, Medicamentos e Biociências
 Aplicadas à Farmácia), Universidade
 Estadual de Ponta Grossa e Universidade
 Orientador: Prof. Dr. Michel Otuki.
 Co-Orientador: Prof. Dr. Sinvaldo
 Baglie.

 1.Psychotria nuda. 2.Antioxidante.
 3.Antimicrobiano. 4.Citotoxicidade.
 I.Otuki, Michel. II. Baglie, Sinvaldo.
 III. Universidade Estadual de Ponta
 Grossa. Universidade Estadual do
 Centro-Oeste. Mestrado em Ciências
 Farmacêuticas. IV. T.

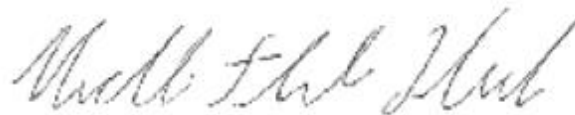
CDD: 615.321

YVANNA CARLA DE SOUZA SALGADO

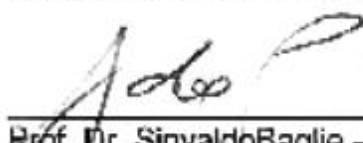
**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E
CITOTÓXICA DE *DEPSYCHOTRIA NUDA* (CHAM. & SCHLTDL.) WAWRA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa do curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de Concentração fármacos, medicamentos e biociências aplicadas à Farmácia.

Ponta Grossa, 26 de fevereiro de 2013



Prof. Dr. Michel Fleith Otuki - Orientador
Doutor em Farmacologia
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Prof. Dr. Sinvaldo Baglie - Co-orientador
Doutor em Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Prof.^a Dr.^a Lia Sumie Nakao
Doutora em Ciências Biológicas - Bioquímica
Universidade Federal do Paraná



Prof. Dr. Giovanni Marino Favero
Doutor em Alergia e Imunologia
Universidade Estadual de Ponta Grossa

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que direta ou indiretamente me apoiaram, incentivaram e contribuíram para a conclusão do mesmo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, minha fonte de fé, esperança e proteção.

À minha mãe Isabel pela minha vida, pelo exemplo de luta e força, pelo amor dedicado, educação, apoio, incentivo e carinho.

Ao meu avô Dante, pelo exemplo de vida e caráter e à minha avó Anna pela dedicação e carinho; e pelo amor a mim dedicado de ambos.

Aos Professores: Dr. Michel Fleith Otuki e Dr. Sinvaldo Baglie, pela credibilidade e contribuição com seus conhecimentos e sugestões na orientação desta dissertação.

Ao Professor Dr. José Carlos Rebuglio Velloso, pela credibilidade e por ter colaborado diretamente com este trabalho tornando a concretização do mesmo possível.

Aos professores Dr. Luís Antônio Esmerino e Dr. Flávio Luis Beltrame pelo apoio e incentivo.

Aos colegas: Francine Alessandra Manente, Stefanie Nolte Dykstra, Priscila Pawloski e Camila Guimarães Moreira, pela colaboração direta, apoio e incentivo.

Ao Professor Valmir de Santi, sua esposa Helena de Santi, sua filha Tatiana de Santi e família por todo apoio, carinho e incentivo de sempre.

Aos amigos: Camila, Marcela, Tati, Nathaly, Ricardo, Leo, Josiane e Thais, que estiveram presentes em todos os momentos dessa caminhada, tornando os meus dias mais leves com apoio, carinho e compreensão em minhas ausências.

Aos professores da banca que dedicaram seu tempo e aceitaram contribuir com seus conhecimentos para tornar este trabalho melhor.

Aos colegas do mestrado e colegas de trabalho pelo apoio e incentivo.

As funcionários da UEPG pelo carinho e contribuição.

A agência financiadora CAPES pela bolsa concedida.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desta pesquisa.

*“Não importa quanto a vida possa ser ruim,
sempre existe algo que você pode fazer, e
triunfar.”*

(Stephen Hawking)

RESUMO

O estudo de plantas medicinais tem levado a descoberta de substâncias farmacologicamente ativas. A espécie *Psychotria nuda* (Cham. e Schltdl.) Wawra é uma planta arbustiva que se encontra distribuída na Floresta Atlântica na costa leste do Brasil e não possui estudos fitoquímicos aprofundados e nem descrição completa de suas atividades biológicas até o momento. O presente trabalho buscou avaliar a atividade antimicrobiana, antioxidante e citotóxica da espécie. O extrato hidroalcoólico não demonstrou atividade antimicrobiana frente às cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. Entretanto, nos ensaios antioxidantes, o extrato apresentou ação sequestradora do radical catiônico ABTS^{•+} (IC₅₀: 33,48 ± 1,99 µg/mL), e foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica induzida pelo radical AAPH em eritrócitos (IC₅₀: 31,59 ± 4,14 µg/mL para 3 horas de incubação) sem exercer atividade citotóxica nestas células. Demonstrou uma atividade moderada sobre o ácido hipocloroso (IC₅₀: 359,24 ± 4,57 µg/mL) e reduzida para os modelos de captação do radical DDPH[•] (IC₁₀: 118,76 ± 28,83 µg/mL), ânion superóxido (IC₁₅: 196,92 ± 0,270 µg/mL), e no modelo enzimático de oxidação induzida pelo HRP (IC₂₀: 104,15 ± 18,15 µg/mL). Observamos uma elevada citotoxicidade no modelo de viabilidade celular pelo MTT frente à linhagem epitelial HaCaT (CL₅₀: 7,72 ± 1,22 µg/mL) e moderada citotoxicidade para a linhagem de fibroblastos embrionários de camundongo NIH3T3 (CL₅₀: 61,65 ± 5,12 µg/mL). No ensaio de citotoxicidade de incorporação do corante vermelho neutro para ambas linhagens, observamos uma elevada citotoxicidade (CL₅₀: 6,07 ± 0,79 µg/mL) frente à linhagem HaCaT; porém nenhum efeito do extrato sobre a linhagem NIH3T3 nas concentrações testadas. O extrato demonstrou uma potencial atividade antioxidante e citotóxica, e a avaliação do extrato bruto permite a condução de pesquisas para identificação de moléculas biologicamente ativas.

Palavras-chave: *Psychotria nuda*, antioxidante, antimicrobiano, citotoxicidade.

ABSTRACT

The medicinal plants study has led to the discovery of pharmacologically active substances. The species *Psychotria nuda* (Cham. and Schltdl.) Wawra is a shrubby plant distributed in the Atlantic Forest at the east coast of Brazil and haven't phytochemical studies and no description of their biological activities until the present moment. This study evaluated the antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activity. The hydroalcoholic extract showed no antimicrobial activity against strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. However, in antioxidants tests, the extract showed antioxidant action scavenger of cationic radical ABTS^{•+} (IC₅₀: 33,48 ± 1,99 µg/mL), and was able to reduce lipid peroxidation induced by AAPH radical on erythrocytes (IC₅₀: 31,59 ± 4,14 µg/mL for 3 hours incubation) without cytotoxic effect in these cells. It showed a moderate antioxidant activity of hypochlorous acid (IC₅₀: 359,24 ± 4,57 µg/mL) and reduced activity to scavenger DDPH[•] radical (IC₁₀: 118,76 ± 28,83 µg/mL), superoxide anion (IC₁₅: 196,92 ± 0,270 µg/mL), and the enzymatic oxidation induced by HRP (IC₂₀: 104,15 ± 18,15 µg/mL). We observed high cytotoxicity assessment models of cell viability by MTT in epithelial HaCaT cells (CL₅₀: 7,72 ± 1,22 µg/mL) and a moderate citotoxicity for the strain of mouse embryonic fibroblast NIH3T3 (CL₅₀: 61,65 ± 5,12 µg/mL). In assay of neutral red dye incorporation in both lineage cells, we observed a high cytotoxicity in HaCaT cells (CL₅₀: 6,07 ± 0,79 µg/mL), but no effect of the extract over NIH3T3 cells at the used concentrations. The extract showed potential antioxidant and cytotoxic activity, and evaluation of crude extract allow us to conducting further research to identify the biologically active molecules

Keywords: *Psychotria nuda*, antioxidant, antimicrobial, cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição geográfica de <i>Psychotria nuda</i> (Cham. & Schltdl.) Wawra	21
Figura 2 - <i>Psychotria nuda</i> (Cham. & Schltdl) Wawra	22
Figura 3 - Frutos de <i>Psychotria nuda</i> (Cham. & Schltdl.) Wawra	22
Figura 4 - Formação de radicais livres na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial	24
Figura 5 - Fagocitose e destruição intracelular dos micro-organismos.....	25
Figura 6 - Formação do ânion superóxido	26
Figura 7 - Formação do peróxido de hidrogênio	26
Figura 8 - Redução do ferro e Harber Weiss	27
Figura 9 - Reação de Fenton.....	27
Figura 10 - Geração de radical hidroxila sem agente redox	28
Figura 11 - Formação do ácido hipocloroso	28
Figura 12 - Geração do ácido hipocloroso no interior do fagossoma, catalisada pela enzima MPO.....	29
Figura 13 Reações de peroxinitritos	30
Figura 14 Estrutura química do Trolox®	33
Figura 15 Estrutura química do DPPH	34
Figura 16 Reação do ânion superóxido com o NBT e formação do cromóforo Formazana	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Média e desvio padrão dos pontos utilizados para elaboração do Gráfico 1	50
Tabela 2	Média e desvio padrão dos pontos utilizados para elaboração do Gráfico 2	51
Tabela 3	Média e desvio padrão dos pontos utilizados para elaboração do Gráfico 3	53
Tabela 4	Média e desvio padrão dos Pontos utilizados para elaboração do Gráfico 4	54
Tabela 5	Média e desvio padrão dos pontos utilizados para elaboração do Gráfico 5	55
Tabela 6	Média e desvio padrão dos pontos utilizados para elaboração do Gráfico 6	56
Tabela 7	Média e desvio padrão dos pontos utilizados para elaboração do Gráfico 7	57
Tabela 8	Média e desvio padrão dos pontos utilizados para elaboração do Gráfico 8	58
Tabela 9	Média e desvio padrão dos pontos utilizados para elaboração do Gráfico 9	58
Tabela 10	Média e desvio padrão dos pontos utilizados para elaboração do Gráfico 10	59
Tabela 11	Média e desvio padrão dos pontos utilizados para elaboração do Gráfico 11	60
Tabela 12	Média e desvio padrão dos pontos utilizados para elaboração do Gráfico 12	61
Tabela 13	Média e desvio padrão dos pontos utilizados para elaboração do Gráfico 13	61
Tabela 14	Média e desvio padrão dos pontos utilizados para elaboração do Gráfico 14	62
Tabela 15	Média e desvio padrão dos pontos utilizados para elaboração do Gráfico 15	63
Tabela 16	Avaliação da concentração inibitória mínima utilizando o revelador cloreto de Trifeniltetrazólio (CTT) em <i>Escherichia coli</i>	64

Tabela 17	Avaliação da concentração inibitória mínima utilizando o revelador cloreto de Trifeniltetrazólio (CTT) em <i>Staphylococcus aureus</i>	65
Tabela 18	Avaliação da concentração inibitória mínima utilizando o revelador cloreto de Trifeniltetrazólio (CTT) em <i>Candida albicans</i>	66
Tabela 19	Determinação da concentração bactericida mínima em placa contendo meio Muller-Hinton	67
Tabela 20	Determinação da concentração bactericida mínima em placa de Agar sangue	67

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** Ação sequestradora de radical ABTS^{•+} (55μM); tampão fosfato de sódio 10 mM (pH 7.4); incubação de 30 minutos (ausência de luz); λ=734 nm 49
- Gráfico 2** Ação sequestradora do radical DPPH 60μM em etanol absoluto; incubação de 15 minutos (ausência de luz); λ=531nm..... 50
- Gráfico 3** Ação Sequestradora de HOCl (30μM) em meio tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7.4), TMB 2,9 mM. Incubação de 10 min; λ=655 nm .. 52
- Gráfico 4** Ação sequestradora de O₂^{•-} em meio tampão pirofosfato de sódio 25 mM (pH 8.3), NBT 60μM, PMS 372μM, NADH 1560μM. Incubação de 10 minutos do sistema gerador de superóxido com as amostras (ausência de luz), λ= 560 nm..... 53
- Gráfico 5** Inibição da oxidação do Guaiacol 2 mM pela enzima HRP 7nM em meio tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7.4), 37°C, H₂O₂ 0,1mM; 1 minuto de reação; λ= 470 nm..... 55
- Gráfico 6** Ação das amostras: suspensão de eritrócitos 5%; 1 hora de incubação a 37°C, tampão fosfato de sódio 10 mM / NaCl 150 mM, pH 7.4; λ= 414 nm 56
- Gráfico 7** Ação das amostras: suspensão de eritrócitos 5%; 2 horas de incubação a 37°C, tampão fosfato de sódio 10 mM / NaCl 150 mM, pH 7.4; λ= 414 nm 57
- Gráfico 8** Ação das amostras: suspensão de eritrócitos 5%; 3 horas de incubação a 37°C, tampão fosfato de sódio 10 mM / NaCl 150 mM, pH 7.4; λ= 414 nm 57
- Gráfico 9** Ação das amostras: suspensão de eritrócitos 5%; 4 horas de incubação a 37°C, tampão fosfato de sódio 10 mM / NaCl 150 mM, pH 7.4; λ= 414 nm 58
- Gráfico 10** Ação das amostras: suspensão de eritrócitos 5%; 5 horas de incubação a 37°C, tampão fosfato de sódio 10 mM / NaCl 150 mM, pH 7.4; λ= 414 nm 59
- Gráfico 11** Ação das amostras: sobre a hemólise promovida pelo radical AAPH 25 mM, suspensão de eritrócitos 5%; 1 hora de incubação a 37°C, tampão fosfato de sódio 10 mM / NaCl 150 mM, pH 7.4; λ= 414 nm. 60

Gráfico 12 Ação das amostras: sobre a hemólise promovida pelo radical AAPH 25 mM, suspensão de eritrócitos 5%; 2 horas de incubação a 37°C, tampão fosfato de sódio 10 mM / NaCl 150 mM, pH 7.4; $\lambda = 414$ nm.	60
Gráfico 13 Ação das amostras: sobre a hemólise promovida pelo radical AAPH 25 mM, suspensão de eritrócitos 5%; 3 horas de incubação a 37°C, tampão fosfato de sódio 10 mM / NaCl 150 mM, pH 7.4; $\lambda = 414$ nm	61
Gráfico 14 Ação das amostras: sobre a hemólise promovida pelo radical AAPH 25 mM, suspensão de eritrócitos 5%; 4 horas de incubação a 37°C, tampão fosfato de sódio 10 mM / NaCl 150 mM, pH 7.4; $\lambda = 414$ nm	62
Gráfico 15 Ação das amostras: sobre a hemólise promovida pelo radical AAPH 25 mM, suspensão de eritrócitos 5%; 5 horas de incubação a 37°C, tampão fosfato de sódio 10 mM / NaCl 150 mM, pH 7.4; $\lambda = 414$ nm	63
Gráfico 16 Avaliação do crescimento da cepa de <i>Escherichia coli</i> pela leitura da turbidez	64
Gráfico 17 Avaliação do crescimento da cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> pela leitura da turbidez.....	65
Gráfico 18 Avaliação do crescimento da cepa de <i>Candida albicans</i> pela leitura da turbidez	66
Gráfico 19 Avaliação da viabilidade celular da linhagem HaCaT pelo ensaio MTT	68
Gráfico 20 Avaliação da viabilidade celular da linhagem NIH3T3 pelo ensaio MTT	68
Gráfico 21 Avaliação da viabilidade celular da linhagem HaCaT pelo método de Incorporação do Vermelho Neutro	69
Gráfico 22 Avaliação da viabilidade celular da linhagem NIH3T3 pelo método de Incorporação do Vermelho Neutro	70

LISTA DE ABREVIATURAS

AAPH	2'-azo-bis (2-aminopropane) dihydrochloride
ABTS ^{•+}	2,29-azinobis-(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)
CBM	Concentração bactericida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CTT	Cloreto de trifeniltetrazólio
CuZnSOD	Superóxido dismutase contendo cobre e zinco
DMEM	Meio Dulbecco MEN
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH [•]	1,1-difenil-2-picrilhidrazila
ECSOD	Superóxido dismutase extracelular
ERN's	Espécies reativas de nitrogênio
ERO's	Espécies reativas de oxigênio
FBS	Soro fetal bovino
FRAP	<i>Ferric reducing ability of plasma</i>
GPX	Glutathione peroxidase
HO ₂ [•]	Radical hidroperoxil
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
iNOS	Isoforma induzível da enzima óxido nítrico sintetase
MMPs	Metaloproteinases de matriz
MnSOD	Superóxido dismutase contendo manganês
MPO	Mieloperoxidase
MTT	3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio brometo
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NBT	<i>Nitroblue tetrazolium</i>
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetase
Nox	NADPH oxidase
NR	Método de incorporação de Vermelho Neutro
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
ONOO ⁻	Peroxinitritos
ORAC	<i>Oxygen radical absorbance capacity</i>
PMN	Polimorfonucleares
PMS	Metassulfato de fenazina
ROO [•]	Radicais peroxila
SOD	Superóxido-dismutase
TAC	<i>Total antioxidant capacity</i>
TEAC	<i>Trolox equivalent antioxidant capacity</i>
TMB	Tetrametilbenzidina
Trolox®	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO LITERÁRIA	18
2.1 FAMÍLIA RUBIACEAE	18
2.2 <i>PSYCHOTRIA NUDA</i> (CHAM. & SCHLTDL.) WAWRA	22
2.3 ESPÉCIES REATIVAS	23
2.4 SISTEMAS DE DEFESA ANTIOXIDANTE	31
2.5 MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	32
2.6 ANTIMICROBIANOS	36
2.7 MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA	37
3 OBJETIVOS	40
3.1 OBJETIVOS GERAIS	40
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 REAGENTES	41
4.2 EQUIPAMENTOS	41
4.3 EXTRATO	41
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE CAPTURA DO RADICAL ABTS ^{•+}	42
4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE CAPTURA DO RADICAL DPPH [•]	42
4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE CAPTURA DO ÁCIDO HIPOCLOROSO	43
4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE CAPTURA DO ÂNION SUPERÓXIDO	43
4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO ENZIMÁTICO HRP	43
4.9 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO SOBRE ERITRÓCITOS	44
4.10 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIOXIDANTE DO EXTRATO SOBRE A HEMÓLISE PROVOCADA PELO RADICAL AAPH EM ERITRÓCITOS	44

4.11 OBTENÇÃO DAS CEPAS BACTERIANAS.....	45
4.12 PREPARO DO INÓCULO	45
4.13 AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA DO EXTRATO PELO MÉTODO DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA POR MICRODILUIÇÃO E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA	45
4.14 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS.....	46
4.15 CULTURA DE CÉLULAS	46
4.16 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO MTT	47
4.17 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO VN.....	47
4.18 ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	 49
5.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	49
5.1.1 Interações diretas com as espécies reativas	49
5.1.2 Interação com o modelo enzimático HRP	54
5.1.3 Interação com células	56
5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	64
5.2.1 Avaliação da concentração inibitória mínima.....	64
5.2.2 Avaliação da concentração bactericida mínima.....	66
5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA	67
5.3.1 Ensaio MTT em linhagem celular HaCaT.....	67
5.3.2 Ensaio MTT em linhagem celular NIH3T3.....	68
5.3.3 Ensaio VN em linhagem celular HaCaT	69
5.3.4 Ensaio VN em linhagem celular NIH3T3	70
 6 CONCLUSÃO	 71
 REFERÊNCIAS.....	 72

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais no tratamento e cura de doenças é muito antigo, sendo que até o século 16, o seu uso foi a maior fonte de tratamento e profilaxia contra diversas doenças. Para que os efeitos farmacológicos dessa utilização sejam comprovados é necessário realizar uma exploração científica interdisciplinar de agentes biologicamente ativos presentes nas plantas tradicionalmente empregadas por determinado agrupamento humano. Entre 1981 e 2006, aproximadamente 52% das pequenas moléculas descobertas ou em fase de desenvolvimento foram derivadas de produtos naturais (KELLY, 2009; MACIEL et al., 2002; MORAES, 2011)

Os compostos químicos presentes nas plantas se originam dos processos vitais de biossíntese, que são responsáveis pela formação, acúmulo e degradação de inúmeras substâncias orgânicas nas plantas. Esses processos envolvem o metabolismo primário, que fornece moléculas envolvidas nas funções básicas essenciais da vida celular; e, o metabolismo secundário, responsável pela produção de substâncias que participam das interações intra e intercelular do próprio organismo. Substâncias provenientes do metabolismo secundário das plantas são responsáveis pelo mecanismo de defesa da planta contra micro-organismos, vírus, insetos e outros patógenos ou predadores e pelo crescimento e desenvolvimento da mesma. Nas últimas décadas houve um grande avanço científico no estudo dos vegetais, objetivando a extração e elucidação estrutural destas moléculas (FERREIRA; AQUILA, 2000; FILHO, 2010; SILVA, MIRANDA, CONCEIÇÃO, 2010).

Em virtude disso, foram realizadas diversas pesquisas com a finalidade de procurar novas substâncias farmacologicamente ativas em plantas. Isto tem levado à descoberta de diversos fármacos clinicamente úteis para o tratamento de várias patologias (LIMA et al., 2006; SILVA et al., 2009).

Neste trabalho utilizamos a espécie *Psychotria nuda* (Cham. e Schltdl.) Wawra que é uma planta nativa e encontra-se amplamente distribuída na Floresta Atlântica na costa leste do Brasil. No gênero *Psychotria* L., os alcaloides são os principais metabólitos secundários encontrados, e várias atividades biológicas descritas entre essas espécies foram atribuídas à esses metabólitos. (MIGUEL; MORAES; CUNHA, 2009; TAILOR, 2010).

Como esta espécie não possui estudos fitoquímicos aprofundados e nem descrição completa de suas atividades biológicas até o presente momento; o presente trabalho buscou avaliar a atividade antioxidante, antimicrobiana e citotóxica da mesma.

2 REVISÃO LITERÁRIA

2.1 FAMÍLIA RUBIACEAE

A família Rubiaceae é um dos mais importantes componentes das florestas neotropicais, estando entre as cinco famílias de maior riqueza de espécies na Floresta Atlântica (FONSECA; ALMEIDA; ALVES, 2008). Abrange cerca de 650 gêneros e 12.000 espécies distribuídas principalmente das regiões tropicais e subtropicais do mundo. No Brasil, está representada por 101 gêneros e 1010 espécies, distribuídas por diversas áreas, principalmente na Floresta Atlântica (DELPRETE, 1999; BARROSO 1991; apud PEREIRA, 2007).

Várias atividades biológicas foram atribuídas às espécies pertencentes à família Rubiaceae, tais como antimicrobiana, antimalárica, hepatoprotetora, antioxidante, entre outras (CHOUDHURY, CHOUDHURY, BARUAH, 2012). Segundo uma revisão elaborada por Choudhury, Choudhury, Baruah (2012), diversas espécies da família Rubiaceae apresentam atividade antimicrobiana frente a diferentes cepas bacterianas, incluindo o extrato metanólico da casca de *Psychotria gardneri* (Thwaites) Hook. F., o extrato metanólico da casca de *Psychotria nigra* (Gaertn.) Alston, o extrato éter das partes aéreas de *Psychotria reevesii* Wall. ex Roxb. e o extrato diclorometano da casca de *Psychotria stenophylla* (Thwaites) Hook. f..

O gênero *Psychotria* L. é o maior da família Rubiaceae, com cerca de 2000 espécies de distribuição tropical. A Farmacopeia Europeia descreve que as preparações de *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes atuam como medicação emética e expectorante. Já a infusão em água fria de folhas maceradas de *Psychotria uliginosa* Sw. MED. é utilizada pela medicina popular para tratar problemas digestivos e condições febris (ACHENBACH et al., 1995; ALMEIDA; ALVES, 2000; JOLI et al., 1987).

As atividades biológicas deste gênero geralmente estão relacionadas à composição química alcaloidica. Os alcaloides desempenham um papel importante nas interações de plantas com outros organismos, tais como herbívoros, micróbios, insetos, plantas e outros (FACCHINI, 2001; PARANHOS et al., 2009; VEROTTA et al., 1999)

Segundo Silva & Aragão (2009), os alcaloides podem ser extraídos em solvente etanol:água; esta extração apresentou uma maior eficiência extrativa em comparação à decocção em meio ácido recomendado pela Farmacopéia Brasileira (1988); uma vez que o etanol foi capaz de baixar a constante dielétrica da água, melhorando em princípio a solubilidade das substâncias semi-polares como é o caso dos alcaloides.

Moraes et al. (2011) demonstraram que o extrato etanólico de várias plantas deste gênero foram capazes de inibir o crescimento do *Mycobacterium bovis* BCG em diferentes concentrações, sendo que, a *Psychotria pubigera* Schltdl., *Psychotria ruellifolia* (Cham. & Schltdl.) Müll. Arg. e *Psychotria stachyoides* Benth. apresentaram uma inibição do crescimento superior à 50% na concentração de 4 µg/mL.

Na região amazônica a população nativa utiliza um preparado de plantas como analgésico tradicional, entre essas plantas está *Psychotria colorata* (Willd. ex Roem. & Schult.) Müll. Arg., que parece ser o constituinte principal por possuir alcaloides com atividades analgésicas (VEROTTA et al., 1999). Kato et al. (2012) demonstraram que alcaloides isolados de *Psychotria prunifolia* (Kunth) Steyerm. apresentaram atividade contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi*.

Vários pesquisadores, em busca de substâncias farmacologicamente ativas, isolaram alcaloides de plantas do gênero *Psychotria* (SOLIS et al., 1997). Alcaloides indólicos foram identificados em duas espécies do gênero *Psychotria* L. e alcaloides 5,6-diidro-β-carbolínicos foram identificados em nove espécies do mesmo por Moraes, et al. (2011).

Alcaloides, cerebrósidos e alguns isoprenoides, por exemplo, foram isolados a partir dos extratos das folhas e/ou raízes de *Psychotria correae* (Dwyer & M.V. Hayden) C.M. Taylor. (ACHENBACH et al., 1995; BARREIRO; 1990). Takaiama et al. (2004) isolaram dois alcaloides novos a partir do extrato de folhas de *Psychotria rostrata* Blume. Três alcaloides quinolidínicos foram isolados das partes aéreas de *Psychotria glomerulata* (Donn. Sm.) Steyerm. do Panamá (SOLIS et al., 1997).

Ning Li et al., 2011 isolaram um alcaloide novo de *Psychotria pilifera* Hutch. As espécies *Psychotria lyciiflora* (Baill) Schlecht. e *Psychotria oleoides* (Baill) Schlecht são duas plantas do gênero Rubiaceae que possuem os mesmos tipos

de alcaloides pirrolidínicos (JANNIC et al., 1999). Beyer; Drummer e Maurer, 2009 evidenciaram o alcaloide *N,N-Dimethyltryptamine* em *Psychotria viridis* Ruiz & Pav. (BEYER; DRUMMER; MAURER, 2009). Nove produtos foram isolados a partir do material vegetal das espécies *Psychotria colorata* (Willd. ex Roem. & Schult.) Müll. Arg. e *Psychotria muscosa* (Jacq.) Steyerm. (VEROTTA et al., 1999).

Paranhos et al. (2009), relataram atividade antioxidante para captação de oxigênio singlete, superóxido e peróxido em um alcaloide indólico denominado Psicolatina derivado de *Psychotria umbellata* Vell.

Em geral, produtos naturais de diferentes origens como componentes fenólicos: flavonoides, ácidos fenólicos e diterpenos fenólicos, carotenoides, entre outros têm demonstrado atividade antioxidante (PIETA; SIMONETTI; MAURI, 1998; REGASINI, 2008).

A boldina, por exemplo, um alcaloide isolado de *Peumus boldus* Mol (Monimiaceae) possui dois grupamentos fenólicos altamente reativos que conferem a esta moléculas a capacidade se sequestrar radicais hidroxilas e inibir a peroxidação lipídica (KONRATH, 2006).

Como já citado acima as espécies de *Psychotria* L. encontradas no sul do Brasil produzem alcaloides do tipo monoterpreno indólicos, alguns deles oriundos de novas rotas biossintéticas e com atividades biológicas de interesse farmacológico; a Psicolatina se enquadra nessa classe e apresenta-se como um eficiente agente redutor de peróxidos e sequestrador de oxigênio *singlet* “*in vitro*” (FRAGOSO, 2007).

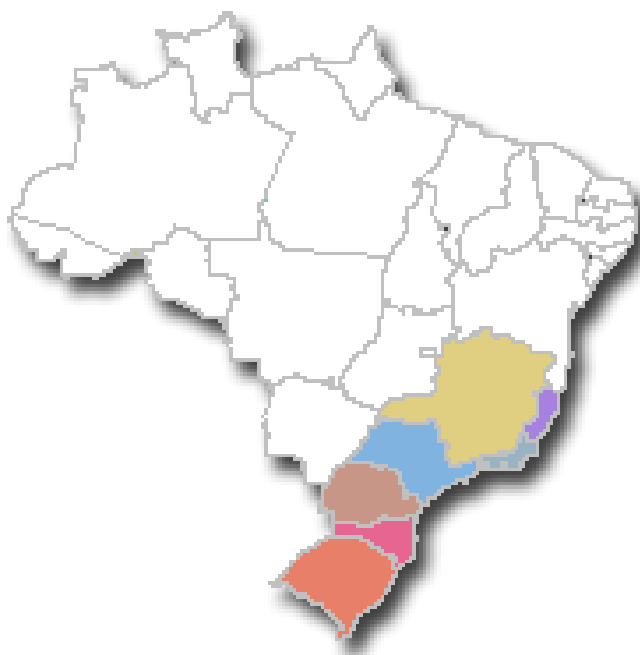
Konrath (2006) evidenciou que o alcaloide Psicolatina demonstrou ser um sequestrador de radicais peroxila mais potente que o padrão Trolox[®], e que os alcaloides indólicos monoterpênicos: coronaridina, venalstonina, andrangina, vincadiformina e voacristina também exibiram potentes atividades antioxidantes e anticolinesterásica em ensaios autobiográficos “*in vitro*”.

Em nosso trabalho utilizamos a *Psychotria nuda* (Chan. & Schldl.) Wawra, uma planta da família Rubiaceae e do gênero *Psychotria* L., que possui potencial em conter possíveis moléculas protetoras, quando levado em conta a composição química característica do gênero *Psychotria* L.

2.2 *PSYCHOTRIA NUDA* (CHAM. & SCHLTDL.) WAWRA

A espécie *Psychotria nuda* (Cham. e Schltldl.) Wawra é uma planta nativa, arbustiva, angiosperma, dicotiledônea que encontra-se distribuída na Floresta Atlântica na costa leste do Brasil na região sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro), e na região sul (Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul) (Figura 1) (MIGUEL; MORAES; CUNHA, 2009; TAILOR, 2010).

Figura 1 – Distribuição geográfica de *Psychotria nuda* (Cham. & Schltldl.) Wawra



Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br>

Constitui-se por um arbusto de 1,5 a 4 metros de altura, cujos ramos possuem folhas opostas, as flores são amarelas com cálices avermelhados e os frutos possuem coloração violeta/azulada. Floresce de fevereiro a junho e frutifica no outono e inverno. O nome *nuda* vem do latim e significa ausência de pelos na corola (Figuras 2 e 3) (ALMEIDA; ALVES, 2000; NERY, 2010).

A espécie é conhecida popularmente pelos nomes grandíuva-d'anta, araçá-de-macaco, flor-de-cera, sonhos de ouro, e casca d' anta. Moraes et al. (2011), identificaram a presença de alcaloides indólicos nesta espécie, bem como identificaram atividade contra o *Micobacterium bovis* (BCG), capacidade de inibição na produção de NO por macrófagos e citotoxicidade reduzida na avaliação da enzima lactato desidrogenase liberada por estas células.

Figura 2 - *Psychotria nuda* (Cham. & Schltdl.) Wawra



Disponível em: www.ufrgs.br

Figura 3 – Frutos de *Psychotria nuda* (Cham. & Schltdl.) Wawra



Disponível em:

<https://sites.google.com/site/biodiversidadecatarinense/plantae/magnoliophyta/rubiaceae/psychotria-nuda>

Levando-se em conta a composição química característica deste gênero e espécie, bem como os resultados obtidos pelo estudo de Moraes et al. (2011), a pesquisa da mesma pode ser útil na descoberta de novas substâncias antioxidantes e antimicrobianas de interesse farmacológico.

Os antioxidantes são moléculas que apresentam a característica de evitar as modificações oxidativas em proteínas e lipídeos causadas por espécies reativas, que podem ser deletérias às células; já os antimicrobianos são compostos que tem como função principal um efeito anti-infeccioso. (NETO; NICODEMO; LOPES, 2007; HALLIWELL, 1997 apud CERQUEIRA; GENNARI; AUGUSTO, 2007).

2.3 ESPÉCIES REATIVAS

As espécies reativas são átomos, íons ou moléculas que podem conter ou não, um elétron não pareado e são caracterizados, em geral, por grande instabilidade e elevada reatividade; comportando-se como receptores (oxidantes) ou doadores (redutores) de elétrons (REIS et al., 2008).

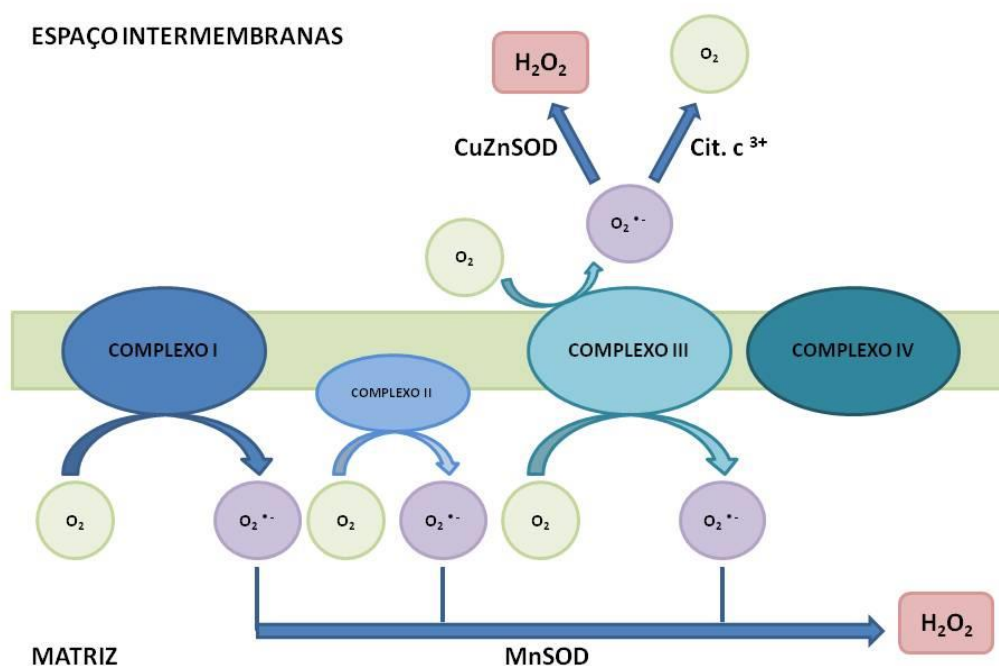
O nosso organismo produz espécies reativas de oxigênio (ERO's), de nitrogênio (ERN's), entre outras espécies reativas como parte integrante do metabolismo humano e estas estão envolvidas em diversas condições fisiológicas (VASCONCELOS et al., 2007; VELLOSA et al., 2008).

Os organismos aeróbios utilizam o oxigênio (O_2) como aceptor terminal do transporte mitocondrial de elétrons. O O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água pela enzima catalisadora citocromo oxidase na porção terminal da cadeia transportadora de elétrons. A ação da citocromo oxidase controla a geração de radicais livres, impedindo sua geração excessiva na mitocôndria. No entanto, cerca de 2% a 5% do oxigênio metabolizado nas mitocôndrias são desviados para outra via metabólica, e reduzidos de forma univalente, dando origem aos radicais livres: ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$); peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH^{\cdot}$) (Figura 4) (BARBOSA et al., 2010; RUBIN et al., 2006; FUKAI; FUKAI, 2011; GUZIK; HARRISON, 2006)

O próprio oxigênio (O_2) no estado fundamental é um radical, uma vez que contém dois elétrons desemparelhados no último orbital molecular, porém, não reage com a maioria dos componentes celulares pelo fato da reação com compostos que não possuam elétrons desemparelhados ser lenta (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990; CERQUEIRA; GENNARI; AUGUSTO, 2007).

As principais fontes endógenas geradoras de espécies reativas de oxigênio incluem os componentes da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, a conversão da xantina desidrogenase à xantina oxidase que produz ânion superóxido, as monooxigenases do citocromo P450, a lipoxigenase, a óxido nítrico sintetase (NOS), e o NADPH oxidase (FUKAI; FUKAI, 2011; GUZIK; HARRISON, 2006; QUINLAN; SPIVACK; MOSSMAN, 1994).

Figura 4 – Formação de radicais livres na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial



Fonte: Adaptado pela autora de CERQUEIRA; GENNARI; AUGUSTO (2007).

As espécies reativas de oxigênio também podem ser geradas por grupos de agentes físicos e químicos exógenos, como o ozônio, hiperoxia, óxidos de nitrogênio e enxofre, minerais, herbicidas, radiação ultravioleta, toxinas e fumo (QUINLAN; SPIVACK; MOSSMAN, 1994).

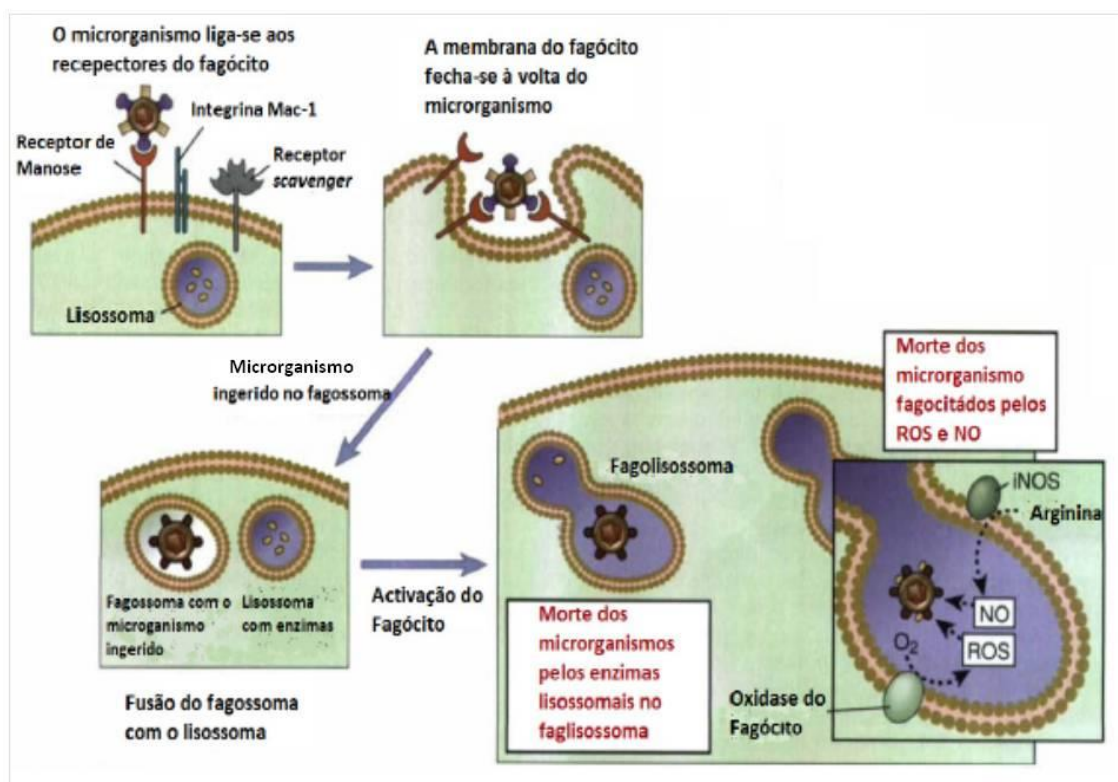
Fisiologicamente as espécies reativas de oxigênio podem ativar fatores de transcrição, que induzem a remodelação da cromatina e a expressão de genes de mediadores pró-inflamatórios (RICHTER et al., 1995).

A atividade bactericida dos polimorfonucleares (PMN) e macrófagos é mediada, em parte, pela produção de espécies reativas de oxigênio, que contribuem para a destruição das bactérias fagocitadas através da ativação de

uma NADPH oxidase presente na membrana celular destas células (Figura 5) (RUBIN et al., 2006; ABBAS; LICHTMAN, 2007).

A expressão de NADPH oxidases ocorre em todos os mamíferos, embora as isoformas individuais tenham diferentes distribuições entre tecidos e espécies. Essas proteínas regulam muitos processos fisiológicos fundamentais, incluindo o crescimento celular, diferenciação, apoptose, remodelação do citoesqueleto e a defesa do hospedeiro (BROWN; GRIENDLING, 2009).

Figura 5 – Fagocitose e destruição intracelular dos micro-organismos



Fonte: Adaptado de ABBAS; LICHTMAN (2007).

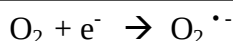
Essa enzima (NADPH) é um complexo de transporte de elétrons com múltiplos componentes que reduzem o oxigênio molecular a $O_2^{\cdot-}$. A ativação dessa enzima é aumentada pela exposição previa das células a um estímulo quimiotático ou a um polissacarídeo bacteriano. A ativação da NADPH oxidase (Nox) está associada a um aumento do consumo de oxigênio, sendo assim, a essas respostas celulares denomina-se “explosão respiratória” ou “*oxidative burst*” (RUBIN et al., 2006).

Ânion Superóxido

O ânion superóxido é produzido principalmente por extravasamentos no transporte mitocondrial de elétrons ou como parte da resposta inflamatória (RUBIN et al., 2006). Estima-se que de todo o oxigênio consumido durante a respiração, cerca de 1% a 2% formam radicais superóxido (FRIDOVICH, 1995 apud MIRIYALA; HOLLEY; CLAIR, 2011).

O ânion superóxido é o produto primário de enzimas Nox, produzido fisiologicamente via redução de um elétron de oxigênio molecular. É altamente reativo e de curta duração, o que dificulta a determinação de uma meia-vida biológica (Figura 6) (FRIDOVICH, 1983 apud BROWN; GRIENDLING, 2009).

Figura 6 - Formação do ânion superóxido



Fonte: RUBIN et al. (2006).

Estes radicais podem reagir com grupamentos contendo ferro e enxofre e liberar íons férricos; com grupos heme e com os tióis proteicos como os resíduos de cisteína (BROWN; GRIENDLING, 2009). Porém, a velocidade da reação de conversão de $\text{O}_2^{\bullet -}$ em H_2O_2 ocorre em uma velocidade maior do que a reação do $\text{O}_2^{\bullet -}$ com biotióis (BROWN; GRIENDLING, 2009).

O ânion superóxido quando protonado forma o radical hidroperoxil ($\text{HO}_2^{\bullet}$), que é mais reativo e possui meia vida menor que o superóxido, tornando-o desta forma mais deletério às células por danificar membranas biológicas com mais facilidade (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990).

Peróxido de Hidrogênio

O superóxido pode sofrer dismutação para um segundo intermediário de sinalização, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), espontaneamente ou por via enzimática por meio da enzima superóxido-dismutase (SOD) (Figura 7) (FRIDOVICH, 1983 apud BROWN; GRIENDLING, 2009).

Figura 7 - Formação do peróxido de hidrogênio



Fonte: RUBIN et al. (2006).

Apesar de não ser um radical livre, pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada, o H_2O_2 é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, porque participa da reação que produz o radical hidroxila ($\text{OH}^\bullet$) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

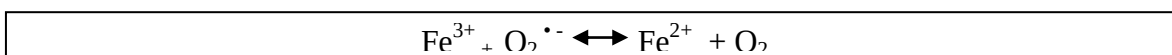
O H_2O_2 reage com tióis proteicos e, embora a taxa de reação do superóxido com tióis proteicos ser quimicamente mais rápida do que a de H_2O_2 , uma maior estabilidade e difusibilidade do peróxido aumentam a probabilidade de que a oxidação de tióis é provavelmente dependente do mesmo. (BROWN; GRIENDLING, 2009). Sendo também capaz de atravessar camadas lipídicas é altamente tóxico para as células (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

O superóxido e o peróxido de hidrogênio podem então, especificamente e reversivelmente, reagirem com as proteínas alterando a sua atividade, localização, e meia-vida (BROWN; GRIENDLING, 2009).

Radical Hidroxila

A redução de H_2O_2 ocorre inicialmente quando o metal de valência mais alta (Fe^{3+}) reage com o $\text{O}_2^{\bullet -}$, produzindo íon ferroso e oxigênio molecular, através da reação de Haber-Weiss (Figura 8) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

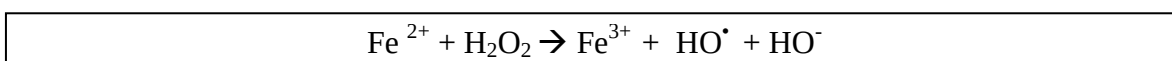
Figura 08 - Redução do ferro e Harber-Weiss



Fonte: FERREIRA; MATSUBARA (1997).

Embora essa reação ocorra lentamente no pH fisiológico, na presença de Ferro (Fe^{2+}), a reação de Fenton converte rapidamente peróxido em radical hidroxila. (Figura 9) (RUBIN et al., 2006).

Figura 9 - Reação de Fenton

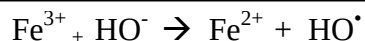


Fonte: FERREIRA; MATSUBARA (1997).

Adicionalmente, Lipinski (2011), relata que os radicais hidroxila podem ser gerados somente na presença de íons férricos sem qualquer agente adicional redox. Nesta reação, um elétron a partir do grupamento hidroxila da água é

transferido para o íon férrico, com a formação de um ferro divalente e um radical hidroxila (Figura 10) (LIPINSKI, 2011).

Figura 10 – Geração de radical hidroxila sem agente redox



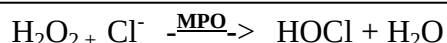
Fonte: LIPINSKI (2011).

O radical hidroxila é altamente reativo, reagindo com metais e outros radicais no local de sua formação; também pode inativar várias proteínas ao oxidar seus grupos sulfidrílicos formando pontes dissulfeto (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Por fim a redução adicional de $\text{OH}^{\bullet}$ acarreta a formação de água (RUBIN et al., 2006).

Ácido Hipocloroso

A mieloperoxidase (MPO), um produto de neutrófilos com uma carga catiônica muito forte, é secretada dos grânulos durante a exocitose e catalisa a conversão de H_2O_2 em ácido hipocloroso, na presença do íon cloro (Figuras 11 e 12) (RUBIN et al., 2006).

Figura 11 - Formação do ácido hipocloroso



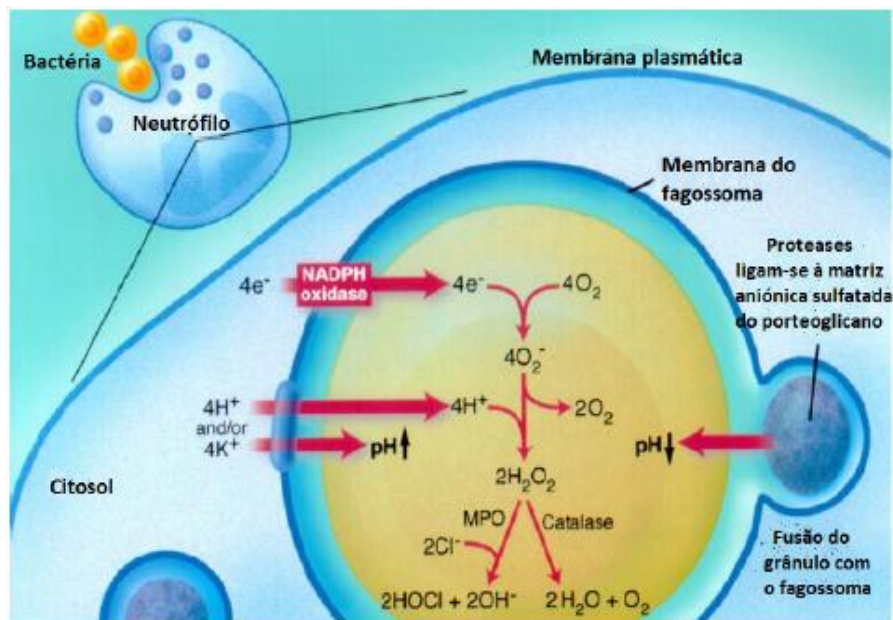
Fonte: VELLOSA (2008)

Esse agente oxidante é um poderoso agente bactericida, além disso, participa da ativação da colagenase e da gelatinase derivadas dos neutrófilos, ambas secretadas como enzimas latentes (RUBIN et al., 2006). Essas duas enzimas fazem parte da família das metaloproteinases de matriz (MMPs), que constituem-se de um grupo de enzimas (endopeptidases) responsáveis pela degradação dos componentes da matriz extracelular e das membranas basais (NAVARRO et al., 2006, ROOS; VAN BRUGGEN; MEISCHL, 2003).

No entanto, é capaz de iniciar a peroxidação lipídica, promovendo uma série de modificações pós-tradução de proteínas alvo, lesar tecidos normais, e oxidativamente, destruir as cadeias de transporte de elétrons (MALECH; GALLIM,

1987; SOUZA et al., 2011). Também está envolvido em processos inflamatórios e em certas neoplasias (HAWKINS; PATTISON; DAVIES, 2002).

Figura 12 – Geração do ácido hipocloroso no interior do fagossoma catalisado pela MPO



Fonte: ROOS; VAN BRUGGEN; MEISCHL (2003)

Outro importante fato é que estes radicais reagem seletivamente com certas cadeias laterais dos aminoácidos, tornando a proteína mais suscetível à degradação por proteases intracelulares. Esta reação do HOCl com aminas resulta na formação de cloraminas e estas espécies podem provocar a dissociação da dupla fita de DNA, devido à ruptura de ligações de hidrogênio (HAWKINS; PATTISON; DAVIES, 2002).

A mieloperoxidase, citada inicialmente, pertence a uma família de peroxidases, responsáveis também pela oxidação de uma variedade de xenobióticos através do peróxido de hidrogênio, tais como: fenóis, metabólitos do benzeno e alguns medicamentos. São encontradas em animais e vegetais e possuem em sua estrutura funcional um grupamento heme com quatro nitrogênios pirrólicos ligados ao Ferro (III) e um resíduo de histidina (VELLOSA, 2008).

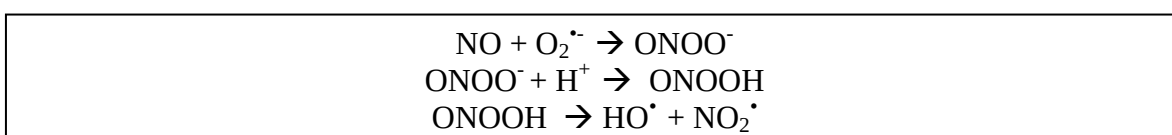
Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é sintetizado a partir da L-arginina por três isoformas distintas da óxido nítrico sintetase (NOS). Considerando que duas das três isoformas (NOS neuronal e NOS epiteliais) são constitutivamente expressas, a isoforma induzível (iNOS) é expressa principalmente em resposta a citocinas específicas em processos inflamatórios (QIDWAI; JAMAL, 2010; RAFIEI et al., 2012).

O óxido nítrico (NO) é capaz de reagir com o ânion superóxido e tióis, levando a formação de peroxinitritos (ONOO^-) e S-nitrosotióis altamente reativos e potencialmente prejudiciais, o que inativa NO. Como o NO possui propriedades anti-inflamatórias e anticoagulantes, bem como do efeito vasodilatador, esta inativação pode acarretar consequências patológicas, especialmente em células endoteliais vasculares (BROWN; GRIENDLING, 2009; FUKAI; FUKAI, 2011; GUZIK; HARRISON, 2006; MADAMANCHI; RUNGE, 2007; RUBIN et al., 2006). Em contrapartida, pode eliminar O_2^- , dessa forma reduzindo a quantidade de radicais tóxicos (RUBIN et al., 2006)

O peroxinitrito (ONOO^-) é um potente oxidante, e reage com íon H^+ formando ONOOH que se decompõe em $\text{HO}^\bullet$ e radical dióxido de nitrogênio (Figura 13) (VELLOSA, 2008).

Figura 13 - Reações de peroxinitritos



Fonte: VELLOSA (2008)

O organismo por sua vez, dispõe de uma variedade de mecanismos de defesa que reduzem os danos causados pela ação deletéria desses radicais. Para o funcionamento celular normal, deve haver uma compensação entre a formação de ERO's e ERN's e os níveis de defesas antioxidantes, que mantêm a célula em estado geral reduzido. O estresse oxidativo decorre de um desequilíbrio entre a geração desses radicais e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante (BARBOSA et al., 2010; CERQUEIRA; GENNARI; AUGUSTO, 2007).

Quando instalado o processo de estresse oxidativo, a natureza reativa destas espécies leva a modificações em biomoléculas, provocando alterações em suas estruturas e funções. Entre as alterações mais drásticas encontram-se alterações na ribose e bases nitrogenadas do ácido desoxirribonucleico (DNA); ligações cruzadas entre bases nitrogenadas, entre DNA e proteínas e entre as próprias proteínas; peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados, que compõem membranas plasmáticas e lipoproteínas; e nitração e nitrosilação de proteínas (CERQUEIRA; GENNARI; AUGUSTO, 2007). Sendo assim, esses radicais estão também envolvidos em diversos processos patológicos como: a fibrose cística, doença respiratória aguda, asma, enfisema, câncer, aterosclerose, inflamação, injúria por reperfusão, artrite reumatoide e danos pelo tabagismo (BARBOSA et al., 2010; VASCONCELOS et al., 2007 VELLOSA et al., 2008).

2.4 SISTEMAS DE DEFESA ANTIOXIDANTES

Um antioxidante é definido como alguma substância presente em concentrações baixas, quando comparadas às concentrações do substrato oxidante, que previne significativamente ou atrasa a oxidação de substratos susceptíveis. Os principais mecanismos de ação de compostos antioxidantes incluem captadores de radicais e supressores de estados excitados; sistemas catalíticos que neutralizam ou eliminam ERO's e ERN's e a ligação de íons metálicos a proteínas, o que os torna indisponíveis para a produção de espécies oxidantes (HALLIWELL, 1997 apud CERQUEIRA; GENNARI; AUGUSTO, 2007).

As substâncias antioxidantes endógenas incluem a cobre-zinco superóxido dismutase, a catalase, a glutathione reduzida (GSH) e a glutathione peroxidase (GPX). A família das superóxido dismutases (SOD) inclui o cobre e zinco contendo SOD (CuZnSOD), uma enzima homodimérica encontrada principalmente no citoplasma e no núcleo, com pequenas quantidades dentro da mitocôndria; e uma forma glicosilada de CuZnSOD chamada SOD extracelular (ECSOD) que reside na região extracelular; também a MnSOD, que é encontrada exclusivamente na matriz mitocondrial e existe como um homotetramero (ZELKO; MARIANI; FOLZ, 2002 apud MIRIYALA; HOLLEY; CLAIR, 2011). Essas enzimas protegem as células pela conversão do ânion superóxido em peróxido de

hidrogênio, este último, porém, pode formar o radical hidroxila, mais reativo que o seus precursores (QUINLAN; SPIVACK; MOSSMAN, 1994).

As enzimas catalase e GPX são então responsáveis pela inativação do peróxido de hidrogênio. A catalase está presente nos peroxissomos intracelulares e catalisa a decomposição específica de H_2O_2 gerando moléculas de água e oxigênio. A glutathione peroxidase por sua vez, é fundamental no metabolismo de H_2O_2 e de outros peróxidos, pois catalisa reações de doação de elétrons, nas quais se utiliza da glutathione reduzida (GSH) como agente redutor, formando a glutathione oxidada. Sendo assim este conjunto de enzimas pode converter sequencialmente uma espécie reativa em outra e rapidamente transformá-las em subprodutos não tóxicos. (QUINLAN; SPIVACK; MOSSMAN, 1994; GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007).

A vitamina E, ou α -tocoferol, uma das substâncias antioxidantes obtidas pela dieta e presente na estrutura das membranas, é um dos mais importantes inibidores da peroxidação lipídica em animais, por capturar $RO_2^{\cdot}$. A vitamina C (ácido ascórbico), também obtido da dieta alimentar, regenera o radical tocoferila formado na reação do α -tocoferol, fazendo parte da linha de defesa hidrossolúvel (GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007).

Essas duas vitaminas, no entanto, podem atuar como pró-oxidante por serem fortes agentes redutores, e poderem reagir com metais de transição, reciclando-os para a reação de Fenton e facilitando a formação dessas espécies (GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007).

2.5 MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

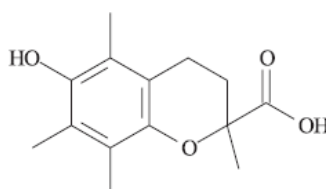
Existem diferentes metodologias para avaliar a atividade antioxidante de um composto, sendo que em cada método ocorre a geração de um radical diferente, através de mecanismos variados. Os ensaios antioxidantes podem ser realizados de maneira direta, ou seja, baseados em estudos de cinética química, onde ocorre uma competição entre uma sonda oxidável e o antioxidante pelas espécies reativas; ou de maneira indireta, através de ensaios mediados pela transferência de elétrons, caracterizados por uma reação de oxi-redução entre o oxidante e o antioxidante (RE et al., 1999; ROGINSKI; LISSI, 2005)

No método direto podem ser utilizados lipídios individuais, misturas lipídicas, proteínas, DNA, plasma sanguíneo, membranas biológicas, entre outras como substrato para oxidação. No método indireto, o processo é caracterizado por uma reação de oxi-redução entre o oxidante e o antioxidante; onde, o agente oxidante ao ser reduzido pelo antioxidante sofre uma mudança na coloração, cuja intensidade é proporcional à atividade deste antioxidante ou à concentração do mesmo. (BARCLAY; VINQUIST, 2003; BENZIE; STRAIN 1999).

Um grupo de estudos de Nicholas J. Miller em Londres, no início dos anos 90, desenvolveu um teste de capacidade antioxidante total “*total antioxidant capacity*” (TAC). A principal vantagem deste teste é medir a capacidade antioxidante de virtualmente todos os componentes de uma amostra biológica, extrato vegetal ou alimento e não de somente um ou outro composto (FERRARI, 2010).

A atividade antioxidante total (TAA) de plantas medicinais pode ser avaliada geralmente pela capacidade de absorção do radical oxigênio “*oxygen radical absorbance capacity*” (ORAC), pela capacidade de redução férrica do plasma “*ferric reducing ability of plasma*” (FRAP) e pela capacidade antioxidante do método frente a um padrão “*Trolox equivalent antioxidant capacity*” (TEAC). O Trolox® é o nome comercial da Hoffman-La Roche para o ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico; um análogo da vitamina E, de caráter hidro e lipofílico, utilizado para investigação da capacidade antioxidante em diferentes metodologias e em aplicações bioquímicas para reduzir o estresse oxidativo (Figura 14) (BERG et al., 2000; BRAGA et al., 2010; DAVID et al., 2010; FORREST et al., 1994; PIETA; SIMONETTI; MAURI, 1998; RE et al., 1999; WANG et al., 2004).

Figura 14 – Estrutura química do Trolox®



Fonte: ALVES et al. (2010)

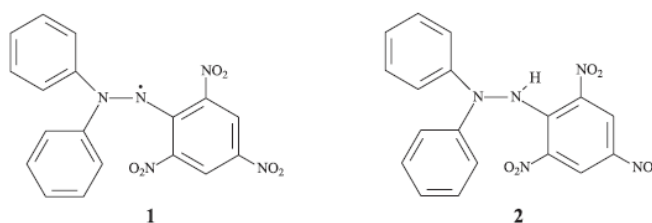
O radical ABTS^{•+} [2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)] é gerado a partir da reação do reagente ABTS com o persulfato de potássio, esta solução

tem coloração verde-azulada escura e absorve luz à 734 nm. A extensão da descoloração nesta reação fornece a porcentagem de inibição dos radicais $ABTS^{\bullet+}$, em função da concentração e do tempo (BERG et al., 2000; BRAGA et al., 2010; PIETA; SIMONETTI; MAURI, 1998; RE et al., 1999; WANG et al., 2004).

Essa metodologia é uma das mais utilizadas para medir a atividade antioxidante em vegetais, por ser um método estável e sensível, onde o radical é gerado ao longo do tempo do ensaio e pode ser aplicado em antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos (MANSUR, 2011; RE et al., 1999; RUFINO et al., 2010).

Outro ensaio amplamente utilizado para avaliação antioxidante de substâncias de interesse fitotecnológico, alimentar, farmacológico e toxicológico baseia-se na capacidade de uma substância sequestrar o radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila ($DPPH^{\bullet}$) (Figura 15). Na literatura são descritos inúmeros trabalhos envolvendo o conteúdo de polifenóis totais, flavonoides e essa metodologia; pois a mesma caracteriza-se por um ensaio simples, rápido, preciso e de baixo custo. Este reagente, quando dissolvido em etanol possui coloração roxa, sendo o seu máximo de absorção em 531 nm; a porcentagem de inibição das espécies radicalares é obtida pela diferença das absorbâncias na ausência e presença das amostras. (SILVA et al., 2011; VELLOSA, 2005; VELLOSA et al., 2007).

Figura 15 – Estrutura química do DPPH

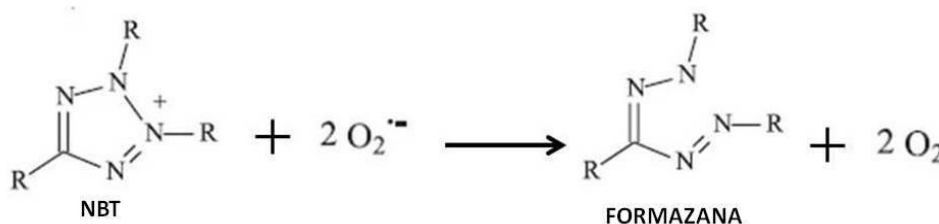


Nota: 1-forma radicalar, 2-forma não-radicalar
 Fonte: ALVES et al. (2010)

A atividade de um grande número de substâncias pode ser medida em termos da atividade sequestradora do radical superóxido. O $O_2^{\bullet-}$ pode ser gerado por distintos sistemas enzimáticos, entre eles a reação catalisada pela enzima xantina oxidase, ou pelo sistema não enzimático através da reação de metassulfato de fenazina (PMS) com NADH e oxigênio molecular. (KOBAC; GRYGLEWSK, 1988 apud ALVES et al., 2010).

No método utilizado para avaliar a capacidade sequestradora, o radical $O_2^{\cdot-}$ reduz o azul de nitro tetrazólio (NBT) a formazana em pH 7.4 e temperatura ambiente, e a geração do formazana é acompanhada por espectrofotometria pela mudança da coloração amarelo pálido do NBT para uma coloração púrpura do formazana (Figura 16) (SILVA et al., 1991 apud ALVES et al., 2010).

Figura 16 – Reação do ânion superóxido com o NBT e formação do cromóforo Formazana:



Fonte: Adaptado pela autora de ALVES et al. (2010)

O HOCl é um potente agente oxidante gerado nos neutrófilos pela reação de íons cloreto (Cl^-) com peróxido de hidrogênio catalisado pela mieloperoxidase (MPO). A produção de HOCl por este sistema constitui um importante mecanismo de defesa contra micro-organismos (ALVES et al., 2010).

Um ensaio colorimétrico pode ser realizado avaliando o efeito de uma amostra sobre o sobre HOCl; onde uma solução HOCl é incubada com a mesma em diferentes concentrações, e o HOCl remanescente revelado espectrofotometricamente em 652 nm com a adição de tetrametilbenzidina. Este método foi utilizado para avaliação da atividade antioxidante em chás de *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (CAMARGO, 2011) em compostos isolados a partir do extrato bruto de *Pterogyne nitens* Tul. (VELLOSA, 2008) e em medicamentos (PAINO et al. 2005; MANENTE et al., 2011).

A avaliação da atividade antioxidante pode ser realizada em sistemas oxidativos onde se utilizam enzimas peroxidases. A *horseradish* (*Armoracia rusticana* G. Gaertn., B. Mey & Scherb.; Cruciferae) é uma rica fonte de peroxidase, uma enzima que contém um grupamento heme e utiliza o peróxido para oxidar uma variedade de compostos orgânicos e inorgânicos (VEICHT, 2004; SMITH et al., 1990)

A enzima “*horseradish peroxidase*” (HRP) catalisa a reação do peróxido de hidrogênio com um substrato reduzido, formando água e um subproduto radicalar. Em geral os substratos são fenóis aromáticos, ácidos fenólicos, indóis, aminas e

sulfonatos (VEIGHT, 2004). A oxidação do guaiacol por peroxidases na presença de H_2O_2 é a base para um ensaio colorimétrico amplamente utilizado (DOERGE, DIVI, CHURCHWELL, 1997). O resultado é expresso pela determinação da velocidade de reação quando o tempo tende à zero na ausência e presença das amostras (VELLOSA, 2008).

Um método direto de avaliação que verifica o estresse oxidativo em células animais é realizado com eritrócitos. A membrana da hemácia é o modelo primário para estudo de membrana plasmática celular animal, pelo fato de ser desprovida de núcleo e organelas e essencialmente constituída de lipídeos e proteínas (MURADOR; DEFFUNE, 2007).

Nesse ensaio o composto *2'-azo-bis (2-aminopropane) dihydrochloride* (AAPH) gera radicais livres pela sua decomposição térmica unimolecular. A taxa da geração de radicais peroxil ($ROO^\bullet$) pode ser controlada e medida através do ajuste da concentração de AAPH. (NG; LIU; WANG, 2000). O radical peroxil ataca a membrana dos eritrócitos induzindo uma cadeia de oxidação dos lipídeos e proteínas, desestruturando a membrana e promovendo a hemólise (MENDES et al., 2011). Por conseguinte, a hemólise induzida por AAPH fornece a extensão do dano oxidativo na membrana dos eritrócitos causada pelo radical peroxil (NG, LIU, WANG, 2000).

2.6 ANTIMICROBIANOS

O termo antimicrobiano é um termo utilizado para designar substâncias naturais (antibióticos) bem como as moléculas sintetizadas em laboratórios (quimioterápicos) com efeito anti-infeccioso (NETO; NICODEMO; LOPES, 2007).

A origem infecciosa das doenças foi demonstrada no século XIX, e estimulou a pesquisa de substâncias capazes de combater esses micro-organismos. Em meados do século XX surgiram os primeiros quimioterápicos de ação sistêmica. Inicialmente os antibióticos eram obtidos a partir de micro-organismos e vegetais superiores; com o conhecimento de sua estrutura química, passaram também a ser sintetizados em laboratórios. O reconhecimento do núcleo ativo desses medicamentos possibilitou também o desenvolvimento de substâncias semi-sintéticas, obtidas por modificações estruturais do composto natural (TAVARES, 1999).

Mesmo com a emergência de antibióticos e antifúngicos cada vez mais potentes, as cepas resistentes ou multi-resistentes aparecem continuamente, fazendo com que a busca e o desenvolvimento de novas drogas se torne fundamental. Atualmente a resistência é descrita em praticamente todas as espécies de bactérias (ALVES et al., 2000; TAVARES, 1999).

Como discutido anteriormente, as plantas medicinais vêm sendo utilizadas popularmente ao longo dos anos para tratar, controlar ou prevenir doenças humanas, sendo considerada uma importante fonte de novos agentes antimicrobianos. O isolamento de moléculas pode servir como modelo para síntese química de novos protótipos (AKINPELU; ADEGBOYE; ADELLOYE, 2008; SILVA et al., 2011; SUFFREDINI et al., 2006).

Sendo assim, pesquisas neste âmbito podem contribuir para o desenvolvimento do campo da saúde em nível mundial, encontrando substâncias mais eficazes e menos tóxicas na corrida contra resistência e o surgimento de micro-organismos patogênicos (OSTROSKY et al., 2008).

2.7 MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Para o estudo de agentes antimicrobianos, os conceitos de resistência e sensibilidade bacteriana se fundamentam na correlação entre a concentração inibitória mínima (CIM) e os níveis plasmáticos alcançados na administração do antimicrobiano (ESMERINO et al., 2004)

A concentração inibitória mínima (CIM) é a menor concentração de um determinado antibiótico capaz de inibir o desenvolvimento visível do micro-organismo; já a concentração bactericida mínima (CBM) corresponde à menor concentração do antibiótico capaz de eliminar as bactérias presentes; sendo esta, de duas a quatro vezes maiores que a CIM (NETO; NICODEMO; LOPES, 2007).

A avaliação da susceptibilidade de micro-organismos aos antimicrobianos é realizada *in vitro*, determinando-se a concentração inibitória mínima (CIM) de cada antimicrobiano para cada micro-organismo, este princípio básico se aplica a diversas técnicas existentes (NETO; NICODEMO; LOPES, 2007).

Os métodos mais utilizados para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) são os de difusão, como o do disco difusão, a difusão através de cavidades feitas no Agar e o do cilindro em placas; e os métodos de diluição em

ágar e diluição em caldo. Essa variedade de metodologias torna difícil a comparação entre estudos envolvendo a atividade antimicrobiana (Quadro 1) (NASCIMENTO et al., 2007).

Quadro 1 - Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana.

MÉTODO DE DIFUSÃO	
O teste de difusão em ágar é um método físico, no qual um micro-organismo é exposto a uma substância biologicamente ativa em um meio de cultura sólido. O resultado é obtido pelo diâmetro do halo de inibição (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003; TAVARES, 1999).	
Teste de Difusão em Disco	Consiste em aplicar os discos impregnados com a substância em teste sobre o meio de cultura sólido previamente inoculado com uma solução de turbidez padrão 0,5 de McFarland do micro-organismo (BRASIL, 2005).
Cilindros de Aço Inoxidável	Esta técnica de aplicação envolve cilindros de aço inoxidável no meio de cultura solidificado já inoculado e a adição da solução em estudo nos cilindros (OSTROSKY et al., 2008).
Perfuração em Ágar	Na técnica de perfuração em ágar, a remoção do meio de cultura sólido é realizada com auxílio de cilindros de 6-8 mm de diâmetro para a formação de poços, nos quais é possível aplicação das substâncias a serem analisadas (OSTROSKY et al., 2008).
MÉTODO DE DILUIÇÃO EM CALDO	
Neste método aplicam-se concentrações crescentes do antimicrobiano ou da substância em análise aos meios de cultivo do micro-organismo, determinando-se desta maneira, a menor concentração capaz de inibir seu crescimento (TAVARES, 1999).	
Macrodiluição	A macrodiluição envolve testes em tubos de ensaio, com volume de meio de cultura variando de 1 e 10 mL (OSTROSKY et al., 2008).
Microdiluição	A microdiluição utiliza microplacas com 96 poços, com volume de meio de cultura entre 0,1 e 0,2 mL (OSTROSKY et al., 2008)

Fonte: Elaborado com base em: BRASIL (2005); OSTROSKY et al. (2008); PINTO, KANEKO, OHARA (2003); TAVARES (1999).

Não existem métodos padronizados para expressar e comparar diretamente os resultados de testes antimicrobianos de produtos naturais devido aos diversos fatores que podem interferir na determinação da CIM, dentre eles encontram-se: a técnica aplicada, o micro-organismo e a cepa utilizada no teste, a origem da planta, a época da coleta, se os extratos foram preparados a partir de plantas frescas ou secas e a quantidade do extrato testado (FENNEL et al., 2004; KUANAR et al., 2010)

Eloff (1998), no entanto, demonstrou que a técnica de micro-diluição em microplacas de 96 poços e a utilização de sais de tetrazólio para indicar o crescimento bacteriano apresentou uma sensibilidade maior em relação às técnicas de difusão em Agar e reprodutibilidade dos resultados frente às cepas de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Escherichia coli* com extratos de muitas plantas diferentes.

Langkield et al. (2004) ressaltam as vantagens deste método sobre o de difusão em disco, que incluem: sensibilidade aumentada para pequenas quantidades de extrato, a capacidade para distinguir entre os efeitos bacteriostáticos e bactericidas e determinação quantitativa de concentrações inibitórias mínimas (CIM).

A técnica de microdiluição demonstrou-se efetiva no rastreio para atividade antimicrobiana e para o isolamento biomonitorado de compostos antimicrobianos a partir de plantas. (ELOFF et al., 1998). Neste contexto, a técnica de microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima foi a técnica de escolha para o presente trabalho.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho buscou avaliar a atividade antimicrobiana, antioxidante e citotóxica da espécie *Psychotria nuda* (Cham. & Schltdl.) Wawra.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de *Psychotria nuda* (Cham. & Schltdl.) Wawra frente a modelos químicos não-biológicos: ABTS^{•+}, DPPH[•]; frente a modelos químicos biológicos: HOCl e Superóxido; frente a um modelo enzimático: HRP; frente a um modelo de peroxidação lipídica em células: Hemólise induzida por AAPH.
- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de *Psychotria nuda* (Cham. & Schltdl.) Wawra através da concentração inibitória mínima e através da concentração bactericida mínima.
- Avaliar a atividade citotóxica do extrato hidroalcoólico de *Psychotria nuda* (Cham. & Schltdl.) Wawra através do ensaio MTT e através do ensaio de incorporação de Vermelho Neutro.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 REAGENTES

2,2'- Azobis [2-methylpropionamidine] dihydrochloride (AAPH) – Sigma-Aldrich; 2,2'- Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6'-sulfonic acid) (ABTS) – Sigma-Aldrich; 2,2 Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) – Sigma-Aldrich; 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) - Sigma-Aldrich; Horseradish (HRP) - Sigma-Aldrich; Phenazine Methosulfate (MSF) - Sigma Chemical; β -nicotinamide adenine dinucleotide reduced form (NADH) – Sigma Chemical; Nitro blue tetrazolim (NBT) - Sigma Chemical; 3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidine (TMB) - Sigma-Aldrich; Guaiacol oxidation indicator - Sigma-Aldrich; ($\pm$)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (TROLOX[®]) - Sigma-Aldrich; Dimethyl Sulfoxide (DMSO) – Sigma-Aldrich; 2,3,5-Trifeniltetrazólio cloreto – Merck; ácido 3 - [4,5-dimetiltiazol- 2-il] -2,5 - difeniltetrazólio (MTT) - Sigma-Aldrich; Vermelho Neutro (VN) - Cyquant (Invitrogen); Agar Sangue (AS) e ágar Muller-Hinton (MH) – Merck Millipore, meio de Dulbecco MEN (DMEM) – Cultilab.

4.2 EQUIPAMENTOS

Foram utilizadas balanças analíticas, centrífugas, estufas, banho-maria, capela de fluxo laminar, homogeneizadores e refrigeradores. Para os ensaios espectrofotométricos utilizou-se o espectrofotômetro de placas – Leitora de microplacas BioTeck μ Quant; e o espectrofotômetro de cubetas – PerkinElmer Lambda 25 UV-VIS.

4.3 EXTRATO

O material botânico (folhas) foi identificado e fornecido pelo grupo de pesquisa da Prof^a. Dra. Kátia Christina Zuffellato-Ribas, do Departamento de Botânica da UFPR. O extrato bruto hidroalcoólico 50% das folhas da *Psychotria nuda* (EBPN) foi produzido no laboratório da Prof^a Daniela de Almeida Cabrini do Departamento de Farmacologia da UFPR.

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE CAPTURA DO RADICAL ABTS^{•+}

O reagente ABTS^{•+} foi preparado pela reação de 5mL de 7 mM de solução aquosa de (ABTS) com 88μL de 140 mM de Persulfato de Potássio, essa solução ficou ao abrigo da luz em temperatura ambiente por 12 – 16 horas antes do uso. Antes da análise, esta solução foi diluída com KH₂PO₄/K₂HPO₄ (10 mM, pH: 7.0, 1:10), a sua absorbância foi lida em 734 nm. Para avaliação da atividade antioxidante o extrato foi previamente diluído em Dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 1mg/mL para obter as diluições subsequentes. Foi avaliada a capacidade de capturar os radicais ABTS^{•+} em diferentes concentrações do extrato e quantidade de tampão fosfato de sódio 10 mM (pH 7.3) para completar o volume de 300 μL. As amostras foram incubadas por 30 minutos em ausência de luz, e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro (734 nm). (VELLOSA et al., 2007; PELLEGRINI et al., 1999; WANG et al., 2004). As amostras foram realizadas em triplicata e o mesmo procedimento foi realizado com o padrão TROLOX[®] e com um controle com o diluente Dimetilsulfóxido (DMSO) nas concentrações experimentais.

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE CAPTURA DO RADICAL DPPH[•]

Para avaliação da atividade antioxidante o extrato foi previamente diluído em Dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 2 mg/mL para obter as diluições subsequentes. Foi avaliada a capacidade de capturar os radicais DPPH[•] em diferentes concentrações do extrato diluídas em microplacas com o reagente DPPH[•] e quantidade de tampão fosfato de sódio 10 mM (pH 7.3) para completar o volume de 300μL. As amostras foram incubadas por 15 minutos em ausência de luz, e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro (531 nm). (MANSUR, 2011; VELLOSA, 2005). As amostras foram realizadas em triplicata e o mesmo procedimento foi realizado com o padrão TROLOX[®] e com um controle com o diluente Dimetilsulfóxido (DMSO) nas concentrações experimentais.

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE CAPTURA DO ÁCIDO HIPOCLOROSO

Para avaliação da atividade antioxidante o extrato foi previamente diluído em Dimetilsulfóxido (DMSO) a 6,7% na concentração de 2 mg/mL para retirar a interferência do diluente e obter as diluições subsequentes. Em microplacas adicionou-se tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7.4) em quantidade suficiente para 300µL, a amostra em diferentes concentrações, a solução contendo 2,8 mM de TNB (dissolvido em 50% de dimetilformamida, iodeto de potássio 10 mM e 0,8M de ácido acético) e HOCl (30µM). Incubou-se 15 minutos em ausência de luz e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro (552 nm) (COSTA, 2004 adaptado por VELLOSA, 2008). A concentração da solução de HOCl foi verificada espectrofotometricamente usando o quociente de extinção molar $350 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ em 292 nm (CAMARGO, 2011). As amostras foram realizadas em triplicata e o mesmo procedimento foi realizado com o padrão TROLOX® e com um controle com o diluente Dimetilsulfóxido (DMSO) nas concentrações experimentais.

4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE CAPTURA DO ÂNION SUPERÓXIDO

Para avaliação da atividade antioxidante o extrato foi previamente diluído em Dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 2 mg/mL para obter as diluições subsequentes. Em microplaca foi adicionado tampão pirofosfato de sódio 25 mM (0,025M, pH 8.3) Metassulfato de Fenazina 372 µM, *Nitroblue tetrazolium salt* 600 µM e NADH 1560 µM, e incubados por 10 minutos em ausência de luz sendo que as leituras foram realizadas em espectrofotômetro (560 nm). (Esse ensaio foi adaptado de VELLOSA et al., 2007). As amostras foram realizadas em triplicata e o mesmo procedimento foi realizado com o padrão TROLOX® e com um controle com o diluente Dimetilsulfóxido (DMSO) nas concentrações experimentais.

4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO ENZIMÁTICO HRP

Neste ensaio o extrato foi previamente diluído em Dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 1 mg/mL para se obter as diluições subsequentes. Inicialmente os reagentes foram preparados nas seguintes concentrações: HRP: 7

nM, H_2O_2 : 0,1mM, Guaiacol: 2 mM, onde a concentração de HRP em solução foi determinada através de seu coeficiente de extinção molar em 403 nm ($1,02 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e a concentração de H_2O_2 através de seu coeficiente de extinção molar em 230 nm ($80 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Adicionou-se primeiramente o tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7.4) para o volume final de 1mL, a amostra, o HRP, o Guaiacol e por último H_2O_2 ; realizando a leitura imediata a 470 nm por 1 minuto a 37°C. Por fim determinou-se a velocidade de reação (KHALIL, 2002; VELLOSA, 2008)

4.9 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO SOBRE ERITRÓCITOS

O sangue foi obtido de humanos e os eritrócitos foram separados do plasma após centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos; em seguida os eritrócitos foram lavados três vezes com tampão fosfato de sódio 10 mM / NaCl 150 mM (pH 7.4) centrifugando a suspensão de hemácias a 1500 rpm por 10 minutos após cada lavagem. O extrato foi inicialmente diluído em uma solução de DMSO a 25%. Diferentes concentrações do extrato foram incubadas a 37°C com a suspensão de hemácias final a 5% e volume de tampão fosfato de sódio 10 mM / NaCl 150 mM (pH 7.4) para completar 1mL. As leituras foram realizadas com o sobrenadante a 4,76% em tampão após 1, 2, 3, 4 e 5 horas de incubação em comprimento de onda de 414 nm (NG, LIU, WANG, 2000; VELLOSA, 2008). As amostras foram realizadas em triplicata e o mesmo procedimento foi realizado com o padrão TROLOX® e com um controle com o diluente Dimetilsulfóxido (DMSO) nas concentrações experimentais. O protocolo foi aprovado no comitê de ética sob o número 190375.

4.10 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIOXIDANTE DO EXTRATO SOBRE A HEMÓLISE PROVOCADA PELO RADICAL AAPH EM ERITRÓCITOS

O sangue foi obtido de humanos e os eritrócitos foram separados do plasma após centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos; em seguida os eritrócitos foram lavados três vezes com tampão fosfato de sódio 10 mM / NaCl 150 mM (pH 7.4) centrifugando a suspensão de hemácias a 1500 rpm por 10 minutos após cada lavagem. O extrato foi inicialmente diluído em uma solução de DMSO a 25%. Diferentes concentrações do extrato foram incubadas a 37°C com a suspensão de hemácias final a 5%, o reagente 2,2'-Azobis [2-

methylpropionamidine] dihydrochloride (AAPH) a 25 mM e volume de tampão fosfato de sódio 10 mM / NaCl 150 mM (pH 7.4) para completar 1mL. As leituras foram realizadas com o sobrenadante a 4,76% em tampão após 1, 2, 3, 4 e 5 horas de incubação em comprimento de onda de 414 nm (NG, LIU, WANG, 2000; VELLOSA, 2008). As amostras foram realizadas em duplicata e o mesmo procedimento foi realizado com o padrão TROLOX® e com um controle com o diluente Dimetilsulfóxido (DMSO) nas concentrações experimentais. O protocolo foi aprovado no comitê de ética sob o número 190375.

4.11 OBTENÇÃO DAS CEPAS BACTERIANAS

As cepas padrões foram cedidas pelo Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Foram testados o micro-organismos Gram-negativo: *Escherichia coli* (ATCC® 25922); o micro-organismo Gram-positivo: *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923) e o fungo *Candida albicans* (ATCC® 10231). As culturas foram repicadas 24 horas antes da realização dos testes em placa de Agar Sangue (USA, 2009).

4.12 PREPARAÇÃO DO INÓCULO

Pelo menos de 3 a 5 colônias, bem isoladas, do mesmo tipo morfológico foram selecionadas da placa de Ágar com uma alça esterelizada e os micro-organismos transferidos para um tubo contendo de 4 a 5 mL de solução fisiológica com uma concentração de aproximadamente $1-2 \cdot 10^8$ unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) para bactérias e 10^6 UFC/mL para leveduras, obtidas pelo controle de turbidez de BaSO₄, equivalente à escala 0,5 de McFarland (BRASIL, 2005; OSTROSKY et al., 2008 ; SILVA et al., 2011).

4.13 AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA DO EXTRATO PELO MÉTODO DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA POR MICRODILUIÇÃO E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA

O método da CIM foi realizado em placas de microtitulação com 96 poços, com volume de meio de cultura Muller-Hinton de 0,17 mL por poço. (OSTROSKY et al., 2008).

Os micro-organismos foram padronizados na concentração de 10^5 UFC/mL diluídos a partir da escala 0,5 de MacFarland. Foi retirada então uma alíquota de 20 μ L do extrato nas concentrações iniciais de 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625 mg/mL. Estas foram depositadas em cada poço contendo 170 μ L de caldo Muller-Hinton para bactérias ou Muller-Hinton 2% glicose para o fungo e finalmente adicionada a suspensão de micro-organismos (10 μ L). Os testes foram executados em quadruplicata para as bactérias e triplicata para o fungo e juntamente foi realizado um controle microbiológico do extrato, bem como um controle positivo com o meio e o micro-organismo e um controle negativo somente com o meio (SILVA et al., 2011)

Em seguida, as placas foram incubadas por 24 horas a 35°C. O crescimento foi lido em espectrofotômetro (580 nm) e posteriormente avaliado, utilizando-se o revelador cloreto de trifeniltetrazólio (CTT). A menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento microbiano foi considerada como CIM.

Para determinação da concentração bactericida mínima (CBM), as culturas nos poços das microplacas foram inoculadas em Ágar Muller-Hinton para as cepas bacterianas e Agar Sangue para o fungo e, em seguida incubadas por 24 horas a 35°C. A menor concentração do extrato capaz de inibir completamente o crescimento microbiano foi considerada a CBM (SILVA et al., 2011).

4.14 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS

As células padrões foram cedidas pelo Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná. Utilizou-se a célula NIH3T3, um fibroblasto de célula embrionária de camundongo e a célula HACAT, uma célula epitelial humana imortalizada.

4.15 CULTURA DE CÉLULAS

A célula NIH3T3 foi cultivada em meio de Dulbecco MEM (DMEM) com 10% de soro fetal bovino (SFB) a 5% de CO₂ e 37° C, por 3 a 5 dias. O meio foi retirado e as células lavadas com tampão fosfato salino (PBS), em seguida, foi adicionado 1mL de EDTA por 10 minutos e posteriormente 1mL de Tripsina por mais 10 min. As células foram retiradas com o meio e centrifugadas por 10 min a

1000rpm, o meio sobrenadante retirado e a concentração celular foi ajustada para 7×10^3 células/mL do mesmo meio em microplacas com 96 poços e reincubadas a 5% de CO₂ e 37° C por 24 horas para que atingissem de 60 a 70% de confluência (BORENFREUD; BABICH; MARTIN-ALUACIL, 1985; POSKUS et al., 2009)

4.16 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE PELO ENSAIO MTT

A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio colorimétrico descrito por Mosmann (1983), em que o ácido 3 - [4,5-dimetiltiazol- 2-il] -2,5 - difeniltetrazólio (MTT) é reduzido para azul de formazana pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial das células viáveis. O extrato foi inicialmente diluído em DMSO, e posteriormente foram preparadas diferentes concentrações do mesmo em meio DMEM. As células foram tratadas e reincubadas a 5% de CO₂ e 37° C por 24 horas. Após esse período foi retirado o meio e adicionado 200µL de (MTT), incubado por 3 horas a 5% de CO₂ e 37° C; o (MTT) foi aspirado e os cristais intracelulares de formazana foram solubilizados com etanol (CARMICHAEL et al., 1987) e a leitura realizada em 570 nm. Controles foram realizados com o meio, o veículo na concentração inicial e Trolox® a 0,3 mM. O experimento realizado em quadruplicata. (BORENFREUD; BABICH; MARTIN-ALUACIL, 1987; MOSMANN, 1983; POSKUS, 2009)

4.17 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE PELO ENSAIO DE INCORPORAÇÃO DE VERMELHO NEUTRO

Outro teste de citotoxicidade foi realizado com um método de incorporação de vermelho neutro (NR) pelos lisossomos das células viáveis. O extrato foi inicialmente diluído em DMSO, e posteriormente foram preparadas diferentes concentrações do mesmo em meio DMEM. As células foram tratadas e reincubadas a 5% de CO₂ e 37° C por 24 horas. Após esse período foi retirado o meio e as células foram lavadas com 1mL de PBS. Um total de 200 µl de solução de NR (40 µg/mL), previamente centrifugado para remoção de precipitados, foi adicionado a cada poço e incubou-se a 37°C durante 3 horas. O meio foi então removido e as células lavadas com uma mistura de Cloreto de Cálcio 1% e formaldeído 0,5%. Foi adicionada uma solução de ácido acético 1% e etanol 50%

e após 10 minutos em temperatura ambiente e leve agitação foi realizada a leitura a 570 nm. O experimento foi realizado em triplicata (BORENFREUD; BABICH; MARTIN-ALUACIL, 1987; FOTAKIS; TMBRELL, 2006; MACHANA et al., 2011).

4.18 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão da média com 4 casas decimais. Foi calculada a IC₅₀ e CL₅₀ (concentração necessária para reduzir em 50% as respostas dos grupos tratados em relação ao grupo controle), sendo obtido através da plotagem de curvas concentração-resposta, por regressão linear. Em alguns casos foi necessário calcular a concentração que promovia uma inibição inferior a 50%. Os cálculos foram realizados utilizando o *software* estatístico *Microcal (TM) Origin 6.0*[®] Northampton, MA, EUA.

Os dados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de múltipla comparação de Tukey. Nos ensaios antioxidantes os valores foram comparados com o valor da absorbância referente à máxima concentração de radicais sem a adição das amostras. Valores de p inferiores a 0,05 (p<0,05) foram considerados como indicativos de significância. Os cálculos foram realizados utilizando o *software* estatístico *GraphPad Prism 3.0*[®], San Diego, Califórnia, EUA.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

5.1.1 Interações diretas com as espécies reativas

- ABTS

Demonstrou-se relação entre o aumento da concentração do Trolox[®] (IC_{50} : $5,38 \pm 0,097 \mu\text{g/mL}$) e do extrato (IC_{50} : $33,48 \pm 1,99 \mu\text{g/mL}$), e a inibição do radical $ABTS^{\bullet+}$; sendo que a captação radicalar revelou uma diferença significativa em relação ao controle na concentração inicial de $13,3 \mu\text{g/mL}$. Isso demonstra a presença de atividade antioxidante proporcional à concentração do extrato (Gráfico 1). O diluente Dimetilsulfóxido nas concentrações experimentais não interferiu na captura dos radicais (Tabela 1).

Um estudo conduzido por Silva et al., 2012 identificou uma IC_{50} de 89 e $465 \mu\text{g/mL}$ para o extrato (metanol 80: água 20) de duas espécies distintas de *Spondias* sp (Anacardiaceae) e a ocorrência de quercetina, rutina e ácido elágico, substâncias com atividade antioxidante relevante.

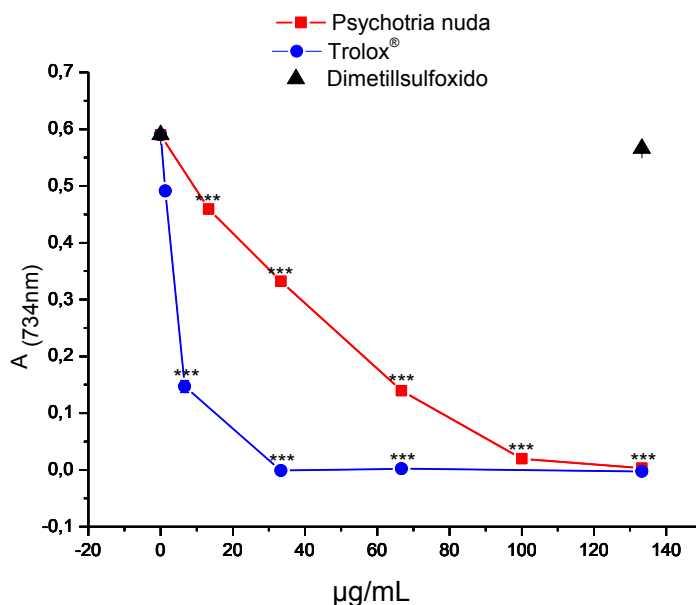


Gráfico 1 – Ação sequestradora de radical $ABTS^{\bullet+}$ ($55\mu\text{M}$); tampão fosfato de sódio 10 mM (pH 7.4); incubação de 30 minutos (ausência de luz); $\lambda=734 \text{ nm}$.

Fonte: Dados da pesquisa

Nota: (*): $p<0,05$; (**): $p<0,01$; (***) : $p<0,001$ – os valores foram comparados com o valor da absorbância referente à máxima concentração de radicais sem a adição das amostras.

Tabela 1 - Média e desvio padrão dos pontos utilizados para elaboração do Gráfico 1.

<i>P. nuda</i> µg/mL	Média	Desvio Padrão	Trolox [®]	Média	Desvio Padrão
133,3	0,0030 ***	0	133,3	-0,0027 ***	± 0,0012
100	0,0197 ***	± 0,0025	66,7	0,0020 ***	± 0,0010
66,7	0,1397 ***	0	33,3	-0,0010 ***	± 0,0010
33,3	0,3323 ***	± 0,0014	6,7	0,1470 ***	± 0,0106
13,3	0,4590 ***	± 0,0040	1,3	0,4913	± 0,0047
Abs Max: 0,59 (± 0,0057)			DMSO 13,3%: 0,5658 (± 0,0021)		

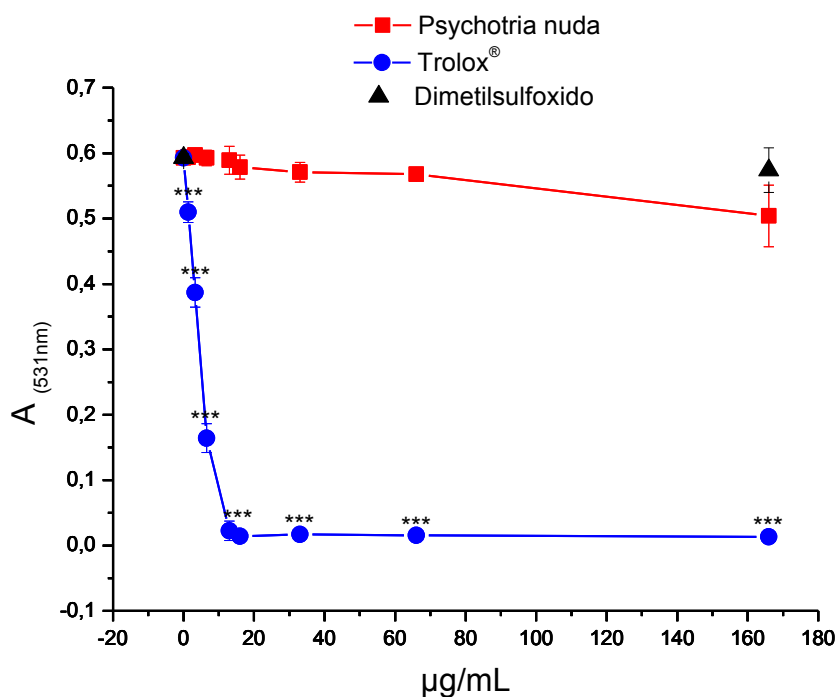
Nota: (*): $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$; (***): $p < 0,001$ – os valores foram comparados com o valor da absorbância referente à máxima concentração de radicais sem a adição das amostras

Fonte: Dados da pesquisa

Frente ao resultado deste ensaio preliminar, outros ensaios antioxidantes foram realizados.

- DPPH[•]

O extrato demonstrou uma baixa eficiência como sequestradora de radical DPPH[•] (IC₁₀: $118,76 \pm 28,83$ µg/mL) frente ao Trolox[®] (IC₅₀: $8,05 \pm 0,53378$ µg/mL) (Gráfico 2). O diluente Dimetilsulfóxido nas concentrações experimentais não interferiu na captura dos radicais (Tabela 2).

**Gráfico 2** – Ação sequestradora do radical DPPH 60 µM em etanol absoluto; incubação de 15 minutos (ausência de luz); $\lambda = 531$ nm.

Nota: (*): $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$; (***): $p < 0,001$ – os valores foram comparados com o valor da absorbância referente à máxima concentração de radicais sem a adição das amostras.

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 2 - Média e desvio padrão dos pontos utilizados para elaboração do Gráfico 2.

<i>P. nuda</i> µg/mL	Média	Desvio Padrão	Trolox®	Média	Desvio Padrão
166	0,5040	± 0,0469	166	0,0131 ***	± 0,0013
66	0,5676	± 0,0035	66	0,0156 ***	± 0,0038
33	0,57083	± 0,0152	33	0,0172 ***	± 0,0025
16	0,5785	± 0,0183	16	0,0142 ***	± 0,0005
13	0,5892	± 0,0214	13	0,0225 ***	± 0,0151
6,6	0,5927	± 0,0118	6,6	0,1642 ***	± 0,0219
3,3	0,5970	± 0,0096	3,3	0,3870 ***	± 0,0223
1,3	0,5939	± 0,0111	1,3	0,5098 ***	± 0,0157
Abs Max: 0,5930 (± 0,0062)			DMSO 1,3%: 0,5740 (± 0,0342)		

Nota: (*): $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$; (***): $p < 0,001$ – os valores foram comparados com o valor da absorbância referente à máxima concentração de radicais sem a adição das amostras.

Fonte: Dados da pesquisa

Saha et al. (2004) analisaram o efeito do extrato metanólico de sete plantas da família Rubiaceae provenientes da Malásia, incluindo a *Psychotria rostrata* Blume, na captação de radicais DPPH•. Entre as sete amostras da família Rubiaceae, a *Spermacoce articularis* L. f. (IC₅₀: 65 µg/mL) mostrou forte atividade em comparação com os padrões Vitamina C (IC₅₀: 9 µg/mL), quercetina (IC₅₀: 11 µg/mL), e o di-terc-butil metil fenol-BHT (IC₅₀: 12,5 µg/mL). O extrato de *Spermacoce exilis* (L.O. Williams) C.D. Adams (IC₅₀: 370 µg/mL), apresentou atividade moderada e as demais demonstraram uma atividade reduzida; segundo classificação apresentada pelos respectivos autores.

Embora Moraes et al. (2011) tenham identificado que a concentração de 100µg/mL foi capaz de inibir $42,68 \pm 5,15\%$ destas espécies radicalares na avaliação do extrato etanólico de *Psychotria nuda*; no presente trabalho não foi possível calcular a concentração necessária para reduzir em 50% a captação dos radicais, e o cálculo foi realizado para determinar a concentração capaz de inibir 10% da mesma; e o extrato testado apresentou uma inefetividade na captação de radicais DPPH•, visto que, não foi identificada diferença significativa em relação ao controle em nenhuma concentração testada.

Estes dois ensaios envolvem radicais modelos que não ocorrem em sistemas biológicos. O extrato demonstrou maior efetividade na captura dos radicais catiônicos ABTS^{•+} do que para os radicais DPPH•. Na sequência procurou-se avaliar a interação do extrato em espécies reativas presentes em sistemas orgânicos.

Ácido Hipocloroso

No modelo de sequestro de ácido hipocloroso as amostras demonstraram uma ação antioxidante, sendo o Trolox® (IC_{50} : $2,49 \pm 0,215 \mu\text{g/mL}$) mais efetivo que o extrato (IC_{50} : $359,24 \pm 4,57 \mu\text{g/mL}$) (Gráfico 3). O diluente Dimetilsulfóxido nas concentrações experimentais não interferiu na captura dos radicais (Tabela 3).

Em um estudo conduzido por Kouakou-Siransy et al. (2010), onde a quantidade de HOCl foi mensurada pela cloração da taurina foi obtido um valor de IC_{50} de $2,1 \mu\text{g/mL}$ para o extrato aquoso de *Alchornea cordifolia* Schumach. & Thonn., uma Euphorbiaceae; uma IC_{50} de $1,7 \mu\text{g/mL}$ para o extrato aquoso de *Baphia nitida* Lodd. uma Fabaceae; uma IC_{50} de $0,5 \mu\text{g/mL}$ para o extrato acetato de etila de *Alchornea cordifolia* Schumach. & Thonn., outra Euphorbiaceae e uma IC_{50} de $1,8 \text{ mg/L}$ para o extrato acetato de etila de *Cassia occidentalis* L., outra Fabaceae; o que demonstra uma atividade antioxidante superior às substâncias de referência: N-acetilcisteína (IC_{50} de $2,5 \mu\text{g/mL}$) e Mitexan (mesna) (IC_{50} $3,3 \mu\text{g/mL}$). Neste estudo esta atividade foi relacionada à presença de flavonoides.

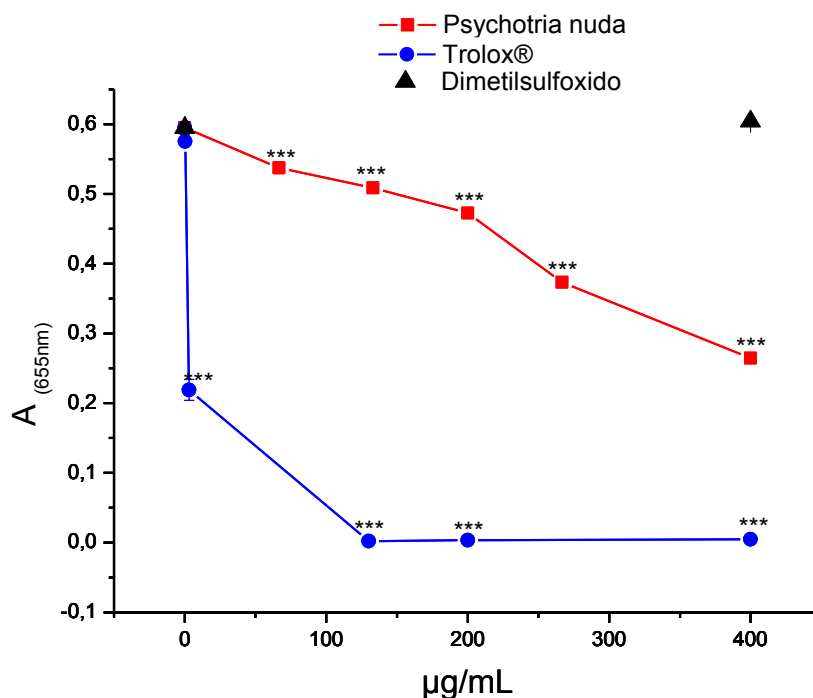


Gráfico 3 – Ação Sequestradora de HOCl (30µM) em meio tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7.4), TMB 2,8 mM. Incubação de 10 min; $\lambda=655 \text{ nm}$.

Nota: (*): $p<0,05$; (**): $p<0,01$; (***): $p<0,001$ – os valores foram comparados com o valor da absorbância referente à máxima concentração de radicais sem a adição das amostras.

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 3 - Média e desvio padrão dos pontos utilizados para elaboração do Gráfico 3.

<i>P. nuda</i> µg/mL	Média	Desvio Padrão	Trolox [®]	Média	Desvio Padrão
400	0,2638 ***	± 0,0035	400	0,0050 ***	± 0,0031
266,7	0,3727 ***	± 0,0028	200	0,0037 ***	± 0,0012
200	0,4727 ***	± 0,0012	130	0,0023 ***	± 0,0006
133	0,5085 ***	± 0,0007	3	0,2190 ***	± 0,0150
66,7	0,5350 ***	± 0,0099	0,3	0,5745	± 0,0035
Abs Max: 0,5947 (± 0,0085)			DMSO 1,3%: 0,6038 (± 0,0035)		

Nota: (*): $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$; (***): $p < 0,001$ – os valores foram comparados com o valor da absorbância referente à máxima concentração de radicais sem a adição das amostras.

Fonte: Dados da pesquisa

O extrato hidroalcoólico de *Psychotria nuda* desempenhou uma captação radicalar para o ácido hipocloroso significativa ($p < 0,001$) em todas as concentrações testadas.

Ânion Superóxido

O Trolox[®] (IC₁₅: 137,94 ± 25,48 µg/mL) e o extrato (IC₁₅: 196,92 ± 0,270 µg/mL) demonstraram reduzida ação sequestrador de O₂^{•-} em sistema gerador de superóxido (Gráfico 4). O diluente Dimetilsulfóxido nas concentrações experimentais não interferiu na captura dos radicais (Tabela 4).

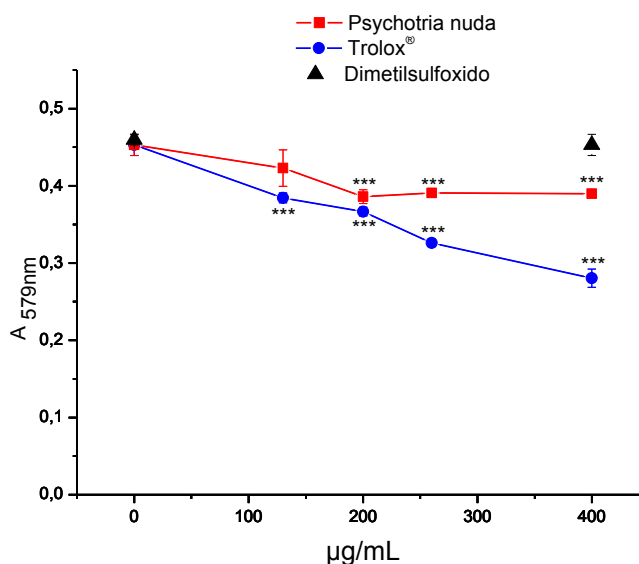


Gráfico 4 – Ação sequestrador de O₂^{•-} em meio tampão pirofosfato de sódio 25 mM (pH 8.3), NBT 60µM, PMS 372µM, NADH 1560µM. Incubação de 10 minutos do sistema gerador de superóxido com as amostras (ausência de luz), λ=560 nm.

Nota: (*): $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$; (***): $p < 0,001$ – os valores foram comparados com o valor da absorbância referente à máxima concentração de radicais sem a adição das amostras.

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 4 - Média e desvio padrão dos pontos utilizados para elaboração do Gráfico 4.

Extrato µg/mL	Média	Desvio Padrão	Trolox [®]	Média	Desvio Padrão
400	0,3898 ***	± 0,0035	400	0,2803 ***	± 0,0118
260	0,3908 ***	± 0,0045	260	0,3262 ***	± 0,0049
200	0,3860 ***	± 0,0089	200	0,3667 ***	± 0,0057
130	0,4230	± 0,0235	130	0,3845 ***	± 0,0064
Abs Max: 0,4530 (± 0,0138)			DMSO 20%:0,4597 (± 0,0065)		

Nota: (*): $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$; (***): $p < 0,001$ – os valores foram comparados com o valor da absorbância referente à máxima concentração de radicais sem a adição das amostras.

Fonte: Dados da pesquisa

Paranhos et al. (2009) analisaram atividade antioxidante da Psicolatina, um alcaloide indólico derivado da *Psychotria umbellata* Vell. No ensaio, os autores utilizaram uma concentração de 0,5 mM da amostra juntamente com um padrão positivo Trolox[®], também na concentração de 0,5 mM. Embora menos efetiva que o Trolox[®], a Psicolatina, nesta concentração foi capaz de capturar 50% dos radicais.

Neste ensaio calculou-se concentração necessária para reduzir em 15% a concentração da espécie radicalar tanto para o Trolox[®], quanto para o extrato. Em 130 µg/mL não houve diferença significativa na captura destas espécies ($p > 0,05$), sendo que a inibição radicalar é pouco efetiva.

A seguir procurou-se avaliar o comportamento do extrato frente a um modelo enzimático de oxidação de um substrato.

5.12 Interação com o modelo enzimático HRP

Na inibição da oxidação do Guaiacol pela enzima peroxidase HRP, o extrato demonstrou-se ineficiente (IC_{20} : $104,15 \pm 18,15$ µg/mL) (Gráfico 5). O diluente Dimetilsulfóxido nas concentrações experimentais não interferiu na captura dos radicais (Tabela 5).

Halliwell; Gutteridge e Aruoma, 1987 apud Alves, 2010 observam que há necessidade de checar se a substância teste não funciona como um substrato para a peroxidase o que poderia interferir na velocidade da reação, e que o radical superóxido pode inibir a peroxidase e comprometer a medida de H_2O_2 em sistemas geradores de $O_2^{\bullet-}$.

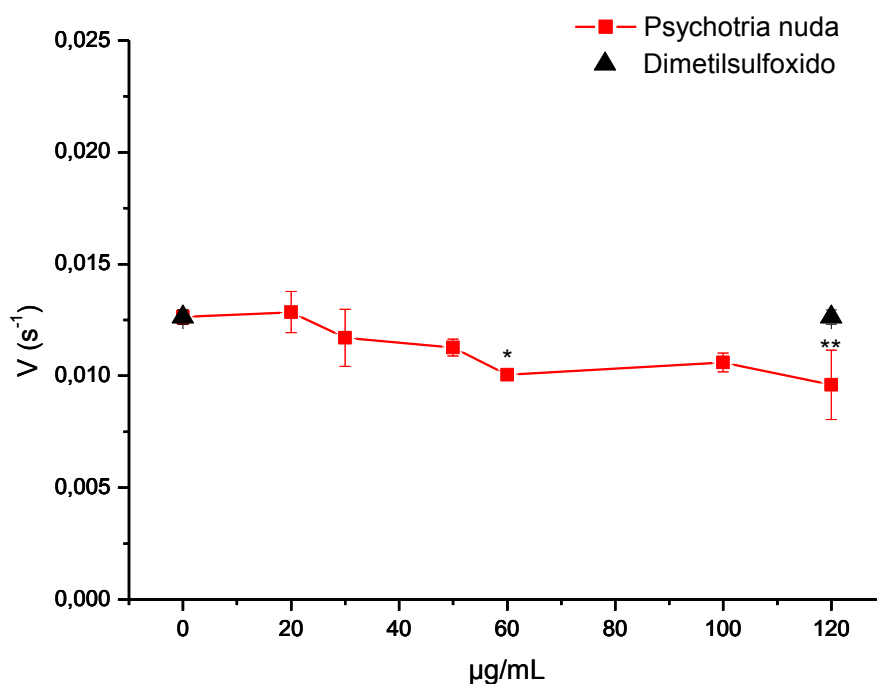


Gráfico 5 – Inibição da oxidação do Guaiacol 2 mM pela enzima HRP 7 nM em meio tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7.4), 37°C, H₂O₂ 0,1 mM; 1 minuto de reação; λ=470 nm. Nota: (*): p<0,05; (**): p<0,01; (***): p<0,001 – os valores foram comparados com o valor da absorbância referente à máxima concentração de radicais sem a adição das amostras. Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 5 - Média e desvio padrão dos pontos utilizados para elaboração do Gráfico 5.

<i>Psychotria nuda</i> µg/mL	Média	Desvio Padrão
120	0,0096 **	± 0,0015
100	0,0106	± 0,0004
60	0,0100 *	± 0,0002
50	0,0113	± 0,0004
30	0,0117	± 0,0013
20	0,0128	± 0,0009
Abs Max: 0,01263 (± 0,0003)		DMSO 12%: 0,0117

Nota: (*): p<0,05; (**): p<0,01; (***): p<0,001 – os valores foram comparados com o valor da absorbância referente à máxima concentração de radicais sem a adição das amostras. Fonte: Dados da pesquisa

Buscando dar continuidade aos ensaios de oxidação, procurou-se avaliar a interação do extrato frente a modelos celulares que possam reproduzir o dano oxidativo causado pela presença de radicais.

5.13 Interação com células

- Hemólise

Em uma etapa inicial, foi avaliada a interação entre as amostras e eritrócitos, para avaliar o possível efeito citotóxico das mesmas em diferentes concentrações. Nas concentrações testadas o extrato demonstrou um discreto efeito protetor. A hemólise se intensifica à medida que o tempo de incubação aumenta, porém o efeito protetor da amostra se mantém em todas as leituras (Gráficos 6 a 10).

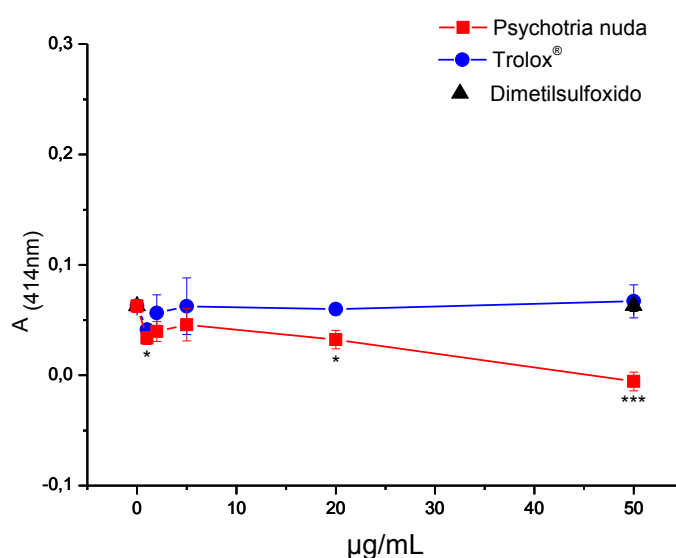


Gráfico 6 - Ação das amostras: suspensão de eritrócitos 5%; 1 hora de incubação a 37°C, tampão fosfato de sódio 10 mM / NaCl 150 mM (pH 7.4); $\lambda = 414$ nm

Nota: (*): $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$; (***): $p < 0,001$ – os valores foram comparados com o valor da absorbância referente à máxima concentração de radicais sem a adição das amostras.

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 6- Média e desvio padrão dos pontos utilizados para elaboração do Gráfico 6

<i>P. nuda</i> (µg/mL)	Média	Desvio Padrão	Trolox® (µg/mL)	Média	Desvio Padrão
50	-0,0057***	± 0,0085	50	0,0670	± 0,0150
20	0,0322*	± 0,0083	20	0,0598	± 0,0050
5	0,0457	± 0,0146	5	0,0625	± 0,0256
2	0,0397	± 0,0089	2	0,0563	± 0,0164
1	0,0337*	± 0,0058	1	0,0413	± 0,0049
Abs. máx.: 0,0627 (± 0,0059)			DMSO 0,25%: 0,06283 (± 0,00513)		

Nota: (*): $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$; (***): $p < 0,001$ – os valores foram comparados com o valor da absorbância referente à máxima concentração de radicais sem a adição das amostras.

Fonte: Dados da pesquisa

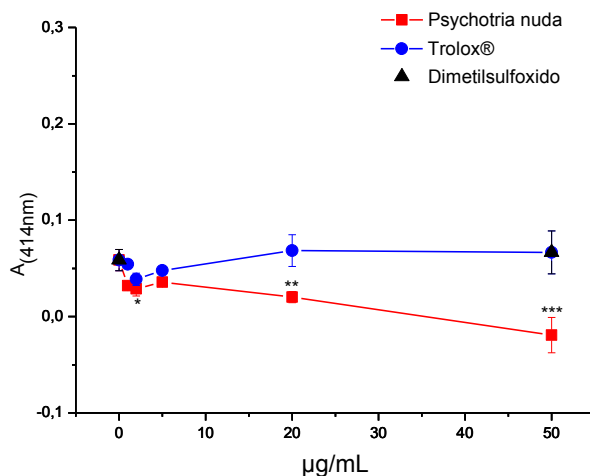


Gráfico 7 - Ação das amostras: suspensão de eritrócitos 5%; 2 horas de incubação a 37°C, tampão fosfato de sódio 10 mM / NaCl 150 mM (pH 7.4); $\lambda = 414 \text{ nm}$

Nota: (*): $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$; (***) : $p < 0,001$ – os valores foram comparados com o valor da absorvância referente à máxima concentração de radicais sem a adição das amostras.

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 7 - Média e desvio padrão dos pontos utilizados para elaboração do Gráfico 7

<i>P. nuda</i> ($\mu\text{g/mL}$)	Média	Desvio Padrão	Trolox® ($\mu\text{g/mL}$)	Média	Desvio Padrão
50	-0,0193***	$\pm 0,0183$	50	0,0667	$\pm 0,0223$
20	0,0202**	$\pm 0,0058$	20	0,0685	$\pm 0,0165$
5	0,0357	$\pm 0,0042$	5	0,0478	$\pm 0,0012$
2	0,0287*	$\pm 0,0074$	2	0,0387	$\pm 0,0064$
1	0,0320	$\pm 0,0046$	1	0,0543	$\pm 0,0040$
Abs. Max. 0,0587 ($\pm 0,0110$)			DMSO 0,25% 0,0667 ($\pm 0,0223$)		

Nota: (*): $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$; (***) : $p < 0,001$ – os valores foram comparados com o valor da absorvância referente à máxima concentração de radicais sem a adição das amostras.

Fonte: Dados da pesquisa

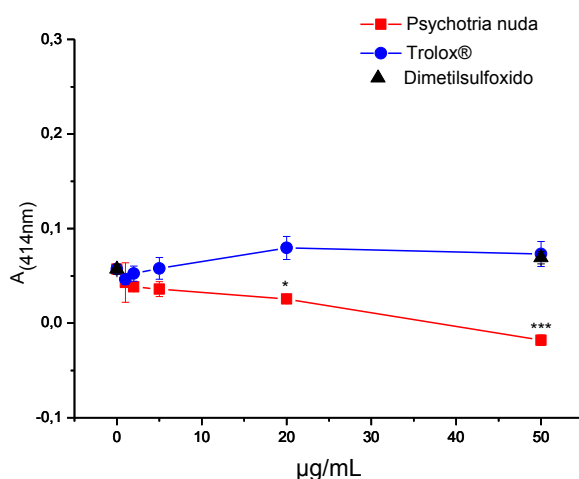


Gráfico 8 - Ação das amostras: suspensão de eritrócitos 5%; 3 horas de incubação a 37°C, tampão fosfato de sódio 10 mM / NaCl 150 mM (pH 7.4); $\lambda = 414 \text{ nm}$

Nota: (*): $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$; (***) : $p < 0,001$ – os valores foram comparados com o valor da absorvância referente à máxima concentração de radicais sem a adição das amostras.

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 8 - Média e desvio padrão dos pontos utilizados para elaboração do Gráfico 8

<i>P. nuda</i> (µg/mL)	Média	Desvio Padrão	Trolox® (µg/mL)	Média	Desvio Padrão
50	-0,0180***	± 0,0056	50	0,0730	± 0,0132
20	0,0255*	± 0,0036	20	0,0795	± 0,0121
5	0,0360	± 0,0078	5	0,0578	± 0,0115
2	0,0383	± 0,0038	2	0,0523	± 0,0081
1	0,0430	± 0,0209	1	0,0463	± 0,0055
Abs. máx.: 0,057 (± 0,0053)			DMSO 0,25%: 0,06917 (± 0,0064)		

Nota: (*): $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$; (***): $p < 0,001$ – os valores foram comparados com o valor da absorbância referente à máxima concentração de radicais sem a adição das amostras.

Fonte: Dados da pesquisa

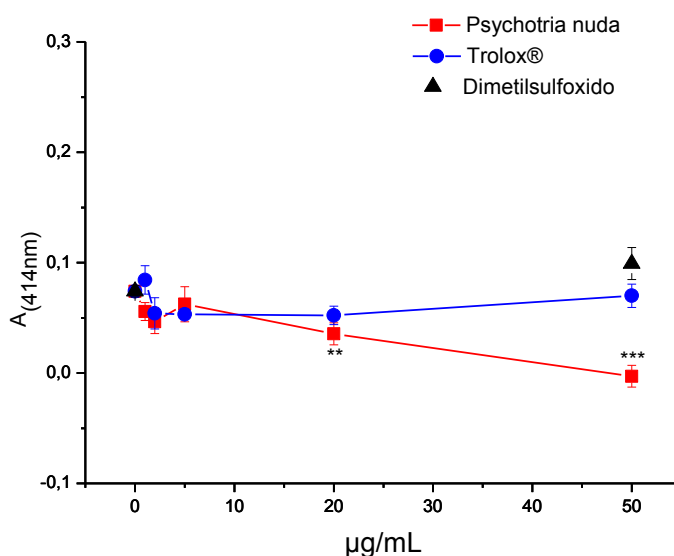


Gráfico 9 - Ação das amostras: suspensão de eritrócitos 5%; 4 horas de incubação a 37°C, tampão fosfato de sódio 10 mM / NaCl 150 mM (pH 7.4); $\lambda = 414$ nm

Nota: (*): $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$; (***): $p < 0,001$ – os valores foram comparados com o valor da absorbância referente à máxima concentração de radicais sem a adição das amostras.

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 9 - Média e desvio padrão dos pontos utilizados para elaboração do Gráfico 9

<i>P. nuda</i> (µg/mL)	Média	Desvio Padrão	Trolox® (µg/mL)	Média	Desvio Padrão
50	-0,0030***	± 0,0098	50	0,0700	± 0,0105
20	0,0355**	± 0,0100	20	0,0522	± 0,0084
5	0,0623	± 0,0159	5	0,0532	± 0,0042
2	0,0463	± 0,0106	2	0,0540	± 0,0141
1	0,0557	± 0,0081	1	0,0843	± 0,0128
Abs. máx.: 0,0740 (± 0,0052)			DMSO 0,25%: 0,0992 (± 0,0144)		

Nota: (*): $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$; (***): $p < 0,001$ – os valores foram comparados com o valor da absorbância referente à máxima concentração de radicais sem a adição das amostras.

Fonte: Dados da pesquisa

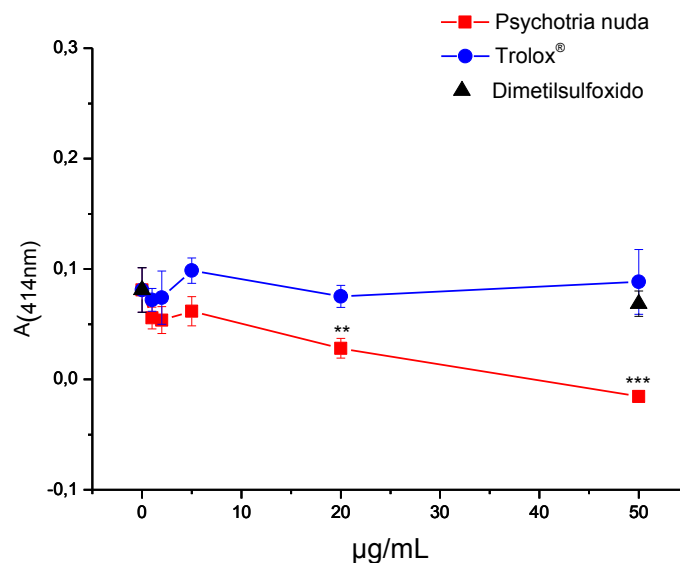


Gráfico 10 - Ação das amostras: suspensão de eritrócitos 5%; 5 horas de incubação a 37°C, tampão fosfato de sódio 10 mM / NaCl 150 mM (pH 7.4); $\lambda = 414$ nm

Nota: (*): $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$; (***): $p < 0,001$ – os valores foram comparados com o valor da absorvância referente à máxima concentração de radicais sem a adição das amostras.

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 10 - Média e desvio padrão dos pontos utilizados para elaboração do Gráfico 10

<i>P. nuda</i> (µg/mL)	Média	Desvio Padrão	Trolox® (µg/mL)	Média	Desvio Padrão
50	-0,0155***	± 0,0049	50	0,0883	± 0,0294
20	0,0282**	± 0,0089	20	0,0752	± 0,0101
5	0,0617	± 0,0132	5	0,0985	± 0,0115
2	0,0537	± 0,0122	2	0,0740	± 0,0240
1	0,0557	± 0,0099	1	0,0720	± 0,0104
Abs. máx.: 0,0810 (± 0,0202)			DMSO 0,25%: 0,0685 (± 0,0115)		

Nota: (*): $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$; (***): $p < 0,001$ – os valores foram comparados com o valor da absorvância referente à máxima concentração de radicais sem a adição das amostras.

Fonte: Dados da pesquisa

O diluente Dimetilsulfóxido nas concentrações experimentais não interferiu na viabilidade dos eritrócitos.

Em uma segunda etapa foi acrescentado o radical AAPH que apresenta uma grande ação hemolítica para verificar se as amostras seriam capazes de capturar o mesmo e reduzir os danos celulares que o mesmo exerce. A hemólise se intensifica à medida que o tempo de incubação aumenta, porém tanto a amostra quanto o Trolox® conservam um efeito protetor. Demonstrando que o extrato é capaz de sequestrar o radical AAPH sem exercer um efeito citotóxico (Gráficos 11 a 15).

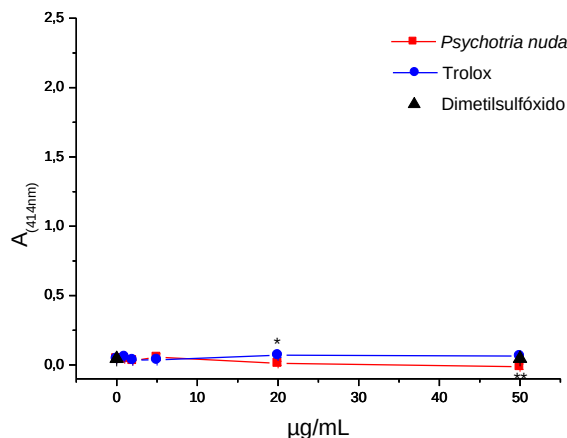


Gráfico 11: Ação das amostras: sobre a hemólise promovida pelo radical AAPH 25 mM, suspensão de eritrócitos 5%; 1 hora de incubação a 37°C, tampão fosfato de sódio 10 mM / NaCl 150 mM (pH 7.4); $\lambda = 414$ nm.

Nota: (*): $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$; (***) : $p < 0,001$ – os valores foram comparados com o valor da absorbância referente à máxima concentração de radicais sem a adição das amostras.

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 11 - Média e desvio padrão dos pontos utilizados para elaboração do Gráfico 11

<i>P. nuda</i> (µg/mL)	Média	Desvio Padrão	Trolox® (µg/mL)	Média	Desvio Padrão
50	-0,0127**	$\pm 0,0195$	50	0,0647	$\pm 0,0032$
20	0,0118	$\pm 0,0146$	20	0,0705*	$\pm 0,0157$
5	0,0560	$\pm 0,0241$	5	0,0365	$\pm 0,0053$
2	0,0313	$\pm 0,0015$	2	0,1240	$\pm 0,0020$
1	0,0450	$\pm 0,0078$	0	0,1205	$\pm 0,0074$
Abs. máx.: 0,0447 ($\pm 0,0042$)			DMSO 0,25%: 0,0455 ($\pm 0,0061$)		

Nota: (*): $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$; (***) : $p < 0,001$ – os valores foram comparados com o valor da absorbância referente à máxima concentração de radicais sem a adição das amostras.

Fonte: Dados da pesquisa

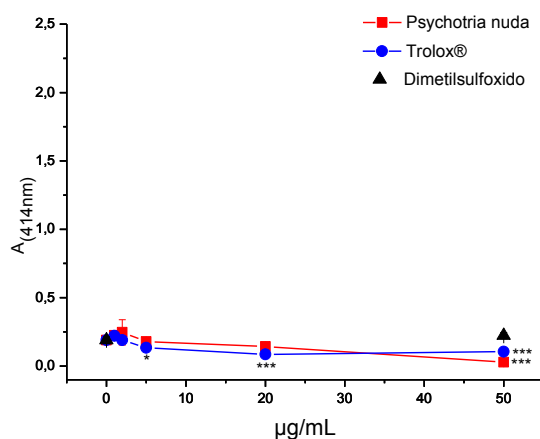


Gráfico 12 - Ação das amostras: sobre a hemólise promovida pelo radical AAPH 25 mM, suspensão de eritrócitos 5%; 2 horas de incubação a 37°C, tampão fosfato de sódio 10 mM / NaCl 150 mM (pH 7.4); $\lambda = 414$ nm

Nota: (*): $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$; (***) : $p < 0,001$ – os valores foram comparados com o valor da absorbância referente à máxima concentração de radicais sem a adição das amostras.

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 12 - Média e desvio padrão dos pontos utilizados para elaboração do Gráfico 12

<i>P. nuda</i> (µg/mL)	Média	Desvio Padrão	Trolox® (µg/mL)	Média	Desvio Padrão
50	0,0280***	± 0,0078	50	0,1057***	± 0,0217
20	0,1435	± 0,0157	20	0,0852***	± 0,0106
5	0,1793	± 0,0135	5	0,1332*	± 0,0104
2	0,2463	± 0,0926	2	0,1897	± 0,0091
1	0,2247	± 0,0214	1	0,2213	± 0,0051
Abs. máx.: 0,1900 (± 0,0233)			DMSO 0,25%: 0,2232 (± 0,0228)		

Nota: (*): $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$; (***): $p < 0,001$ – os valores foram comparados com o valor da absorbância referente à máxima concentração de radicais sem a adição das amostras.

Fonte: Dados da pesquisa

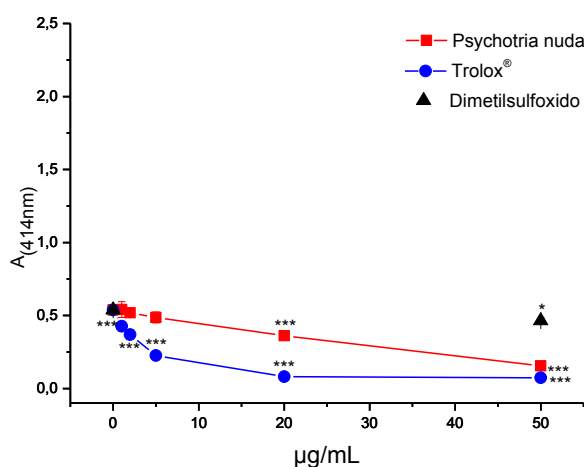


Gráfico 13 - Ação das amostras: sobre a hemólise promovida pelo radical AAPH 25 mM, suspensão de eritrócitos 5%; 3 horas de incubação a 37°C, tampão fosfato de sódio 10 mM / NaCl 150 mM (pH 7,4); $\lambda = 414$ nm

Nota: (*): $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$; (***): $p < 0,001$ – os valores foram comparados com o valor da absorbância referente à máxima concentração de radicais sem a adição das amostras.

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 13 - Média e desvio padrão dos pontos utilizados para elaboração do Gráfico 13.

<i>P. nuda</i> (µg/mL)	Média	Desvio Padrão	Trolox® (µg/mL)	Média	Desvio Padrão
50	0,1547***	± 0,0265	50	0,0737***	± 0,0070
20	0,3608***	± 0,0195	20	0,0805***	± 0,0036
5	0,4867	± 0,0384	5	0,2255***	± 0,0095
2	0,5177	± 0,0237	2	0,3697***	± 0,0328
1	0,5407	± 0,0539	1	0,4270***	± 0,0318
Abs. máx.: 0,5373 (± 0,0287)			DMSO 1,25%: 0,4635* (± 0,0173)		

Nota: (*): $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$; (***): $p < 0,001$ – os valores foram comparados com o valor da absorbância referente à máxima concentração de radicais sem a adição das amostras.

Fonte: Dados da pesquisa

Mendes et al. (2011) avaliaram a capacidade do extrato de *Arbutus unedo* L, uma Ericaceae cujos frutos são conhecidos por serem uma fonte dietética de antioxidantes que incluem compostos fenólicos, vitamina C, vitamina E e

carotenoides, em reduzir a extensão do dano oxidativo produzido pelo radical AAPH na membrana eritrocitária e encontraram uma IC_{50} : $62 \pm 0,002 \mu\text{g/mL}$ para o extrato aquoso das folhas e uma IC_{50} : $430 \pm 0,091 \mu\text{g/mL}$ para o extrato aquoso dos frutos após 3 horas de incubação; como controle utilizaram o ácido ascórbico, um antioxidante de referência, sendo que após 3 horas de incubação apresentou uma IC_{50} : $31 \pm 0,006 \mu\text{g/mL}$.

O extrato hidroalcoólico da *Psychotria nuda* (IC_{50} : $31,59 \pm 4,14 \mu\text{g/mL}$) se mostrou menos eficiente que o Trolox® (IC_{50} : $3,57 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$), porém mais eficiente que os extratos aquosos das folhas e frutos de *Arbutus unedo* L. e apresentou uma atividade comparável a do o ácido ascórbico (IC_{50} : $31 \pm 0,006 \mu\text{g/mL}$) com base nos estudos de Mendes et al. (2011); demonstrando uma relevante atividade quando se leva em consideração a natureza da amostra, um extrato bruto, frente a um composto isolado.

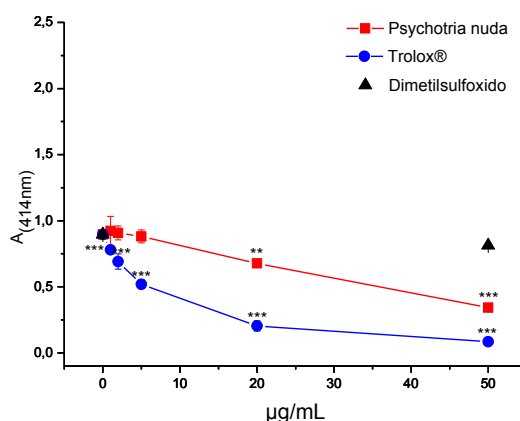


Gráfico 14 - Ação das amostras: sobre a hemólise promovida pelo radical AAPH 25 mM, suspensão de eritrócitos 5%; 4 horas de incubação a 37°C, tampão fosfato de sódio 10 mM / NaCl 150 mM (pH 7,4); $\lambda = 414 \text{ nm}$

Nota: (*): $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$; (***) : $p < 0,001$ – os valores foram comparados com o valor da absorbância referente à máxima concentração de radicais sem a adição das amostras.

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 14 - Média e desvio padrão dos pontos utilizados para elaboração do Gráfico 14

<i>P. nuda</i> (µg/mL)	Média	Desvio Padrão	Trolox® (µg/mL)	Média	Desvio Padrão
50	0,3413***	$\pm 0,0280$	50	0,0837***	$\pm 0,0159$
20	0,6768**	$\pm 0,0200$	20	0,2038***	$\pm 0,0380$
5	0,8810	$\pm 0,0487$	5	0,5185***	$\pm 0,0331$
2	0,9070	$\pm 0,0528$	2	0,6907***	$\pm 0,0584$
1	0,9220	$\pm 0,1106$	1	0,7790**	$\pm 0,0223$
Abs. máx.: 0,8947 ($\pm 0,0228$)			DMSO 0,25%: 0,8125 ($\pm 0,0113$) **		

Nota: (*): $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$; (***) : $p < 0,001$ – os valores foram comparados com o valor da absorbância referente à máxima concentração de radicais sem a adição das amostras.

Fonte: Dados da pesquisa

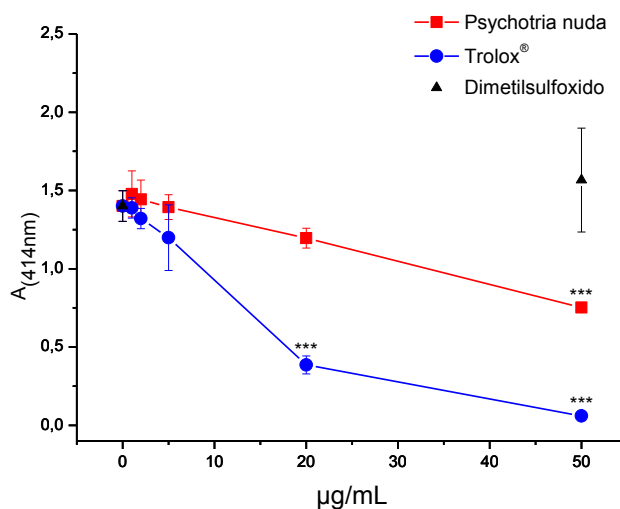


Gráfico 15 - Ação das amostras: sobre a hemólise promovida pelo radical AAPH 25 mM, suspensão de eritrócitos 5%; 5 horas de incubação a 37°C, tampão fosfato de sódio 10 mM / NaCl 150 mM (pH 7.4); $\lambda = 414$ nm

Nota: (*): $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$; (***): $p < 0,001$ – os valores foram comparados com o valor da absorbância referente à máxima concentração de radicais sem a adição das amostras.

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 15 - Média e desvio padrão dos pontos utilizados para elaboração do Gráfico 15

<i>P. nuda</i> (µg/mL)	Média	Desvio Padrão	Trolox® (µg/mL)	Média	Desvio Padrão
50	0,7523***	± 0,0180	50	0,0603***	± 0,0032
20	1,1958	± 0,0635	20	0,3858***	± 0,0574
5	1,3937	± 0,0793	5	1,1982	± 0,2099
2	1,4430	± 0,1231	2	1,3210	± 0,0648
1	1,4780	± 0,1472	1	1,5665	± 1,5665
Abs. máx.: 1,4003 (± 0,0980)			DMSO 0,25%: 1,566 (± 0,3323)		

Nota: (*): $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$; (***): $p < 0,001$ – os valores foram comparados com o valor da absorbância referente à máxima concentração de radicais sem a adição das amostras.

Fonte: Dados da pesquisa

O diluente Dimetilsulfóxido nas concentrações experimentais não interferiu na captação radicalar.

Quando o radical AAPH é adicionado à suspensão de eritrócitos, o surgimento da hemólise é tempo-dependente, indicando que antioxidantes endógenos presentes nos eritrócitos como a glutatona, α -tocoferol, L-ascorbato e enzimas como a catalase e a superóxido dismutase, podem exercer uma proteção inicial contra os radicais presentes (MENDES, et al. 2011; ZOU; AGAR; JONES, 2001). Porém esses sistemas de defesa demonstram uma limitação mediante a exposição contínua e prolongada ao radical peroxil.

Velloso (2008) sugere que pode haver uma possível afinidade entre compostos fenólicos e o radical de intensidade tal que torne praticamente

inexistente a interação da amostra com as células e reduza a interação destas com o radical, formando assim produtos com capacidade hemolítica inferior.

5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

5.2.1 Avaliação da Concentração Inibitória Mínima

Na avaliação da concentração inibitória mínima, o extrato nas concentrações e condições testadas não foi capaz de inibir o crescimento dos micro-organismos testados (Gráfico 16 a 18).

Após a leitura das absorvâncias, foi realizada a revelação com corante Trifeniltetrazólio para identificar se a turbidez identificada nas leituras era referente ao crescimento bacteriano (Tabela 16 a 17).

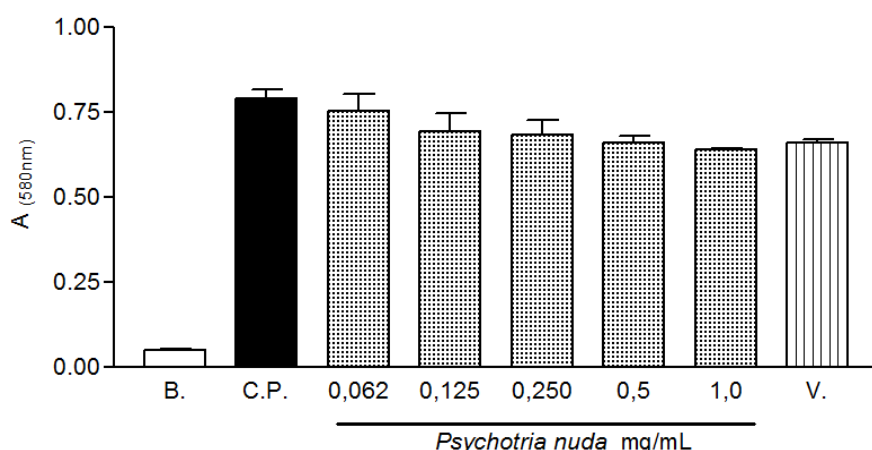


Gráfico 16 - Avaliação do crescimento da cepa de *Escherichia coli* pela leitura da turbidez.
 Legenda: B: meio Muller-Hinton; C.P.: *Escherichia coli* 10⁵ em meio Muller-Hinton, V: *Escherichia coli* 10⁵ e Dimetilsulfóxido 3,3% em meio Muller-Hinton.
 Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 16 - Avaliação da concentração inibitória mínima utilizando-se o revelador cloreto de Trifeniltetrazólio (CTT) em *Escherichia coli*.

Micro-organismos	Concentração em mg/mL do extrato hidroalcoólico de <i>P. nuda</i>				
	0,62	0,125	0,25	0,5	1,0
<i>E. coli</i>	+++	+++	+++	+++	+++
Extrato <i>Psychotria nuda</i>	-	-	-	-	-

Controle positivo: (+++); controle negativo: (-); Veículo na concentração inicial de 3,3%: (+++)

Nota: +: crescimento bacteriano; -: ausência de crescimento bacteriano.

Segundo Jayasinghea et al. (2002) o extrato metanólico das folhas e casca da *Psychotria gardneri* (Thwaites) Hook. f., o extrato metanólico da casca de *Psychotria nigra* (Gaertner) Alston e o extrato diclorometano das folhas e casca

da *Psychotria stenophylla* (Thwaites) Hooker apresentaram atividade contra a *Escherichia coli* no método de avaliação microbiológica de disco difusão.

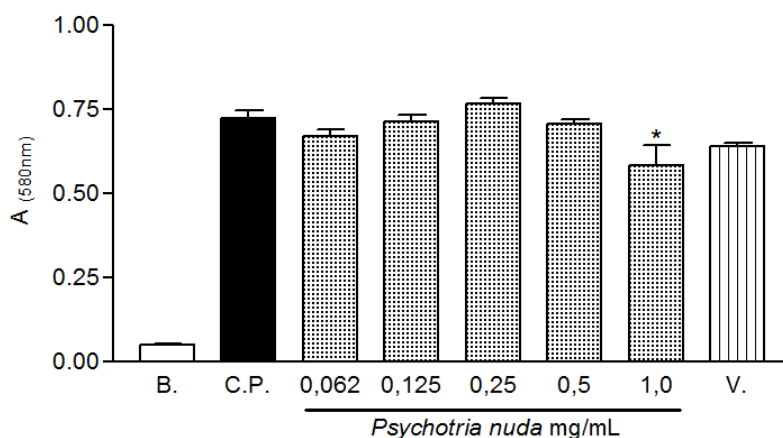


Gráfico 17 - Avaliação do crescimento da cepa de *Staphylococcus aureus* pela leitura da turbidez. Legenda: B: meio Muller-Hinton; C.P.: *S. aureus* 10^5 em meio Muller-Hinton, V: *S. aureus* 10^5 e Dimetilsulfóxido 3,3% em meio Muller-Hinton.

Nota: (*): $p < 0,05$ – os valores foram comparados com o valor da absorbância referente ao controle.

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 17 - Avaliação da concentração inibitória mínima utilizando-se o revelador cloreto de Trifeniltetrazólio (CTT) em *Staphylococcus aureus*.

Micro-organismos	Concentração em mg/mL do extrato hidroalcoólico de <i>P. nuda</i>				
	0,062	0,125	0,25	0,5	1,0
<i>S. aureus</i>	+++	+++	+++	+++	+++
Extrato <i>Psychotria nuda</i>	-	-	-	-	-

Controle positivo: (+++); controle negativo: (-); Veículo na concentração inicial de 3,3%: (+++)

Nota: +: crescimento bacteriano; -: ausência de crescimento bacteriano.

Para avaliação antibacteriana de extratos vegetais considera-se que concentrações abaixo de 100 $\mu\text{g/mL}$ representam uma boa atividade, entre 100-500 $\mu\text{g/mL}$ apresentam atividade moderada, de 500-1000 $\mu\text{g/mL}$ uma atividade fraca e são considerados inativos concentrações maiores que 1000 $\mu\text{g/mL}$ (AYRES et al., 2008; DALL AGNOL et al., 2003; RIOS; RECIO; VILLAR, 1998). Nessas condições o extrato em questão mostrou-se inativo frente às cepas testadas.

O extrato também não demonstrou atividade antifúngica frente à cepa de *Candida albicans* (Gráfico 18).

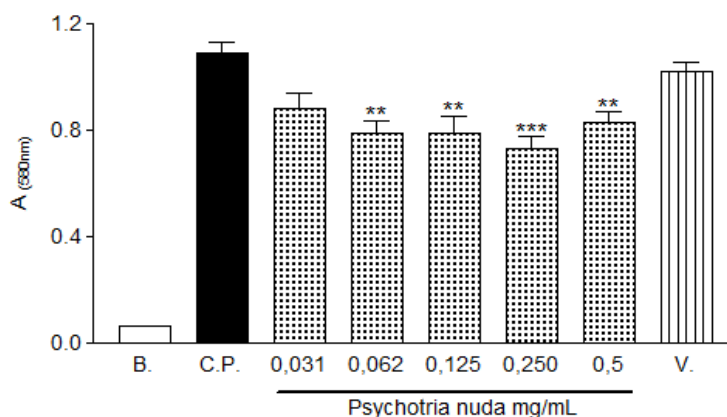


Gráfico 18 - Avaliação do crescimento da cepa de *Candida albicans* pela leitura da turbidez.

Legenda: B: meio Muller-Hinton 2% glicose; C.P.: *C. albicans* 10⁶ em meio Muller-Hinton 2% glicose, V: *C. albicans* 10⁶ e Dimetilsulfóxido 1,6% em meio Muller-Hinton 2% glicose.

Nota: (**): $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$ - os valores foram comparados com o valor da absorbância referente ao controle.

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 18 - Avaliação da concentração inibitória mínima utilizando-se o revelador cloreto de Trifeniltetrazólio (CTT) em *Cândida albicans*.

Micro-organismos	Concentração em mg/mL do extrato hidroalcoólico de <i>P. nuda</i>				
	0,031	0,062	0,125	0,25	0,5
<i>Candida albicans</i>	+++	+++	+++	+++	+++
Extrato <i>Psychotria nuda</i>	-	-	-	-	-

Controle positivo: (+++); controle negativo: (-); Veículo na concentração inicial de 1,6%: (+++)

Nota: +: crescimento fúngico; -: ausência de crescimento fúngico.

Nos poços onde várias concentrações do extrato foram incubadas somente com o meio de cultura, não houve crescimento microbiológico, eliminando a possibilidade de contaminação prévia do referido extrato.

Embora segundo Langkield et al. (2004) a utilização de um indicador colorimétrico elimina a necessidade de um leitor de placas espectrofotométrico e evita a ambiguidade associada comparação visual ou de medição de anéis de inibição de crescimento em placas de Agar; no presente estudo as duas metodologias foram aplicadas.

5.22 Avaliação da Concentração Bactericida Mínima

Na avaliação da concentração bactericida mínima, o extrato nas concentrações e condições testadas não apresentou propriedade bactericida. As Tabelas 19 e 20 apresentam a avaliação microbiológica do extrato e resultado da

avaliação do crescimento microbiano frente às cepas testadas inoculadas em placas de Agar Muller-Hinton e Agar Sangue.

Tabela 19 - Determinação da concentração bactericida mínima em placa contendo meio Muller-Hinton

Micro-organismos	Concentração em mg/mL do extrato hidroalcoólico de <i>P. nuda</i>				
	0,062	0,125	0,25	0,5	1,0
<i>S. aureus</i>	+++	+++	+++	+++	+++
<i>E. coli</i>	+++	+++	+++	+++	+++
Extrato <i>Psychotria nuda</i>	-	-	-	-	-
Controle positivo: (+++); controle negativo: (-); Veículo na concentração inicial de 3,3%: (+++)					

Nota: +: crescimento bacteriano; -: ausência de crescimento bacteriano.

Tabela 20 - Determinação da concentração bactericida mínima em placa de Agar sangue.

Micro-organismos	Concentração em mg/mL do extrato hidroalcoólico de <i>P. nuda</i>				
	0,031	0,062	0,125	0,25	0,5
<i>Candida albicans</i>	++	+++	+++	+++	+++
Extrato <i>Psychotria nuda</i>	-	-	-	-	-
Controle positivo: (+++); controle negativo: (-); Veículo na concentração inicial de 1,6 %: (+++)					

Nota: +: crescimento fúngico; -: ausência de crescimento fúngico.

As diferentes concentrações do extrato inoculadas em Agar Muller-Hinton e Agar sangue não apresentaram crescimento microbiológico, confirmando a ausência de contaminação prévia do referido extrato. Foi possível estabelecer relação entre a concentração inibitória mínima, concentração bactericida mínima, corroborando os resultados obtidos.

5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA

Frente ao resultado obtido nos modelos antioxidantes, em especial, no modelo de peroxidação lipídica da membrana de eritrócitos, procurou-se avaliar o potencial citotóxico do extrato.

5.31 Ensaio MTT em linhagem celular HACAT

Como descrito anteriormente, a linhagem de células HaCaT é uma célula epitelial humana imortalizada que apresenta diferenciação dos queratinócitos normais, o que o torna um útil modelo de sistema *in vitro* para determinar os mecanismos de regulação durante a diferenciação de células da epiderme

humana (UDENSI et al., 2011). O extrato apresentou uma elevada toxicidade para estas células CL_{50} : $7,72 \pm 1,22 \mu\text{g/mL}$ (Gráfico 19).

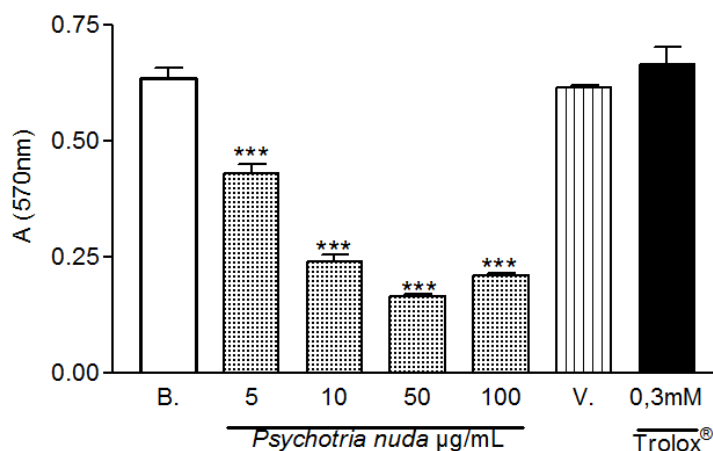


Gráfico 19: Avaliação da viabilidade celular da linhagem HaCaT pelo ensaio MTT

Legenda: B: meio DMEN; V: HaCaT (7.10^3), Dimetilsulfóxido 0,6% em DMEN.

Nota: (*): $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$; (***) : $p < 0,001$ - os valores foram comparados com o valor da absorbância referente ao Branco.

Fonte: Dados da pesquisa

5.32 Ensaio MTT em linhagem celular NIH3T3

A célula NIH3T3, um fibroblastos de célula embrionária de camundongo, é amplamente utilizada para estudar o efeito da citotoxicidade dos compostos e das plantas, em modelos *in vitro* (LING et al., 2011). Para este ensaio o extrato apresentou uma CL_{50} : $61,65 \pm 5,12 \mu\text{g/mL}$ (Gráfico 20).

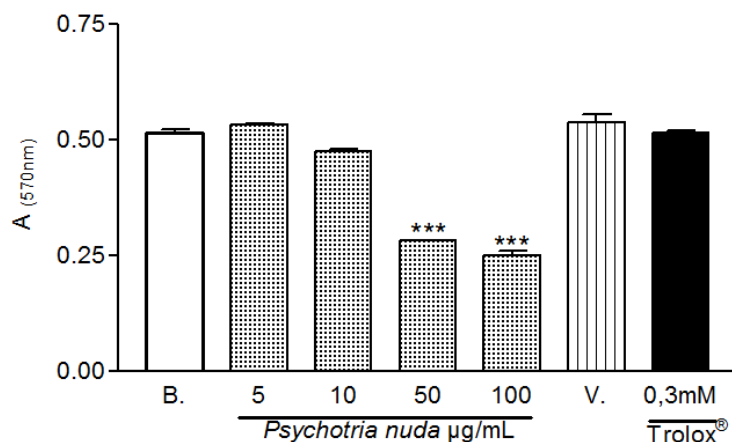


Gráfico 20 - Avaliação da viabilidade celular da linhagem NIH3T3 pelo ensaio MTT

Legenda: B: meio DMEN; V: NIH3T3 (7.10^3), Dimetilsulfóxido 0,6% em DMEN.

Nota: (*): $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$; (***) : $p < 0,001$ os valores foram comparados com o valor da absorbância referente ao Branco.

Fonte: Dados da pesquisa

Smee et al. (2002) relatam que pelo fato do reagente MTT sofrer uma conversão enzimática no interior de células viáveis, compostos de diferentes naturezas poderiam reagir com as enzimas e interferir na avaliação da citotoxicidade, podendo conferir ao composto uma superestimativa da toxicidade. Além disso, compostos com coloração intrínseca podem interferir em ensaios colorimétricos. Neste sentido é recomendado que outro método seja testado em paralelo.

Como o MTT e o vermelho neutro são provavelmente os indicadores colorimétricos mais comumente utilizados (SMEE et al., 2002), buscou-se avaliar na sequência a metodologia de incorporação do Corante Vermelho Neutro.

5.33 Ensaio Vermelho Neutro em linhagem celular HACAT

Neste ensaio o vermelho neutro, que é um corante catiônico fraco, penetra e se acumula nos lisossomos de células vivas, sendo possível a avaliação da viabilidade celular (FOTAKIS; TMBRELL, 2006). O resultado deste ensaio (CL_{50} : $6,07 \pm 0,79 \mu\text{g/mL}$) corrobora com o resultado obtido com a mesma linhagem celular pelo método do MTT (Gráfico 21).

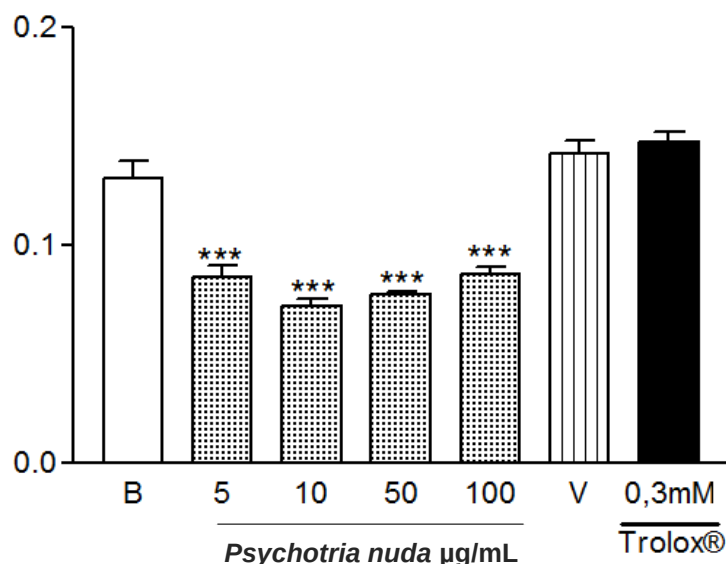


Gráfico 21: Avaliação da viabilidade celular da linhagem HaCaT pelo de Incorporação do Vermelho Neutro

Legenda: B: meio DMEN; V: HaCaT (7.10^3), Dimetilsulfóxido 0,6% em DMEN.

Nota: (*): $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$; (***) : $p < 0,001$ - os valores foram comparados com o valor da absorbância referente ao Branco.

Fonte: Dados da pesquisa

5.34 Ensaio Vermelho Neutro em linhagem celular NIH3T3

Neste ensaio, para o fibroblasto NIH3T3, a amostra não interferiu na viabilidade celular nas concentrações testadas, diferentemente do resultado obtido no modelo citotoxicidade pelo MTT; o que demonstra a importância de analisar duas metodologias distintas para avaliação da citotoxicidade para extratos brutos, como já citado por Smee et al. (2002) (Gráfico 22).

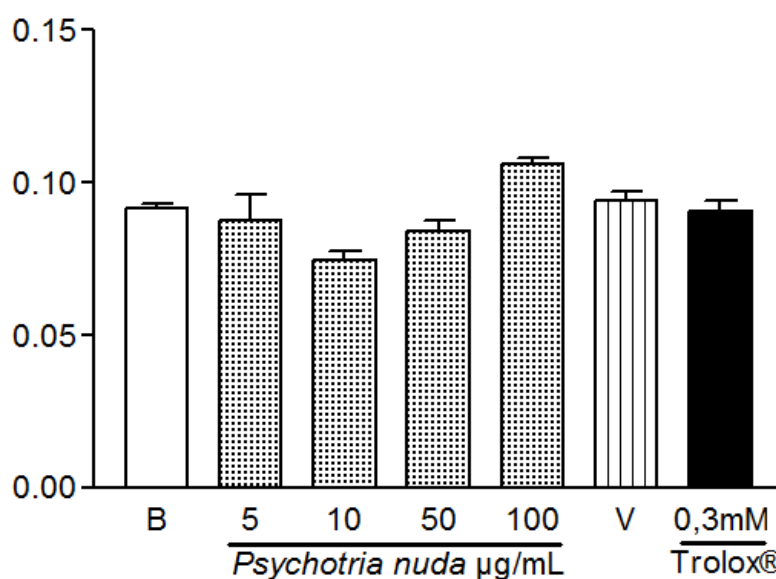


Gráfico 22: Avaliação da viabilidade celular da linhagem NIH3T3 pelo método de Incorporação do Vermelho Neutro.

Legenda: B: meio DMEN; V: NIH3T3 ($7 \cdot 10^3$), Dimetilsulfóxido 0,6% em DMEN.

Fonte: Dados da pesquisa

Em um estudo conduzido por Borenfreud, Babich, Martin-Aluacil (1987), vinte e oito agentes com diferentes potenciais de toxicidade foram testados nos métodos de MTT e NR para linhagens de BALB/c e 3T3. Neste estudo os autores estabeleceram uma boa correlação entre os resultados obtidos pelas duas metodologias.

6 CONCLUSÃO

No presente estudo, o extrato hidroalcoólico de *Psychotria nuda* (Cham. e Schltdl.) Wawra:

- Apresentou ação de captação do radical catiônico ABTS^{•+}
- Foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica induzida pelo radical AAPH nos eritrócitos.
- Não apresentou atividade citotóxica para eritrócitos
- Demonstrou uma atividade sobre a captação do ácido hipocloroso
- Apresentou atividade reduzida para os modelos de captação do radical DDPH[•], ânion superóxido, e no modelo enzimático de oxidação induzida pelo HRP.
- Não demonstrou atividade antibacteriana frente à cepa de *Staphylococcus aureus* e de *Escherichia coli*; também não demonstrou atividade fungicida frente à cepa de *Candida albicans*.
- O extrato também revelou uma elevada citotoxicidade nos modelos de avaliação da viabilidade celular pelo MTT e pela incorporação do corante Vermelho Neutro frente à linhagem epitelial HaCaT e moderada atividade citotóxica no modelo de avaliação da viabilidade celular pelo MTT de fibroblastos embrionários de camundongo NIH3T3, não exercendo citotoxicidade para estas células no modelo de incorporação do corante Vermelho Neutro nas concentrações testadas.

O extrato demonstrou atividade antioxidante e citotóxica. A avaliação das atividades biológicas do extrato bruto permite a condução de novas pesquisas para a identificação das moléculas biologicamente ativas.

O extrato de *Psychotria nuda* (Cham. e Schltdl.) Wawra não possui estudos aprofundados sobre suas atividades biológicas até o presente momento. A pesquisa contribui então para uma maior compreensão das mesmas, bem como demonstra a necessidade de continuidade de novos estudos biológicos e fitoquímicos.

REFERÊNCIAS

- AARON, P.; BRIDSON, D.; JARVIS, C.; GOVAERTIS, R. The Typification and Characterization of the Genus *Psychotria* L. (Rubiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 135, p. 35-42, 2001.
- ABBAS, K.; LICHTMAN, A. Basis Immunology: with student consult acess. 2^a ed., Philadelphia: W.B. Saunders Co., 2007.
- ACHENBACH, H; LOTTES, M. WAIBEL, R; KARIKAS, G. A.; CORREA, M. D. GUPTA, M. P. Alkaloids and Other Compounds from *Psychotria correae*. **Phytochemistry**, v. 38, n. 6, p. 1537-1545, 1995.
- AKINPELU, D. A.; ADEGBOYE, M. F.; ADELLOYE, O. A. Biocidal Activity of Partially Purified Fractions from Methanolic Extract of *Garcinia kola* (Heckel) Seeds on Bacterial Isolates. **Biol. Res.**, v. 41, p. 277-287, 2008.
- ALMEIDA, E. M.; ALVES, M. A. S. P. Fenologia de *Psychotria nuda* e *P. brasiliensis* (rubiceae) em uma Área de Floresta Atlântica do Sudeste do Brasil. **Acta Bot. Bras.**, v. 14, n. 3, p. 335-346, 2000.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Food Chem. Métodos para Determinação de Atividade Antioxidante *in vitro* em Substratos Orgânicos. **Quim. Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA J. R. A.; ZANI, C. L.; Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v.95, n.3, Rio de Janeiro: May/Jun, 2000.
- AYRES, M. C. C.; BRANDÃO, M. S.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; MENOR, J. C. A. S.; SILVA, H. B.; SOARES, M. J. S.; CHAVES, M. H. Atividade Antibacteriana de Plantas Úteis e Constituintes Químicos da Raiz de *Copernicia prunifera*. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.18, n. 1, p. 90-97, 2008.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B; ALFENAS, R. C. G; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Oxidative Stress: concept, implications and modulating factors. **Rev. Nutr.**, v. 23, n.4, Campinas July/Aug, 2010.
- BARCLAY, L. R. S; VINQUIST, M. R. **Phenols as Antioxidants**. In: Rappoport, Z. The Chemistry of Phenols. Ed Wiley: New York. p. 839-908. 2003.
- BARREIRO, E. J. Produtos Naturais Bioativos de Origem Vegetal e o Desenvolvimento de Fármacos. **Química Nova**, v. 13, n. 1, 1990.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. **Methods Enzymol.**, v. 299, p.15-27, 1999.

BERG, R. V. D.; HAENEN, G. R. M. M.; BERG, H. V. D.; WIM, V. D. V.; BAST, A. The Predictive Value of the Antioxidant Capacity of Structurally Related Flavonoids Using the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) Assay. **Food Chemistry**, v. 70, N. 3, p. 391-395, 2000.

BEYER, J.; DRUMMER, O. H.; MAURER, H. H. Analysis of Toxic Alkaloids in Body Samples. **Forensic Sci. Int.**, v. 185, 2009.

BORENFREUD, E.; BABICH, H.; MARTIN-ALGUACIL, N. Comparisons of Two *In Vitro* Cytotoxicity Assays – the Neutral Red (NR) and Tetrazolium MTT Tests. **Toxic. In Vitro**, v. 2, n. 1, p. 1-6, 1988.

BRAGA, A. C. C.; SILVA, A. E.; PELAIS, A. C. A.; BICHARA, C. M. G.; POMPEU, D. R. Atividade Antioxidante e Quantificação de Compostos Bioativos dos Frutos de Abriçó (*Mammea americana*). **Alim. Nutr.**, v. 21, n. 1, p. 31-36, 2010.

BRASIL. **Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada**- Oitava Edição. v. 23, n.01, 2005.

BROWN, D. I.; GRIENDLING, K. K.; Nox Proteins in Signal Transduction. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 47, n. 9, p. 1239-1253, 2009.

CAMARGO, L. E. A. **Avaliação das Atividades Antioxidante e Antifúngica da *Camellia sinensis* (L.) Kuntze Obtida por Diferentes Formas de Produção**. Universidade Estadual Do Centro-Oeste-Programa De Pós-Graduação Em Ciências Farmacêuticas, 2011.

CARMICHAEL, J.; DEGRAFF, W. G.; GAZDAR, A. F.; MINNA, J. D.; MITCHEL, J. B. Evaluation of Tetrazolium Based Semiautomated Colorimetric Assay: assessment of chemosensitivity testing. **Cancer Rev.**, v. 47, n. 4, p. 936-942, 1987.

CERQUEIRA, F. M.; GENNARI, M. H; AUGUSTO, O. Dietetic Antioxidants: Controversies and Perspectives. **Quím. Nova**, v. 30, n. 2, 2007.

CHOUDHURY, K. D.; CHOUDHURY, M. D.; BARUAH, M. Anti Bacterial Activity of Some Plants Belonging to the Family Rubiaceae: A Review. **World Journal of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences**, v. 1, n. 3, p.1179-1194, 2012.

COSTA, M.; XIMENES, V. F.; FONSECA, L. M. Hypochlorous Acid Inhibition by Acetoacetate: Implications on Neutrophil Functions. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 27, n.8, p. 1183-1187, 2004.

DALL AGNOL, R.; FERRAZ, A. A.; BERNARDI, A. P.; ALBRING, D.; NOR, C.; SARMENTO, L.; LAMB, L.; HASS, M.; VON POSER, G.; ACHAPOVAL, E. E. S. Antimicrobial Activity of Some *Hypericum* species. **Phytomedicine**, v. 10, n. 6-7, p. 511-516, 2003.

DAVID, C. Q. A. J.; DAVID, J. O.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para Determinação de Atividade Antioxidante *in vitro* em Substratos Orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

DOERGE, D. R.; DIVI, R. L.; CHURCHWELL, M. I.; Identification of the Colored Guaiacol Oxidation Product Produced by Peroxidases. **Analytical Biochemistry**, v. 250, n. 1, p. 10-17, 1997.

ELOFF, J. N. A Sensitive and Quick Microplate Method to Determine the Minimal Inhibitory Concentration of Plant Extracts for Bacteria. **Planta Med.**, v. 64, n. 8, p. 711-713, 1998.

ESMERINO, L. A.; PEREIRA, A. V.; ADAMOWICZ, T.; BORGES, D. M.; TALACIMON, E. A.; SCHELESKY, M. E. Método Microbiológico para Determinação da Potência de Antimicrobianos. **UEPG Ci. Biol. Saúde**, v.10, n. 01, p. 53-60, 2004.

FACCHINI, P. J. Alkaloid Biosynthesis in Plants: Biochemistry, Cell Biology, Molecular Regulation, and Metabolic Engineering Applications. **Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 52, p. 29-66, 2001.

FENNEL, C. W.; LINDSEY, K. L.; Mc GAW, L. J.; SPARG, S.G.; STAFFORD, G. I.; ELGORASHI, E. E.; GRACE, O. M.; VAN STADEN, J. Review: Assessing African Medicinal Plants for Efficacy and Safety: pharmacological screening and toxicology. **J. Ethnopharmacol.**, v.94, p.205-217, 2004.

FERRARI, C. K. B. Capacidade Antioxidante Total (CAT) em Estudos Clínicos, Experimentais e Nutricionais. **J. Health Sci. Inst.**, v. 28, n.4, p. 307-310, 2010.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, v.12, p. 175-204, 2000.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v.43, n.1, 1997.

FILHO, R. B. Contribuição da Fitoquímica para o Desenvolvimento de um País Emergente. **Quim. Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.

FONSECA, L. C. N.; ALMEIDA, E. M.; ALVES, M. A. Phenology, Floral Morphology and Visitors of *Psychotria brachypoda* (Müll. Arg.) Britton (Rubiaceae) in Atlantic Forest, Southeastern Brazil. **Acta Bot. Bras.**, v. 22, n.1, São Paulo, Jan./Mar 2008.

FORREST, V. J.; KANG, Y. H.; McLAIN, D. E.; ROBINSON, D. H.; RAMAKRISHNAN, N. Oxidative Stress Induced Apoptosis Prevented by Trolox. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 16, n. 6, p. 675-684, 1994.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A.; *In Vitro* Cytotoxicity Assays: Comparison of LDH, Neutral Red, MTT And Protein Assay in Hepatoma Cell Lines Following Exposure to Cadmium Chloride. **Toxicology Letters**, v. 160, n. 2, p. 171-177, 2006.

FRAGOSO, V. **Alcalóides de *Psychotria*: fotorregulação e Propriedades Antioxidantes e Antimutagências**. Dissertação de Mestrado do Programa de

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

FUKAI, T.; FUKAI, M. U. Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 15, n. 6, p.1583-1606, 2011.

GUARATINI, T.; MEDEIROS, M. H. G.; COLEPICOLO, P. Antioxidantes na Manutenção do Equilíbrio Redox Cutâneo: Uso e Avaliação de sua Eficácia. **Quim. Nova**, v. 30, n. 1, p. 206-213, 2007.

GUZIK, T. J.; HARRISON, D. G. Vascular NADPH Oxidases as Drug Targets for Novel Antioxidant Strategies. **Drug Discov. Today**, v. 11, p. 524–533, 2006.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of Free Radicals and Catalytic Metal Ions in Human Disease: an overview. **Methods in Enzimology**, v. 186, p. 1-85, 1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; ARUOMA, O. E. I.; **Anal. Biochem.**, v. 165, p. 215, 1987.

HAWKINS, C. L.; PATTISON, D. I.; DAVIES, M. J. Reaction of Protein Chloramines with DNA and Nucleosides: Evidence for the Formation of Radicals, Protein–DNA Cross-Links and DNA. **Fragmentation. Biochem. J.**, v. 365, p. 605-615, 2002.

JANNIC, V.; GUÉRITTE, F.; LAPRÉVOTE, O.; SERANI, L.; MARTIN, M. T.; SÉVENET, T.; POTIER, P. Pyrrolidinoindoline Alkaloids from *Psychotria oleoides* and *Psychotria lyciiflora*. **Nat. Prod.**, v. 62, p. 838-843, 1999.

JAYASINGHEA, U. L. B.; JAYASOORIYAA, C. P.; BANDARAB, B. M. R.; EKANAYAKEC, S. P.; MERLINID, L.; ASSANTEE, G. Antimicrobial Activity of Some Sri Lankan Rubiaceae and Meliaceae. **Fitoterapia**, v. 73, p. 424, 2002.

JOLY, L. G.; GUERRA, S.; STIPTIMOP, R.; SOL, P. N.; CORREA, M. GUPTA, M; LEVYC, S.; SANDBERG, F. Ethnobotanical Inventory of Medicinal Plants Used by the Guayami Indians in Western Panama. Part I. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 20, p. 145-171, 1987.

KATO, L.; OLIVEIRA, C. M. A.; FARIA, E. O.; RIBEIRO, L. C.; CARVALHO, B. G.; SILVA, C. C.; SCHUQUEL, I. T. A.; SANTIN, S. M. O.; NAKAMURA, C. V.; BRITTA, E. A.; MIRANDA, N; IGLESIAS, A. H.; DELPRETE, P. G. Antiprotozoal Alkaloids from *Psychotria prunifolia* (Kunth) Steyerl. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 23, n. 2, p. 355-360, 2012.

KELLY, K. **History of medicine**. New York: Facts, p. 29-50, 2009.

KHALIL, N. M. **Interação Nicotina-Peroxidase (Mieloperoxidase e Horseradish): implicações no burst oxidativo de leucócitos polimorfonucleares**. 2002. 99p. Dissertação de Mestrado em Análises Clínicas –

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.

KONRATH, E. L. **Investigação in vitro do Efeito Neurotóxico, Antioxidante e Anticolinesterásico de Alcalóides e Avaliação de Parâmetros de Estresse Oxidativo em Fatias de Hipocampo Submetidas à Privação de Oxigênio e Glicose**. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

KOUAKOU-SIRANSY, G.; SAHPAZ, S.; IRIÉ-NGUESSAN, G.; DATTE, Y. J.; KABLAN, J.; GRESSION, B.; BAILLEUL, F. Oxygen Species Scavenger Activities and Phenolic Contents of Four West African Plants. **Food Chemistry**, v. 118, n. 2, p. 430-435, 2010.

KUANAR, A.; MOHANTY, S.; PANDA, M. K.; SUBUNDHI, E. *In Vitro* Antimicrobial Study of Plant Essential Oils Extracts. **The Internet Journal of Microbiology**, v. 8, n. 1, 2010.

LANGFIELD, R. D.; SCARANO, F. J.; HEITZMAN, M. E.; KONDO, M.; HAMMOND, G. B.; NETO, C. C. Use of a Modified Microplate Bioassay Method to Investigate Antibacterial Activity in the Peruvian Medicinal Plant *Peperomia galioides*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, Issues 2-3, p. 279-281, 2004.

LIMA, M. R. F.; XIMENES, E. C. P. A.; LUNA, J. S.; SANT'ANA, A. E. G. The Antibiotic Activity of Some Brazilian Medicinal Plants. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.16, n.3, João Pessoa, Jul/Set. 2006.

LING, L. T.; RADHAKRISHNAN, A. K.; SUBRAMANIAM, T.; CHENG, H.M.; PALANISAMY, U. D. Assessment of Antioxidant Capacity and Cytotoxicity of Selected Malaysian Plants. **Molecules**, v. 15, p. 2139-2151, 2010.

LIPINSKI, B. Hydroxyl Radical and Its Scavenger in Health and Disease. **Oxid Med. Cell. Longev.**, 2011.

MACHANA, S.; WEERAPREEYAKUL, N.; BARUSRUX, S.; NONPUNYA, A.; SRIPANIDKULCHAI, B.; THITIMETHAROCH, T. Cytotoxic and Apoptotic Effects of Six Herbal Plants Against the Human Hepatocarcinoma (HepG2) Cell Line. **Chinese Medicine**, v. 6, n. 1, p. 39, 2011.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F.; GRYBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: A necessidade de Estudos Multidisciplinares. **Quim. Nova**, v. 25, n. 3, p.429-438, 2002.

MADAMANCHI, N. R.; RUNGE, M. S. Mitochondrial Dysfunction in Atherosclerosis. **Circ. Rev.**, v. 100, p. 460–473, 2007.

MALECH, H. L.; GALLIN, J. I. Current Concepts: Immunology. Neutrophils in Human Diseases. **N. Engl. J. Med.**, v. 317, p. 687–694, 1987.

MANENTE, F. A.; MELLO, L. R. A.; KHALIL, O. A. K.; CARVALHO, C. T.; BANNACH, G.; VELLOSO, J. C. R. Effect of Metal Complexation to Anti-

inflammatory Over the Action Against Oxidative and Free Radicals: Ketoprofen Action. **Eclet. Quím.**, v.36, n.2, 2011.

MANSUR, M. C. P. P. R. **Estudo Preliminar das Atividades Fotoprotetora e Antioxidante dos Extratos das Folhas de *Bauhinia microstachya* var. *massambabensis* Vaz numa Formulação Antissolar.** Tese de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2011.

MENDES, L.; FREITAS, V.; BAPTISTA, P.; CARVALHO, M. Comparative Antihemolytic and Radical Scavenging Activities os Strawberry Tree (*Arbutus unedo* L.) Leaf and Fruit. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n.9, p. 2285-2291, 2011.

MIGUEL, E. C.; MORAES, D. G.; CUNHA, M. Stipular Colleters in *Psychotria nuda* (Cham. & Schltdl.) Wawra (Rubiaceae): micromorphology, anatomy and crystals microanalysis. **Acta Bot. Bras.**, v.23, n.4, São Paulo, Dec, 2009.

MIRIYALA, S.; HOLLEY A. K.; CLAIR, D. K. S. Mitochondrial Superoxide Dismutase - Signals of Distinction. **Anticancer Agents Med Chem**, v.11, n.2. p. 181–190. 2011.

MORAES, T. M.; DE ARAÚJO, M. H.; BERNARDES, N. R.; DE OLIVEIRA, D. B.; LASUNSKAIA, E. B.; MUZITANO, M. F.; DA CUNHA, M. Antimycobacterial Activity and Alkaloid Prospection of *Psychotria* species (Rubiaceae) from the Brazilian Atlantic Rainforest. **Planta Med.**, v. 77, n. 9, p. 964-970, 2011.

MOSMANN T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **J. Immunol. Met.**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MURADOR, P.; DEFFUNE, E. Structural Aspects of the Erythrocyte Membrane **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.29, n.2, p.168-178, 2007.

NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, P. O.; BARBOSA JR, M.; TRINDADE, R. C. Atividade Antimicrobiana dos Óleos Essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.17, n.1, p. 108-113, Jan./Mar. 2007.

NAVARRO, V. P.; NELSON-FILHO, P.; SILVA, L. A. B. FREITAS, A. C. A Participação das Metaloproteinases da Matriz nos Processos Fisiopatológicos da Cavidade Bucal. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 35, n.4, p.233-38, 2006.

NERY, F. S. G. **Propagação Vegetativa de *Psychotria nuda* (Cham. & Schltdl.) Wawra (Rubiaceae) nas Quatro Estações do Ano.** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal do Paraná, 2010.

NETO, L. G.; LOPES, N. P. Medicinal Plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. **Quím. Nova**, v.30, n.2, São Paulo Mar/Apr 2007.

NETO, V. A.; NICODEMO, A. C.; LOPES, H. V. **Antibióticos na Prática Médica**. Ed Sarvier: 6º Ed., São Paulo, 2007.

NG, T. B.; LIU, F.; WANG, Z. T. Antioxidative Activity of Natural Products from Plants. **Life Sci.**, v. 66, n. 8, p.709-723, 2000.

NING-LI, X.; ZHANG, Y.; HAI-CAI, X.; FENG, T.; LI, Y.; REN, J.; ZHU, H.; DONG LUO, X. Psychotripine: A New Trimeric Pyrroloindoline Derivative from *Psychotria pilifera*. **Organic Letters**, v. 13, n. 21, p. 5896-5899, 2011.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Methods for Evaluation of the Antimicrobial Activity and Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of Plant Extracts. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.18, n.2, Apr./June 2008.

PAINO, I. M. M.; XIMENES, V. F.; FONSECA, L. M.; KANEGAE, M. P. P.; KHALIL, M. M.; BRUNETTI, I. L. Effect of Therapeutic Plasma Concentrations of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs on the Production of Reactive Oxygen Species by Activated Rat Neutrophils. **Braz. J. Med. Biol. Rev.**, v. 38, n. 04, p. 543-551, 2005.

PARANHOS, J. T.; FRAGOSO, V.; SILVEIRA, V. C.; HENRIQUES, A. T.; FETT- NETO, A. G. Organ-Specific and Environmental Control of Accumulation of Psychollatine, A Major Indole Alkaloid Glucoside from *Psychotria umbellata*. **Biochemical Systematics and Ecology journal**, v. 37, n. 6, p.707-715, 2009.

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-6 sulfonic acid) Radical Cation Decolorization Assay. **Methods in Enzymology**, v.299, p.379-389, 1999.

PEREIRA, Z. V. **Rubiaceae Juss. Do Parque Estadual das Várzeas do Rio Ivinhema, Mato Grosso do Sul: florística, sistema reprodutivo, distribuição espacial e relações alométricas de espécies distintas**. Tese de Doutorado em Biologia Vegetal. Universidade Estadual de Campinas. 2007.

PIETTA, P.; SIMONETTI, P.; MAURI, P. Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plants. **J. Agric. Food Chem.**, v. 46, n. 11, p. 4487-4490, 1998.

PINTO, T. J. A; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. Editora Atheneu: São Paulo, 2º.ed, p. 325, 2003.

POSKUS, L. T.; LIMA, R. S. M. S.; LIMA, I. R.; GUIMARÃES, J. G. A.; SILVA, E. M.; GRANJEIRO, J. M. G. Cytotoxicity of Current Adhesive Systems: *in Vitro* Testing on Cell Culture of L929 and Balb/C 3T3 Fibroblasts. **Rev. Odonto Ciênc.**, v. 24, n. 2, p.129-134, 2009.

QIDWAI, T.; JAMAL, F. Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) Gene Polymorphism and Disease Prevalence. **Scand. J. Immunol.**, v.72, p.375–387, 2010.

QUINLAN, T.; SPIVACK, S.; MOSSMAN, B. T. Regulation of Antioxidant Enzymes in Lung after Oxidant Injury. **Environmental Health Perspectives**, v. 102, suppl. 2, p. 79-87, 1994.

RAFIEI, A.; HOSSEINI, V.; JANBABAI, G.; FAZLI, B.; AJAMI, A.; HOSSEINI-KHAH, Z.; GILBREATH, J.; MERRELL, D. S. Inducible Nitric Oxide Synthetase Genotype And *Helicobacter pylori* Infection Affect Gastric Cancer Risk. **World J Gastroenterol.**, v. 18, n.35, p. 4917–4924, 2012.

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 & Medicine**, v. 26, n. 9/10, p. 1231–1237, 1999.

REGASINI, L. O.; OLIVEIRA, C. M.; VELLOSA, J. C. R.; OLIVEIRA, M. M. F.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S. Free Radical Scavenging Activity of *Pterogyne nitens* Tul (Fabaceae). **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 24, p. 4609-4613, 2008.

REIS, J. S.; VELOSO, C. A.; MATTOS, R. T.; PURISH, S.; NOGUEIRA-MACHADO, J. A. Estresse Oxidativo: Revisão da Sinalização Metabólica no Diabetes tipo I. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 52, n. 7, 2008.

RICHHTER, C.; GOGVADZE, V.; LAFFRANCHI, R.; SCHLAPBACH, R.; SCHWEIZER, M.; SUTER, M.; WALTER, P.; YAFFE, M. Oxidants in Mitochondria: from physiology to diseases. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1271, n.1, p.67–74, 1995.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. Screening Methods for Natural Products with Antimicrobial Activity: A review of the literature. **J Ethnopharmacol.**, v. 23, n. 2-3, p.127-149, 1998.

ROGINSKI, V; LISSI, E.A. Review of Methods to Determine Chain-breaking Antioxidant Activity in Food. **Food Chemistry**, v.92, p.235-254, 2005.

ROOS, D., VAN BRUGGEN, R., MEISCHL, C. Oxidative Killing of Microbes by Neutrophils. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 1307–1315, 2003.

RUBIN, E.; GORSTEIN, F.; RUBIN, R.; SCHWARTING, R.; STRAYER, D. **Patologia: bases clinicopatológicas da medicina**. Guanabara Koogan: 4º ed. 2006.

RUFINO, M. do S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. de; PÉREZ-JIMÉNEZ, J., SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J.; Bioactive Compounds and Antioxidant Capacities of 18 Non-traditional Tropical Fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, p. 996-1002, 2010.

SAHA, K.; LAJIS, N. H.; ISRAF, D. A.; HAMZAH, A. S.; KHOZIRAH, S.; KHAMIS, S.; SYAHIDA, A. Evaluation of Antioxidant and Nitric Oxide Inhibitory Activities of Selected Malaysian Medicinal Plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, p. 263–267, 2004.

SILVA, A. R.; MORAIS, S. M.; MARQUES, M. M.; OLIVEIRA, D. F.; BARROS, C. C.; ALMEIDA, R. R.; VIEIRA, I. G.; GUEDES, M. I. Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities of Two *Spondias* Species from Northeastern Brazil. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 6, p. 740-746, 2012.

SILVA, I. D. D.; ARAGÃO, C. F. S. Extraction Parameters from *Cinchona pubescens* Vahl Using Pharmacopeia and no Pharmacopeia Methods. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.19, n.3, 2009.

SILVA J. R. I. E.; FILHO, V. C.; ZACCHINO, S. A.; LIMA, J. C. S.; MARTINS, D. T. O. Antimicrobial Screening of Some Medicinal Plants from Mato Grosso Cerrado. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 19, n. 1, 2009.

SILVA, L. C.; PEGORARO, K. A.; PEREIRA, A. V.; ESMERINO, L. A.; CASS, Q. B.; BARISON, A.; BELTRAME, F. L. Antimicrobial Activity of *Alternanthera brasiliana* Kuntze (Amaranthaceae): a Biomonitored Study. **Lat. Am. J. Pharm.**, v.30, n.1, p. 147-150, 2011.

SILVA, N. L. A.; MIRANDA, F. A. A.; CONCEIÇÃO, G. M. Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Cientia Plena**, v. 6, n. 2, 2010.

SILVA, P.B.; MEDEIROS, A. C. M.; DUARTE, M. C. T; RUIZ, A. L. T. G.; KOLB, R. M.; FREI, F.; SANTOS, C. Avaliação do Potencial Alelopático, Atividade Antimicrobiana e Antioxidante dos Extratos Orgânicos das Folhas de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers (Bignoniaceae). **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 13, n. 4, p. 447-455, 2011.

SMEE, D. F.; MORRISON, A. C.; BARNARD, D. L.; SIDWELL, R. W. Comparison of Colorimetric, Fluorometric, and Visual Methods for Determining Anti-influenza (H1N1 and H3N2) Virus Activities and Toxicities of Compounds. **Journal of Virological Methods**, v. 106, n. 1, p. 71–79, 2002.

SMITH, A. T.; SANTANA, N. DACEY, S.; EDWARDS, M.; BRAY, R. C.; THOMELEY, R. N. F.; BURKE, J. F. Expression of a Synthetic Gene for Horseradish Peroxidase C in *Escherichia coli* and Folding and Activation of the Recombinant Enzyme with Ca^{2+} and Heme. **J. Biol. Chem.**, v. 265, p. 13335-13343, 1990.

SOLIS, P. N.; RAVELO, A. G.; PALENZUELA, J. A.; GUPTA, M. P.; GONZÁLEZ, A.; PHILLIPSON, D. Quinoline Alkaloids from *Psychotria glomerulata*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 5, p. 963-969, 1997.

SOUZA, C. E. A.; MAITRA, D.; SAED, G. M.; DIAMOND, M. P.; MOURA, A. A.; PENNATHUR, S.; ABU-SOUD, A. Hypochlorous Acid-Induced Heme Degradation from Lactoperoxidase as a Novel Mechanism of Free Iron Release and Tissue Injury in Inflammatory Diseases. **PLoS One**, v. 6, n. 11, 2011.

SUFFREDINI B, I.; MATEUS, P. L. B.; NEPOMUCENO, D. C.; RIAD N, Y.; VARELLA D, A. Atividade Antibacteriana e Citotóxica de Extratos de Plantas Brasileiras – Clusiaceae. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.101, n.3, Rio de Janeiro, maio 2006.

TAKAYAMA, H.; MORI, I; KITAJIMA, M.; AIMI, N; LAJIS, N. H. New Type of Trimeric and Pentameric Indole Alkaloids from *Psychotria rostrata*. **Organic Letters**, v. 6, n. 17, p. 2945-2948, 2004.

TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Anti-infecciosos**. Ed Atheneu: São Paulo, 2º ed., 1999.

TAYLOR, C. *Psychotria in. Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB014201>). Acesso em: jan 2013.

UDENSI, U. K.; COHLY, H. H. P.; GRAHAM-EVANS, B. E.; NDEBELE, K.; GARCIA-REYERO, N.; NANDURI, B.; TCHOUNWOU, P. B.; ISOKPEHI, R. D. Aberrantly Expressed Genes in HaCaT Keratinocytes Chronically Exposed to Arsenic Trioxide. **Biomarker Insights**, v. 8, n. 6, p. 95, 2011.

USA. **Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically Approved Standard** – Eighth Edition. CLSI document M07-A8 (ISBN 1-56238-689-1) Clinical and Laboratory Institute, Pensylvania, 2009.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; BENFATO, V. M. M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies Reativas de Oxigênio e de Nitrogênio, Antioxidantes e Marcadores de Dano. **Quim. Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VEITCH, N. C. Horseradish Peroxidase: A Modern View of a Classic Enzyme. **Phytochemistry**, v. 65, p. 249-259, 2004.

VELLOSA, J. C. R. **Avaliação da Capacidade Antioxidante de Extratos Vegetais de Plantas Brasileiras e sua Contribuição ao Estudo de Inibição da Enzima Mieloperoxidase**. Dissertação Apresentada ao programa de Pós Graduação em Análises Clínicas. Universidade Estadual Paulista, 2005.

VELLOSA, J. C. R. **Estudo Bioquímico do Efeito de Alguns Flavonoides de *Pterogyne nitens* Tulasne (Fabaceae) em Processos Oxidativos: sistema modelo “químicos”**. Tese de Doutorado em análises Clínicas. Universidade Estadual Paulista, 2008.

VELLOSA, J. C. R.; BARBOSA, V. F.; KHALIL, N. M.; SANTOS, V. A. F. F. M.; FURLAN, M.; BRUNETTI, I. L.; OLIVEIRA, O. M. M. F. Profile of *Maytenus aquifolium* Action Over Free Radicals and Reactive Oxygen Species. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 3, 2007.

VELLOSA, J. C. R.; KHALIL, O. A. K.; KHALIL, N. M.; SANTOS, V. A. F. F. M.; HAKIME-SILVA, R. A.; FURLAN, M.; BRUNETTI, I. L.; OLIVEIRA, O. M. M. F.

Maytenus ilicifolia as Source of Antioxidants and Anti-radicals Agents and its Action on Neutrophils. **African journal of Biochemistry Research**, v. 2, n. 12, p. 232-239, 2008.

VEROTTA, L.; PETERLONGO, F.; ELISABETSKY, E.; AMADOR, T. A.; NUNES, D. S. High-performance Liquid Chromatography–diode Array Detection-tandem Mass Spectrometry Analyses of the Alkaloid Extracts of Amazon *Psychotria* species. **Journal of Chromatography**, v. 841, p. 165–176, 1999.

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

www.ufrgs.br - IMAGEM

ZOU, C. G.; AGAR, N. S.; JONES, G. L.; Oxidative Insult to Human Red Blood Cells Induced by Free Radical Initiator AAPH and its Inhibition by a Commercial Antioxidant. **Mixture. Life Sci.**, v. 69, p. 75-86, 2001.

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Bioética

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
PONTA GROSSA - UEPG



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Ação de xenobióticos sobre eritrócitos e hemólise provocada por radicais livres

Pesquisador: JOSÉ CARLOS REBUGLIO VELLOSO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 07588412.1.0000.0105

Instituição Proponente: Universidade Estadual de Ponta Grossa

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 190.375

Data da Relatoria: 04/02/2013

Apresentação do Projeto:

O projeto versa sobre a pesquisa das ações de produtos naturais tais como extratos vegetais e substâncias isoladas, bem como alguns xenobióticos de interesse, como a anfotericina B, sobre eritrócitos e os processos de destruição de hemácias por radicais livres. A atividade antioxidante de compostos de plantas deve-se às suas propriedades REDOX e estruturas químicas, que possibilitam a estes compostos exercerem a função de neutralizar os radicais livres. Espera-se que os produtos estudados apresentem ação protetora contra a hemólise provocada por radicais livres e que estes ainda não apresentem ação hemolítica intrínseca. Neste caso busca-se maior embasamento para justificar um possível uso de produtos naturais, associados aos xenobióticos mencionados, em terapias antioxidantes e antiradicais livres.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Identificar as ações de diferentes produtos naturais (hesperidina e rutina), extratos (*Psychotria nuda* (Rubiaceae)) e xenobióticos (anfotericina B), associados ou não, sobre a hemólise causada por radicais livres.

Objetivo Secundário:

Definir se as amostras apresentam ação hemolítica; Definir se as amostras interferem na hemólise provocada por radicais livres (modelo AAPH).

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748 bl M sala 12

Bairro: CEP: 84.030-900

UF: PR **Município:** PONTA GROSSA

Telefone: (42-)3220-3108 **Fax:** (42-)3220-3102 **E-mail:** seccoeop@uepg.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
PONTA GROSSA - UEPG



Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Desconforto mínimo para retirada de sangue utilizando somente material descartável. Risco mínimo e possibilidade de estudar os efeitos de produtos naturais em células humanas. Material descartável para a coleta (seringa, agulha, luvas e tubos) protegendo o manipulador e o voluntário.

Durante a manipulação das amostras será utilizado luvas descartáveis para evitar o contato com o sangue. Os extratos vegetais, os produtos naturais e o xenobiótico utilizado na pesquisa não apresentam riscos ao manipulador.

Benefícios:

É muito difundido atualmente o uso de plantas e produtos naturais em diferentes terapias. Neste caso busca-se maior embasamento para justificar um possível uso de compostos isolados de plantas em terapias antioxidantes e anti-radicaís livres. Ou então, caso o resultado seja a exacerbação da hemólise pelos compostos testados, mostrar o risco do uso dos mesmos em terapias.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Após a inclusão das recomendações e correção das inadequações o projeto tem pertinência e há possibilidade de execução. Somente há necessidade de alterar as datas do cronograma de execução. O correto é iniciar após a aprovação da COEP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE foi corrigido e está de acordo.

Recomendações:

Há necessidade de alterar as datas do cronograma de execução. O correto é iniciar após a aprovação da COEP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Há necessidade de alterar as datas do cronograma de execução. O correto é iniciar após a aprovação da COEP.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

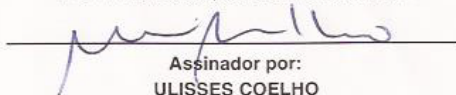
Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748 bl M sala 12
Bairro: CEP: 84.030-900
UF: PR Município: PONTA GROSSA
Telefone: (42-)3220-3108 Fax: (42-)3220-3102 E-mail: seccoep@uepg.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
PONTA GROSSA - UEPG



PONTA GROSSA, 30 de Janeiro de 2013



Assinador por:
ULISSES COELHO
(Coordenador)

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748 bl M sala 12
Bairro: CEP: 84.030-900
UF: PR Município: PONTA GROSSA
Telefone: (42-)3220-3108 Fax: (42-)3220-3102 E-mail: seccoop@uepg.br