

MATHEUS SANTIAGO SILVA

**AVALIAÇÃO ANTIOXIDANTE E QUANTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS DE *Psychotria deflexa* D. C. (RUBIACEAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação
apresentado para obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia.
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais
Universidade Federal da Grande Dourados
Orientadora: Prof. Dr^a Anelise Samara Nazari
Formagio
Co-orientadora: Prof. Dr^a Alexéia Barufatti Grisólia

DOURADOS

2015

MATHEUS SANTIAGO SILVA

**AVALIAÇÃO ANTIOXIDANTE E QUANTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS DE *Psychotria deflexa* D. C. (RUBIACEAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia na Universidade Federal da Grande Dourados, pela comissão formada por:

Orientadora: Prof. Dr^a Anelise Samara Nazari Formagio
FCA – UFGD

Prof. Dr^a Alexéia Barufatti Grisólia
FCBA – UFGD

Prof. Dr^o Jonas da Silva Mota
UEMS

Dourados, 09 de novembro de 2015.

RESUMO

Psychotria deflexa D. C. (Rubiaceae), conhecida popularmente como “erva-do-rato” é encontrada em solos de Cerrado e mata Atlântica. Na literatura consultada, não se encontra trabalhos biológicos e químicos de *P. deflexa*. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antioxidante e o teor de constituintes do extrato metanólico das folhas de *P. deflexa* D. C. O extrato metanólico foi obtido por maceração das folhas com metanol a frio. A atividade antioxidante foi avaliada frente aos métodos fotolorimétricos *in vitro* do radical livre estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) (ABTS·+), do branqueamento do β-caroteno/ácido linoleico e de redução de ferro. O teor de fenóis totais foi determinado pelo método de folin-ciocalteu's, flavonoides e flavonol pelo ensaio com cloreto de alumínio e taninos condensados com reagente de vanilina. O perfil cromatográfico do extrato metanólico de *P. deflexa* foi realizado por cromatografia em camada delgada (CCD) e com reagentes químicos. O extrato não demonstrou promissora atividade antioxidante frente os ensaios de DPPH (IC₅₀= 146,4 µg/mL), β-caroteno/ácido linoleico (AA = 26.05%) e ABTS·+ (AA = 15.58%). O ensaio de FRAP foi o mais promissor com valores de 2369.6 µM de FeSO₄/ g de extrato. O extrato metanólico de *P. deflexa*, apresentou moderados teores de flavonoides, flavonol, fenóis e taninos condensados, apresentando resultados de, 37.64 e 275.07 mg de quercetina/g de extrato, 111.42 mg de ácido gálico/ g de extrato e 194.67 mg de catequina/g de extrato, respectivamente. A análise por CCD, apresentou halos quando revelados em anisaldeído. Conclui-se que o extrato metanólico de *P. deflexa*, apresentou potencial antioxidante frente ao ensaio de FRAP e moderadas quantidades de flavonol e flavonoides.

Palavras-chave: erva-do-rato, radical livre, metabólitos secundários.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela oportunidade de estar presente e ativo para realizar todos os feitos em minha vida e na vida do próximo. Agradeço a minha família, em especial minha mãe, Ivonete, a qual com muita dedicação, incentivo e luta me apoiou dia e noite nesta etapa da minha vida, agradeço aos meus irmãos Jonas e Samuel, pelo incentivo ao estudo e por muitas vezes me auxiliarem em ideias e precauções a serem tomadas. Agradeço a minha noiva Ianuska, pelo qual me incentivou e deu todo apoio para seguir biotecnologia como um visionário e me acompanhou em boa parte do curso.

Agradeço muito à minha orientadora, professora e incentivadora doutora Anelise Samara Nazari Formagio, a qual contribuiu não apenas neste trabalho, mas trilhou a construção do meu perfil profissional e desenvolvimento pessoal, o seu grande coração e sua linda família a qual dedicarei sempre bons frutos e alegrias. À doutora Alexéia Barufatti Grisólia, por sempre corresponder alegremente aos meus pedidos, as vezes os antecipando, ao doutor Jonas da Silva Mota por prontamente aceitar a participar do processo do trabalho de conclusão de curso.

Agradeço também, a todos do laboratório que auxiliaram em momentos de dificuldades e amizades, em especial a mestranda Carla e Marina e o graduando Lucas por sempre estarem solícitos as adversidades do laboratório desde que resolvi participar do grupo, à técnica Suzana pelo seu trabalho, amizade e alegria com todos do laboratório, e aos mais novos, Diego, Yara, Kamilla, Camila, Isabela, Hariana, Jacenir, Raquel e Carol por fortalecerem e darem um futuro ao laboratório.

Agradeço a todos os professores de Biotecnologia que não apenas ensinaram teoria, mas como amar biotecnologia e promover relações interpessoais com valor emocional e de amizade. A 3ª Turma de Biotecnologia, deixo meus agradecimentos, por que nunca haverá igual, uma união perfeita entre todos.

Agradeço também a Universidade Federal da Grande Dourados, à CAPES e ao CNPQ, pela oportunidade do desenvolvimento profissional podendo inserir meus agradecimentos pelo apoio intelectual e financeiro.

Muito obrigado a todos.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1 O gênero <i>Psychotria</i>	10
2.2. <i>Psychotria deflexa</i> D. C.	12
2.3 Atividade Antioxidante	14
3 OBJETIVO	16
3.4. Objetivo Geral	16
3.5. Objetivo específico	16
4 METODOLOGIA	16
4.1 Coleta e identificação	16
4.2 Preparação do extrato metanólico	17
4.3 Perfil cromatográfico em cromatografia em camada delgada analítica (CCD) ...	17
4.4 Avaliação da atividade antioxidante.....	17
4.4.1 Método de DPPH·	18
4.4.2 Método β-caroteno/ácido linoleico.....	18
4.4.3 Método do ABTS·+.....	19
4.4.4 Determinação da redução de ferro (FRAP).....	19
4.5 Teor de constituintes no EMPD	20
4.5.1 Determinação do teor de Fenóis Totais (FE).....	20
4.5.2 Teor de Flavonoides Totais (FT).....	21
4.5.3 Teor total de Flavonol (FLA)	22
4.5.4 Teor de Taninos condensados (TC).....	23
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1 Perfil fitoquímico	23

5.2 Atividade antioxidante	25
5.3 Teor de constituintes químicos.....	27
6 CONCLUSÃO	28
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
ANEXO A – Lista de reagentes.....	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Visão geral de estudos inter e multidisciplinar com plantas medicinais.	9
Figura 2. Estudo fitoquímico bioguiado de plantas medicinais.	9
Figura 3. Estruturas de alcalóides isolados de Psychotrias. N,N -dimetilriptamina (1), Vincosamida (2), Psycholatina (3), Psychotrimina (4) e Psychopentamina (5). .	11
Figura 4. Estruturas de iridoides isolados de Psychotrias. Asperulosídeo (1), Acetilasperulosídeo (2), Ácido asperulosídico (3) e 6 α -hidroxigenoposídeo (4).	12
Figura 5. <i>Psychotria deflexa</i>	13
Figura 6. Classificação dos antioxidantes (Sousa, 2008).	15
Figura 7. Curva de calibração do ácido gálico.	21
Figura 8. Curva de calibração da quercetina (FT).....	22
Figura 9. Curva de calibração da quercetina (FLA).....	22
Figura 10. Curva de calibração da catequina.	23
Figura 11. Análise em CCD. Grupo 1 (hexano/acetato de etila 30%) e 2 (metanol 100%), três placas (x visualizada em UV 254, y em 365 e z revelada em terpeno). Ds: distância do solvente e D(a;b;c;d;e;f): distância das amostras em centímetros (cm).	24
Figura 12. Apresentação das reações químicas antioxidantes: 1 - DPPH•, 2- ABTS•+, 3- FRAP. (Imagens: Embrapa).	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Divisão taxonômica de <i>P. deflexa</i>	13
Tabela 2. Mecanismo de ação dos testes antioxidantes.....	15
Tabela 3. Resultados da antioxidante frente aos ensaios avaliação DPPH•, β -Caroteno, ABTS e FRAP.....	26
Tabela 4. Resultados do teor total de constituintes químicos. QE: quercetina, AG: ácido gálico, CT: catequina, TC: Taninos condensados.	27

1 INTRODUÇÃO

Plantas medicinais possuem um papel fundamental na saúde humana, demonstrando interesse de diversas áreas em estudá-las, como exemplos, a biotecnologia com o avanço de novas ferramentas como a transgenia e organismos geneticamente modificados (OGM), na biologia em taxonomia e interações entre planta x invertebrados x vertebrados x microrganismos, na farmácia no desenvolvimento de fármacos e ensaios farmacológicos e na química orgânica com identificação, isolamento e síntese de compostos, tendo como exemplo, o Ácido acetil salicílico e o Taxol (Figura 1). Uma subárea da química orgânica, é a fitoquímica, que possibilita o isolamento, caracterização e posterior avaliação farmacológica e direcionamento a pesquisa para uma possível estrutura bioativa (Figura 2).

No Brasil, a pesquisa com plantas medicinais apresenta 500 mil espécies catalogadas, mas apenas 8%, ou seja, 40 mil espécies foram estudadas para compostos bioativos. Este conceito está intimamente ligado à produção na indústria farmacêutica, a qual gera anualmente uma receita equivalente a R\$ 28 bilhões, segundo o Portal Brasil. (2010, modificado 2014).

Neste conjunto de espécies estudadas, algumas famílias apresentam importância medicinal com potencial maior que outras para determinadas doenças, como exemplo, a família Rubiaceae, uma das maiores dentre as Angiospermas, compreendendo cerca de 13.000 espécies distribuídas em 650 gêneros e 44 tribos, comumente encontrada nos biomas brasileiros, Amazônia, Floresta Atlântica e Cerrado (MIATELO, 2008; LIMA et al., 2009).

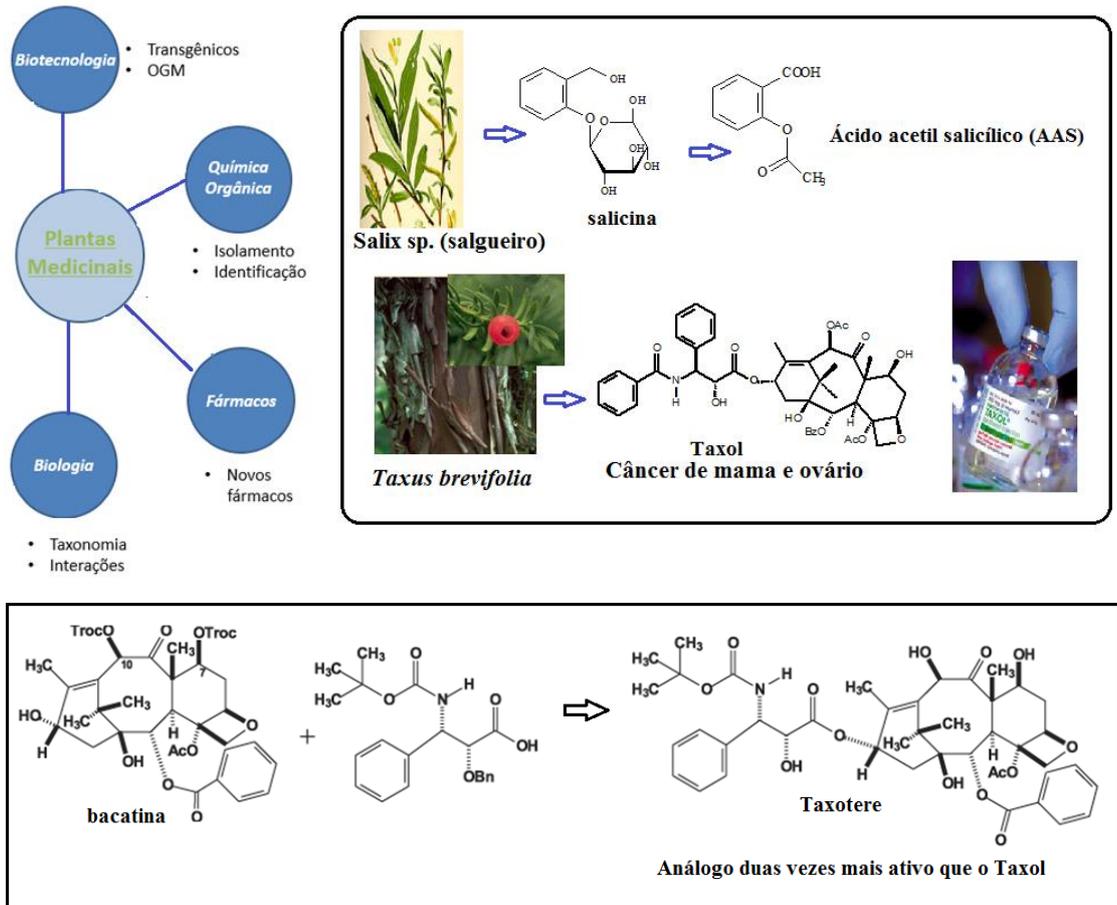


Figura 1: Visão geral de estudos inter e multidisciplinar com plantas medicinais.



Figura 2: Estudo fitoquímico bioguiado de plantas medicinais.

Baseado no conhecimento da bioatividade de compostos da família Rubiaceae e o valor financeiro gerado por plantas medicinais, o presente trabalho, visa o estudo químico de *Psychotria deflexa* D. C., na busca por um direcionamento à presença de possíveis compostos, como alcaloides e iridóides que contenham potencial farmacológico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O gênero *Psychotria*

O gênero *Psychotria* é o maior da família Rubiaceae e possui cerca de 1400 espécies com ampla distribuição na zona tropical, encontrada principalmente em países da América Central e Sul. Na área química, este gênero é conhecido por, possuir alta complexidade dos tipos de metabólitos secundários e de suas atividades positivas quando testados em sistemas biológicos.

Na literatura foram encontrados espécies de *Psychotria* avaliadas em sistemas biológicos, como exemplo, *P. forsteriana*, contra células leucêmicas humanas (ADJIBADÉ et al., 1989), *P. oleoides* na influência sobre hormônios hipofisários (GUÉRITTE-VOEGELEIN et al., 1992; RASOLONJANAHARY et al., 1995), *P. nigra* e *P. stenophylla* com potencial bactericida e fungicida (JAYASINGHE et al., 2002), *P. brachyceras*, *P. leiocarpa* e *P. suterella* com propriedades analgésicas e efeito hipotérmico (ELISABETSKY et al., 1997), *P. ipecacuanha* com propriedades expectorante, amebicida e emética (GOMES, 2007).

Como exemplo, de isolamento de metabólitos secundários, temos os alcaloides, compostos com um nitrogênio em seu núcleo cíclico, sendo tóxicos aos herbívoros devido à inclusão na síntese proteica, gerando proteínas não funcionais (PORTO, 2009). Estes, compostos possuem diversos efeitos em humanos, como o N,N-dimetiltriptamina (1), composto com alto potencial alucinógeno, extraído de folhas de *Psychotria viridis* (PIRES et al., 2010). Esta espécie, associada com caules de *Banisteriopsis caapi* produzem, em infusão, um chá conhecido por tribos indígenas do Brasil como Ayahuasca. Esta bebida, produz um mecanismo que provoca o

aumento do N,N-dimetiltriptamina no cérebro ligando-se competitivamente a receptores serotoninérgicos que são específicos do neurotransmissor do humor, a serotonina (PIRES et al., 2010; SOUZA, 2011).

Diversas espécies do gênero *Psychotria*, indicam o isolamento de alcalóides com potencial farmacológico, como em, *P. myriantha* que apresentou a vincosamida (2) o qual tem redução quimiotóxica de leucócitos polimorfonucleares (FARIAS, 2006), *P. umbellata* com a psycholatina (3) a qual tem função como agente redutor de peróxidos (FRAGOSO, 2007) e *P. rostrata* com psychotrimina (4) e psychopentamina (5), com potencial antioxidante, antimutagênico e genotóxico (TAKAYAMA et al., 2004).

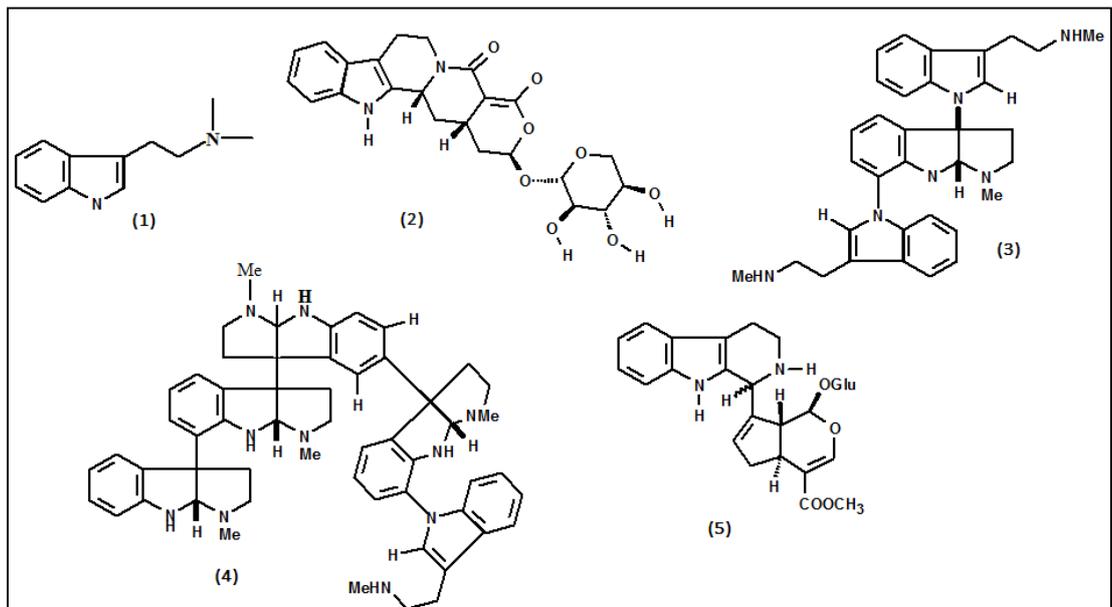


Figura 3. Estruturas de alcalóides isolados de *Psychotrias*. N,N -dimetiltryptamina (1), Vincosamida (2), Psycholatina (3), Psychotrimina (4) e Psychopentamina (5).

Outra classe de metabólito secundário de interesse para a saúde humana são os iridóides, monoterpenos irregulares, com propriedades biológicas para atividade antiviral, antitumoral, hemodinâmica, vasoconstritora, antimicrobiana, e em vegetais, apresentam características protetoras, como venenoso ou amargo principalmente para herbívoros, como também, auxilia na síntese, de alcalóides indolterpenicos (GOMES et al., 2011; RODRIGUEZ et al., 2014).

Em *Psychotria leiocarpa*, foram isolados os iridóides, asperulosídeo (1) e acetilasperulosídeo (2) (LOPES et al., 2004). LU et al. (2014), encontraram dois iridóides em *P. rubra*, o ácido asperulosídico (3) e 6 α -hidroxigenoposídeo (4), conforme figura 4.

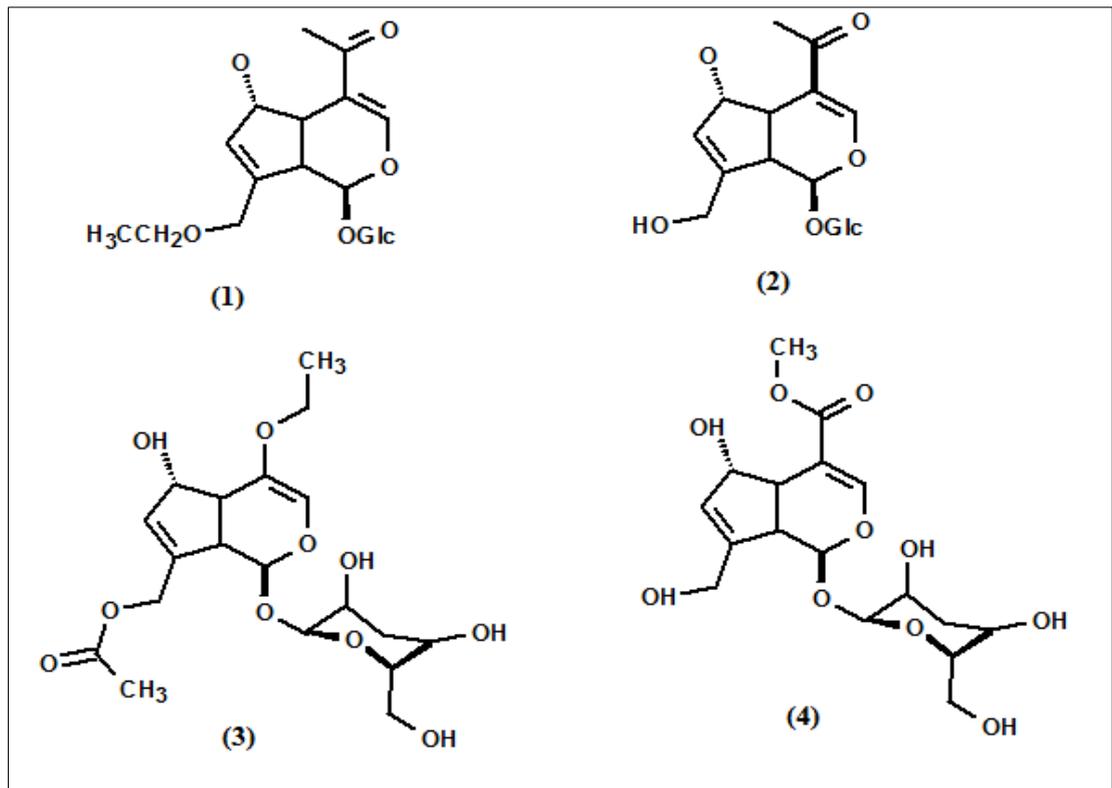


Figura 4. Estruturas de iridóides isolados de *Psychotrias*. Asperulosídeo (1), Acetilasperulosídeo (2), Ácido asperulosídico (3) e 6 α -hidroxigenoposídeo (4).

2.2. *Psychotria deflexa* D. C.

P. deflexa (Figura 3) é comumente encontrada em regiões do Cerrado e Mata Atlântica, tendo presença em países da América Central e Sul americanos como, Argentina, Paraguai e Brasil e sua classificação taxonômica está apresentada na Tabela 1. Popularmente é conhecida como “café-selvagem” ou “erva-do-rato”, a qual historicamente deriva de aplicações em conjunto com outras substâncias no controle

de dedetização em ratos domésticos. Seu efeito *in natura* provoca alterações estomacais em bovinos podendo levar a morte

Oliveira et al. (2011), descreve o teste de citotoxicidade em células meristemáticas de *Allium cepa* aplicado à infusão aquosa de folhas de *P. deflexa*, tendo como resultado uma inibição significativa na divisão celular, podendo possivelmente ser indicada em terapias relacionadas à inibição do ciclo celular. Na literatura consultada, *P. deflexa* não apresenta dados fitoquímicos e atividade biológica, mas devido ao seu conhecimento popular e os relatos sobre alcaloides e iridóides em seu gênero, possivelmente há presença destes metabólitos secundários.



Figura 5: *Psychotria deflexa*

Tabela 1. Divisão taxonômica de *P. deflexa*.

Categoria	Nome científico
Reino	Plantae
Sub-reino	Tracheobionta
Superdivisão	Spermatophyta
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sub-classe	Asteridae
Ordem	Rubiales
Família	Rubiaceae
Gênero	<i>Psychotria</i> L.
Espécie	<i>Psychotria deflexa</i>

2.3 Atividade Antioxidante

Diferentes métodos “*in vitro*”, determinaram a atividade antioxidante em *Psychotrias*, como exemplos, os relatados por Devadoss et al. (2013), Formagio et al. (2014), Nascimento et al. (2015), Fragoso et al. (2008), esta atividade tem como base, a transferência de elétrons que é um processo químico oxiredutor, ou seja, quando há uma troca entre moléculas de ganho (oxidação) ou perda (redução) de elétrons (ALVES et al., 2010). O processo de transferência de elétrons, está intimamente ligado ao sistema biológico humano através de seus processos celulares, liberando e utilizando altas cargas de elétrons. Caso o sistema esteja debilitado, haverá a perda do equilíbrio químico, conseqüentemente, o mau funcionamento celular e a produção excessiva de radicais livres (COTINGUIBA et al., 2013).

Os radicais livres em excesso, são correlacionados com diferentes tipos de doenças, principalmente as neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer. Atualmente, existem várias formas de radicais livre, como exemplo, os ânions superóxido (O_2^-), as hidroxilas (-OH), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), óxido nítrico (-NO), hidroperóxido orgânico (ROOH) e a carbonila excitada (RO_2) (COTINGUIBA et al., 2013; SUETH-SANTIAGO et al., 2015).

Um organismo debilitado, terá que se submeter à um controle sobre sua rotina diária, incluindo principalmente alimentação e ingestão de medicamentos, promovendo uma defesa antioxidante. Os antioxidantes, são moléculas que tem a capacidade de estabilizar a produção cinética ou eliminar o excesso de radicais livres, existem dois tipos de antioxidantes, os naturais encontrados facilmente na alimentação humana como o β -caroteno (cenoura), a vitamina C (laranja) e a vitamina E (cereais), e os sintéticos como o Butilhidroanisol (BHA) e o Butilhidroxitolueno (BHT) (OLIVEIRA et al., 2009). Em plantas, alguns compostos apresentam alta atividade antioxidante, comparados a outros, sendo estes, os derivados de compostos fenólicos e taninos (SANTOS et al., 2011). A figura 4, demonstra a classificação dos antioxidantes.

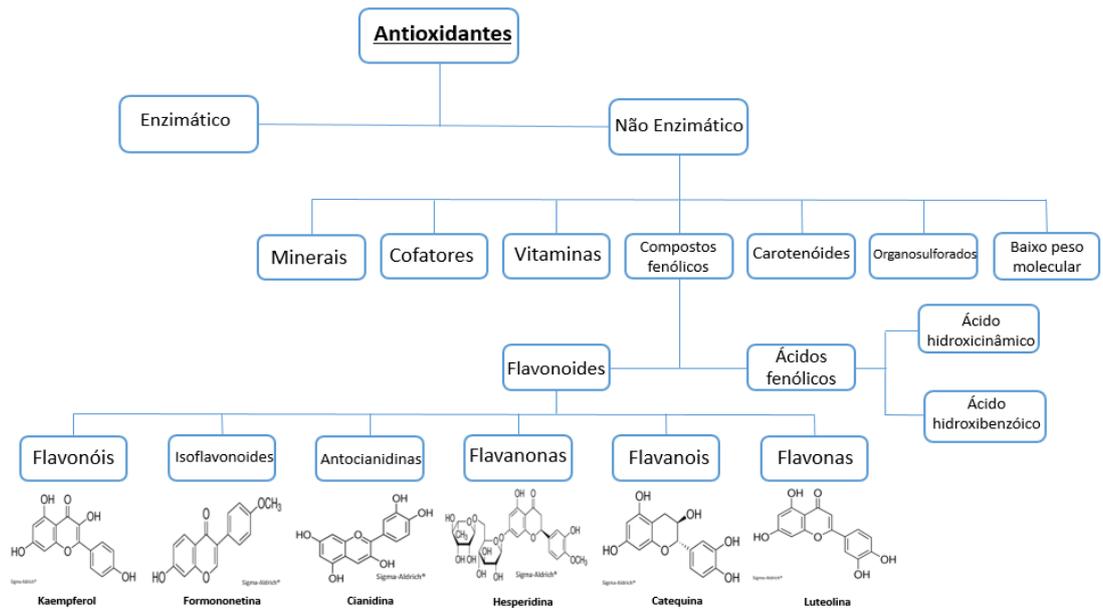


Figura 6: Classificação dos antioxidantes (Sousa, 2008).

As técnicas de avaliação antioxidante, além de determinar o potencial antioxidante do composto, classifica também sua natureza, se são hidrofílicos ou lipofílicos, o sistema DPPH· (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) e FRAP (redução do ferro) avaliam compostos hidrofílicos (OLIVEIRA^b et al., 2011; CAZARIN et al., 2014), o β-caroteno/ácido linoleico compostos lipofílicos (DAVID et al, 2010) e o ABTS+· (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina)-6-ácido sulfônico) compostos hidro e lipofílicos (SCOTTI et al, 2007). A Tabela 2, apresenta os modos de ação dos testes antioxidantes avaliados.

Tabela 2. Mecanismo de ação dos testes antioxidantes.

Avaliação antioxidante	Mecanismo de ação
DPPH·	A capacidade de sequestro do radical livre é determinada pela quantidade de transferência de Hidrogênio (H) em compostos hidrofílicos (SANTOS et al., 2011).
FRAP	Capacidade de uma amostra em reduzir Ferro (III) para Ferro (II), pelo sequestro de hidroxila (-OH) (BARBOSA et al., 2010)

β-caroteno/ácido linoleico	Baseado no tempo de oxidação do β -caroteno promovido pelo ácido linoleico (MATTOS et al., 2009).
ABTS\cdot+	Ampla capacidade sequestradora de hidrogênio (H). Determinado pela capacidade de redução do radical ABTS \cdot + (RUFINO et al., 2007).

3 OBJETIVO

3.4. Objetivo Geral

Avaliação da atividade antioxidante e teor de constituintes do extrato metanólico das folhas de *Psychotria deflexa* D. C.

3.5. Objetivo específico

- Avaliar a atividade antioxidante pelo método de DPPH, ABTS \cdot + e FRAP;
- Quantificar o teor total de flavonoides, fenóis, flavonol e taninos condensados.

4 METODOLOGIA

4.1 Coleta e identificação

Folhas de *P. deflexa* foram coletadas na Fazenda Coqueiro (22°12'S e 54°54'W), na cidade de Dourados, Mato Grosso do Sul e identificadas pela Dr^a Zefa Valdevina Pereira. Uma exsicata (DDMS 5005) foi depositada no Herbário da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Dourados, MS.

4.2 Preparação do extrato metanólico

A secagem das partes aéreas (folhas e galhos) foi realizada em estufa de circulação de ar a 45 ± 5 °C por 48 horas e, em seguida, trituradas em moinho de facas (Marconi® MA680) e posteriormente 620g foi submetida a maceração exaustiva com metanol (8 x 4 L), filtrada e concentrada em evaporador rotativo (Marconi® MA120) sob pressão reduzida à 60 °C, para a obtenção do extrato metanólico (EMPD) (114,7g).

4.3 Perfil cromatográfico em cromatografia em camada delgada analítica (CCD)

Para análise visual do perfil fitoquímico do EMPD foi realizado a cromatografia em camada delgada e reveladas com solução anisaldeído, dragendorff e iodo. A análise foi realizada em diferentes placas de alumínio, (ALUGRAM® Xtra SIL G/UV), separadas em 2 grupos (1 e 2), eluídas em hexano/acetato de etila 30% (grupo 1) e metanol 100% (grupo 2), e observadas em emissão de radiação ultravioleta (Boitton - 0238), com UV (360; 254 nm). As placas que apresentaram parâmetros físico de compostos foi calculado o fator de retenção (R_f), utilizando a seguinte equação:

$$R_f = \frac{Da}{Ds}$$

Onde, Da é a distância percorrida pela amostra e Ds distância percorrida pelo solvente.

4.4 Avaliação da atividade antioxidante

4.4.1 Método de DPPH·

A investigação da atividade antioxidante foi realizada pelo método fotocolorimétrico “*in vitro*” do radical livre estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH·), utilizando como controle positivo o Butil hidroxitolueno. O método consiste no monitoramento do consumo do radical livre DPPH· na amostra, através do decréscimo da medida de absorvância. O extrato foi pesado em balança (Shimadzu® AY220) e preparado com 20 mg em 10 mL de metanol. Alíquotas de 1 mL do extrato foi adicionado a 2 mL da solução de DPPH 0,0047% e armazenadas sem presença de luz, a temperatura ambiente por 30 minutos. A leitura da absorvância foi realizada em espectrofômetro (Biochrom® S80) a 515 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata. A porcentagem de inibição (% I) foi calculada pela fórmula: $\% I = (A_0 - A)/A_0 \times 100$. Onde A_0 é a absorvância do DPPH· (controle) e A é a absorvância do extrato mais DPPH·. Foi calculada a concentração inibitória em 50% (IC₅₀), os resultados foram apresentados em porcentagem de inibição *versus* concentração do extrato.

4.4.2 Método β-caroteno/ácido linoleico

Para o teste de branqueamento do β-caroteno/ácido linoleico, foi preparada uma solução de 2 mg de β-caroteno solubilizado em 10 mL de clorofórmio. Colocou-se 1 mL desta solução em um balão contendo 20 µL de ácido linoleico e 200 µL de Tween 40. Procedeu-se a evaporação do clorofórmio por 5 minutos à 45 °C em evaporador rotativo. Após, adicionou-se 50 mL de água destilada lentamente e agitou-se vigorosamente para formar a emulsão. Transferiu-se 5 mL da emulsão para um tubo de ensaio contendo 0,2 mL do extrato de *P. deflexa*. Como controle usou-se metanol-HPLC no lugar do extrato. Os tubos de ensaio foram colocados em banho-maria à 50 °C, monitorando-se a oxidação da emulsão para leitura em espectrofotômetro a 470 nm em intervalos de 15 minutos até que a cor do β-caroteno no controle tivesse desaparecido. Todos os testes foram realizados em triplicata (JAYAPRAKASHA et al., 2001). A atividade antioxidante (AA) foi calculada como percentual de inibição relativa ao controle com a seguinte equação: $AA = [1 - (A_i - A) / (A_i - A't)] \times 100$, em

que, A_i é a absorvância do extrato no tempo zero; A_t é a absorvância do extrato após a incubação (105 min) a 50 °C; A_i' é a absorvância do controle no tempo zero; A_t' é a absorvância do controle após incubação (105 min) a 50 °C. Os resultados foram apresentados em porcentagem de oxidação do β -caroteno.

4.4.3 Método do ABTS $\cdot+$

Para o ensaio da captura do radical livre 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS $\cdot+$), empregou-se o método descrito por Rufino et al. (2007), com adaptações. 5 mL de 2,2-azinobis-ácido-3-etilbenzoatina-6-sulfônico (ABTS $\cdot+$) (7 mM) foi homogenizado com 88 μ L de persulfato de potássio (140 mM), mantendo no escuro por 16 horas, diluiu-se 1 mL em etanol (P.A.) até obter uma absorvância de $0,70 \pm 0,05$ nm à 735 nm. 20 mg do extrato foi solubilizado em 10 mL de Metanol/HPLC. Para realizar as leituras, o extrato foi diluído em diferentes concentrações (100; 200; 400; 600 e 800 μ L) em água destilada até completar o volume de 1000 μ L. 30 μ L de cada diluição foi transferida para tubos de ensaio contendo 3 mL do radical ABTS $\cdot+$, reagindo por 6 minutos, procedendo-se a leitura em espectrofotômetro à 734 nm, utilizando etanol como controle. A curva de calibração foi realizada com soluções etanólicas de 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico (Trolox) 2 mM, em diferentes concentrações (100; 500; 1.000; 1.500 e 2.000 μ M). Os resultados foram expressos em μ mol de Trolox equivalente/g de extrato.

4.4.4 Determinação da redução de ferro (FRAP)

Para determinação de redução do ferro, foi utilizada a metodologia de Rufino et al. (2006), com adaptações. Preparou-se a curva de calibração adicionando-se em tubos de ensaio, 90 μ L das concentrações de sulfato ferroso (500; 1000; 1500 e 2.000), 270 μ L de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP (25 mL de tampão Acetato 0,3 M, 2,5 mL 2,4,6-Tris (2pyridyl)s-Triazine (TPTZ) 10 mM e 2,5 mL de Cloreto Férrico

à 20 μM . Agitou-se em vortex (Biomixer[®] VTX2500), seguido de banho-maria por 30 minutos. A análise de redução foi realizada em espectrofotômetro à 595 nm. Para análise do extrato substituiu-se as concentrações de sulfato ferroso, pelas concentrações do extrato. Os resultados obtidos foram expressos em μmol de sulfato ferroso/g de extrato.

4.5 Teor de constituintes no EMPD

4.5.1 Determinação do teor de Fenóis Totais (FE)

O teor de fenólicos totais de EMPD, foi determinado pelo método folin-ciocalteu's (SINGLENTON et al., 1965). Para os testes, a cada 100 μl de extrato, adicionou-se 1,5 mL de solução aquosa de carbonato de sódio 2%, 0,5 mL de reagente folin-ciocalteu's (1:10 v/v) e 1 mL de água destilada. Reagiu-se por 30 minutos. A leitura foi realizada no espectrofotômetro com 760 nm. O mesmo procedimento foi empregado na análise do branco, sendo substituídos 100 μL do extrato por 100 μL de Metanol/HPLC (DJERIDANE et al., 2006). Para calcular a concentração de fenóis foi preparada uma curva analítica (1,0; 5,0; 10,0; 15,0; 30,0 e 40,0 μg) empregando o ácido gálico como controle e as respectivas absorbâncias foram lidas. Com estes dados foi feita a regressão linear e obtida a equação da reta e calculado seu valor real (Figura 5). Todos os testes foram realizados em triplicata. Os resultados foram apresentados em mg de ácido gálico/g de extrato.

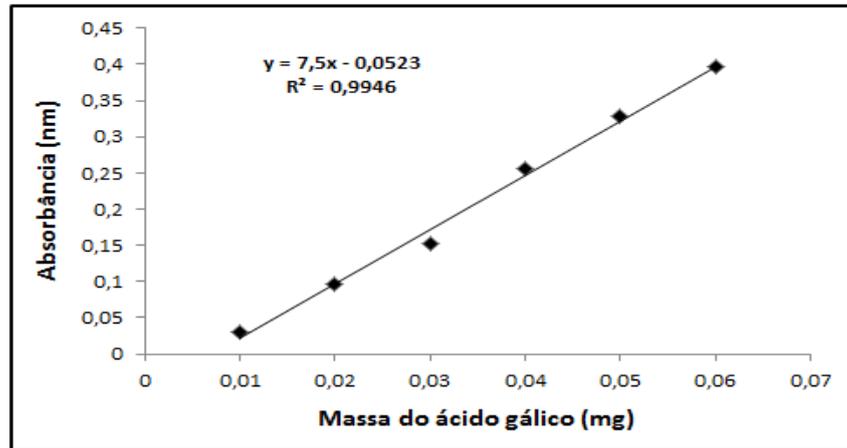


Figura 7: Curva de calibração do ácido gálico.

4.5.2 Teor de Flavonoides Totais (FT)

Para o teste de flavonoides, a cada 500 μL de extrato diluído em etanol (1mg/ml), adicionaram-se 1,50 mL de álcool etílico 95%, 0,10 mL de cloreto de alumínio 10% ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 0,10 mL de acetato de sódio ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (1 mol L^{-1}) e 2,80 mL de água destilada. Deixou-se reagir à temperatura ambiente por 40 minutos. Realizou-se a leitura no espectrofotômetro com em 415 nm. O mesmo procedimento foi empregado na análise do controle (LIN & TANG, 2007). Para calcular a concentração de flavonoides foi preparada uma curva analítica (2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 25,0; 50,0; 100,0 e 125,0 μg) empregando a quercetina como padrão e as respectivas absorbâncias foram lidas. Com estes dados foi feita a regressão linear e a equação da reta foi obtida e calculado seu valor real (Figura 6). Os resultados foram apresentados em mg de quercetina/g de extrato.

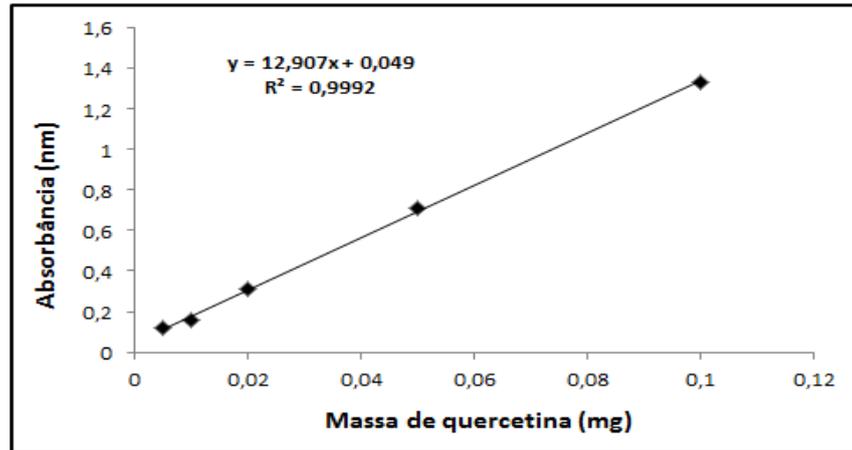


Figura 8: Curva de calibração da quercetina (FT).

4.5.3 Teor total de Flavonol (FLA)

Para análise do teor total de flavonol, em um tubo de ensaio, foi inserido 2 mL da solução etanólica do extrato de *P. deflexa*, 2 mL de solução etanólica de cloreto de alumínio à 2% e 3 mL de solução acetato de sódio (50g/L), incubando por 150 minutos à 20 °C. Após, leu-se a absorbância em espectrofotômetro à 440 nm. Com estes dados foi feita a regressão linear e a equação da reta foi obtida e calculado seu valor real (Figura 7). Os resultados foram expressos em mg de quercetina/g de extrato (ADEDAPPO et al., 2008)

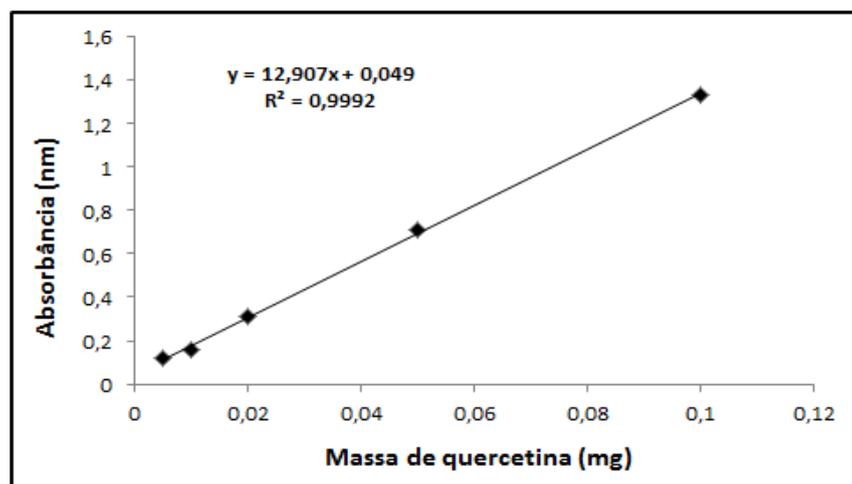


Figura 9: Curva de calibração da quercetina (FLA).

4.5.4 Teor de Taninos condensados (TC)

A metodologia utilizada foi descrita por Agostini-Costa et al. (1999), com adaptações. O extrato bruto de *P. deflexa*, foi solubilizado em metanol/HPLC na concentração 10 mg/mL. Após, 1 mL desta solução foi homogeneizado com 5 mL de reagente de vanilina em tubos de ensaio fechado. Em seguida os tubos de ensaio foram mantidos em banho-maria por 20 minutos à 30°C. As amostras foram lidas em espectrofotômetro à 500 nm, em triplicata. A catequina foi utilizada como padrão, nas concentrações de 2,5 a 40 µL. Com estes dados foi feita a regressão linear e a equação da reta foi obtida e calculado seu valor real (Figura 8). Os resultados foram expressos em mg de catequina/g de extrato.

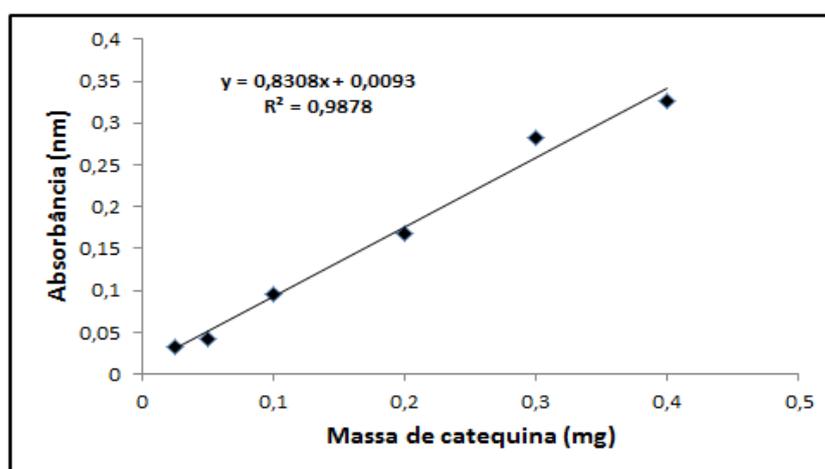


Figura 10: Curva de calibração da catequina.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Perfil fitoquímico

Para separação dos compostos, é de fundamental importância determinar o nível de polaridade do solvente utilizado, este irá conseguir eluir os compostos de natureza semelhante à sua. O metanol é um solvente orgânico de alta polaridade

utilizado no processo de maceração de plantas extraindo heterosídeos em geral, agliconas, ceras, sapogeninas, iridóides e sesquiterpenos (SIMÕES et al., 2003). O extrato metanólico de *P. deflexa* (EMPD) apresentou rendimento de 18,5% (114,7g).

A técnica de análise cromatográfica em camada delgada (CCD), visa obter a separação analítica de compostos através da afinidade dos componentes de uma mistura pela sua fase estacionária, sendo classificada por sua forma física (DEGANI et al., 1998; COLLINS, 2010).

Nas placas do grupo 1 utilizou-se como eluente a solução de hexano/acetato de etila 30% (média polaridade), obtendo-se 4 halos principais, codificados como a, b, c e d com R_f de 0,11, 0,32, 0,48 e 0,76, respectivamente. O grupo 2, foi preparado devido ao grupo 1 apresentar em sua base halo referente à compostos, desta forma, realizou-se uma nova análise via CCD com solvente metanol 100% (alta polaridade) e observou-se 2 halos principais (e e f) com $R_f = 0,44$ e 0,82). A revelação em CCD das placas do grupo 1 e 2 quando submetidas a lâmpada UV, revelaram a presença de compostos com dupla ligação e a presença de terpenos quando submetidas ao revelador químico anisaldeído, pela presença de coloração roxa (Figura 9). Terpenos e esteroides, são sintetizadas, a partir da condensação de uma molécula de acetil-CoA ligada a uma unidade de acetoacetil-CoA (SIMÕES et al., 2003). A revelação das placas 1 e 2, com iodo e dragendorff não apresentaram parâmetros físicos.

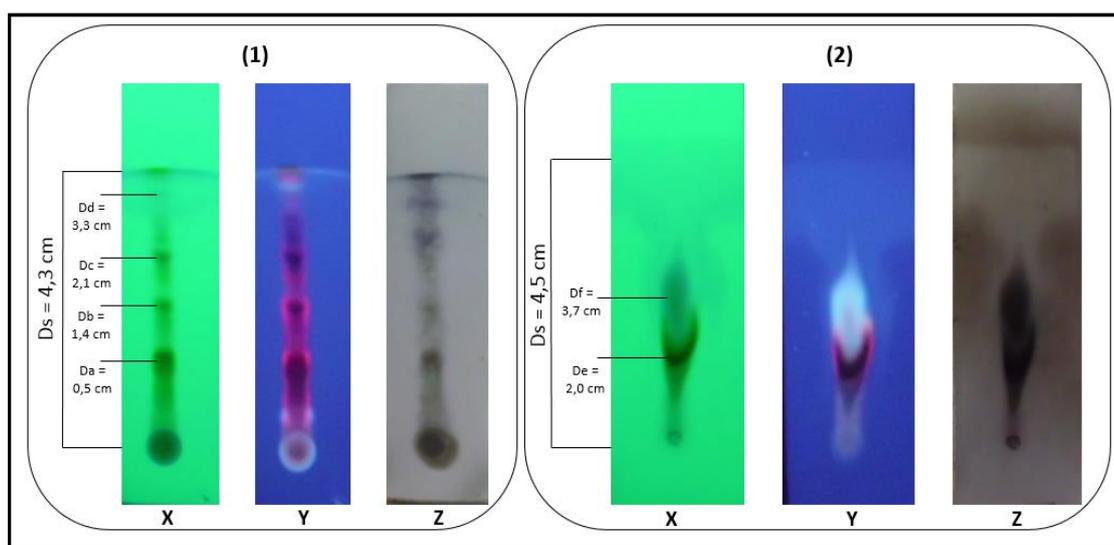


Figura 11: Análise em CCD. Grupo 1 (hexano/acetato de etila 30%) e 2 (metanol 100%), três placas (x visualizada em UV 254, y em 365 e z revelada em terpeno). D_s : distância do solvente e $D(a;b;c;d;e;f)$: distância das amostras em centímetros (cm).

5.2 Atividade antioxidante

As metodologias de avaliação antioxidante utilizadas, possuem em comum, a capacidade de sequestro de radical livre em uma substância resultando em uma alteração de cor, determinada via espectrofotômetro. A reação química fotocolorimétrica das técnicas de DPPH \cdot , ABTS \cdot^+ e redução do ferro (FRAP), são apresentadas na figura 10.

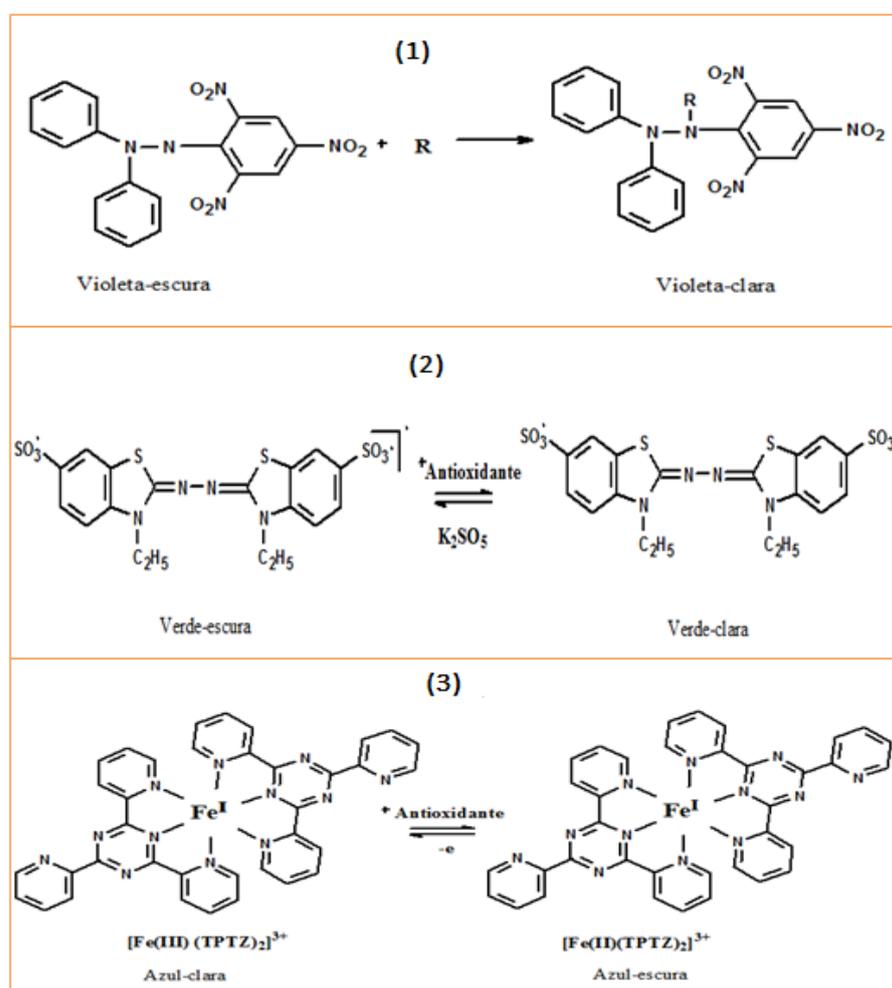


Figura 12. Representação das reações fotocolorimétricas antioxidantes “*in vitro*” avaliadas: 1 - DPPH \cdot , 2- ABTS \cdot^+ , 3- FRAP.

Os resultados das avaliações das atividades antioxidantes estão apresentados na Tabela 3. O EMPD apresentou baixa atividade antioxidante pelo ensaio de DPPH

(IC₅₀=146,4 µg/mL), quando comparado com padrão BHT (IC₅₀=16,72 µg/mL). O BHT, é classificado como antioxidante sintético primário, o qual demonstra capacidade de doar um próton para estabilizar o radical livre. O EMPD não apresentou promissora atividade antioxidante (AA=26.5%), via método β-caroteno/ác. linoleico, comparado ao BHT (91.2%), mas, comparado ao ácido ascórbico (4.13%) se mostrou mais eficiente. O β-caroteno, uma vitamina solúvel em água, se encaixa no grupo de antioxidantes do tipo nutrientes, utilizada como padrão no método de β-caroteno/ácido linoleico, com sua principal capacidade eliminar o oxigênio singlete (¹O₂). No ensaio de ABTS, o extrato também apresentou baixa eficácia (AA=15.58%) quando comparado ao ácido ascórbico (AA=80.9%), demonstrando assim baixo índice de eliminação de oxigênio. Pelo ensaio de redução de ferro (FRAP), o EMPD demonstrou uma concentração de 2369.6 µM FeSO₄/ grama de extrato.

Tabela 3. Resultados da avaliação antioxidante frente aos ensaios DPPH•, β-Caroteno, ABTS e FRAP.

AMOSTRAS	ENSAIOS ANTIOXIDANTE				
	DPPH•		β-Caroteno	ABTS•+	FRAP
	IC ₅₀ (µg/mL)	% CRL	(% AA)	(AA%)	(µM FeSO ₄ /g)
EMPD	146.4	66.37	26.05	15.58	2369.6
BHT	16.72	92.19	91.20	96.4	n.d.
ÁC. ASCÓRBICO	22.28	96.4	4.13	80.9	n.d.
QUERCETINA	n.d.	n.d.	80.65	n.d.	n.d.
FESO₄	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3150,0

IC₅₀: Concentração inibitória necessária em 50%, micrograma por microlitro de composto. %CRL: Porcentagem de Captura de Radical Livre. %A.A.: Porcentagem de Atividade Antioxidante. µM/g: micromolar por grama de extrato. n.d.: Não determinado.

Analisando os resultados das metodologias antioxidantes utilizadas, determinamos que apenas o teste de redução de ferro (FRAP), apresentou considerável importância para a avaliação do extrato metanólico de *P. deflexa*. Determinando que a amostra possui maiores quantidades de constituintes químicos que promovem a complexação do íon ferro.

5.3 Teor de constituintes químicos

Compostos fenólicos possuem atividade antioxidante, as quais podem ser encontradas através da extração de metabólitos secundários de plantas. As estruturas fenólicas em sua totalidade, possuem um anel benzênico (C₆) ligado à uma cadeia substituinte de carbono (C_n), com exceção dos fenóis simples que possuem apenas o anel benzênico como esqueleto básico (SIMÕES et al., 2003).

Na planta os flavonoides têm diferentes funções, como proteção contra raios ultravioletas e visível, proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias, inibidores de enzimas, entre outros, são também utilizados como marcadores taxonômicos. Para humanos, os flavonoides, são utilizados em diferentes processos produtivos, como tanagem de couro e fermentação, e processos farmacológicos, como antitumoral, antioxidante e antiviral (SIMÕES et al., 2003), as estruturas fenólicas são as principais neutralizadoras de processos oxidativos, devido ao impedimento da formação de radicais livres (NASCIMENTO et al., 2015). A quantificação do teor de constituintes químicos determina a quantidade de compostos secundários presente no vegetal, tendo como função direcionar o estudo sobre o potencial farmacológico da espécie.

Os resultados obtidos para o teor total de flavonoides, flavonol, fenóis e taninos condensados estão apresentados na tabela 4. O EMPD apresentou resultados promissores para o teor total de flavonol com 275.07 mg QE/ g EM e taninos condensados 194.67 mg de catequina/ g EM, representando 27,5% e 19,4%, respectivamente em 1 mg de extrato, ou seja, dos constituintes químicos presentes nas folhas de *P. deflexa*, aproximadamente 47% foi referente a flavonóis e taninos condensados.

Tabela 4. Resultados do teor total de constituintes químicos. QE: quercetina, AG: ácido gálico, CT: catequina, TC: Taninos condensados.

Espécie	Avaliação do teor total			
	Flavonoides (mg QE/g EM)	Flavonol (mg QE/ g EM)	Fenóis (mg AG/ g EM)	TC (mg CT/ g EM)
<i>P. deflexa</i>	37.64	275.07	111.42	194.67

Os flavonóis, são frequentemente oxigenados e facilmente destruídos por hidrólise ácida, os mais comumente encontrados em vegetais são o canferol, quercetina e miricetina. Em especial a quercetina possui propriedades farmacológicas, como antitumoral, anti-inflamatória, antiúlcera, antiviral e antioxidante (SIMÕES et al., 2003). Behling et al. (2004), descreve que os flavonóis possuem capacidade ao combate e prevenção de diferentes tipos de doenças, como carcinoma ovariano, desregulação do ciclo celular e tumores, relata também a ação antiproliferativa em células. A alta quantidade de flavonol, frente aos outros avaliados, se deve por esta classe ser facilmente encontrada em espécies vegetais.

Os taninos condensados, são formados pela ligação de unidades de flavonoides possuindo alto peso molecular e classificados como polímeros, este tem a característica de reagir e precipitar proteínas promovendo um efeito antimicrobiana e antifúngico, na saúde, este tem capacidade de auxílio em cura de feridas, queimaduras e inflamações, onde agem formando uma camada protetora sobre tecidos epiteliais (SIMÕES et al., 2003; VERONESE, 2011). Simões et al. (2003), relata que taninos condensados possuem ao mínimo, três características gerais, a complexação com íons metálicos, atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres e a complexação de macromoléculas. Este relato, pode estar intimamente ligado ao resultado da avaliação antioxidante via método de redução de ferro (FRAP).

De acordo com Monteiro, (2005) e Behling et al. (2004), taninos e flavonóis possuem a habilidade de se ligarem a proteínas celulares e apresentarem atividades tóxicas. No presente trabalho encontrou-se altas quantidades (em mg) para flavonóis e taninos condensados, o qual, sugere que pode haver uma relação com o trabalho apresentado por Oliveira et al. (2011), sobre o potencial inibitório do ciclo celular em *Allium cepa* através do extrato de *P. deflexa*.

6 CONCLUSÃO

O extrato metanólico de *P. deflexa* apresentou promissores valores *in vitro* quanto submetido ao ensaio de redução do ferro – FRAP (2369.6 μ M de sulfato ferroso/g de extrato) para avaliação da atividade antioxidante e considerável teor de flavonol e taninos condensados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia, da planta ao medicamento**. 5. ed.: Editora UFRGS / Editora UFSC, p. 371-657, 2003.

GOMES, S. V. F.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. **Eclética Química**, v. 36, n. 01, p. 64-77, 2011. Doi: 10.1590/S0100-46702011000100005

LOPES, S.; POSER, G. L. V.; KERBER, V. A.; FARIAS, F. M.; KONRATH, E. L.; MORENO, P.; SOBRAL, M. E.; ZUANAZZI, J. A. S.; HENRIQUES, A. T. Taxonomic significance of alkaloids and iridoid glucosides in the tribe Psychotrieae (Rubiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 1187-1195, 2004. Doi: 10.1016/j.bse.2004.04.015

RODRIGUEZ, P. D. A.; ROMERO, L. T. O.; TACHA, A. L.; PEREA, E. M.; ARTEAGA, J. J. M.; ARANGO, W. M. Estudio químico y etnobotánico de *Croton leptostachyus*. **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**, v. 38, n 149, p. 356-363, 2014.

LU, H-X.; LIU, L-Y.; LI, D-P.; LI, J-Z; XU, L-C. A new glycoside from the root of *Psychotria rubra*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 57, p. 133-136, 2014. Doi: 10.1016/j.bse.2014.07.024

PORTO, D. D. **Papel do alcaloide braquicerina na resposta ao estresse por radiação ultravioleta e dano mecânico em *Psychotria brachyceras* Mull Arg.** Rio

Grande do Sul. Tese de doutorado (Biologia celular e molecular) – Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

DEVADOSS, S.; MURUGAIYAN, I.; RAJAN, M.; THANGARAJ, P. Evaluation of phytochemical, antioxidante and antimicrobial properties of ethnomedicinal plant *Psychotria nilgiriensis* Deb. & Gang. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 3, p. 417-422, 2013.

FORMAGIO, A. S. N.; VOLOBUFF, C. R. F.; SANTIAGO, M.; CARDOSO, C. A. L. VIEIRA, M. do C.; PEREIRA, Z. V. Evaluation of antioxidante activity, total flavonoids tannins and phenolic compounds in *Psychotria* leaf extracts. **Antioxidants**, v. 3, p. 754-757, 2014. Doi: 10.3390/antiox3040745

FRAGOSO, V.; NASCIMENTO, N. C. do; MOURA, D. J. SILVA, A. C. e; RICHTER, M. F.; SAFFI, J.; FETT-NETO, A. G. Antioxidant and antimutagenic properties of the monoterpene índole alkaloid psychollatine and the crude foliar extract of *Psychotria umbellata* Vell. **Toxicology in vitro**, v. 22, n. 3, p. 559-566, 2008. Doi: 10.1016/j.tiv.2007.11.010

NASCIMENTO, R. R. G.; MONTEIRO, J. A.; PIMENTA, A. T. A.; TREVISAN, M. T. S.; BRAZ-FILHO, R.; SOUZA, E. B. de; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S. Novos flavonoides de *Margaritopsis carrascoana* com atividade antioxidante. **Química Nova**, v. 38, n. 01, p 60-65, 2015. Doi: 10.5935/0100-4042.20140289

ADJIBADÉ, Y. Pharmacognoise Du *Psychotria forsteriana* A. Gray (RUBIACEAE). **Aspects Botanique Chimique et Essais Pharmacologiques Prelimaires**, 1989.

ADEDAPO, A. A.; JIMOH, F. O.; KODURU, S.; AFOLAYAN, A. J.; MASIKA, P. J. Antibacterial and antioxidante properties of the metanol extracts of the leaves and stems of *Calpurnia aurea*. *Bio Med Central*, v. 8, p. 53, 2008. Doi: 10.1186/1472-6882-8-53

AGOSTINI-COSTA, T. S.; GARRUTI, D. S.; LIMA, L.; FREIRE, S.; ABREU, F. A. P.; FEITOSA, T. Avaliação de metodologias para determinação de taninos no suco de caju. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 17, n. 2, p. 167-176, 1999.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M.B. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010. Doi: 10.1590/S0100-40422010001000033

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. de C. G.; PAULA, S. O. de; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista Nutrição**, v. 23, n. 04, p. 629-643, 2010. Doi: 10.1590/S1415-52732010000400013

BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. de L. P. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, n. 03, p. 285-292, 2004.

CAZARIN, C. B. B.; SILVA, J. K. da; COLOMEU, T. C.; ZOLLNER, R. de L.; JUNIOR, M. R. M. Capacidade antioxidante e composição química da casca de maracujá (*Passiflora edulis*). **Ciencia rural**, v. 44, n. 09, p. 1669-1704, 2014. Doi: 10.1590/0103-8478cr20131437

COLLINS, C. H. V. O desenvolvimento da cromatografia em camada Delgada. **Scientia Chromatographica**, v. 02, n. 01, p. 5-12, 2010. ISSN: 1984-4433

COTINGUIBA, G. G.; SILVA, J. R. do N.; AZEVEDO, R. R. de S.; ROCHA, T. J. M.; SANTOS, A. F. dos. Métodos de avaliação da defesa antioxidante: Uma revisão de Literatura. **Unopar Científica de Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 15, n. 03, p. 231-237, 2013.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; 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. Doi: 10.1590/S0100-40422010001000033

SOUZA, P. A. de. Alcaloides e o chá de ayahuasca: uma correlação dos “estados alterados da consciência” induzido por alucinógenos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n. 03, 2011. Doi: 10.1590/S1516-05722011000300015

DEGANI, A. L.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia um breve ensaio. **Química nova na escola**, v. 1, n. 07, 1998

DJERIDANE, A.; YOUSFI, M.; NADJEMI, B.; BOUTASSOUNA, D.; STOCKER, P.; VIDAL, N. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 97, p. 654-660, 2006.

ELISABETSKY, E.; AMADOR, T. A.; LEAL, M. B.; NUNES, D. S.; CARVALHO, A.; VEROTTA, L. Merging ethnopharmacology with chemotaxonomy: An approach to unveil bioactive natural products. The case of *Psychotria alkalids* as potential analgesics. **Ciencia e Cultura**, v. 49, p. 378-385, 1997.

FARIAS, F. B. *Psychotria myriantha* Mull Arg. (Rubiaceae): caracterização dos alcaloides e avaliação das atividades antiquimiotóxica e sobre o Sistema nervosa central. Porto Alegre. Tese de doutorado (Pós-graduação em farmácia) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

FRAGOSO, V. Alcalóides de *Psychotria*: fotorregulação e propriedades antioxidantes e antimutagenicas. Porto Alegre. Tese de mestrado (Pós-graduação em biologia celular e molecular) – Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2007.

GOMES, R. S. D. L. Estudo comparativo da *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes – Rubiaceae – do Bioma Amazônia obtida na mata nativa e de cultivo *in vitro* submetido a diferentes tratamentos de interceptação da radiação solar. Belo Horizonte. Tese de mestrado (Pós-graduação em Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmaceuticas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.

GUÉRITTE-VOEGELEIN, F.; SÉVENET, T.; PUSSET, J.; ADELIN, M. T.; GILLET, B.; BELOEIL, J. C.; GUÉNARD, D.; POTIER, P. Alkaloids from *Psychotria oleoides* with activity on growth hormone release. **Journal of Natural Products**, v. 55, p. 93-930, 1992.

JAYAPRAKASHA GK, SINGH RP, SAKARIAH KK. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinífera*) extracts on peroxidation models *in vitro*. **Food Chemistry**, v. 73, p. 285-290, 2001.

JAYASINGHE, U. L. B.; JAYASOORIYA, C. P.; BANDARA, B. M. R.; EKANAYAKE, S. P.; MERLINI, L. ASSANTE, G. Antimicrobial activity of some Sri Lankan Rubiaceae and Meliaceae. **Fitoterapia**, v. 73, p. 424-427, 2002.

LIMA, G.S.; MOURA, F.S.; LEMOS, R.P.L.; CONSERVA, L.M. Triterpenos de *Guettardagraziellae* M.R.V. Barbosa (Rubiaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, p. 284-289, 2009.

LIN JY & TANG CY. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. **Food Chemistry**, v. 101, p. 140-147, 2007.

MATTOS, L. M.; MORETTI, C. L.; MUNIZ, L. B.; SILVA, E. Y. Y. da. Protocolo de análise para determinação da atividade antioxidante total em hortaliças no sistema Beta-caroteno/ácido linoleico. **Comunicado Técnico – Embrapa**, v. 68, 2009.

MIATELO, J. H. B. **Biodiversidade e distribuição da Família Rubiaceae no Distrito Federal e nos Estados de Goiás e Tocantins**. Goiania. Tese de mestrado (Pós-graduação em ecologia e evolução) - Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Goiás, 2008.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P. de; ARAÚJO, E. de L.; AMORIM, E. L. C. de. Taninos: uma abordagem química a ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 05, p. 892-896, 2005. Doi: 10.1590/S0100-40422005000500029

OLIVEIRA, M.G. de; PEREIRA, Z. V.; USHIROBIRA, T. M.; RISSATO, D. F.; MOURA, V. M. de. Atividade citotóxica preliminar do chá das folhas de uma espécie

do gênero *Psychotria* em células meristemáticas de *Allium cepa*. **Anais - VII Jornada Acadêmica e científica de Ingá**, v. 2, n.5, p.112, 2011. ISSN: 2178-2571

OLIVEIRA^a, A. C. de; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidante. **Química Nova**, v. 32, n. 03, p. 689-702, 2009. Doi: 10.1590/S01000-40422009000300013

OLIVEIRA^b, D. da S.; AQUINO, P. P.; RIBEIRO, S. M. R.; PROENÇA, R. P. da C.; SANT'ANA, H. M. Vitamina C, carotenoides, fenólicos totais e atividade antioxidante de goiaba, manga e mamão procedentes da Ceasa do Estado de Minas Gerais. **Acta Scientiarum**, v. 33, n. 01, p. 89-98, 2011. Doi: 10.4025/actascihealth.v33i1.8052

PIRES, A.P.S.; OLIVEIRA, C.D.R.; YONAMINE, M. Ayahuasca: uma revisão dos aspectos farmacológicos e toxicológicos. **Revista de Ciências Farmaceuticas Básica e Aplicada**, v. 31, p.15-23, 2010.

PORTAL BRASIL. Saiba mais sobre a indústria farmacêutica do País. Disponível em: <www.brasil.gov.br/ciencia-e-tecnologia/2010/12/industria-farmaceutica>. Acesso em: 28 agost. 2010.

RASOLONJANAHARY, R.; SÉVENET, T.; VOEGELEIN, G. F.; KORDON, C. Psycholeine, a natural alkaloid extracted from *Psychotria oleoides*, acts as a weak antagonist of somatostatin. **European Journal of Pharmacology**, v. 285, p. 19-23, 1995.

RUFINO, M. do S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E.S. de; MORAIS, S.M. de; SAMPAIO, C. de G.; JIMÉNEZ, J. P.; CALIXTO, F. D. S. Metodologia Científica:

Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP). **Comunicado técnico on-line - Embrapa**, v.125, 2006. ISSN 1679-6535

RUFINO, M do S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E.S. de; MORAIS, S. M. de; SAMPAIO, C. de G.; JIMÉNEZ, J. P.; CALIXTO, F.D.S. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS. **Comunicado Técnico on-line - Embrapa**, v. 128, 2007.

SANTOS, S. N.; CASTANHA, R. F.; HABER, L. L.; MARQUES, M. O. M.; SCRAMIM, S.; MELO, I. S. de. Determinação quantitativa da atividade antioxidante de extratos brutos de microorganismos pelo método de captura de radical livre DPPH. **Comunicado Técnico – Embrapa**, v. 50, 2011.

SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T.; CARDOSO, C.; PAULETTI, P.; GAMBOA, I. C.; BOLZANI, V. da S.; VELASCO, M. V. R.; MENEZES, C. M. de S. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas**, v. 43, n. 02, p. 153-166, 2007. Doi: 10.1590/S1516-933322007000200002

SINGLENTON, V. L.; JOSEPH, A.; ROSSI, J. R. J. A. Colorimetry of totl phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagentes. **American Journal Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.

SOUSA, J. B. A. S. P. **Actividade biológica de derivados do Ácido cafeico: efeito antioxidante e anti-inflamatório**. Porto. Tese de mestrado (Pós-graduação em Farmácia) – Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, 2008.

SUETH-SANTIAGO, V.; MENDES-SILVA, G. P.; DECOTÉ-RICARDO, D.; LIMA, M. E. F. de. Curcumina, o pó do açafrão-da-terra: introspecções sobre química e atividades biológicas. **Química Nova**, v. 38, n. 04, p. 538-552, 2015. Doi: 10.5935/01000-4042.20150035

TAKAYAMA H, MORI I, KITAJIMA M, AIMI N, LAJIS NH. New type of trimeric and pentameric índole alkaloids from *Psychotria rostrata*. **American Chemical Society**, v. 6, n. 17, p. 2945-5948, 2004. Doi: 10.1021/ol048971x

VERONESE, P. Q. A hora é a vez dos taninos condensados. **Food ingredientes Brasil**, nº19 p. 2-4, 2011.

ANEXO A – Lista de reagentes

Produto	Marca	Pureza (%)	Peso molecular
β-caroteno	Sigma-Aldrich®	97.0	536,87
Acetato de sódio	Vetec®	99.0 – 100.5	136,08
Ácido gálico	Vetec®	99.0 – 100.5	170,12
Ácido Linoleico	Vetec®	> 90.0	280,45
Álcool etílico	Sigma -Aldrich®	99.5	46,07
Carbonato de sódio	Dinâmica®	99.5	84,01
Catequina	Sigma-Aldrich®	> 98	290,27
Cloreto de Alumínio	Vetec®	99.5	241,43
Clorofórmio PA	Vetec®	99.8	119,38
DPPH	Sigma-Aldrich®	> 85.0	394,32
Folin-Ciocalteu's	Vetec®	98.0	N/A
Hexano	Dinâmica®	98.5	86,18
Metanol PA	Cromato®	99.5	32,04
Metanol-HPLC	Vetec®	99.9	32,04
Quercetina	Sigma-Aldrich®	> 95.0	302,23
Vanilina	Sigma-Aldrich®	98.0	152,15
Trolox	Aldrich	97.0	250,29
TPTZ	Sigma	≥98.0	312,33
ABTS	Sigma-Aldrich	≥98.0	548,68