

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIENCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

SUELLEN RODRIGUES RAMALHO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E QUANTIFICAÇÃO DO TEOR
DE FENÓIS, FLAVONÓIDES E TANINOS CONDENSADOS DE *Psychotria*
carthagenensis e *P. leiocarpa***

DOURADOS

2013

SUELLEN RODRIGUES RAMALHO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E QUANTIFICAÇÃO DO TEOR
DE FENÓIS, FLAVONÓIDES E TANINOS CONDENSADOS DE *Psychotria*
carthagenensis e *P. leiocarpa***

Trabalho de Conclusão do Curso, apresentado a Universidade Federal da Grande Dourados, UFGD, como parte das exigências do curso de Biotecnologia para obtenção do título em Bacharel em Biotecnologia.

Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais

Universidade Federal da Grande Dourados

Orientadora: Profa. Dra. Anelise Samara Nazari Formagio

Co-orientadora: Profa. Dra. Cláudia Roberta Damiani

DOURADOS

2013

*Dedico este trabalho aos
meus pais e a minha irmã
pelo apoio e suporte em
toda a minha vida...*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por nunca me deixar perder a fé.

Aos meus queridos e amados pais Roberto Ramalho e Glaucia Ethel Rodrigues, que tanto incentivaram na perseverança da conclusão deste sonho.

Á minha irmã pela amizade e carinho que nos une.

Á minha avó, exemplo de vida e determinação.

Á minha orientadora Dr. Anelise Samara Nazari Formagio, pela orientação, ensinamentos, apoio e dedicação, que nesses quatro anos, abriu-me as portas da ciência e contribuiu para minha formação acadêmica. Contribuindo firmemente no meu caminho pela ciência.

Aos meus companheiros de laboratório, pelo companheirismo e amizade durante nossa rotina diária de trabalho. À Suzana Hein, pela amizade, dedicação e cuidado. Pelos momentos de alegria compartilhados no laboratório de Plantas Mediciniais.

Á prof. Dr^a. Maria do Carmo Vieira pela confiança e a possibilidade de realização do trabalho.

Á todos meus professores que compartilharam seus conhecimentos e que contribuíram para minha formação. Em especial a prof. Dr^a. Claudia R. Damiani pela amizade, dedicação e modo acolhedor com a primeira turma de Biotecnologia.

À prof. Dr^a. Liliam Candido pela amizade e companheirismo.

Ao CNPQ pela bolsa de estudo.

À Universidade Federal da Grande Dourados.

Ao programa “Ciencia sem Fronteiras” pela realização do intercâmbio.

À Universitat de Barcelona e o Departamento de Biotecnologia Vegetal-Produção de Fitofármacos pela realização do estágio.

Ao prof. Dr. Javier Palazón Barandela, pelas orientações do período de estágio e todo o grupo de pesquisa, Ana Gallego, Karla Ramirez Estrada, Heriberto Rafa Ramirez, Diego Hidalgo, Liliana Córdova por todos os ensinamentos.

À Banca Examinadora pela disponibilidade e orientações para melhoria deste trabalho.

Aos meus queridos amigos que nestes quatro anos de curso, participaram dos trabalhos realizados das indagações, dos sorrisos compartilhados e alegrias vividas. Em especial a Danielly Beraldo, Nicholas V. da Silva, Igor Chiarelli, Luiz Augusto Cauz dos Santos, Carla R. Wolobueff, Lara Endres. Pela amizade de anos Albneir dos Santos Souza, Nathália Lopes, Sulamita Portes, Danilo Portes, Dryely Silva, Isabela Bernal e Landerson Bernal.

Aos meus queridos amigos que mesmo de longe participaram da minha trajetória, Evelize G. Figueiredo pela paciência e amizade durante todos esses anos, ao Wandrey Tosta pela amizade incondicional. E a todos que contribuíram com o meu crescimento tanto profissional como pessoal. Muito Obrigada!

SUMÁRIO

1. ASPECTOS GERAIS	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. <i>Psychotria</i>	3
2.2. <i>Psychotria carthagenensis</i> Jacq.....	6
2.3. <i>Psychotria leiocarpa</i> Cham. & Schlecht.....	7
2.4. Atividade Antioxidante e Compostos Fenólicos.....	8
3. OBJETIVO	12
3.1. Objetivo Geral.....	12
3.2. Objetivos Específicos.....	12
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1. Obtenção e identificação do material botânico.....	13
4.2. Secagem do material vegetal e preparação do extrato metanólico.....	13
4.3. Teor de polifenóis totais (PT).....	13
4.4. Teor de flavonóides totais (FT).....	13
4.5. Taninos Condensados (TC).....	14
4.6. Atividade Antioxidante de radicais livres- DPPH.....	14
4.7. Teste de branqueamento do β -caroteno/ ácido linoléico.....	14
4.8. Perfil Fotoquímico.....	15
5. RESULTADOS E DISCUSÕES	16
5.1. Avaliação da atividade antioxidante.....	16
5.2. Teor de constituintes.....	17
6. CONCLUSÃO	20
7. REFERÊNCIAS	21

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Atividade antioxidante
PT	Polifenóis totais
FT	Flavonóides totais
TC	Taninos condensados
DPPH·	Difenil-picril-hidrazil
IC₅₀	Inibição de concentração
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência/High Performance liquid Chromatography
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
CCD	Cromatografia em camada delgada

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Alcalóides ativos isolados de <i>P. ipecacuanha</i>	3
Figura 2:	Alcalóides presentes na “bebida alucinógena” ayahuasca de <i>Psychotria carthagenensis</i>	4
Figura 3:	Estrutura química do alcalóide isolado de <i>Psychotria myriantha</i>	4
Figura 4:	Alcalóides indólicos de <i>Psychotria suterella</i>	5
Figura 5:	Alcalóide extraído das folhas de <i>Psychotria umbellata</i>	5
Figura 6:	Fotos ilustrativas de <i>Psychotria carthagenensis</i> (PEREIRA, Z.V, 2010).....	6
Figura 7:	Compostos químicos de <i>Psychotria carthagenensis</i>	7
Figura 8:	Fotos ilustrativas de <i>Psychotria leiocarpa</i>	7
Figura 9:	Alcalóide indólico glicosilado isolado das folhas de <i>Psychotria leiocarpa</i>	8
Figura 10:	Classificação dos antioxidantes. Adaptado de RATMAN et al., 2006.....	10
Figura 11:	Curva de calibração para obtenção da equação da reta empregando ácido gálico para determinação de fenóis totais.....	14
Figura 12:	Curva de calibração para obtenção da equação da reta empregando quercetina para determinação de flavonóides totais.....	14
Figura 13:	Curva de calibração para obtenção da equação da reta empregando catequina para determinação taninos condensados.....	15
Figura 14:	Descoloração do radical livre DPPH.....	18
Figura 15:	Análise qualitativa por CCD do extrato metanólico de <i>Psychotria leiocarpa</i> e <i>Psychotria carthagenensis</i> para alcalóides.....	20

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Atividade antioxidante DPPH (IC₅₀) e sistema β-Caroteno (%) dos extratos metanólicos das espécies de *Psychotria*..... **17**
- Tabela 2.** Polifenóis totais (PT), Flavonóides totais (FT) e Taninos Condensados (TC) dos extratos metanólicos de *P. carthagenensis* e *P. leiocarpa*..... **19**

RESUMO

Na medicina popular espécies de *Psychotria* são empregadas no tratamento de várias doenças, tais como: diarreia e parasitas intestinais, viral, infecções bacterianas entre outras. “Cafeieiro-do-mato” e “Pimenteira” é o nome popular dado a duas espécies da família Rubiaceae sendo respectivamente *Psychotria carthagenensis* e *Psychotria leiocarpa*. Estudos fitoquímicos relatam a presença de alcalóides como principais constituintes neste gênero. Desta forma o objetivo do trabalho foi avaliar *in vitro* a atividade antioxidante e teor de fenóis, flavonóides e taninos condensados do extrato metanólico das folhas de *P. carthagenensis* e *P. leiocarpa*. A atividade antioxidante foi realizada pelo método fotocolorimétrico *in vitro* do radical livre estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e pelo branqueamento do β -caroteno/ácido linoleico. O teor de fenóis totais foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu's, tendo o ácido gálico como padrão, flavonóides pelo reagente de cloreto de alumínio, quercetina como padrão e taninos condensados utilizando o reagente acidificado de vanilina e catequina como padrão. Os resultados demonstraram que ambos os extratos metanólicos de apresentaram significativa atividade antioxidante no ensaio de DPPH, com os valores de IC₅₀ de 3,0 μ g/mL para *P. carthagenensis* e IC₅₀ de 15, 20 μ g/mL para *P. leiocarpa*, quando comparado ao controle BHT (IC₅₀ de 16,8 μ g/mL). Frente ao método do β -Caroteno/ácido linoleico *P. leiocarpa* foi a mais promissora (AA = 82,1%). Em relação ao teor de metabólitos secundários, *P. leiocarpa* apresentou alto valor de TC de 304,68 mg/g de amostra e de FT com 83.04 mg de quercetina/g de amostra. O conteúdo de PT em ambas as espécies não foi representativo. Conclui-se que *P. leiocarpa* pode ser considerada uma promissora espécie vegetal para posteriores estudos.

Palavras-chave: Rubiaceae, DPPH, β -caroteno/ácido linoleico, polifenóis, flavonóides e taninos.

ABSTRACT

In folk medicine *Psychotria* species are employed in the treatment of various diseases such as diarrhea and intestinal parasites, viral, bacterial and other infections. "Cafeeiro-do-mato" and "Pimenteira" is the popular name given to two species of the family Rubiaceae being respectively *Psychotria carthagenensis* and *Psychotria leiocarpa*. Chemistry study related the presence of alkaloids, as constituents main. Therefore, the objective of the study was to evaluate the *in vitro* antioxidant activity and phenolic content, flavonoids and tannins of the methanolic extract of the leaves of *P. carthagenensis* and *P. leiocarpa*. The antioxidant activity was performed by *in vitro* fotolorimetric with free radical 2,2-diphenyl-1-picryl-hidrazila (DPPH) and β -carotene/ácido linoleic bleaching. The total phenolic content was determined by Folin-Ciocalteu's, the flavonoids for aluminum chloride reagent and condensed tannins using acidified vanillin reagent. The results showed that both the methanolics extracts of *P. carthagenensis* and *P. leiocarpa*, have significant antioxidant in the DPPH assay, with value of IC_{50} 3.0 mg / mL for *P. carthagenensis* and IC_{50} of 15.20 mg/mL for *P. leiocarpa*, which compared with to the control BHT (IC_{50} of 16.8 mg/mL). The method β -Carotene/ácido linoleic bleaching, *P. leiocarpa* was the most promising (AA = 82.1%). The *P. leiocarpa* CT showed a high value of 304.68 mg/g sample and TF of the 83.04 mg of quercetin/g of sample. The PT content in both species was not representative. It was concluded that *P. leiocarpa* can be considered a promising plant species for further studies.

Keywords: Rubiaceae, DPPH, β -carotene/acid linoleic, polyphenols, flavonoids, tannins.

1. ASPECTOS GERAIS

As plantas são fontes importantes de produtos naturais com uma vasta aplicação, uma vez que compostos encontrados na natureza revelam uma gama inacreditável de diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas.

O potencial químico dos vegetais estimula o interesse de indústrias alimentícias, devido ao uso de produtos naturais para dar cor e sabor aos alimentos; de cosméticos pela utilização de essências naturais na fabricação de perfumes; farmacêutica, como fonte de fármacos e ainda, na indústria agroquímica, pelo uso cada vez mais frequente de herbicidas, fungicidas e inseticidas naturais (SIMÕES et al., 1999).

O emprego de produtos naturais de origem vegetal no desenvolvimento de substâncias biologicamente ativas tem aumentado consideravelmente, porém, das 350.000 a 550.000 espécies de plantas catalogadas, apenas um pequeno percentual foi investigado fitoquimicamente. Além disto, a fração submetida a investigações farmacológicas ou biológicas é ainda menor. Dados revelam que apenas 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal ou químico (SIMÕES et al., 1999).

Assim, a investigação fitoquímica e a avaliação biológica são de grande importância, pois o isolamento de princípios ativos e a modificação química destes pode resultar em descobertas de novos produtos com aplicação terapêutica. Outro aspecto a ser considerado é o fato de que o estudo fitoquímico pode contribuir para a classificação das plantas em função de seus constituintes químicos fornecendo subsídio para estudos de quimiotaxonomia.

Em função dos aspectos discutidos acima, e visto a gama da diversidade de espécies vegetais ainda não estudadas fitoquimicamente presentes na região centro-oeste, nos propusemos ao estudo do potencial químico de plantas presentes em Dourados-MS. Das várias famílias presentes nesta região, destaca-se a Rubiaceae, por sua ampla distribuição e pelo número de gêneros e espécies ocorrentes ainda não estudadas. Em função disto, do uso medicinal popular e da atividade farmacológica apresentada por muitas espécies desta família, além da importância das substâncias presentes, nos interessamos pelo estudo de espécies de Rubiaceae.

A Rubiaceae compreende espécies arbóreas e arbustivas, que ocorrem em florestas tropicais (BURGER & TAYLOR, 1987). Possui distribuição cosmopolita, incluindo aproximadamente 550 gêneros e 9.000 espécies. No Brasil, ocorrem cerca de 130 gêneros e

1.500 espécies, ocorrendo em quase todas as formações naturais (SOUZA & LOZENZI, 2005).

Segundo Robbrecht (1988), Rubiaceae pode ser dividida em quatro subfamílias: Rubioideae, Cinchonoideae, Ixoroideae e Artirheoideae. As espécies pertencentes à subfamília Rubioideae estão distribuídas em 15 tribos, dentre as quais a maior é Psychotrieae, com 50 gêneros, sendo que alguns deles apresentam delimitação incerta e controversa, como é o caso de *Psychotria* e *Palicourea* devido a sua complexidade taxonômica e a dificuldade de delimitação de suas fronteiras (LIBOT et al., 1987).

Visando ampliar os estudos químicos e biológicos de espécies da família Rubiaceae presentes na região de Dourados, desenvolvemos neste trabalho o estudo de espécies do gênero *Psychotria*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Psychotria*

O gênero *Psychotria* apresenta aproximadamente 2.000 espécies, sendo o maior gênero da tribo Psychotrieae e da família Rubiaceae, bem como das espécies lenhosas (DAVIS et al., 2001). De acordo com Nepokroeff (1999) são arbustivos, embora árvores, ervas, lianas e epífitas sejam também conhecidas.

Na medicina popular espécies de *Psychotria* são empregadas no tratamento de várias doenças, tais como: diarreia e parasitas intestinais, viral, infecções bacterianas, hipertensão, disfunções cardiovasculares, distúrbio mental e distúrbios alimentares (LOCHER et al., 1995; NEPOKROEFF et al., 1999; MCGAW et al., 2000; KUO et al., 2001; CABALLERO et al., 2001).

Em relação aos estudos fitoquímicos, destaca-se pela presença de alcaloides, principalmente alcaloides indólicos. Alcalóides são importantes exemplos de metabólitos secundários que deram origem a vários fármacos, como a morfina, isolada em 1806 com potente atividade hipnoalérgica (FARIAS, 2008). A classe de alcaloides predominante no gênero *Psychotria* tem como origem o amino ácido triptofano, sendo na sua maior parte, indol não-iridoidicos (não-monoterpênicos), com destaque no grupo dos triptamínicos (N, N-dimetiltriptamina, N-metiltriptamina), polindólicos ou derivados metiltriptamínicos (RIBEIRO, 2010).

De *P. ipecacuanha* destaca-se os alcalóides cefaleina com atividade antimalárica e antileishmania e emetina com atividade expectorante, amebicida e propriedades de indução ao vômito (Figura 1) (MUHAMMAD et al., 2003).

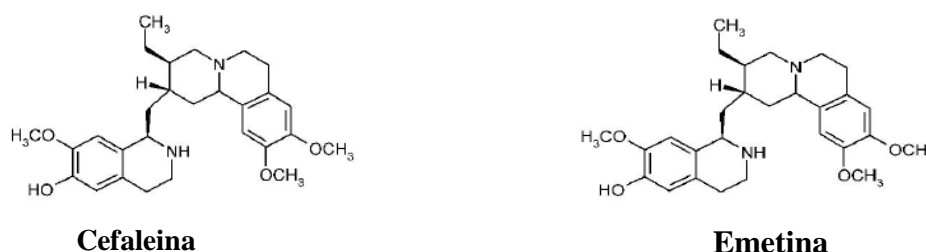


Figura 1: Alcaloides ativos isolados de *Psychotria ipecacuanha*.

De *P. carthagenensis* prepara-se uma bebida alucinógena, conhecida popularmente como “Ayahuasca” no Peru, “Yagé” na Colômbia e no Brasil como “Caapi”, “Santo Daime”

ou simplesmente “Daime”, que possui derivados β -carbolina como tetraidro-harmina, harmalina, harmina e N, N-dimetiltriptamina (Figura 2) (SANTOS et al., 2007).

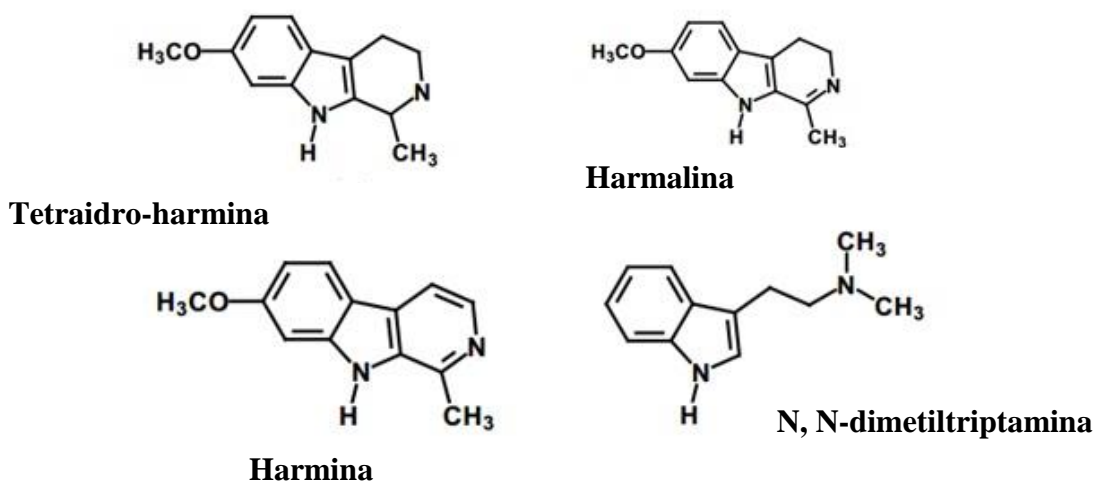
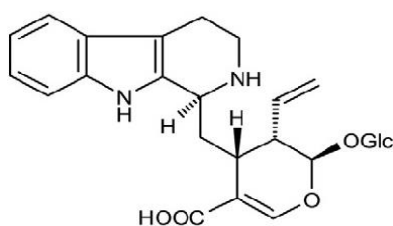


Figura 2: Alcaloides presentes na “bebida alucinógena” ayahuasca de *Psychotria carthagenensis*.

O alcaloide, ácido strictosidínico (Figura 3) isolado das folhas de *P. myriantha* foi capaz de inibir a enzima acetilcolinesterase e promover alterações nos sistemas dopaminérgico e serotoninérgico de ratos tratados pelas vias intracerebral e intraperitoneal, demonstrando potencial atividade central (FARIAS et al., 2012).



Ácido strictosidínico

Figura 3: Estrutura química do alcaloide isolado de *Psychotria myriantha*.

O extrato das folhas de *P. suterella* Müll. Arg. não apresentou atividade analgésica devido a alta toxicidade das frações alcaloidal, destacando os alcaloides lialosídeo, strictosamida e naucleatina (Figura 4) (SANTOS et al., 2001).

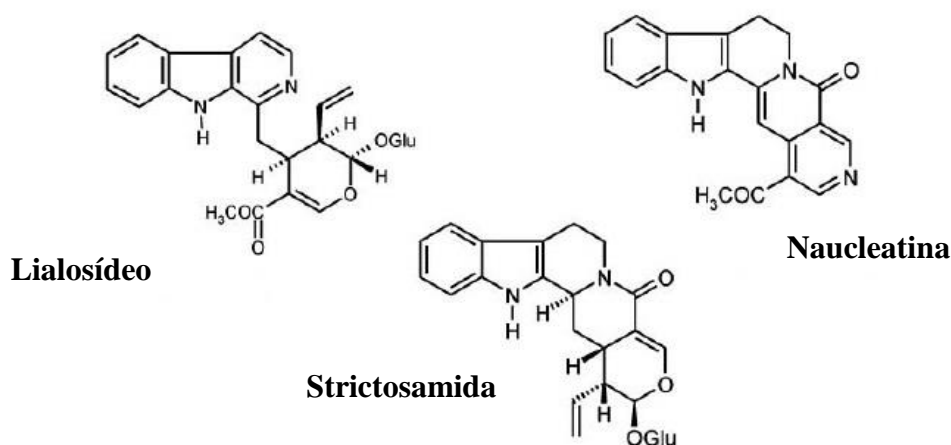


Figura 4: Alcaloides indólicos de *Psychotria suterella*.

As folhas de *Psychotria umbellata* são acumuladoras do alcalóide monoterpreno psicolatina (Figura 5), conhecido anteriormente como umbellatina (KERBER et al., 2008), com atividade analgésica, ansiolítica, antidepressiva, e efeitos amnésicos e sedativos em doses mais elevadas (BOTH et al., 2005). Tanto psicolatina como o extrato metanólico de *P. umbellata* apresentaram propriedades antioxidantes e antimutagênicas em *Saccharomyces cerevisiae* (FRAGOSO et al., 2008).

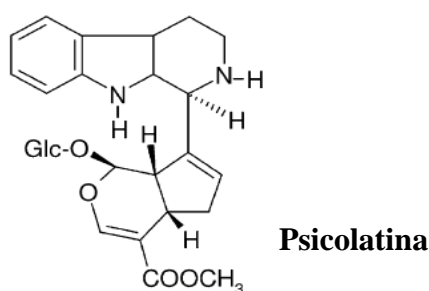


Figura 5: Alcaloide extraído das folhas de *Psychotia umbellata*.

Uma pesquisa etnofarmacológica mostrou que remédios caseiros preparados com flores, frutos e raízes de *P. colorata* (Willd. ex R. & S.) Muell. Arg. são usados por caboclos amazônicos como analgésicos (ELISABETSKY et al., 1995).

2.2. *Psychotria carthagenensis* Jacq.

P. carthagenensis Jacq. (Figura 6) é encontrada nas Américas da Costa Rica a Argentina e no Brasil, ocorrendo do Pará ao Rio Grande do Sul (DELPRETE et al., 2005). É conhecida popularmente como “carne-de-vaca”, “cafeeiro-do-mato” ou “maria-mole” e é um dos componentes da bebida alucinógena “ayahuasca”, originalmente usado pelos povos da Floresta Amazônica. A propriedade alucinógena foi atribuída à presença do alcaloide dimetiltriptamina encontrado na espécie (FARIAS et al., 2006)

Segundo *The List Plant* (www.theplantlist.org) *P. carthagenensis* apresenta as seguintes sinónimas: *Mapouria alba* f. *intermedia* Chodat & Hassl, *Mapouria alba* var. *tristis* (Mull. Arg.), *Mapouria alba* var. *tristis* (Mull.Arg.) Chodat & Hassl. *Mapouria australis* Mull. Arg. *Mapouria catharinensis* Mull. Arg. *Mapouria crassa* Mull. Arg., *Mapouria* (DC) Lemeé, *Mapouria fockeana* (Miq) Bremek, *Mapouria martiana* Mull. Arg., *Mapouria robeniana* Mull. Arg. *Uragoga carthagenensis* (Jacq.) Kuntze, *Uragoga australis* (Mull.Arg.) Kuntze e *Uragoga compaginata* (Mull.Arg.) Kuntze, entre outros.



Figura 6: Foto ilustrativa de *Psychotria carthagenensis* (PEREIRA, Z. V., 2010)

Trabalhos fitoquímicos das folhas de *P. carthagenensis* demonstrou quantidades relevantes de N, N dimetiltriptamina e 2-metil-1, 2, 3, 4-tetrahidro- β -carbolina (Figura 7), exibindo potente atividade no sistema nervoso central (RIVIER & LINDGREN, 1972).

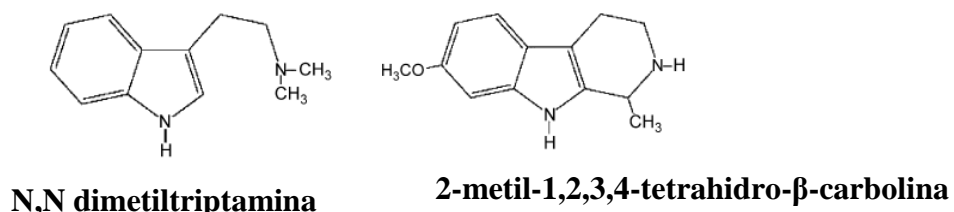


Figura 7: Compostos químicos de *Psychotria carthagenesis*.

2.3 *Psychotria leiocarpa* Cham. & Schlecht

P. leiocarpa Cham. & Schlecht (Figura 8), conhecida popularmente como pimenteira, é um arbusto podendo chegar a 2 m de altura, nativa da Argentina, Paraguai e Brasil na região Sul do estado do Rio Grande do Sul (LONGHI et al.,1999).

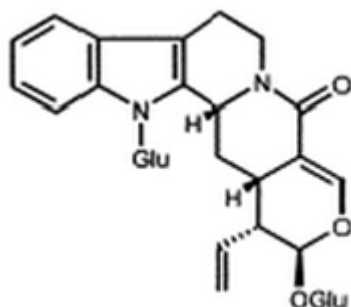
P. leiocarpa tem como sinomímias em sua nomenclatura como: *Psychotria leiocarpa* Cham. & Schldtl. *Psychotria leiocarpa* f. *angustifolia* Chodat & Hassl. *Psychotria* var. *constricta* (Mull.Arg.) Chodat Hassl. *Psychotria leiocarpa* var. *elliptica* Mull. Arg. *Psychotria leiocarpa* var. *extracarpa* Cham. *Psychotria leiocarpa* var. *extratropica* Cham & Schldtl (www.theplantlist.org).



Figura 8: Foto ilustrativa de *Psychotria leiocarpa*

(http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=4225), acesso em 15/06/2013.

O estudo fitoquímico do extrato etanólico das folhas de *P. leiocarpa* revelou o alcaloide indólico glicosilado, N, β -glucopiranosil vincosamida (Figura 9), com teores de 2,5 de seu peso seco (HENRIQUES et al., 2004).



N, β -glucopiranosil vincosamida

Figura 9: Alcaloide indólico glicosilado isolado das folhas de *Psychotria leiocarpa*.

Foi verificado que o extrato das folhas de *P. leiocarpa* possui compostos fitotóxicos com efeito inibitório sobre as seguintes espécies *L. sativa L.*, *Mimosa bimucronata DC.*, *Chorisia speciosa*. (CORRÊA et al., 2008). O extrato etanólico das folhas *P. leiocarpa* produziu uma atividade analgésica não específica na cauda teste de filme (ELISABETSKY et al., 1995).

2.4. Atividade Antioxidante e Compostos Fenólicos

Atualmente, uma quantidade substancial de evidências tem indicado o papel chave dos radicais livres e outros oxidantes como grandes responsáveis pelo envelhecimento e o surgimento de doenças degenerativas associadas, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (ALVES et al., 2010). Em função dos possíveis problemas provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, as pesquisas tem-se voltado no sentido de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante (SOUSA et al., 2007).

A oxidação é um processo essencial aos organismos aeróbios e ao nosso metabolismo, sendo os radicais livres produzidos naturalmente, como consequência desse processo de oxidação, ou por alguma disfunção biológica. Nestes radicais, o elétron desemparelhado encontra-se no átomo de oxigênio ou nitrogênio, sendo, portanto, estes radicais classificados

como espécies reativas do oxigênio (ERO) ou espécies reativas do nitrogênio (ERN) (BARREIROS et al., 2006). Assim, os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem nos alvos biológicos das células. Os radicais formados a partir de antioxidantes não são reativos para propagar a reação em cadeia, sendo neutralizados por reação com outro radical, formando produtos estáveis ou captados por outro antioxidante.

Os antioxidantes podem ser definidos como sintéticos ou naturais. Dentro dos chamados naturais enquadra-se em dois grandes grupos os enzimáticos e não enzimáticos (Figura 10). Dentre as diversas classes de antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido grande atenção, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácido benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonoides e outros (RATNAM et al., 2006). Os compostos fenólicos são definidos como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. (SOARES et al., 2008). Por suas propriedades redutoras e estruturas químicas, as substâncias fenólicas têm capacidade de sequestrar radicais livres, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo, sendo os intermediários formados relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático das estruturas.

Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar as atividades antioxidantes *in vitro*, de maneira a permitir uma rápida seleção de substâncias e/ou misturas potencialmente interessantes, na prevenção de doenças crônico-degenerativas (ALVES et al., 2010). Dentre estes métodos destaca-se o sistema de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico, o método de sequestro de radicais livres (DPPH), peroxil-ORAC e ABTS.

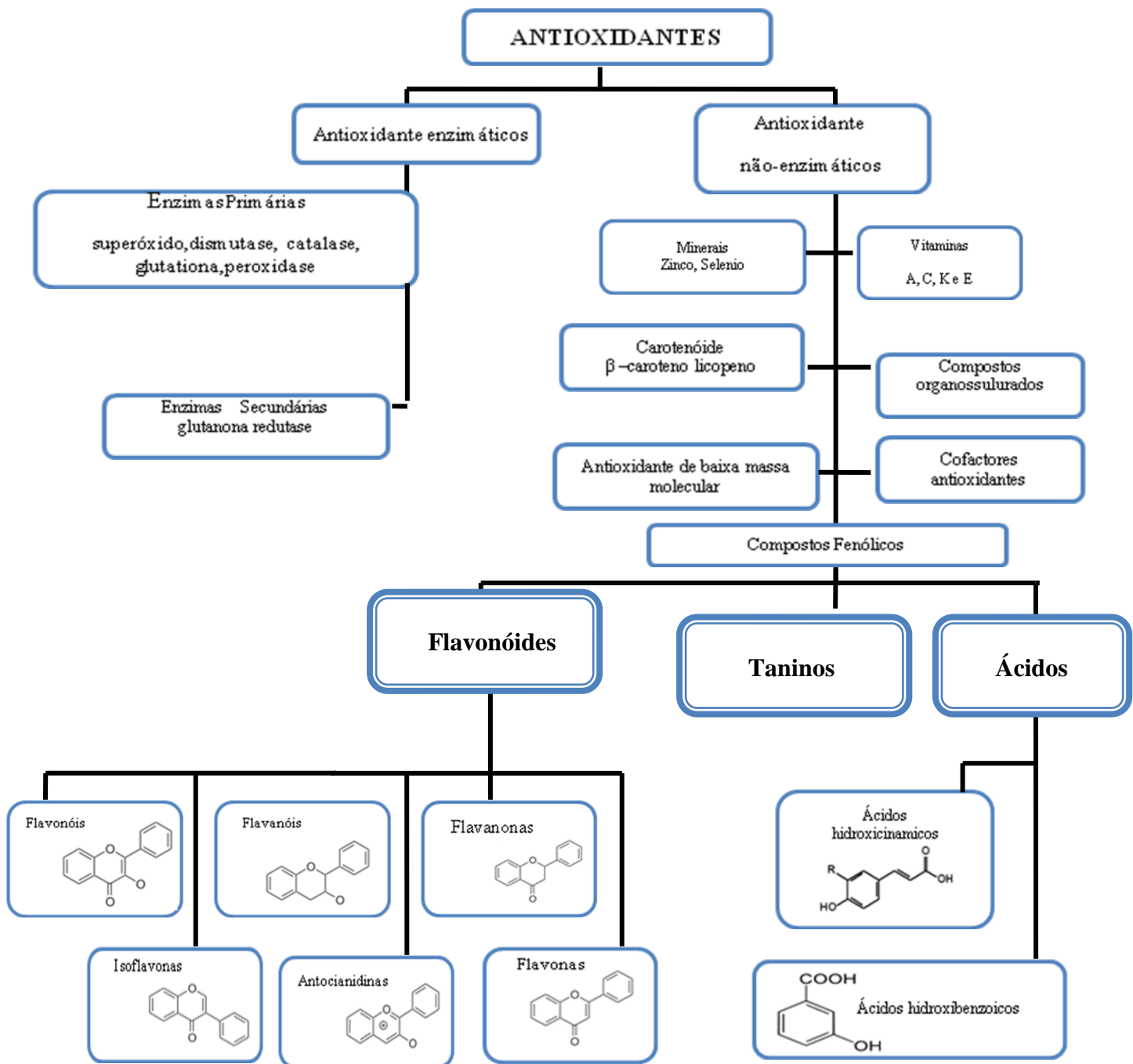


Figura 10: Classificação dos antioxidantes. Adaptado de RATMAN et al., 2006.

São encontrados em cereais, frutas e vegetais e têm sido demonstrados através de estudos clínicos e epidemiológicos que populações que fazem alto consumo de tais alimentos apresentam baixa e significativa redução da incidência de doenças crônicas e degenerativas (YAMAGUCHI et al., 1998). Além da promoção de saúde eles têm um papel importante nas indústrias alimentícias para evitar o processo de oxidação lipídica em 21 alimentos responsável pelo aroma e a formação de compostos indesejáveis podendo substituir antioxidantes sintéticos (BRAND-WILLIANS et al., 1995). Estudos indicam que o ácido

ascórbico pode prevenir mutações em DNA de humanos, uma vez que altas concentrações do ácido reduzem mutações causadas por estresse oxidativo em células humanas *in vitro* (LUTSENKO et al., 2002).

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo Geral

- Avaliação antioxidante e determinação de polifenóis totais (PT), flavonóides totais (FT) e taninos condensados (TC) de *Psychotria carthagenensis* e *Psychotria leiocarpa*.

3.2. Objetivos Específicos

- Determinação dos teores de polifenóis totais pelo reagente de Folin-Ciocalteu's;
- Quantificação de flavonóides utilizando cloreto de alumínio;
- Quantificação de taninos condensados pelo reagente acidificado de vanilina;
- Avaliação da atividade antioxidante pelo método de descoloramento do radical livre DPPH (difetil-picril-hidrazil) e pelo método de branqueamento do β -caroteno/ ácido linoleico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção e identificação do material botânico

Folhas de *Psychotria carthagenensis* Jacq e *Psychotria leiocarpa* Cham. & Schlecht foram coletadas na Fazenda Coqueiro, Dourados/MS. As plantas foram identificadas pela Dra. Zefa Valdevina Pereira- FCBA-UFGD.

4.2. Secagem do material vegetal e preparação do extrato metanólico

O material vegetal foi seco em estufa de ar circulante a 45 °C (Tecnal 394/3) e posteriormente triturado em moinho de facas (Marconi/MA-340/A). Em seguida, as amostras foram submetidas à extração por maceração com metanol por 10 dias e posteriormente filtrados e concentrados em rotaevaporador sob pressão reduzida, para obtenção do extrato metanólico.

4.3. Teor de polifenóis totais (PT)

A concentração de fenóis totais da amostra (0,01 g de extrato das folhas de *P. carthagenensis* e *P. leiocarpa* em 10 mL de metanol HPLC) foi determinada pelo método Folin-Ciocalteu's (SINGLENTON & ROSSI, 1965). Para os testes, a cada 100 µL de amostra adicionou-se 1,5 mL de solução aquosa de carbonato de sódio 2%, 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu (1:10 v/v) e 1 mL de água destilada. Reagiu-se por 30 minutos. A leitura foi realizada no espectrofotômetro a 760 nm. O mesmo procedimento foi empregado na análise do controle, sendo substituídos 100 µL de amostra por 100 µL de metanol (DJERIDANE et al., 2006). Para calcular a concentração de fenóis foi preparada uma curva analítica (2, 5, 10, 20, 40, 60 e 80 µg) empregando o ácido gálico como padrão e as respectivas absorbâncias foram registradas. O procedimento experimental realizado com o padrão foi o mesmo utilizado para as amostras. Com estes dados foi feita a regressão linear e obtida a equação da reta, a qual teve seus dados empregados no cálculo das amostras reais. Todos os testes foram realizados em triplicata.

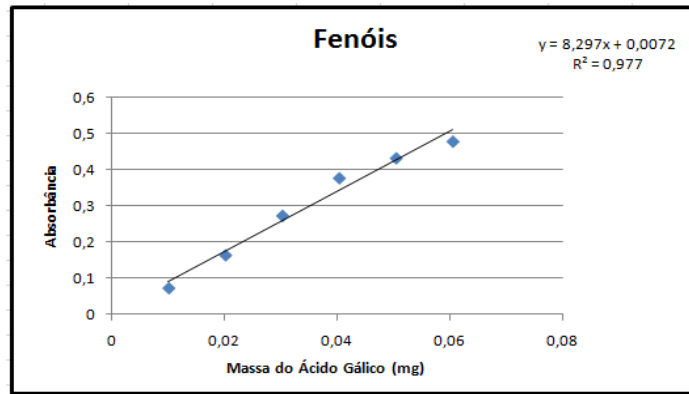


Figura 11: Curva de calibração para obtenção da equação da reta empregando ácido gálico para determinação de fenóis totais.

4.4. Teor de flavonóides totais (FT)

Para o teste de flavonóides, a cada 500 μL das amostras (0,01 g de extrato das folhas de *P. carthagenensis* e *P. leiocarpa* em 10 mL de metanol HPLC) 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) e 2,80 mL de água destilada. Deixou-se reagir à temperatura ambiente por 40 minutos. Fez-se a leitura no espectrofotômetro a 415 nm. O mesmo procedimento foi empregado na análise do branco (LIN & TANG, 2007). Para calcular a concentração de flavonóides foi preparada uma curva analítica (2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 25,0; 50,0; 100,0 e 150,0 μg) empregando a quercetina como padrão e as respectivas absorbâncias foram registradas. Com estes dados foi feita a regressão linear e a equação da reta foi obtida, a qual teve seus dados empregados no cálculo das amostras reais.

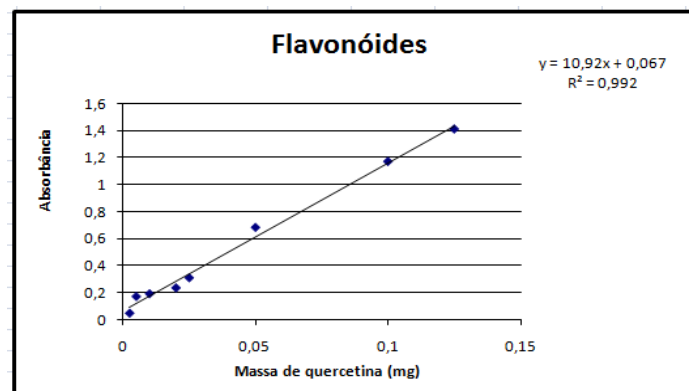


Figura 12: Curva de calibração para obtenção da equação da reta empregando quercetina para determinação de flavonóides totais.

4.5. Taninos condensados (TC)

As concentrações de taninos condensados foram determinadas por uma versão modificada do método desenvolvido por BROADHURST & JONES (1978), adaptado por Agostini-Costa (1999). Foram pesados 100 mg das amostras e solubilizadas em 10 mL de metanol HPLC, em seguida 1 mL desta solução foi misturado a 5 mL de reagente de vanilina em tubos de ensaio com tampas de rosca. Em seguida os tubos de ensaio foram mantidos em banho-maria a 30°C por 20 minutos. A leitura foi realizada em triplicata, no espectrofotômetro a 510 nm. A catequina foi utilizada como padrão, nas concentrações de 2,5 a 40 µL, para cálculo da curva de calibração. Os resultados foram expressos em mg/g de extrato.

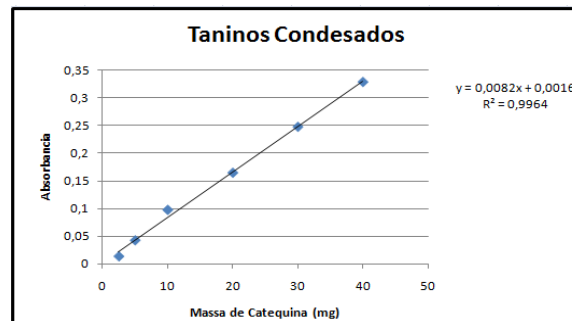


Figura 13: Curva de calibração para obtenção da equação da reta empregando catequina para determinação taninos condensados.

4.6. Atividade sequestradora de radicais livres - DPPH

A capacidade de seqüestrar radicais livres dos extratos foi determinada método de descoloramento do radical livre DPPH· (difetil-picril-hidrazil) (BLOIS, 1958), utilizando como controle positivo o BHT. Alíquotas de 1 mL da amostra (2,0 mg de extrato das folhas de *P. carthagenensis* e *P. leiocarpa* solubilizado com 10 mL de metanol HPLC) foram adicionadas a 2 mL da solução de DPPH 0,004% e incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos. A leitura da absorbância da amostra foi realizada em espectrofotômetro a 517 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 absorbância do DPPH (controle) e A é a absorbância da amostra mais DPPH.

4.7. Teste de branqueamento do β-caroteno/ ácido linoleico

O método de branqueamento do β -caroteno/ ácido linoleico (KAUR e KAPOOR, 2002) foi realizado para determinação da atividade antioxidante utilizando como controle positivo o BHT. A solução de β -caroteno foi preparada a partir de 2mg de β -Caroteno solubilizado em 10 mL de clorofórmio. Em seguida pipetou-se 1 mL desta solução em um balão de ebulição rotativo contendo 20 mg de ácido linoleico e 200 mg de Tween 40. Procedeu-se a evaporação do clorofórmio. Adicionou-se 50 mL de água destilada lentamente e depois agitou-se vigorosamente para formar emulsão. Transferiu-se 5 mL da emulsão para um tubo de ensaio contendo 0,2 mL da amostra do extrato. Para o controle utilizou-se metanol HPLC da amostra. Os tubos de ensaio foram colocados em banho-maria a 50°C e foi monitorada a oxidação da emulsão para posterior leitura em espectrofotômetro a 470 nm, em intervalos de 15 minutos até que a cor do β -caroteno na amostra controle tivesse desaparecido (195 minutos). Todos os testes foram realizados em duplicata. 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 absorbância da amostra no tempo zero; $A't$ é a absorbância da amostra após a incubação (105 min) a 50°C; A_i é a absorbância do controle no tempo zero; $A't$ é a absorbância do controle após incubação (105 min) a 50°C.

4.8. Perfil Fitoquímico

A presença de outras classes de metabólitos secundários foi determinada utilizando os extratos metanólicos previamente preparados, utilizando métodos de separação por cromatografia em camada delgada (CCD). Os alcaloides pelo reagente de Dragendorff, que ao entrar em contato com as substâncias alcaloidais formam halos alaranjados (FALKENBERG et al., 2003).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Avaliação da atividade antioxidante

A capacidade antioxidante dos extratos foi avaliada através de dois métodos diferentes: seqüestro de radicais livres pelo DPPH e descoloramento do β -caroteno. Os resultados da avaliação da atividade antioxidante (Tabela 1) mostraram que pelo teste de seqüestro de radicais livres do DPPH, o extrato metanólico de *P. carthagenensis* foi o mais ativo com valores de IC_{50} de 3.0 μ g/mL, quando comparado ao antioxidante padrão BHT.

Tabela 1. Atividade antioxidante DPPH (IC_{50}) e sistema β -Caroteno (AA%) dos extratos metanólicos das espécies de *Psychotria*.

Extrato metanólico	IC_{50} (μ g/mL)	Sistema β -Caroteno (%)
<i>P. carthagenensis</i>	3.0	38.5
<i>P. leiocarpa</i>	15.2	82.1
BHT	16.8	91.2

Este método baseia-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um radical livre, o DPPH•, que ao se reduzir perde sua coloração púrpura. Avalia apenas o poder redutor do antioxidante, que ao doar um elétron se oxida e passa a coloração amarela, e por este motivo não detecta substâncias pró-oxidantes (Figura 11) (BRAND-WILLIAMS et al., 1995). O radical estável DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazil) reage com a substância antioxidante e é convertido a 2,2-difenil-1-picril hidrazina. O grau de descoloração indica a capacidade do extrato em seqüestrar o radical livre. Um alto potencial de seqüestrar radicais livres é expresso através de um baixo índice de IC_{50} , pois quanto menor a concentração utilizada do extrato para inibir a oxidação pelo radical em 50%, melhor atividade antioxidante (BRAND-WILLIAMS et al., 1995).

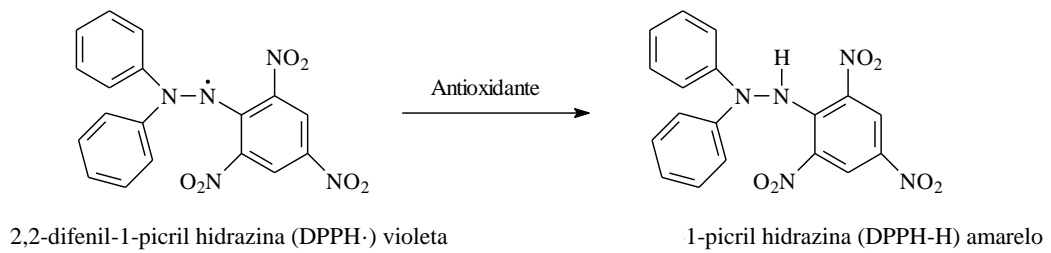


Figura 14. Descoloração do radical livre DPPH.

O método de oxidação do β -caroteno/ ácido linoléico avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico. Sendo o método fundamentado em medidas espectrofométricas da descoloração (oxidação) do β -caroteno induzida pelos produtos de descoloração oxidativa do ácido linoléico (MARCO, 1968).

O segundo método, sistema β -caroteno/ácido linoleico, demonstrou que *P. leiocarpa* apresentou significativa atividade antioxidante com 82,1% (Tabela 1). No sistema β -caroteno/ácido linoléico a atividade de uma amostra ou composto em proteger um substrato lipídico, é representada pela oxidação do β -caroteno, e é determinada por meio da atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico. É baseado na inibição da reação de auto-oxidação do β -caroteno, a qual é provocada pela adição de ácido linoleico e aeração do meio, levando à formação do agente oxidante radicalar. A reação é acompanhada por espectrofotometria no visível em $\lambda = 470$ nm. Nesse método, o ácido linoléico libera um radical livre que reage com o β -caroteno, levando-o a perder o seu cromóforo e sua coloração laranja original, com diminuição da absorbância. Substâncias antioxidantes impedem essa reação por reagirem com o radical livre (ALVES et al., 2010).

Exemplificando a importância dentro de um sistema biológico: o β -caroteno atua inibindo o processo de oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) que constitui um fator crucial para o desenvolvimento da aterosclerose. Devido à sua estrutura, atuam protegendo as estruturas lipídicas da oxidação ou por seqüestro de radicais livres gerados no processo fotoxidativo (MORAES et al., 2006).

5.2. Teor de constituintes

Tem sido sugerido que o conteúdo de constituintes polifenólicos presentes em amostras vegetais pode estar correlacionado com a atividade antioxidante (VALIOGLU et al., 1998). A Tabela 2 mostra o teor de polifenólicos totais (PT), flavonoides totais (FT) e taninos condensados (TC) dos extratos avaliados obtidos pelos cálculos da curva de calibração. *P.*

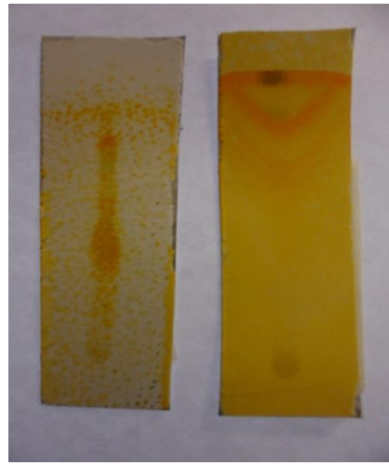
leiocarpa apresentou alto valor de TC (304,68 mg/g de amostra) e de flavonoides totais (83.0 mg de quercetina/ g de amostra). O conteúdo de polifenóis totais em ambas as espécies não foi representativo. Porém outros trabalhos também não demonstram essa correlação direta com o conteúdo de polifenóis e atividade antioxidante (ZIELINSKI & KOZLOWSKA, 2000).

Tabela 2. Polifenóis totais (PT), flavonoides totais (FT) e taninos condensados (TC) dos extratos metanólicos de *Psychotria carthagenensis* e *Psychotria leiocarpa*.

Amostra	PT	Constituintes (mg/g de amostra)	
		FT	TC
<i>P. carthagenensis</i>	5.44	23.50	89.43
<i>P. leiocarpa</i>	3.79	83.00	304.68

A composição química e a estrutura dos componentes são fatores importantes que influenciam na eficácia do antioxidante natural. Acredita-se que o que contribui marcadamente para a habilidade dos flavonóides é o número de hidroxilas fenólicas, a presença do sistema *orto* dihidroxilação do anel B, uma ligação dupla C2- C3 conjugada com a função 4-oxo no anel C ou de um grupo hidroxila no C-3, como anteriormente representado na Figura 10 (BURDA & OLESZEK, 2001).

Os resultados demonstram que possivelmente existam outras substâncias presentes nas amostras que também sejam potentes antioxidantes. O levantamento bibliográfico realizado, demonstrou a presença de alcalóides nas espécies avaliadas, logo realizou-se uma análise qualitativa por cromatografia para verificar a presença ou ausência deste metabólito secundário (Figura 12) nas espécies estudadas e dos triterpenos e esteróides. Verificou-se que *P. leiocarpa* apresentou reação positiva para a presença de alcalóides, pela presença de halo alaranjado com r_f 0.85 mm. Ensaio por CCD demonstraram em ambos extratos a presença de triterpenos e esteroides quando submetidos aos reveladores apropriados.



Psychotria leiocarpa ***Psychotria carthagenensis***

Figura 15: Análise qualitativa por CCD do extrato metanólico de *Psychotria leiocarpa* e *Psychotria carthagenensis* para alcalóides.

Este dado reforça a investigação antioxidante dos alcalóides presentes em *P. leiocarpa*. Ensaio de atividade antioxidante, dentre eles seqüestradora de radical livre ABTS⁺ realizados com alcalóides β -carbolínicos encontrados em frutas e seus sucos, demonstraram atividade mais forte que a do ácido ascórbico, sugerindo que esta classe de compostos podem agir como antioxidantes quando absorvidos e acumulados no corpo (HERRAIZ & GALISTEO, 2003).

6. CONCLUSÃO

O extrato metanólico de *Psychotria carthagenensis* e *Psychotria leiocarpa* apresentou atividade antioxidante frente os métodos avaliados. *P. carthagenensis* foi a mais ativa pelo método de DPPH com valor IC₅₀ de 3.0 µg/mL e *P. leiocarpa* com 82,1% frente ao método do β-Caroteno/ácido linoleico.

Em relação ao teor dos constituintes, *P. leiocarpa* apresentou alto conteúdo de taninos condensados (304.68 mg/g) e baixos valores de fenóis e flavonoides. *P. carthagenensis* não apresentou valores considerados representativos dessas classes de compostos.

Alcaloides foram evidenciados apenas no extrato metanólico de *P. leiocarpa*.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dar continuidade ao estudo fitoquímico, visando a extração e isolamento dos principais constituintes químicos presentes nos extratos avaliados, para evidenciar os possíveis metabólitos responsáveis pela atividade observada de ambas as espécies frente ao método de DPPH e do β-Caroteno/ácido linoleico.

7. REFERÊNCIAS

- 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**, v. 17, n. 2, p. 167-176, 1999.
- 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. 2202-10, 2010.
- BARREIROS, A. L.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BOTH, F.L. Avaliação do perfil psicofarmacológico de psiclatina Isolda de *Psychotria umbellata* (Rubiaceae), in Ciências Farmacêuticas, 2005, Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Porto Alegre.
- BLOIS, M.S. Antioxidant determination by the use of stable free radicals. **Nature**, v. 181, p. 1199-2000, 1958.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.
- BURGER, W.C & TAYLOR, C.M. Flora costaricensis. **Fieldiana**, v. 33, p. 331-333, 1987.
- BROADHURST, R.B. & JONES, W.T. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. **Journal Science Food Agriculture**, v. 28, p. 788-794, 1978.
- BURDA, S.; OLESSZEK, W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.49, p. 27744-27779, 2001.
- CABALLERO-GEORGE, C.; VANDERHEYDEN, P.M.L.; SOLIS, P.N.; PIETERS, L.; SHAHAT, A.A.; GUPTA M.P.; VAUQUELIN, G.; VLIETNICK, A.J. Biological screening of selected medicinal Panamenian plants by radioligand-binding techniques. **Phytomedicine** p. 8, v. 59-70, 2001.
- CORRÊA, L.R.; SOARES G.L.G.; FETT-NETO, A.G. Allelopathic potential of *Psychotria leiocarpa*, a dominant understorey species of subtropical forests. **South African Journal of Botany**, v. 74, p. 583-590, 2008.
- DAVIS, A.P. The tryplification and characterization of the genus *Psychotria* L. (Rubiaceae). **Botanical Journal of Linnean Society**, n. 1, p 35-42, 2001.
- DELPRETE, P.G.; SMITH, L. B AND R>M , Rubiaceae.Flora Ilustrada Catarinense, 2005 Delprete, P.G.; Smith, L.B. & Klein, R.M. 2005. Pp. 542-549. In: Reis, A. 2005. (ed.). Rubiaceae. I Parte – As Plantas/Monografia – Rubi, Vol. II – Gêneros de H-T. 20. Gardênia até 46. Tocoyena. Flora Ilustrada Catarinense, Itajaí.

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, n.4, p.654-660, 2006.

ELIZABETSKY, E.; SHANLEY, P. Ethnopharmacology in the brazilian amazon. **Pharmacology therapeutics**, v.64, n.2, p.201-214, 1994.HAMILTON, C.W. Variation on a distylous theme in mesoamerican psychotria subgenus psychotria (rubiaceae) memoirs of the new york botanical garden, v. 55, p.62-75,1995.

FALKENBERG, M.B., SANTOS, R.I. & SIMÕES, C. M.O. Introdução à análise fitoquímica. Pp.229-245. In: C.M.O. Simões; E.P. Schenkel; G. Gosmann; J.C.P.Mello; L.A. Mentz & P.R. Petrovick (eds.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5^a ed. Porto Alegre, Ed. UFRGS, 2003.

FARIAS, F.M., Strictosamida from *Psychotria nuda* (Cham. *Et Schltl*) *Wawra* (Rubiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, n.12, p. 919-920, 2008.

FARIAS, F.M.; PASSOS, C.S.; ARBO, M.D.; BARROS, D.M.; GOTTFRIED, C.; STEFFEN, V.M.; HENRIQUES A.T. Strictosidinic acid, isolated from *Psychotria myriantha* Mull. Arg. (Rubiaceae), decreases serotonin levels in rat hippocampus, **Fitoterapia**, v.83, p.1138-1148, 2012.

FERRARI, C. K. B.; TORRES, E. A. F. S. Novos compostos dietéticos com propriedades anticarcinogênicas. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 3, p. 375-382, 2002.

FRAGOSO, V.; NASCIMENTO, N.C.; MOURA D. J.; SILVA, A.C.R.; RICHTER, M.F.; SAFFI, J.; FETT-NETO, A.G. Antioxidant and antimutagenic properties of the properties of the monoterpene indole alkaloid and the crude foliar extract of *Psychotria umbellate* Vell. **Toxicology in Vitro**, v. 22, p- 559-566, 2008.

GOTTLIEB, O.R., M. KAPLLAN, A.; BORIN, M.R. Biodiversidade um Enfoque Químio-biológico, 1996. Rio de Janeiro: UFRJ.

GREGIANINI, T. S.; PORTO, D. D.; NASCIMENTO, N. C.; FETT, J. P.; HENRIQUES, A. T.; FETT-NETO, A. G. Environmental and ontogenetic control of accumulation of brachycerine, a bioactive indole alkaloid from *Psychotria brachyceras*. **Journal Chemistry Ecol.**, v. 30, n.10, p. 2023- 2036, 2004.

HENRIQUES, A. T.; LOPES, S. O.; PARANHOS, J. T.; GREGIANINI, T. S.; POSER, G. L. V.; FETT-NETO, A. G.; SCHRIPSEMA, J. *N*-β-D-Glucopyranosyl vincosamide, a light regulated indole alkaloid from the shoots of *Psychotria leiocarpa*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 449-454, 2004.

HERRAIZ, T & GALISTEO J. Tetrahydro-β-carboline alkaloids occur in fruits and fruit juices. Activity as antioxidants and radical scavengers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 24 , p. 7156-7161, 2003.

KAUR CHARANJIT & KAPOOR, H.C. Antioxidant activity and total phenolic content of some asian vegetables. **International Journal Food Science Technology**, v. 37, p. 153-161, 2002.

KERBER, V. A.; PASSOS, C. S.; VERLI, H.; FETT-NETO, A. G.; QUIRION, J.P.; HENRIQUES, A. T. Psychollate, a glucosidic monoterpene indole alkaloid from *Psychotria umbellata*. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 697-700, 2008.

KHAN, M. R.; KIHARA, M.; OMOLOSO, A. D. Antimicrobial activity of *Psychotria microlabastra*. *Fitoterapia*, v, 72, p. 818-821, 2001.

KUO, Y.C.; CHIEN, C.C.; TSAI, W.J.; HO, Y.H. Regulation of herpes simplex virus type 1 replication in Vero cells by *Psychotria serpens*: relationship to gene expression, DNA replication, and protein synthesis. **Antiviral Research**, v. 51, p. 95–109, 2001.

LEAL, M.B; ELISABETSKY, E. Absence of alkaloids in *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.54, p. 37– 40, 1996.

LIBOT, F.; MIETI, C.; KUNESCH, M.; POISSON, J.E.. Rubiaceés d' oceanie: alkaloids de *Psychotria oleioleids* de Nouvelle-Calédonie et de *Calycodendrom milnei* Du Vanatu (Nouvelles-Hébrides). **Journal of Natural Products**, v. 50, p. 468-473, 1987.

LIN, J.Y. & TANG, C. Y. 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.

LOCHER, C.P.; BURCH, M.T.; MOWER, H.F.; BERESTECKY, J.; DAVISH VAN POEL, B.; LASURE, A.;VANDEN, BERGHE D.A.; VLIETINCK, A.J. Anti-microbial activity and anti-complement activity of extracts obtained from selects Hawaiian plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, p.23–32, 1995.

LONGHI, S. J.; NASCIMENTO, A. R. T.; FLEIG, F.D.; DELLA-FLORA J.B.; Composição florística e estrutura da comunidade arbórea de um fragmento florestal no município de Santa Maria-Brasil. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 9, n. 1, p. 115-133, 1999.

LUTSENKO, E. A.; CÁRCAMO, J. M.; GOLDEN, D.W. Vitamin C Prevents DNA Mutation Induced by Oxidative Stress. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 19, p. 895-899, 2002.

MCGAW L.J.; JÄGER, A.K.; VAN STADEN, J. Antibacterial, antihelmintic and antiamebic activity in South African medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology** v.72, p. 247–63, 2000.

MCKENNA, D.J.; TOWERS, G.N.T.; ABBOT, F. Monoamine oxidase inhibitors in South american hallucinogenic plants: tryptamine and b-carboline constituents of Ayahuasca. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 10, p. 195–223, 1984.

MORAES, F.; LUCIANE, M.; COLLA, L. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletronica Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 109-122, 2006.

MUHAMMAD, I.; DUNBAR, D. C.; KHAN, S. I.; TEKWANI, B. L.; BEDIR, E.; AKAMATSU, S.; FERREIRA, D.; WALKER, L. A. Antiparasitic alkaloids from *Psychotria klugii*. *Journal Nat. Prod.*, v. 66, p. 962-967, 2003.

NEPOKROEFF, M.; BREMER, B.; SYTSMA, K. Reorganization of the genus *Psychotria* and the tribe Psychotreae (RUBIACEAE) inferred from ITS and rbcL sequence data. **Systematic Botanic**, v. 24, p. 5–27, 1999.

RATNAM, D.; ANKOLA, D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D.; KUMAR, M. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **Journal Control Release**, v. 113, n. 2, p. 189-207, 2006.

RIBEIRO, L.C. Metabólitos secundários obtidos através dos estudos das raízes de *Psychotria Prunifolia* (Kaunth) Steyern (Rubiaceae), transformações e ensaios biológicos de seus extratos. Goiânia, 2010. Dissertação de mestrado- Universidade Federal de Goiás.

RIVIER, L.; LINDGREN, A.J.E. Ayahuasca, the South American hallucinogenic drink: an ethnobotanical and chemical investigation. **Economic Botany**, v. 26, p. 101–29, 1972.

ROBBRECHT, E. Tropical Wood Rubiaceae. **Opera Botanica**, v.1, 1988.

SANTOS, R.G.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; STRASSMAN.; MOTTA, V.; CRUZ, A.P.M. Effects of ayhuasca on psychometric measures of anxiety, panic-like and hopelessness in Santo Daime members. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 507-513, 2007.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, Ed. UFSC e UFRGS, 1999.

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

SOARES, M.; WELTER, L.; KUSKOSKI, E. M.; GONZAGA, L.; FETT, R. Compostos Fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas Niágara e Isabel. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v, 30, n. 1, p. 59-64, 2008.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA, G. M. J.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L.S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B.M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUZA, V.C. & LORENZI, H. 2005. Botânica Sistemática: Guia Ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira baseado em APG II. Plantarum, Nova Odessa.

VALIOGLU, Y.S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B.D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.46, p. 4113- 4117, 1998.

YAMAGUCHY, T; TAKAMURA, H.; MATOBA, T.; TERAOKA, J. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 62, n. 6, p. 1201-1204, 1998.

ZIELINSKI, H.; KOZLOWSKA, H. Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2008-2016, 2000.

WWW.THEPLANTLIST.ORG/ acessado em 15/06/2013