



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA, ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA IN VITRO DO
EXTRATO ETANÓLICO DA ENTRECASCA DA PLANTA *Ouratea hexasperma*
(EEEOH) (A. St.-Hil.) Baill var. *planchonii* Engl.**

Glauber Vilhena da Costa

Belém-PA
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE E CITÓTOXICA IN VITRO DO
EXTRATO ETANÓLICO DA ENTRECASCA DA PLANTA *Ouratea hexasperma*
(EEEOH) (A. St.-Hil.) Baill var. *planchonii* Engl.**

Autor: Glauber Vilhena da Costa

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marta Chagas Monteiro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do Título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Belém-PA
2015

FOLHA DE APROVAÇÃO

Glauber Vilhena da Costa

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA, ANTIOXIDANTE E CITÓTOXICA IN VITRO DO EXTRATO ETANÓLICO DA ENTRECASCA DA PLANTA *Ouratea hexasperma* (EEEOH) (A. St.-Hil.) Baill var. *planchonii* Engl.

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará para obtenção do título de mestre. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Pedro Roosevelt Torres Romão
Instituição: Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre,
UFCSPA

Profa. Dra. Marta Chagas Monteiro (Orientadora)
Instituição: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/UFPA

Prof. Dr. Carolina Heitmann Mares Azevedo
Instituição: Instituto de Ciências da Saúde/UFPA

Belém- PA

2015

DEDICATÓRIA

A Maria Onélia e Gerson Sá, meus pais, com amor, admiração e gratidão por sua compreensão, carinho, presença e incansável apoio ao longo do período de elaboração deste trabalho.

AGRADECIMENTO

Aos meus pais, por sempre estarem ao meu lado. Sem vocês, nada disso seria possível, amo vocês.

Agradeço especialmente a minha orientadora Dr. Marta Chagas Monteiro pela orientação, apoio e sensibilidade de compreender minhas dificuldades, e também como exemplo de sabedoria e competência que me incentivou e estimulou ao longo desta difícil jornada. Meu carinho e reconhecimento, por acreditar no meu potencial e abrir as portas do seu laboratório me dando liberdade para que eu pudesse aprender processos/métodos que tornaram esse trabalho de mestrado possível. Agradeço pelas discussões/orientações/apresentações que me fizeram não somente conquistar um sonho, mas que também me fizeram ser a pessoa que sou hoje.

Aos professores da banca por terem aceitado estar presentes na defesa e contribuírem para a finalização desse trabalho.

Aos amigos da Pós-Graduação Rafael, Kely, Everton, Rafinha, João Paulo, Ivaldo pelas discussões sobre assuntos pertinentes à vida acadêmica e aos assuntos da vida.

Aos meus amigos de laboratório pelo auxílio nas análises dos experimentos, em especial a Carla Lúcia, Fábio, Thaiana, Ana Lígia, Norma e Caroline.

Aos funcionários da Seção Técnica de Pós-Graduação por todos os serviços realizados e dúvidas esclarecidas.

À Profa. Marcieni e aos membros de seu Laboratório (Laboratório de Farmacognosia, Faculdade de Farmácia, UFPA), em especial, à João Paulo, pela disponibilização do material fitoquímico e de seu tempo na realização dos experimentos nesse trabalho.

Ao Prof. Milton e aos membros de seu Laboratório (Laboratório de cromatografia Líquida de alta eficiência LABCROL, Faculdade de Química, UFPA),

em especial, à Soninha, pela disponibilização de seu tempo na realização dos experimentos nesse trabalho.

Ao Instituto de Pesquisa científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá (IEPA) aos membros de seu Laboratório (Laboratório de Fitoterápicos - Farmácia), em especial a engenheiro agrônomo Moises e mateiro Jonas, pela disponibilização de seu tempo na realização da coleta do material para realização deste trabalho.

Ao Comandante do Corpo de Bombeiros do Estado Amapá, Coronel BM Marcelo Magno Bispo Correa, pelo apoio, compreensão em não medir esforços para proporcionar a realização deste sonho.

Aos comandantes que passaram pelo 1º grupamento de Bombeiro militar, Cap Bm Marques, TC BM Rogério e TC BM FEM Arlete, pela compreensão e disposição em ceder esse militar para concluir essa etapa de sua vida.

A professora Margareth, Érika e farmacêutica Cleia pela ajuda inestimável no início desde projeto que com amizade, carinho e cooperação, facilitando a execução desse trabalho.

Aos colegas da Pós-Graduação, pela agradável convivência.

Aos meus irmãos Genise, Giane, Geise, Glauciane e Gefson, pelo imenso carinho.

A meus sobrinhos Gisele, Gerson neto, Gabrielle, Ariely, Giovanna, Talita, Abhaam e Aaron, Grazielle e Viviane, pelo imenso carinho.

À Alexandre, Kátia e Vinicius, que muito me ajudou nessa etapa de minha vida, com carinho, incentivo e companheirismo.

A todas as pessoas que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho, deixo o meu sincero reconhecimento.

EPÍGRAFE

“O que dignifica a vida de um homem não são as derrotas impostas aos seus opositores, mas as vitórias silenciosas, sem manchetes, conseguidas sobre si mesmo, e que ninguém pode avaliar quanto de renúncias e penosos sacrifícios cada uma delas lhe custou”.

João José Torres

RESUMO

COSTA, G. V. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA, ANTIOXIDANTE E CITÓTOXICA IN VITRO DO EXTRATO ETANÓLICO DA ENTRECASCA DA PLANTA *Ouratea hexasperma* (EEEEOH) (A. St.-Hil.) Baill var. *planchonii* Engl. Dissertação (mestrado), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2015.

Ouratea hexasperma (Ochnacea), popularmente conhecida como “barbatimão do cerrado”, é uma planta muito comum na região do cerrado brasileiro e, vem sendo utilizada para o tratamento de infecções microbianas e inflamações. Por isso, este estudo teve como objetivo avaliar as atividades antioxidante, quantificar teores flavonoides totais (TFT), antibacteriana e citotoxicidade do extrato etanólico da entrecasca da *Ouratea hexasperma* (EEEEOH), bem como realizar sua caracterização fitoquímica. A planta foi coletada no estado do Amapá e em seguida foi realizada extração da entrecasca seca através de maceração à frio com solução etanólica 96% na proporção 2:8 (p/v) durante 1 dia, formando o EEEEOH. A caracterização fitoquímica foi realizada através de ensaios cromáticos/precipitação em tubo e o teor de flavonoides foi mensurado através do ensaio com complexação com alumínio utilizando como padrão uma curva de quercetina (40–0,62µg/mL), e a capacidade antioxidante total através do método espectrofotométrico de descoloração do radical ABTS^{•+} (2,2´azino-bis-3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfônico) - TEAC. A atividade antimicrobiana do EEEEOH foi testada frente às bactérias gram-positivas e gram-negativas, através das técnicas de microdiluição em caldo com coloração por resazurina, para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), e de cultivo em placa de petri com posterior contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) para a obtenção da Concentração Bactericida Mínima (CBM). A citotoxicidade do EEEEOH, foram testadas utilizando leucócitos humanos do sangue periférico, células mononucleares, com diferentes concentrações do extrato e sem nenhum estímulo (controle negativo), e incubação e mantidos a 37°C, 98% de umidade e 5% de CO₂, durante 24h, NO e MDA foram lidas de ELISA e espectrofotômetro em diferentes leituras óticas. A análise fitoquímica preliminar do EEEEOH mostrou a presença de taninos, saponinas e flavonóides. O TFT no extrato foi de 1467 ± 264µg equivalentes em quercetina/g de EEEEOH. A capacidade antioxidante pelo método de TEAC apresentaram elevada atividade antioxidante, não havendo diferença na capacidade antioxidante (TEAC) entre as concentrações do extrato testadas. O EEEEOH apresentou boa ação antibacteriana, principalmente contra as bactérias gram-positivas. Na citotoxicidade por regressão linear se obteve a concentração capaz de matar 50% das células (CC50%), cujo valor foi de 2231,5mg/mL, confirmando que o extrato bruto tem baixa citotoxicidade frente a leucócitos humanos, nas condições testadas. Na produção de NO e MDA verificou-se que o EEEEOH não foi capaz de induzir a produção de NO das concentrações testadas. Como também, nenhuma concentração induziu aumento de MDA quando comparado ao controle negativo (RPMI), confirmando a baixa citotoxicidade do extrato *in vitro*. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste Anova uma via e Turkey. Conclui-se que EEEEOH possui atividade antibacteriana, antioxidante e baixa citotoxicidade.

Palavras-chave: *Ouratea hexasperma*, Teores flavonoides totais, atividade antioxidante, antibacteriana, citotoxicidade.

ABSTRACT

Ouratea hexasperma (Ochnaceae), popularly known as "cerrado barbatimão" is a very common plant in the Brazilian cerrado region and has been used for the treatment of microbial infections and inflammation. Therefore, this study aimed to evaluate the antioxidant activities, quantifying total flavonoid content (TFT), antibacterial and cytotoxicity of ethanol extract of the bark of *Ouratea hexasperma* (EEBOH) as well as perform their phytochemical characterization. The plant was collected in the state of Amapá, and then was held extraction of dry bark through the cold maceration with 96% ethanol solution in a 2: 8 (w/v) for 1 day, forming the EEBOH. The phytochemical characterization was performed by testing chromatic/precipitation tube and flavonoid content was measured by assay complexation with aluminum using quercetin as standard (40-0,62µg/mL), and the total antioxidant capacity by the spectrophotometric method discoloration radical ABTS•+ (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzotiazolin 6-sulfonic acid) - TEAC. The antimicrobial activity of EEBOH was tested against gram-positive and gram-negative bacteria, using the microdilution techniques broth with staining by resazurin, to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), and grown in petri dish with subsequent count of colony forming units (CFU) for obtaining the Minimum Bactericidal Concentration (MBC). The evaluation of the cytotoxicity of EEBOH human peripheral blood leukocytes. Mononuclear peripheral blood cells incubated with different concentrations of the extract and without stimulation (negative control). The cytotoxicity of EEBOH were tested using human peripheral blood leukocyte, mononuclear cells, with different extract concentrations and without stimulation (negative control), and incubated and maintained at 37 ° C, 98% humidity and 5% CO₂ for 24 hours, NO and MDA were read in an ELISA spectrophotometer and different optical readings. The primary EEBOH phytochemical analysis showed the presence of tannins, saponins and flavonoids. The TFT in the extract was 1467 ± 264µg equivalents quercetin/g EEBOH. The antioxidant capacity by TEAC method showed high antioxidant activity, with no difference in antioxidant capacity (TEAC) between those concentrations of the extract. The EEBOH showed good antibacterial activity, mainly against gram-positive bacteria. The cytotoxicity was obtained by linear regression concentration able to kill 50% of cells (CC 50%) whose amount was 2231,5mg/mL, confirming that the crude extract has low cytotoxicity against human leukocytes, under the conditions tested. In the production of NO and MDA it found that the EEBOH was not able to induce NO production of the concentrations tested. As well, no increase MDA of concentration induces changes when compared to the negative control (RPMI), confirming the low in vitro cytotoxicity of the extract. Statistical analyzes were performed by ANOVA one way and Turkey. In concluded that the EEBOH have antibacterial, antioxidant and low cytotoxicity.

Keywords: *Ouratea hexasperma*, Levels total flavonoids, antioxidant activity, antibacterial, cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

| PAINEL 01 (Características botânica da espécie) | | |
|--|---|----|
| Figura 01 - | Bioma do cerrado no Estado do Amapá, origem da planta pesquisada <i>Ouratea hexasperma</i> . Fonte: (SERGÓVIA, 2011). | |
| Figura 02 - | A espécie <i>Ouratea hexasperma</i> no bioma cerrado no município de Macapá. Fonte: Autor. | 20 |
| Figura 03 - | A. Flor; B. Gineceu; C. Antera da espécie <i>Ouratea hexasperma</i> . Fonte: (ABREU, 2014). | |
| Figura 04 - | A - Ramo com destaque para flores e frutos; B – Flores; C- Frutos. Fonte: (SILVA, 2008) C- Ritidoma; C - casca viva. Fonte: (FINGER, 2008). | 21 |
| Figura 05 - | Mecanismos propostos para a interação de taninos com proteínas. Fonte: HORMÔNIOS E DEFESA VEGETAL. | 22 |
| Figura 06 - | Rota biossíntese dos taninos condensados (proantocianidina) e Taninos hidrolisáveis e flavonóides. Fonte: HORMÔNIOS E DEFESA VEGETAL. | 23 |
| Figura 07 - | Estrutura molecular do ácido gálico. Fonte: (JUNIOR, 2011). | 24 |
| Figura 08 - | Estrutura básica do flavonóide. Fonte: (SUZART, 2007) | 25 |
| Figura 09 - | 7"-O-metilagatisflavona (Biflavonóides). Fonte: (SUZART, 2007) | 25 |
| Figura 10 - | Diferenciação da estrutura bacteriana das bactérias gram positivas e gram negativas. Fonte: (MAGRO, 2014). | 28 |
| Figura 11 - | Determinantes estruturais das propriedades antioxidante dos flavonoides. Fonte: adaptado de Twari (2001). Grifos autor. | 31 |
| Figura 12 - | Mecanismo de sequestro de EROs (-R) por flavonoides e formação de estrutura estável. Fonte: adaptado de Heim (2002). | 31 |
| Figura 13 - | Biflavonóide isolado da <i>Ouratea hexasperma</i> seus determinates oxidantes | 32 |
| Figura 14 - | Localização do arbusto da espécie <i>Ouratea hexasperma</i> no mapa nos pontos do GPS. Fonte: GOOGLE MAPS. | 37 |
| Figura 15 - | Localização exata do arbusto da espécie <i>Ouratea hexasperma</i> no mapa nos pontos do GPS. Fonte: GOOGLE MAPS. | 38 |
| Figura 16 - | Esquema de obtenção do extrato etanólico da espécie <i>Ouratea hexasperma</i> . Fonte: Autor. | 39 |
| Figura 17 - | Preparo das diluições dos inóculos bacterianos em caldo MH. | 41 |
| Figura 18 - | Esquema de distribuição das concentrações dos extratos na microplaca, incluindo os controles positivo (+) e negativo (-) e Inóculo (I). Fonte: Autor. | 42 |
| Figura 19 - | Mudança na estrutura química da resazurina após reação de redução ao entrar em contato com células viáveis. Fonte: (MEYER et al, 1979) | 43 |
| Figura 20 - | Esquema da metodologia utilizada na determinação do CIM e CBM. Fonte: Autor. | 44 |
| Figura 21 - | Esquema da metodologia utilizada no ensaio de hemólise. Fonte: Autor. | 48 |
| Figura 22 - | Esquema da metodologia utilizada na determinação NO. Fonte: Autor. | 49 |

| | | |
|--------------------|--|----|
| Figura 23 - | Esquema da metodologia utilizada na determinação de MDA. Fonte: Autor. | 50 |
| Figura 24 - | Reação entre o ácido-2-tiobarbitúrico e o malonadeído. Fonte: OSAWA, FELÍCIO e GONÇALVES (2005). | 51 |
| Figura 25 - | Bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> (Gram positiva), obtenção do CIM e CBM, idênticos no valor de 1250µg/mL. (+ CONTROLE POSITIVO; - CONTROLE NEGATIVO; I – INÓCULO) | 53 |
| Figura 26 - | Bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> oxacilina resistente (Gram positiva), obtenção do CIM no valor de 1250µg/mL, não foi possível determinar o CBM dentro do limite do extrato <i>Ouratea hexasperma</i> de 5000µg/mL. (+ CONTROLE POSITIVO; - CONTROLE NEGATIVO; I – INÓCULO) | 53 |
| Figura 27 - | Bactéria <i>Enterococcus faecalis</i> (Gram positiva), obtenção do CIM e CBM, respectivamente no valor de 625µg/mL e 1250µg/mL (+ CONTROLE POSITIVO; - CONTROLE NEGATIVO; I – INÓCULO) | 54 |
| Figura 28 - | Bactéria <i>Escherichia coli</i> (Gram negativa), não foi possível determinar o CIM ou CBM dentro do limite do extrato <i>Ouratea hexasperma</i> de 5000µg/mL. | 54 |
| Figura 29 - | Bactéria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Gram negativa), obtenção do CIM e CBM, valores idênticos de 2500µg/mL (+ CONTROLE POSITIVO; - CONTROLE NEGATIVO; I – INÓCULO). | 55 |
| Figura 30 - | Efeito citotóxico e hemolítico extrato etanólico da planta <i>Ouratea hexasperma</i> . | 57 |
| Figura 31 - | Atividade antioxidante do extrato etanólico da planta <i>Ouratea hexasperma</i> . Análise da capacidade antioxidante total através do método espectrofotométrico de descoloração do radical ABTS•+ (2,2´azino-bis-3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfônico) - TEAC. | 58 |
| Figura 32 - | Quantificação de teores de flavonoides totais pelo método colorimétrico de cloreto de alumínio | 59 |
| Figura 33 - | Produção de NO induzido pelo extrato etanólico da planta <i>Ouratea hexasperma</i> . Os leucócitos foram incubados com diferentes concentrações do extrato, em seguida foram incubadas a 37°C, por 24h. O sobrenadante foi coletado para a dosagem de NO | 60 |
| Figura 34 - | Produção de MDA induzido pelo extrato etanólico da planta <i>Ouratea hexasperma</i> . Os leucócitos foram incubados com diferentes concentrações do extrato, em seguida foram incubadas a 37°C, por 24h. O sobrenadante foi coletado para a dosagem de MDA | 60 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|--------------------|--|----|
| Tabela 01 - | Características botânicas da espécie <i>Ouratea hexasperma</i> | 19 |
| Tabela 02 - | Classes de metabólitos secundários encontrados EEEOH | 52 |
| Tabela 03 - | Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima do extrato etanólico da espécie <i>Ouratea hexasperma</i> 5000 µg/mL. | 56 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|-------------------------------|---|
| - | Negativo |
| % | Porcentagem |
| + | Positivo |
| µg/mL | Micrograma/militro |
| ·OH | Radical hidroxila |
| ·R | Radical |
| A· | Radical inerte |
| AlCl ₃ | Tricloreto de alumínio |
| AMH | Ágar Muller-Hinton |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| ATPase | Complexo enzimático que catalisa a hidrólise e síntese de ATP |
| C | Carbono |
| CBM | Concentração Bactericida Mínima |
| CBM | Concentração bactericida mínima |
| CC50% | Concentrações citotóxicas a 50% |
| CIM | Concentração Inibitória Mínima |
| CIM | Concentração inibitória mínima |
| CO ₂ | Dioxido de carbono |
| Compr. | Comprimento |
| CYP | Citocromo |
| Da | Dalton |
| DDPH | Radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil |
| DMSO | Dimetilsufóxido |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| <i>E. faecalis</i> | <i>Enterococcus faecalis</i> |
| ECA | Enzima conversora de angiotensina |
| ECOD | Etoxicumarina-o-desetilase |
| EDTA | Ácido etilenodiaminotetracético |
| EEEHOH | Extrato Etanólico da entrecasca <i>Ouratea hexasperma</i> |
| EROs | Espécies Reativas de Oxigênio |
| FIOCRUZ | Fundação Oswaldo Cruz |
| GC | Guanilato ciclase |
| GMP _c | Guanosina monofosfato cíclico |
| GST | Glutathione S-transferases |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrogênio |
| HCl | Ácido clorídrico |
| HOCl | Ácido hipocloroso |
| I | Inóculo |
| IEPA | Instituto de Pesquisa científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá |
| INCQS | Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde |
| iNOS | Oxido nítrico sintase induzida |
| LPO | Peroxidação lipídica ou Lipoperoxidação |
| K ⁺ | Potássio |
| KB | Cancro de melanoma |
| mg | Micrograma |

| | |
|-----------------------------|---|
| mL | Mililitro |
| mm | Milímetro |
| MTT | Brometo de 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio – metil tiazol tetrazólio |
| NA | Não apresenta |
| Na ⁺ | Sódio |
| NADPH | Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato |
| NaNO ₂ | Nitrito de sódio |
| NCCLS | National Commitee for Laboratory Standards |
| nM | Nanomolar |
| NO ₂ | Dioxido nitrogênio |
| NO ⁻² | Nitrito |
| NO ⁻³ | Nitrato |
| NOS | Oxido Nitrico sintase |
| O ₂ ⁻ | Íon peróxido |
| ONOO ⁻ | Peroxinitrito |
| OP3 | Fração acetato etila <i>Ouratea parviflora</i> |
| OP4 | Fração hidroalcoolica da <i>Ouratea parviflora</i> |
| OPEB | Extrato Bruto <i>Ouratea parviflora</i> |
| OS | <i>Ouratea semisserata</i> |
| <i>P. aeruginosa</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| p/v | Peso/volume |
| PBMC | Células mononucleares do sangue periférico |
| PBS | Tampão salino de íons fosfato |
| RNS | Espécie reativa de nitrogênio |
| RPM | Rotação por minutos |
| RPMI | Meio de cultivo utilizado para células animais e hibridomas |
| <i>S. aureus</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| TCLE | Termo consentimento livre esclarecido |
| TEAC | Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox |
| UFC | Unidade formadora de colônia |
| UFPA | Universidade Federal do Pará |
| UTM | Marcador Transversal Universal |
| μL | Microlitro |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 17 |
| 2 REFERÊNCIAL TEÓRICO | 18 |
| 2.1 Classificação taxinômica da espécie <i>Ouratea hexasperma</i> | 18 |
| 2.2 Espécie <i>Ouratea hexasperma</i> (A. St.-Hil.) Bail var. <i>planchonii</i> Engl. | 18 |
| 2.3 Constituição química da <i>Ouratea hexasperma</i> | 21 |
| 2.4 Principais atividades Farmacológicas do gênero <i>Ouratea</i> | 26 |
| 2.5 Resistência e características bacterianas | 27 |
| 2.6 Atividade antioxidante do gênero | 29 |
| 2.7 Citotoxicidade | 33 |
| 2.8 Atividade Vasodilatadora | 34 |
| 3 OBJETIVOS | 36 |
| 3.1 Objetivo geral | 36 |
| 3.2 Objetivos específicos | 36 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS | 37 |
| 4.1 Coleta | 37 |
| 4.2 Identificação | 38 |
| 4.3 Obtenção dos extratos | 38 |
| 4.3.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA | 39 |
| 4.4 Avaliação da atividade antibacteriana para obtenção de CIM e CBM | 39 |
| 4.4.1 PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA | 40 |
| 4.4.2 MICRORGANISMOS UTILIZADOS E MANUTENÇÃO DAS CEPAS | 40 |
| 4.4.3 PREPARO DOS INÓCULOS BACTERIANOS | 41 |
| 4.4.4 TESTE DE MICRODILUIÇÃO | 41 |
| 4.4.4.1 Obtenção da Concentração Inibitória Mínima (CIM) | 42 |
| 4.4.4.2 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) | 43 |
| 4.5 2, 2'-Azinobis- (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS) radical ensaio de descoloração (ABTS) | 44 |

| | |
|---|----|
| 4.6 Determinações de flavonoides totais pelo método colorimétrico de cloreto de alumínio | 44 |
| 4.7 Atividades hemolíticas e citotóxicas | 45 |
| 4.7.1 COLETA DO SANGUE | 45 |
| 4.7.2 CULTURA DE CÉLULAS – PBMC HUMANO | 45 |
| 4.7.3 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE | 46 |
| 4.7.4 ENSAIO HEMÓLISE (MEMBRANA ESTABILIDADE) | 47 |
| 4.7.5 DOSAGEM DE NO | 48 |
| 4.7.6 DETERMINAÇÃO DE MDA | 49 |
| 4.7.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 51 |
| 5 RESULTADOS | 52 |
| 5.1 Obtenção dos extratos | 52 |
| 5.1.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA | 52 |
| 5.2 Avaliação da atividade antibacteriana | 52 |
| 5.2.1. BACTÉRIA GRAM-POSITIVA: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538..... | 52 |
| 5.2.2 BACTÉRIA GRAM-POSITIVA: <i>Staphylococcus aureus</i> OXACILINA RESISTENTE | 53 |
| 5.2.3 BACTÉRIA GRAM-POSITIVA: <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 | 54 |
| 5.2.4 BACTÉRIA GRAM-NEGATIVA: <i>Escherichia coli</i> ATCC 8789 | 54 |
| 5.2.5 BACTÉRIA GRAM NEGATIVA: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25853 | 55 |
| 5.4 Citotoxicidade e Hemólise | 56 |
| 5.5 Atividade Antioxidante | 57 |
| 5.7 Produção por NO induzido pelo EEEOH <i>in vitro</i> | 59 |
| 5.8 Produção por MDA induzido pelo EEEOH <i>in vitro</i> | 60 |
| 6 DISCUSSÃO | 61 |
| 7 CONCLUSÃO | 71 |
| 9 REFERÊNCIAS | 72 |

1 INTRODUÇÃO

A espécie *Ouratea hexasperma* (A. St.-Hil.) Bail var. *planchonii* Engl., possui uma distribuição pantropical, da família Ochnaceae, que nesta compreende cerca de 30 gêneros e distribuídos aproximadamente em 500 espécies (KANIS, 1968; ABREU, 2014). E o seu principal gênero desta família é o *Ouratea*, que engloba cerca de 300 espécies encontradas na América do Sul (BATISTA, 2011). No Brasil deste neste gênero foram catalogadas 198 espécies, 2 subespécies e 5 variedades, com ocorrência nos domínios fitogeográficos da Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (CHACON & YAMAMOTO, 2014; ABREU, 2014).

Na região amazônica, a espécie *Ouratea hexasperma* é frequentemente observada no bioma do cerrado com características peculiares de solo, vegetação e clima, se estabelecendo como uma das espécies nativas mais resistente à seca e ao fogo. Com isso, estes aspectos contribuíram para que esta espécie desenvolvesse mecanismos de sobrevivência como: produção de metabólitos secundários (taninos, saponinas e flavonóides) (FIDÉLIS, 2011). No estado do Amapá, a espécie *Ouratea hexasperma* é conhecida popularmente como barbatimão do cerrado, utilizada tradicionalmente como tônico e adstringente para a prevenção e/ou cura de diversas patologias como: distúrbios do sistema gastrointestinal (antidiarreico, vermífugo e antiulcerativo), infecções por bactérias e fungos (ação antibacteriana e antifúngica), inflamações uterinas e reumáticas (anti-inflamatório) (SEGÓRVIA, 2011).

Os poucos estudos que investigaram a atividade biológica de *Ouratea hexasperma* mostraram sua capacidade de inibição da DNA topoisomerase (GRYNBERG, et al., 2002); inibição do crescimento de células tumorais (Sarcoma 180) *in vivo* (GRYNBERG, et al., 1994; MOREIRA et al., 1999; SERGOVIA, 2011). Essas atividades foram atribuídas a alguns biflavanóides isolados da espécie. No entanto, até o momento, não há relatos na literatura comprovando sua ação antimicrobiana, antioxidante e citotóxica. Desta forma, este projeto visa avaliar tais possíveis atividades do extrato bruto etanólico da planta *Ouratea hexasperma in vitro*.

2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 Classificação taxinômica da espécie *Ouratea hexasperma*

Reino: Plantae

Filo: Magnoliophyta

Família: Ochnaceae

Ordem: Theales

Classe: Magnoliopsida

Gênero: *Ouratea*

Espécie: *Ouratea hexasperma*

Fonte: BIOTA/FAPESP, 2015.

2.2 Espécie *Ouratea hexasperma* (A. St.-Hil.) Bail var. *planchonii* Engl.

A espécie *Ouratea hexasperma* é distribuída geograficamente nos seguintes locais da América latina: Bolívia e Brasil. No Brasil foram catalogadas na região Norte (Amapá; Roraima e Tocantins); Nordeste (Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte); Centro-Oeste e Sudeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais e São Paulo) (SILVA et al., 2012; CHACON & YAMAMOTO, 2014; TROPICOS.ORG, 2014; ABREU; 2014). A espécie foi pesquisada no ambiente do cerrado, domínio morfoclimático que possui condições bem específicas de solo, clima e vegetação, enumerados a seguir. Estas características conferem aos seres desse ambiente um nível de resistência maior a seca e ao fogo em vegetação, mais comum de ocorrer, do que em outras zonas morfoclimáticas (domínios amazônicos, cerrado, caatingas, mares de morros, araucárias, pradarias) (AB`SÁBER, A. 1965; BARBOSA, 2011).

A primeira característica do bioma do cerrado bem singular é seu clima tropical sazonal, de inverno seco, com temperatura máxima de 40° C, e a mínima, chega a alcançar valores próximos ou até abaixo de zero. A precipitação média mensal apresenta um grande período de estagnação, concentrando-se nos meses de primavera e verão, durante esses períodos apresenta curtos períodos de seca,

chamados de veranicos, que podem ocorrer em meio nestas estações, devido a essas condições geram sérios problemas para agricultura (KLEIN, 2002).

Segundo atributo deste ambiente, seu solo é profundo, poroso, permeável, bem drenado e, por isso, profundamente lixiviado. Em sua textura predomina, em geral, a fração areia, vindo em seguida a argila e, por último, o silte. Eles são, portanto, predominantemente arenosos, areno-argilosos ou, eventualmente, argilo-arenosos. Fazendo com que sua capacidade de retenção de água seja relativamente baixa. E possuindo como terceira distinção, em circunstância das mencionadas anteriormente, contribuíram para formação de uma vegetação herbácea e subarbustiva, formada também por espécies predominantemente perenes, possuindo órgãos subterrâneos de resistência, como bulbos, xilopódios, sóboles, etc, que lhe garantem sobreviver à seca e ao fogo (Figura 01) (KLEIN, 2002).

A *Ouratea hexasperma* é um arbusto de até 5 metros de altura (Figura 01), possui como constituintes botânicos específicos desse bioma, segundo tabela 01:

Tabela 01 – Características botânicas da espécie *Ouratea hexasperma*.

| | |
|-----------------------|--|
| Ramos | Cilíndricos, acinzentados, fissurados, lenticelados, glabros |
| Folhas | 2,9 – 6,1 cm comprimento (compr.), alternas; estípulas caducas; canaliculados, glabros; elípticas, glabras; ápice agudo; base cuneada; margem serrilhada, na face adaxial nervura primária prominente e primária proeminente; nervuras secundárias 8 – 21 pares, eucamptódroma. |
| Estrutura reprodutora | <p>Inflorescência: 9 cm compr., panículas terminais.</p> <p>Flores andróginas: amareladas (Pedicelos 6 – 7,5 mm compr., glabros, cálice pentâmero, dialissépalo; ovaladas, glabras, corola pentâmera, dialipétalas, pétalas 7,5 – 8 mm compr., 5,5 – 7 mm largura, obovadas, ápice arredondado, glabras.</p> <p>Anteras: 10; 2,5 – 7,5 mm compr., sésseis, rugosas, glabras, lanceoladas, base truncada, ápice agudo.</p> <p>Gineceu: 6 – 8 mm compr., glabro; ginóforo 0,5 mm compr., ovário 1 – 1,5 mm compr., 6 – 8 carpelar, ovoide, inteiro, filiforme, ginobásico; estigma puntiforme.</p> |

Dentre as partes aéreas da planta *Ouratea hexasperma*, a que é utilizada tradicionalmente é a entrecasca (líber ou floema), que é a secção mais interna da casca das árvores e o principal tecido de condução das substâncias nutritivas nas plantas vasculares, formado por tecido vivo, mole e úmido, capaz de conduzir a seiva elaborada (FORZZA, 2010). Nesta espécie, a entrecasca apresenta uma coloração vermelha, como observado na figura 04 (D-E), e conforme a literatura as partes aéreas que possuem essa tonalidade apresentam alguns constituintes químicos, como por exemplo polifenóis.

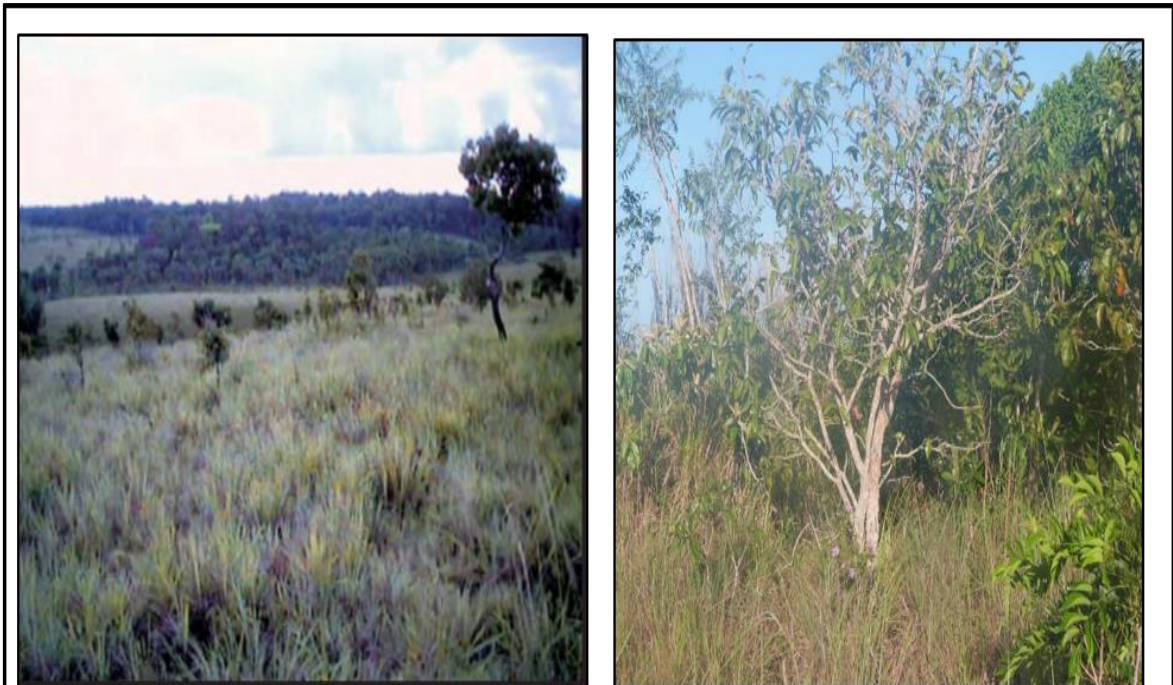


Figura 01 – Bioma do cerrado no Estado do Amapá. Fonte: (SERGÓVIA, 2011).

Figura 02 – A espécie *Ouratea hexasperma* no bioma cerrado. Fonte: Autor.

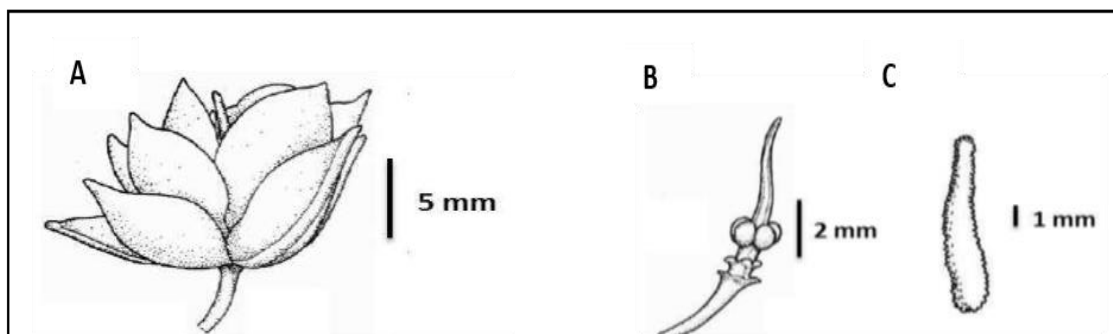
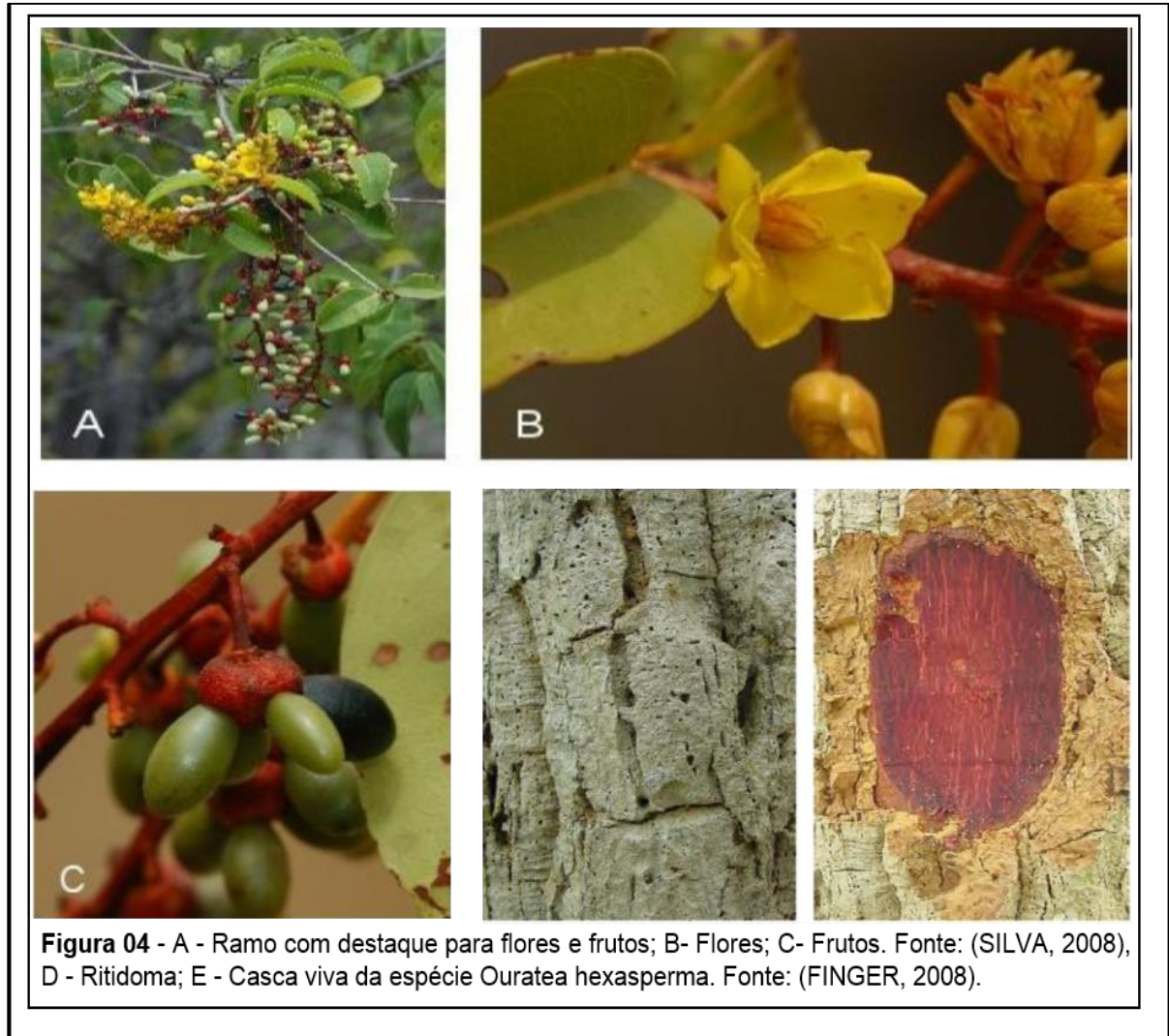


Figura 03 – A. Flor; B. Gineceu; C. Antera da espécie *Ouratea hexasperma*. Fonte: (ABREU, 2014).



2.3 Constituição química da *Ouratea hexasperma*

Na espécie *Ouratea hexasperma* já foram identificados alguns componentes, dos quais os taninos são um dos mais importantes. Os taninos são complexos heterogêneos de polifenóis de origem vegetal com alto peso molecular (500 a 3000 Da) (FERREIRA e NOGUEIRA, 2000; AGANGA e MONASE, 2001; OLIVEIRA, 2007). Estes compostos diferem de outros polifenóis pela sua capacidade de precipitar proteínas (SILANIKOVE, 2001; OLIVEIRA, 2007), íons metálicos, aminoácidos e polissacarídeos (MAKKAR, 2003; OLIVEIRA, 2007).

Os taninos podem ser classificados em: taninos condensados e hidrolisáveis. Para Metche (1980), os taninos hidrolisáveis podem ser considerados como poliésteres da glucose, podendo ser classificados em duas categorias; (a) os galotaninos, que por hidrólise ácida liberam o ácido gálico e seus derivados; (b) os

elagitaninos, que por hidrólise liberam o ácido elágico, ácido valônico, sendo o ácido elágico o mais importante. Pizzi (1993), afirma que os taninos condensados consistem de unidades de flavonóides possuindo diferentes graus de condensação e então invariavelmente associados com seus precursores inéditos, denominados de flavan-3-ols (catequina) e flavan 3-4 diols (leucoantocianidinas).

Os taninos possuem a função de formar complexos com as proteínas, cujo mecanismo é dependente da formação de pontes de hidrogênio ou ligações hidrofóbicas, apresentando-se na forma não oxidada, entre subunidades fenólicas do polímero e os grupos carbonilas dos peptídeos das proteínas (Figura 5A) (McSWEENE, 2001, BASTTETINI *et al.*, 2004). Já os taninos quando são oxidados por uma enzima se transformam em quinonas e formam ligações covalentes com determinados grupos de proteínas, principalmente os grupos sulfídricos (Figura 5B) (BASTTETINI *et al.*, 2004), como observado na figura abaixo.

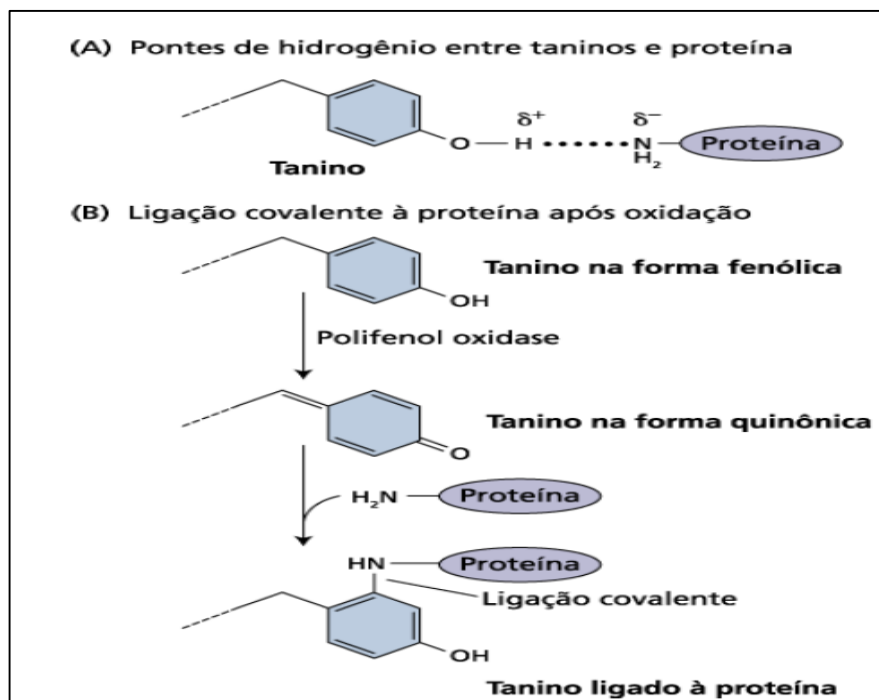


Figura 05 – Mecanismos propostos para a interação de taninos com proteínas. Fonte: HORMÔNIOS E DEFESA VEGETAL.

A formação dos compostos biossintéticos das plantas se desenvolvem através de várias rotas que tem centros comuns. Esses núcleos irão originar os metabólitos secundários, como o caso dos derivados do ácido chiquímico que inicia pela condensação de dois metabólitos da glicose (fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fosfato)

(JUNIOR, 2011). Através dessa rota serão formados os metabólitos secundários: flavonoides, taninos condensados e taninos hidrolisáveis, conforme figura 06.

Outro componente derivado a partir da rota biossintética do ácido Chiquímico (ver Figura 06) é o ácido gálico, quimicamente denominado como ácido 3,4,5-trihidróxi-benzóico (Figura 07). O ácido gálico é um metabólito secundário que gera as subclasses de taninos hidrolisáveis (galotaninos e elagitaninos), que são formados pelas reações de esterificação da glicose pelo ácido gálico ou por ligações meta-dipsídicas formadas entre moléculas do mesmo.

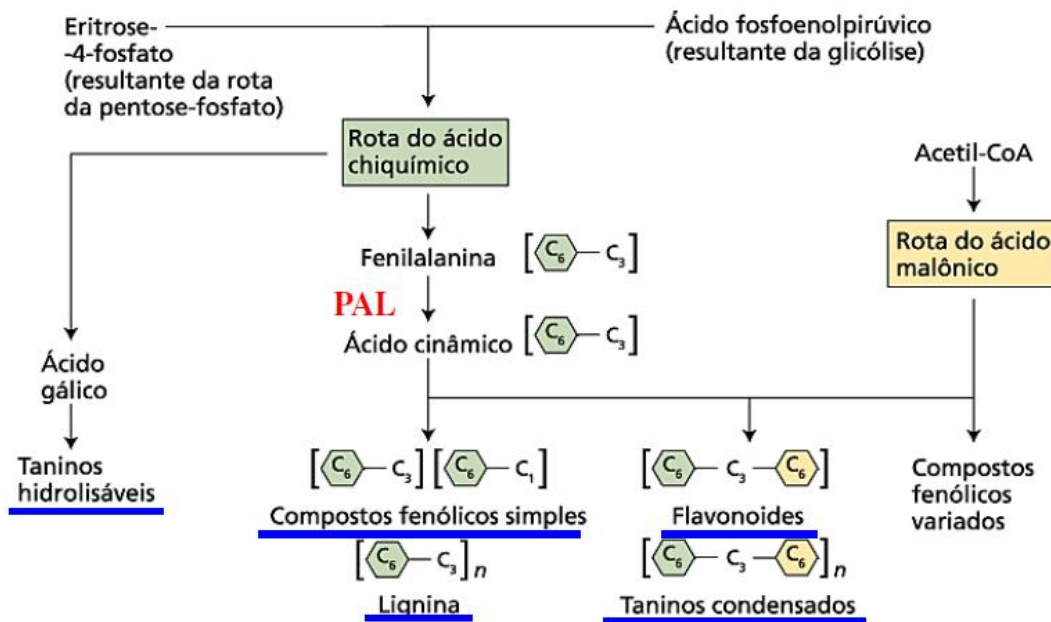


Figura 06 – Rota biossintese dos taninos condensados (proantocianidina), taninos hidrolisáveis e flavonoides. Fonte: HORMÔNIOS E DEFESA VEGETAL.

O ácido gálico possui potente ação farmacológica, sendo aplicado na produção de resinas semicondutoras e do trimetopim, um importante antibiótico anti-malárico. Além disso, possui a capacidade de retirar resíduos do ácido hipocloroso, reduz a peroxidação dos fosfolipídios presentes no cérebro bovino e quela metais formando complexos bastante estáveis, por exemplo, com o ferro III (POLEWSKI; KNIAT; SLAWINSKA, 2002; BATTESTIN, *et al*, 2004).

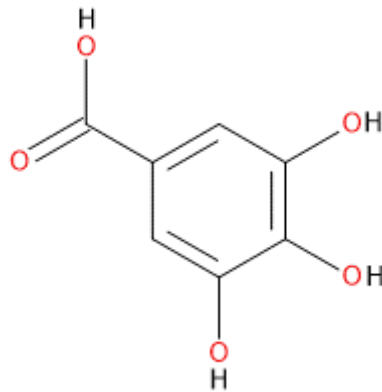


Figura 07 – Estrutura molecular do ácido gálico. Fonte: (JUNIOR, 2011).

As espécies da família Ochnaceae também são capazes de biossintetizar flavonóides e biflavonóides, conforme mostrado na Figura 06, principalmente as espécies pertencentes aos gêneros *Ouratea*, *Luxemburgia*, *Ochna* e *Lophira*. (TIH *et al.*, 1989; TIH, *et al.*, 1992; MESSANGA, *et al.*, 2002; LIKHITWITAYAWUID, 2001; SUZART, 2007).

Os flavonóides constituem um grupo de metabólitos secundários, polifenólicos que constituem a classe mais abundante de produtos naturais e dietéticos, presentes em frutas (frutas cítricas, cereja, uva, maçã), verduras (cebola, pimenta verde, brócolis, tomate, espinafre), bebidas (chás de folhas e grãos), suplementos dietéticos e medicamentos fitoterápicos, como *Gingo biloba*. Até o momento, já foram identificados e classificados mais de 6.000 tipos diferentes de flavonóides (HODEK, TREFIL e STIBOROVA, 2002), que possuem uma estrutura molecular padrão (Figura 8).

Os flavonóides possuem uma potencial capacidade preventiva de várias doenças, tais como doença cardiovascular, doenças inflamatórias, infecções virais, diabetes e doenças neurológicas (SCALBERT e WILLIAMSON, 2000; VAOUZOUR *et al.*, 2008; RATHEE *et al.*, 2009; ANDRES, DONOVAN e KUHLENSCHMIDT, 2009). Estudos relatam sua ação antioxidante, envolvendo não só os compostos flavonoídicos, como também os seus precursores biossintéticos, como aminoácidos alifáticos, terpenóides, ácidos graxos dentre outros (RICHARDSON *et al.*, 1974; PRATT & BIRAC, 1979; MANN, 1987; RIOS *et al.*, 1992). Os flavonóides também são potentes agentes anti-inflamatórios atuando na inibição da biossíntese de eicosanóides envolvidos em processos inflamatórios, por mecanismos dependentes da sua atividade antiradicalar e antiperoxidante (LARSON, 1988).

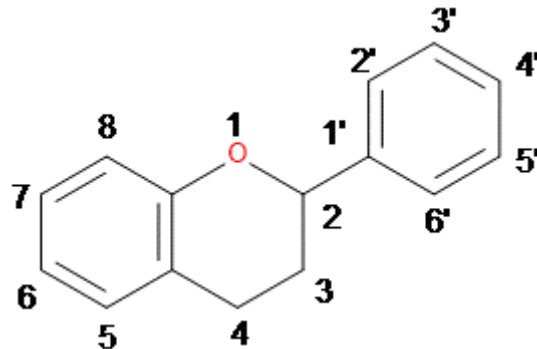


Figura 08 – Estrutura básica do flavonóide. Fonte: Larson, 1988.

Suzart (2007) descreve que as substâncias mais significativas do gênero *Ouratea* são os biflavonóides que podem ser utilizados como marcadores taxonômicos. Estes compostos possuem uma ligação interflavonoídica do tipo Carbono-Carbono, cujo representante mais abundante é o derivado 7''-O-metilagatisflavona (Figura 09). Até o momento, foram isolados da espécie *Ouratea hexasperma* os seguintes constituintes químicos: Hexaspermona A, Hexaspermona B, Hexaspermona C, 5,7,4'-OMe-isoflavona, 7-Ometilagatisflavona, 7,7-O-dimetillanaraflavona, agastiflavona, epicatequina, 6-C glicopiranosil-luteolina, 3-O-glicopiranosil-quercetina, 2-O-Dglicopiranosil-8-C-D-glicopiranosil luteolina.

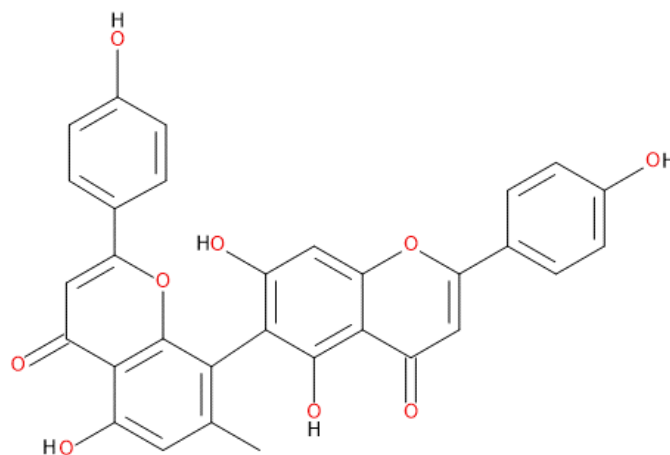


Figura 09 – 7''-O-metilagatisflavona (biflavonóides). Fonte: (SUZART, 2007).

Além de flavonóides e biflavonóides, ocorrem no gênero outras classes de substâncias como: norisoprenóides (VELANDIA *et al.*, 1998; SUZART, 2007), diterpenos (VELANDIA *et al.*, 1998; FELÍCIO *et al.*, 2004; FERNADES, 2008),

triterpenos, (MBING *et al.*, 2003b; CARVALHO *et al.*, 2008; FERNANDES, 2008), esteróides (CARVALHO *et al.*, 2008; FERNANDES, 2008), lignanas (VELANDIA *et al.*, 1998; SUZART, 2007), hidrocarbonetos e ésteres alifáticos (MOREIRA *et al.*, 1994; PAULO *et al.*, 1986; ESTEVAM *et al.*, 2005; SUZART, 2007) e derivado do ácido benzóico (CARVALHO *et al.*, 2008; FERNANDES, 2008). A frequência e a diversidade estrutural destes componentes químicos variam entre as espécies do gênero *Ouratea*, gerando proporções distintas de metabólitos, fato que possibilita que cada espécie mostre diferentes atividades biológicas.

2.4 Principais atividades Farmacológicas do gênero *Ouratea*

As plantas do gênero *Ouratea* apresentam os seguintes usos na medicina popular: tratamento de perturbações gástricas, disenteria e diarreia (MBING *et al.*, 2006, FIDELIS, 2014); como um adstringente e tônico (ESTEVAM *et al.*, 2005, FIDELIS, 2014), e também para o tratamento de doenças relacionadas com a inflamação, tais como artrite reumatoide, artrose e doenças artríticas (CARBONERIA *et al.*, 2006, FIDELIS, 2014).

As principais atividades farmacológicas associadas aos biflavonóides encontrados nas plantas do gênero *Ouratea*, são: estimulação cardíaca, antivirais, antimicrobianas, anti-inflamatórias e anti-hepatotóxicas (SIMÕES *et al.*, 2001). Além disso, as espécies do gênero *Ouratea* (*spectabilis*, *multiflora* e *parviflora*) foram capazes de inibir a produção de aflatoxina por *Aspergillus flavus* (GONÇALEZ *et al.*, 2001; SUZART, 2007), *Ouratea parviflora* apresentou potente atividade contra *candida albicans* (ARAÚJO, *et al.*, 2013), *Ouratea sulcata* exibiram atividade antimicrobiana *in vitro* contra *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Listonella anguillarum* e *Staphylococcus aureus* (PEGNYEMB *et al.*, 2005; FERNANDES, 2008); As folhas de *Ouratea multiflora* mostraram atividade antibacterianas contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* (CARBONEZI *et al.*, 2007; FERNANDES, 2008), *Ouratea spectabilis* inibiram a enzima aldose redutase (FELICIO *et al.*, 1995; FERNANDES, 2008). Estes compostos também apresentam propriedades protetoras contra raios ultravioleta nas folhas, antifúngico e alimento para insetos (SIMÕES *et al.*, 2001).

Quanto à espécie *Ouratea hexasperma*, até o momento, há poucos estudos sobre suas atividades biológicas, somente mostrando sua ação contra células

cancerígenas (SUZART et al., 2007; DANIEL *et al.* 2007; FERNANDES, 2008) e atividade contra *candida albicans* (ARAÚJO et al., 2013). No entanto, ressalta-se que gênero apresenta diversas atividades, que seria importante avaliar sua ação antibacteriana, antioxidante e citotóxica da espécie *Ouratea hexasperma*, visto que há uma busca constante por compostos que apresentem tais atividades farmacológicas.

2.5 Resistência e características bacterianas

As bactérias se classificam de acordo com as características estruturais da sua parede celular (gram-positivas e gram-negativas) e morfologia, tais como cocos, de forma esférica, e os bacilos com forma em bastonete (MAGRO, 2014). As bactérias Gram-positivas possuem uma camada espessa de peptidoglicano contendo ácido teicóico e ácidos lipoteicóicos, e são desprovidas de lipídios na parede celular (MAGRO, 2014)

Por outro lado, as bactérias gram-negativas possuem, na parede celular, uma fina camada de peptidoglicano, situado entre a membrana interna e a membrana externa, e um espaço denominado periplasmático. Neste espaço contém proteínas de transporte, degradativas e de síntese de parede celular, como também, componentes de sistemas de transporte de ferro, e componentes essenciais para constituição das bactérias como: proteínas, açúcares e outros metabólitos (Figura 10). Além disso, há uma variedade de enzimas hidrolíticas que são importantes no metabolismo e proteção osmótica das bactérias em meios hipertônicos (TRABULSI, 1999; POZZA et al., 2006; JUNIOR, 2013).

Nesse sentido, Schaechter et al. (2002) afirma que o espaço periplasmático confere, também, a capacidade de impedir a passagem de compostos hidrofóbicos, devido a presença de açúcares e aminoácidos, proteases, fosfatases, lípases, nucleases e enzimas que degradam carboidratos. No caso das bactérias Gram-negativas patogênicas, muitos fatores de virulência, como colagenases, hialuronidases, proteases e β -lactamases também estão no espaço periplasmático (TRABULSI, 1999; JUNIOR, 2013).

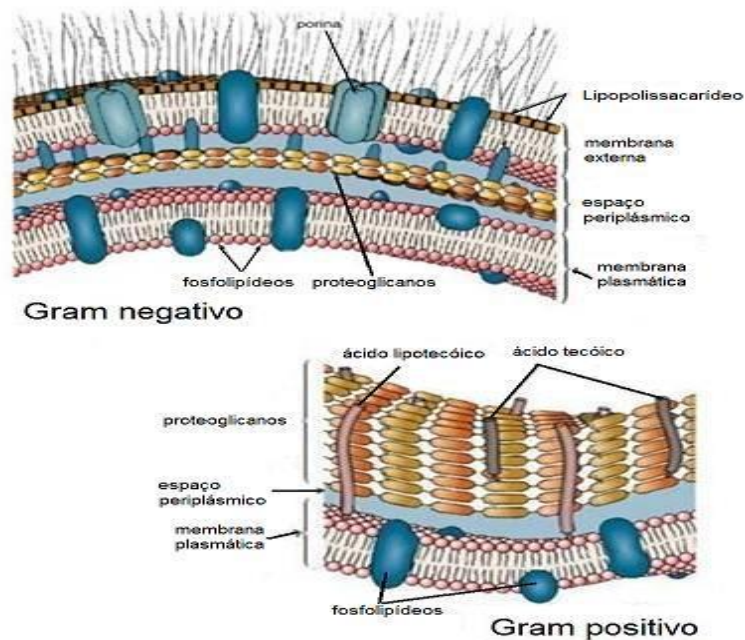


Figura 10 – Esquema da estrutura da parede celular das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. (Figura adaptada de (PRESCOTT, HARLEY, & KLEIN, 2005)). Fonte: (MAGRO, 2014)

Por conseguinte, a bactéria, estimulada pelo instinto de sobrevivência desenvolve mecanismo de resistência aos antimicrobianos, através da mudança em seus constituintes genéticos, tanto relacionado à existência de genes que codificam diferentes mecanismos bioquímicos, fazendo com que impeça a ação das drogas (SANTOS, 2002).

A resistência bacteriana pode ser originada por mutações, que ocorrem durante seu processo reprodutivo, que resultam de erros de cópia da sequência de bases que formam o DNA cromossômico. Outra fonte de resistência é a importação dos genes causadores do fenômeno, consistindo na resistência transferível. Esta resistência se faz através dos mecanismos de transdução, transformação e conjugação e, frequentemente, envolve genes situados em elementos móveis, como plasmídeos e transposons (TAVARES, 2000).

O ambiente hospitalar é comum de propiciarem as bactérias patogênicas desenvolvam mecanismos de resistências, entre essas bactérias destacam-se neste ambiente: bactérias Gram Positivas (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus* oxacilina resistente e *Enterococcus faecalis*) e Gram Negativas (*Pseudomonas aeruginos* e *Escherichia Coli*). Desta forma, avaliar compostos que apresentem atividade antimicrobiana frente a estas cepas multirresistentes tem sido o enfoque de vários

estudos, nos últimos anos. Além disso, na maioria das vezes, a atividade antimicrobiana destes compostos está associada a outras atividades como antioxidante e citotóxica.

2.6 Atividade antioxidante do gênero

O desequilíbrio entre a formação e a remoção de espécies reativas do oxigênio ou nitrogênio no organismo, pode ser decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou do aumento da geração de espécies oxidantes. Com isso, este desequilíbrio favorece um estado pró-oxidante que pode levar danos oxidativos em macromoléculas, como lipídios, proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos e demais substâncias oxidáveis, inclusive podendo resultar na morte celular (HALLIWELLI & GUTTERIDGE, 1989, LEITE, 2003; SIES, 1993). Destes danos, a peroxidação lipídica ou lipoperoxidação é um dos principais processos ocasionados por ações fisiológicas ou deletérias associadas aos processos de oxidação, que levam a uma reação em cadeia nos ácidos graxos poli-insaturados de membranas celulares, alterando a permeabilidade, fluidez e integridade das mesmas (ESTREBAUER; ZOLLNER; SHAUR, 1990). Este tipo de dano oxidativo é definido como estresse oxidativo.

Outra definição, que tem uma ampla popularidade nos dias atuais, é o termo antioxidante: “uma substância que, quando presente em baixas concentrações, comparada ao substrato oxidável (que encontramos em várias substâncias de tecidos vivos, incluindo proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos), impede ou previne, significativamente, a oxidação desse substrato” (VANNUCHI, H., 1998). No entanto, os mecanismos antioxidantes endógenos não são suficientes para remover as espécies oxidativas.

Dentre os tratamentos disponíveis hoje em dia, uma alternativa são o uso de plantas que contêm, além dos nutrientes essenciais e de micronutrientes, como minerais, fibras e vitaminas, diversos compostos secundários de natureza fenólica, denominados polifenóis, como: taninos, flavonoides, antocianidinas e saponinas. (HARBONE & WILLIAMS, 2000; KUSKOSKI, 2006). Entre estes compostos os flavonóides podem afetar ou modular a atividade de enzimas antioxidantes que levam à geração de efeitos farmacológicos e toxicológicos importantes (MIDDLETON et al., 2000), desempenhando um papel essencial na estabilização de peroxidação de

lipídios e atividade antioxidante direta por possuírem grupos hidroxila capazes de sequestrar elétrons livres (BASMA, et al, 2011). Neste contexto, o uso de plantas medicinais ou fonte de alimento rico em compostos antioxidantes podem ser utilizados na prevenção no tratamento de doenças ocasionadas pelo processo de estresse contínuo, tais como diabete mellitus, doenças neurodegenerativas, entre outras.

Os compostos fenólicos agem através dos mecanismos de ação antioxidante principalmente dos flavonoides que incluem: suprimir a formação de espécies reativas de oxigênio, ou pela inibição enzimática ou por quelar metais envolvidos na produção de radicais livres; possuindo a capacidade de retirar esses metais livres, interrompendo a formação de espécies reativas através das reações de Fenton e Haber Weiss (MOREL et al., 1993), eliminando as espécies reativas de oxigênio, ou apenas mantendo o mecanismo de defesa antioxidante regulado e protegido, (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1998; ANDALLU et al., 2014; SPERA et al., 2014), e sua propriedade de sequestrar radicais livres, atua como doadores de hidrogênio (RICEEVANS et al., 1996; GONZALO e ALONSO, 2002).

Bors et al, (1990), Martínés-Flores et al., (2002); Silva, (2002) sugeriram o seguintes determinantes estrutural a partir da estrutura geral dos flavonoides (figura 11), para a efetiva atividade sequestradora de radicais livres: Um grupo orto-diidroxi (catecol) no anel B, que confere uma maior estabilidade à forma radicalar, sendo provavelmente o alvo para o radical, juntamente com uma dupla insaturação entre C2-C3 (1) sendo essa insaturação, conjugada com um grupamento 4-oxo, responsável pela deslocação de elétrons, aumenta a estabilização eletrônica a partir do anel B (2) A adição de 3 e 5 grupamento hidroxila (OH), promove o deslocamento dos elétrons do grupo 4-oxo, levaria a um efeito máximo da capacidade antioxidante do flavonóide (3) (TIWARI, 2001; BUDNI, et al, 2007).

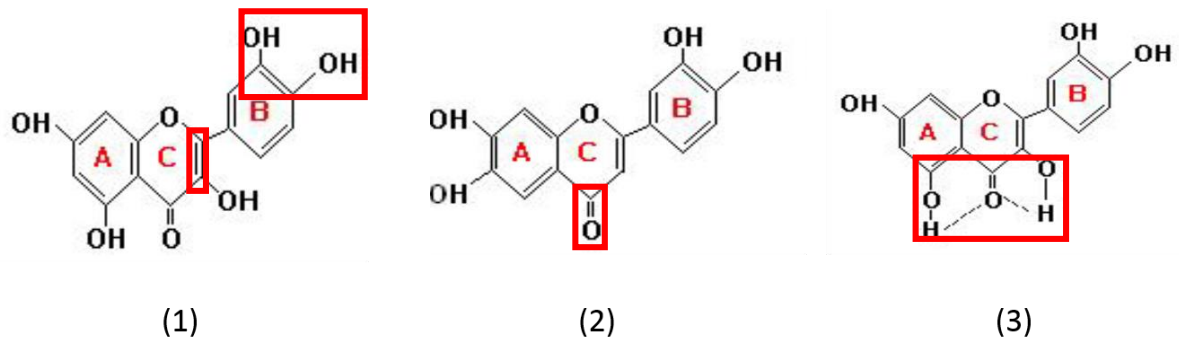


Figura 11 - Determinantes estruturais da propriedade antioxidante dos flavonóides Fonte: Adaptado de Tiwari (2001), grifos autor.

Alguns autores sugerem que os flavonóides bloqueiam a lipoperoxidação através da doação de átomos de hidrogênio aos radicais hidroxil e peroxil, formando um radical semiquinona ou radical aroxil que pode reagir com um segundo radical adquirindo uma estrutura quinona estável (Figura 12), terminando assim a cadeia de propagação da peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO) (TIWARI, 2001; BUDNI, et al, 2007).

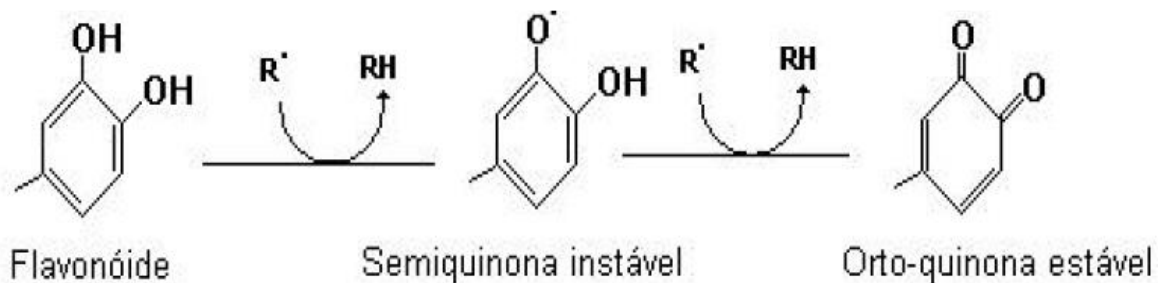


Figura 12 - Mecanismo de seqüestro de EROs (R^\bullet) por flavonóides e formação de estrutura estável. Fonte: Adaptado de Heim (2002).

Com raríssimas exceções, para proteger os lisossomos e outras membranas contra o estresse oxidativo foi constatada a necessidade de no mínimo duas hidroxilas fenólicas no flavonóide. Entre os flavonóides diidroxilados, destacam-se aqueles que possuem o sistema catecol (3',4'-diidroxil) no anel B. Entre os flavonóides com múltiplas hidroxilas destacam-se a miracetina, quercetina que possuem forte atividade antioxidante quando comparadas com α -tocoferol, ácido ascórbico, b-caroteno, glutaciona (HEIM et al., 2002; BARREIROS et al., 2006).

A planta *Ouratea hexasperma* possui um biflavonóide caracterizado na espécie 7"-O-metilagatisflavona (figura 13) que apresenta as características descritas acima. Este biflavonóide possui hidroxila no anel B, juntamente com uma dupla insaturação entre C2-C3, sendo essa insaturação, conjugada com um grupamento 4-oxo e grupamentos hidroxila (OH), e nas posições C4 (Anéis B); C5, C5, C7 (Anéis A). Tornando-o uma justificativa para sua atividade antioxidante.

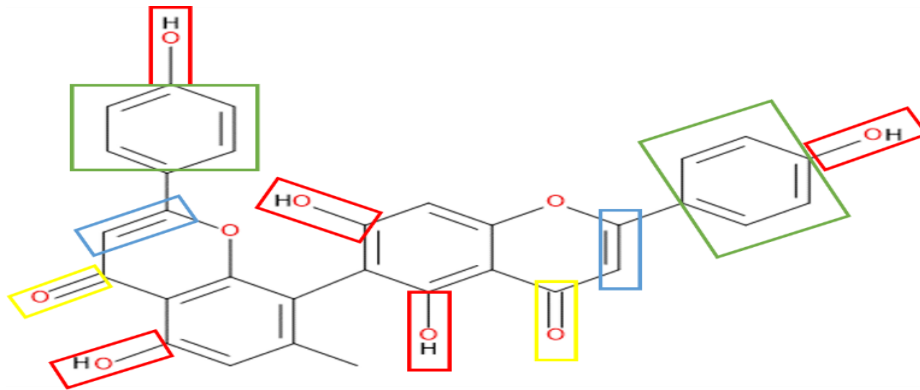


Figura 13 – biflavonóide isolado *Ouratea hexasperma*, características antioxidantes.

Na literatura foram encontrados estudos referentes a atividade antioxidante do gênero e nenhuma publicação sobre espécie *Ouratea hexasperma* e, como foi descrita por Carbonari (2005), das frações e extratos da *Ouratea parviflora* (OPEB) apresentaram significativa atividade antioxidante *in vitro*, destacando-se o extrato e a fração (OPEB, OP4), pois foram capazes de causar o “scavenger” de radicais DPPH, $O_2^{\cdot-}$ e OH^{\cdot} em concentrações menores ou similares à rutina, reconhecido agente antioxidante. Carbonari (2006), também realizou outros testes com fração acetato de etila (OP3) que não apresentou atividade antioxidante, provavelmente por não conter compostos fenólicos. No entanto, todos os demais produtos de *Ouratea parviflora* apresentaram importante efeito protetor da lipoperoxidação, sendo que o extrato bruto (OPEB) e a fração hidroalcoólica (OP4) protegeram melhor as membranas celulares e nucleares.

O ensaio com as frações do óleo fixo das sementes *Ouratea fieldingiana*, mostrou eficiência na inibição e degradação de espécies reativas de oxigênio. Os testes para atividade antioxidante apontaram ótimos resultados quando comparados ao padrão rutina (PASCOAL, et al, 2014).

Outro estudo mostrou que as biflavonas 1-4 da espécie *Ouratea multiflora* apresentou uma atividade antioxidante com eliminação de radical moderada que causa dano celular, enquanto as biflavonas 1-3 mostraram uma eliminação radicalar fraca, confirmando que a atividade antioxidante pode ser dependente do número de grupos hidroxilas aromáticas livres dos compostos testados (CARBONEZI, 2007). Além disso, o extrato metanólico de folhas de *Ouratea blanchetiana* apresentou um ótimo potencial antioxidante capaz de sequestrar o peróxido de hidrogênio (SOUZA, et al, 2013).

2.7 Citotoxicidade

Grynberg, et al (2002) avaliaram os biflavonóides da espécie *Ouratea hexasperma* e mostraram sua atividade citotóxica contra tumor de Ehrlich, cujos mecanismos são dependentes da inibição das topoisomerasas de DNA ou ativação de enzimas de fase II (enzimas de desintoxicação (glutation-S-transferase) que são importantes para o metabolismo carcinogênico. Além disso, Simoni, et al. (2002) avaliaram a citotoxicidade de biflavonóides isolados de outra espécie, *Ouratea spectabilis* em células de córnea de coelho *Sirc*. Estes compostos apresentam citotoxicidade entre 381,9 - 436,74µg/mL. e também foram capazes de inibir a aldose redutase, enzima relacionada com o início da formação da catarata em diabéticos.

Os biflavonóides da espécie *Ouratea multiflora* foram testadas quanto à citotoxicidade em relação linhagens de linfoma de ratos (L5178) linhagem celular de cancro de melanoma (KB) e nenhum dos compostos foram tóxicos para esta linhagem celular (CARBONEZI, 2007). Um estudo realizado com a espécie *Ouratea furrugínea* como agente anticancerígenos e quimioprevenção foi utilizado no ensaio da enzima Etoxicumarina-O-Desetilase (ECOD), que é um marcador enzimático de fase I, já que ECOD é catalisada por enzimas CYP (Citocromo P 450), tais como CYP1A1, CYP2A6, CYP2B6, e CYP2E1, e também CYP3A, em menor grau. A família CYP 1 é composta pelos membros 1A1, 1A2 e 1B1, que são capazes de ativar pró-carcinógenos e elevar a atividade de CYP1A1, que está associada com câncer de colo-retal (FIDELIS, 2012). Desta forma, o autor mostrou que todas as substâncias testadas apresentaram efeitos inibitórios contra pelo menos uma das enzimas utilizadas (ECOD e GST) (FIDELIS, et al., 2012)

De maneira geral, Suzart (2007) resume que os biflavonóides 7"-O-metilagatisflavona (de *O. hexasperma*), a amentoflavona (de *O. semiserrata*) e o derivado acetilado da amentoflavona apresentaram atividade inibitória sobre a DNA topoisomerase humana tipo I, com potente atividade sobre a inibição do crescimento de células de carcinoma de Ehrlich. No entanto, apenas a agatisflavona apresentou atividade sobre a inibição da DNA topoisomerase humana tipo II- α e inibição de 42% do crescimento de células de leucemia humana K562. As biflavonas 6 \rightarrow 6"-begenkwanina e a 7,7"-O-dimetilagatisflavona isoladas de *O. spectabilis* apresentaram atividade inibitória sobre a enzima aldose redutase de cristalino bovino.

2.8 Atividade Vasodilatadora

Pesquisas realizadas com os extratos hidroetanólicos de *O. castanaefolia*, *O. spectabilis* e *O. semiserrata* avaliaram a atividade vasodilatadora destes extratos em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina (VALADARES, 2003). Estes estudos mostraram que apenas o extrato de caules de *O. semiserrata* (OS) produziu vasodilatação significativa, na concentração de 100mg/mL. Além disso, o fracionamento biomonitorado de OS resultou em uma fração enriquecida em proantocianidinas, que produziu a máxima vasodilatação, na concentração testada (VALADARES, 2003).

Em outro estudo, os teores totais de proantocianidinas foram determinados para OS e para as frações bioativas, por espectroscopia no visível (BRAGA *et al.*, 2000). Neste estudo, os autores demonstraram uma potente atividade vasodilatadora *in vitro* para o extrato hidroalcoólico de caules de *O. semiserrata*, juntamente com a atividade inibitória sobre ECA (ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA) *in vitro* (BRAGA *et al.*, 2000). Além disso, também se demonstrou a dependência entre a atividade vasodilatadora e o teor total de proantocianidinas, para diferentes frações de *O. semiserrata*, sugerindo a participação de compostos desta classe na atividade observada (VALADARES, *et al.*, 2003).

O extrato hidroetanólico e a fração acetato de etila de *O. semiserrata* apresentaram efeito vasodilatador endotélio-dependente e atividade antiipertensiva *in vitro*, inibindo a conversão da enzima angiotensina I (ACE). O extrato

aquoso de *Ouratea sp.*, contendo proantocianidina, mostrou atividade antitumoral contra o carcinossarcoma de Walker 256 e sarcoma 180 em ratos.

Mediante as várias atividades farmacológicas das plantas do gênero *Ouratea*, descritas acima, é de grande importância avaliar o potencial antimicrobiano, antioxidante e citotóxico *in vitro* da espécie *Ouratea hexasperma*, cujos dados científicos são escassos, embora esta planta seja bastante usada pela população tradicionalmente em várias patologias.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar as atividades antibacteriana, antioxidante e citotoxicidade do extrato etanólico da planta *Ouratea hexasperma in vitro*.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar caracterização fitoquímica preliminar do EEEOH;
- Avaliar atividade antibacteriana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, do EEEOH para obtenção da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).
- Avaliar a citotoxicidade do extrato EEEOH sobre células mononucleares *in vitro*.
- Avaliar a atividade hemolítica do EEEOH.
- Avaliar a capacidade antioxidante EEEOH pelo método 2, 2'-Azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS) radical ensaio de descoloração (ABTS).
- Quantificar teores de flavonoides no EEEOH.
- Avaliar a produção de Oxido Nitrico (NO) e Malondialdeído (MDA) em leucócitos humanos induzida pelo EEEOH.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta

No dia 23 de Julho de 2014 foi realizada a coleta da entrecasca da planta *Ouratea hexasperma*. A localização do arbusto foi determinada pelas coordenadas de Sistema Posicionamento Geográfico (GPS) do ponto da coleta: cuja coordenadas são em formato Marcador Transversal Universal (UTM) e Geográficas (UTM: 22N 0484191/0015373, Geográfica: N 00° 08'20.7"/ W 051 °08' 31.5") (Figura 14 - 15), local da coleta: M/E da BR 156, Km 14, na cidade de Macapá-AP, no bioma Cerrado, acompanhado pelo engenheiro agrônomo do Instituto de Pesquisa científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá (IEPA) Moises Silva Araújo.

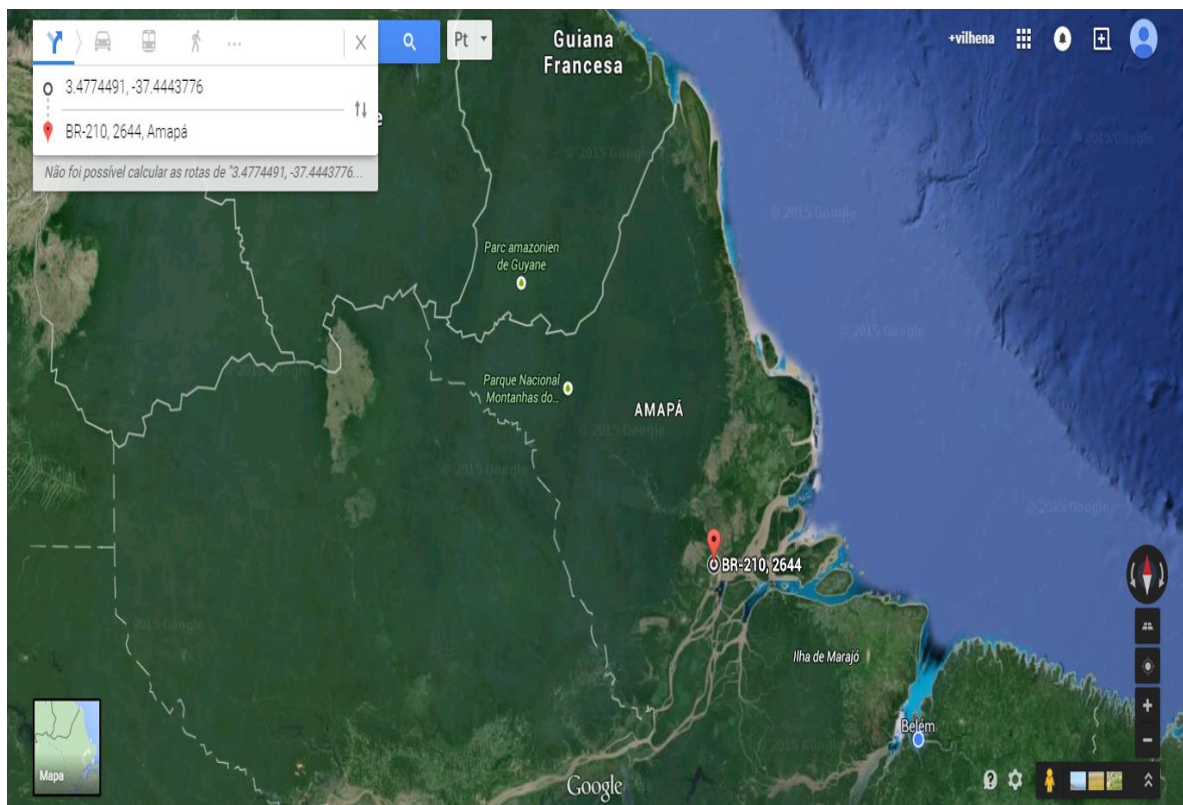


Figura 14 – Localização do arbusto da espécie *Ouratea hexasperma* no mapa nos pontos do GPS. Fonte: Google maps.

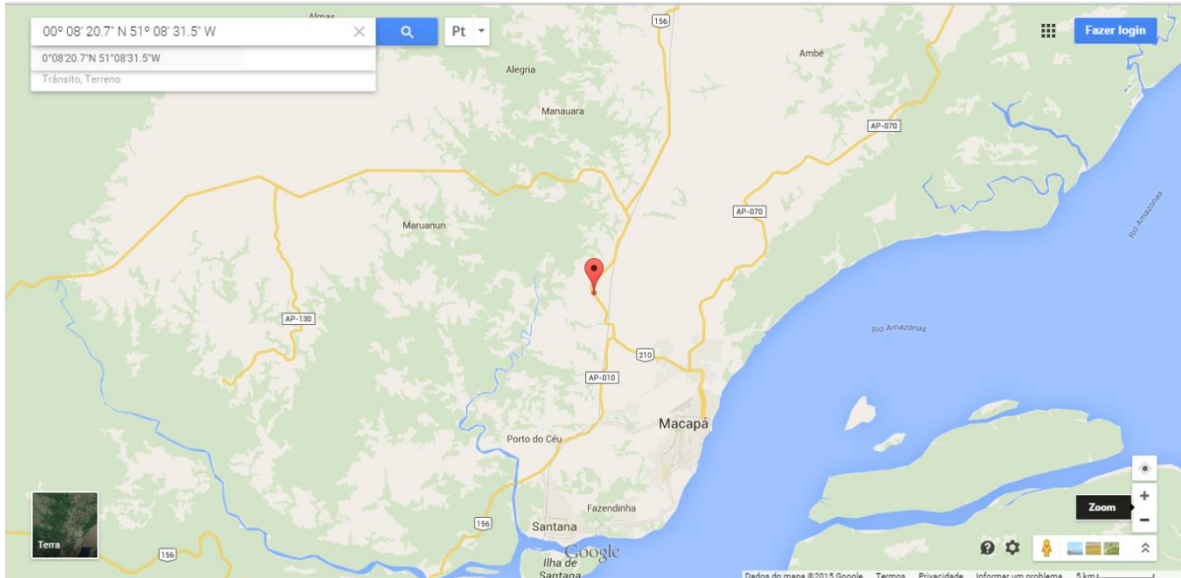


Figura 15 – Localização exata do arbusto da espécie *Ouratea hexasperma* no mapa nos pontos do GPS. Fonte: Google maps.

4.2 Identificação

A partir do material botânico coletado foram confeccionadas as exsicatas para identificação e depósito no Herbário do IEPA, de acordo com o responsável do Herbário, sob a identificação AP7668.

4.3 Obtenção dos extratos

As entrecascas (2700g) foram lavadas com água corrente e acrescentado hipoclorito a 10% e secas em estufa com circulação de ar em temperatura de 50° C. Em seguida, foram submetidas à moagem em moinho tipo martelo, até a obtenção do pó. Todas essas etapas foram realizadas no laboratório de produção de fitoterápicos do IEPA.

Este pó 400g foi submetido à extração por maceração a frio com solução etanólica 96% na proporção 2:8 (p/v) durante 1 dia. Após o processo de extração, seguiu-se a filtração e posterior concentração, secou-se ao ar livre e em seguida foi pesado (Figura 16) e armazenada em freezer a -20°C até o momento de sua utilização. Esta etapa foi realizada no laboratório de Química da Universidade Federal do Pará (UFPA).

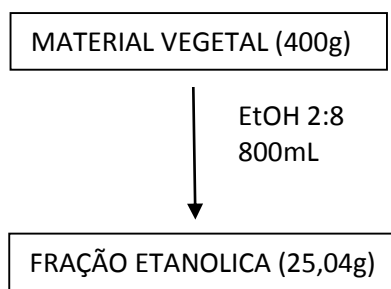


Figura 16 – Esquema de obtenção do EEEOH. Fonte: Autor.

4.3.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA

A prospecção fitoquímica foi realizada de acordo com BARBOSA et al, 2001. O teste foi feito para identificar a presença: saponinas espumificas, açúcares redutores, polissacarídeos, fenóis, taninos, proteínas, alcalóides, glicosídeos cardíacos, catequinas, derivados benzoquinonas, sesquiterpenolactonas e outras lactonas, e flavonoides entre outros.

4.3.2 DILUIÇÃO DOS EXTRATOS

O EEEOH foi diluído em água destilada e Dimetil-sulfóxido (DMSO) a 10% e homogeneizados em agitador vortex por 30 minutos. Para a realização dos testes microbiológicos foram utilizadas as soluções estoque da *Ouratea hexasperma* (10mg/mL) e para os testes antioxidante e citotoxicidade, Oxido Nitrico e Malonaldeido (500mg/mL) e a partir destas, foram feitas diluições para se chegar às concentrações usadas analisadas. Além disso, cada extrato foi protegido da umidade, luz e do calor, usando-os somente no momento do ensaio, em ambiente estéril.

4.4 Avaliação da atividade antibacteriana para obtenção de CIM e CBM

Para a avaliação antimicrobiana foram utilizadas Cepas de bactérias da American Type Culture Collection (ATCC) por serem padronizadas e bem caracterizadas genética e fenotipicamente. Os testes de atividade antimicrobiana do EEEOH foram realizados pelo método de microdiluição em placa de 96 poços, de acordo com os padrões do National Commitee for Laboratory Standards (NCCLS).

4.4.1 PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura utilizados foram caldo Mueller-Hinton (MERCK, Alemanha), ágar Mueller-Hinton (MERCK, Alemanha), ágar cetrimide (HIMEDIA, Índia), ágar nutriente (HIMEDIA, Índia), ágar manitol (HIMEDIA, Índia), ágar macconkey (HIMEDIA, Índia) e ágar sangue (HIMEDIA, Índia). Estes meios foram preparados a partir de uma base desidratada disponível comercialmente e conforme as instruções do fabricante.

4.4.2 MICRORGANISMOS UTILIZADOS E MANUTENÇÃO DAS CEPAS

Para a atividade antibacteriana do EEEOH foram usadas cepas de referência *American Type Culture Collection* (ATCC), bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) e Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 8739 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853) obtidas a partir da coleção do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/FIOCRUZ – Rio de Janeiro). A escolha das amostras justifica-se pela representatividade quanto às classes conhecidas por causarem infecções em humanos e apresentarem alto grau de resistência bacteriana. As cepas foram mantidas em ágar nutriente, à temperatura ambiente, no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará.

Para os ensaios, todas as bactérias foram previamente semeadas em placas de Petri contendo meio específico para cada bactéria, para garantia de identificação das espécies. O *E. faecalis* foi semeado em ágar sangue; *S. aureus* e *oxacilina resistente em ágar Manitol*, *E. coli* em ágar macconkey e *P. aeruginosa* em ágar cetrimide. Em seguida, todas as placas foram incubadas a 35°C por 24 horas em estufa para verificação do crescimento, para posterior preparação dos inóculos.

4.4.3 PREPARO DOS INÓCULOS BACTERIANOS

Para o preparo dos inóculos bacterianos foram utilizadas cepas de *S. aureus* (ATCC 6538), *E. faecalis* (ATCC 29212), *E. coli* ATCC (8739) e *P. aeruginosa* (ATCC 25853). A obtenção dos inóculos seguiu a norma M7-A9 vol. 32 nº 2 da “Metodologia dos testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de crescimento Aeróbico”.

Após o período de incubação, 3 a 4 colônias dessas bactérias foram selecionadas e transferidas para tubo estéril contendo 1mL de meio caldo Mueller-Hinton. Quando necessário, realizou-se ajustes para o alcance da concentração desejada de aproximadamente 1×10^8 UFC/mL, sendo compatível com a escala 0,5 de Mc Farland. Em seguida, realizou-se a incubação dos tubos, cada um contendo a concentração do inóculo 1×10^8 UFC/ml por 1 hora para alcançar o crescimento exponencial das bactérias. Após esse tempo, diluições seriadas foram realizadas até a obtenção do inóculo 1×10^3 UFC/ml (Figura 17).

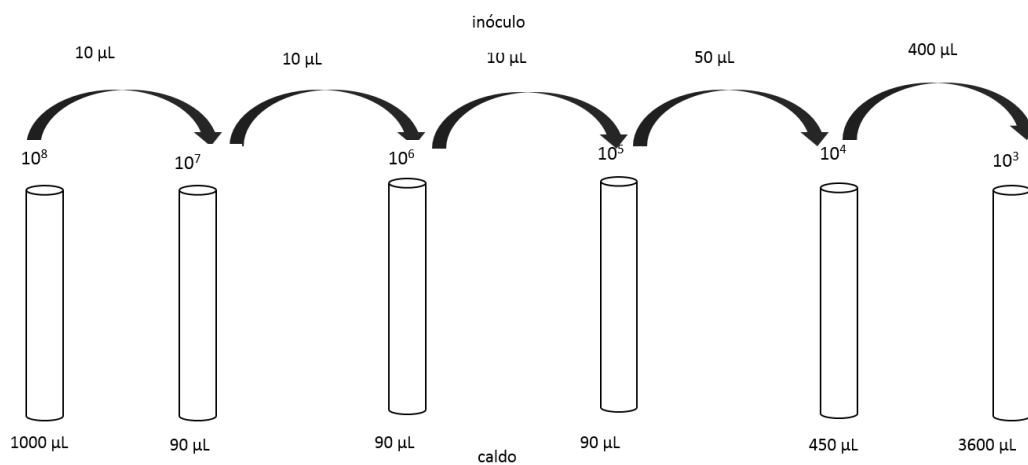


Figura 17 - Preparo das diluições dos inóculos bacterianos em caldo Mueller Hilton.

4.4.4 TESTE DE MICRODILUIÇÃO

Foi utilizado a metodologia descrita por Eloff, 1998 e Mendes, et al, 2011 do método de microdiluição o qual utiliza microplaca com 96 poços. Os extratos diluídos foram colocados em cada poço da microplaca uma alíquota de 100µL de cada concentração foi adicionada juntamente com 100µL de inóculo bacteriano (1×10^3 UFC/mL), obtendo concentrações de: 5-0,19 mg/mL. Cada ensaio foi realizado em

duplicata para cada concentração de extrato acima descrita e cada bactéria testada. Como controle negativo foi utilizado o DMSO 10% (solvente) e para controle positivo, o antimicrobiano comercial cloranfenicol contra bactérias gram-positivas (250 µg/mL) e a penicilina-estreptolisina para bactérias gram-negativas (10000unit/10mg). Ao final deste processo a microplaca foi incubada a 35°C por 24 horas (Figura 18).

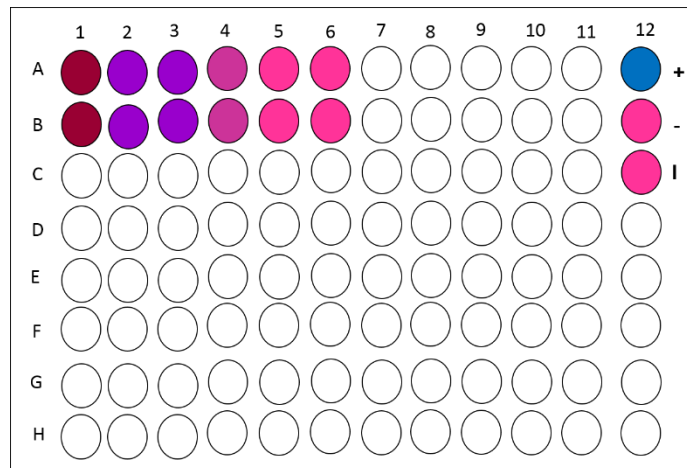


Figura 18 – Esquema de distribuição das concentrações dos extratos na microplaca, incluindo os controles positivo (+) e negativo (-) e Inóculo (I). Fonte: Autor.

4.4.4.1 Obtenção da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima (CIM) é considerada como a menor concentração de um agente antimicrobiano que impedirá o crescimento visível de um micro-organismo em testes de sensibilidade ou de pelo menos 50% do micro-organismo avaliado (efeito bacteriostático). Para a obtenção de CIM neste estudo foi utilizado o parâmetro da mudança de coloração obtida no teste colorimétrico utilizando a resazurina (MONTEIRO et al 2012), sendo esse um parâmetro para avaliar a potência *in vitro* da amostra testada (MENDES, 1997; CLSI, 2009).

A resazurina é um corante que apresenta uma coloração azul, utilizada como referência em testes de viabilidade celular, em contato com as células viáveis sofre uma redução, sendo transformada em resofurina e mostrando uma coloração rosa. (ALVES et al 2008; MONTEJANO et al 2005) (Figura 19).

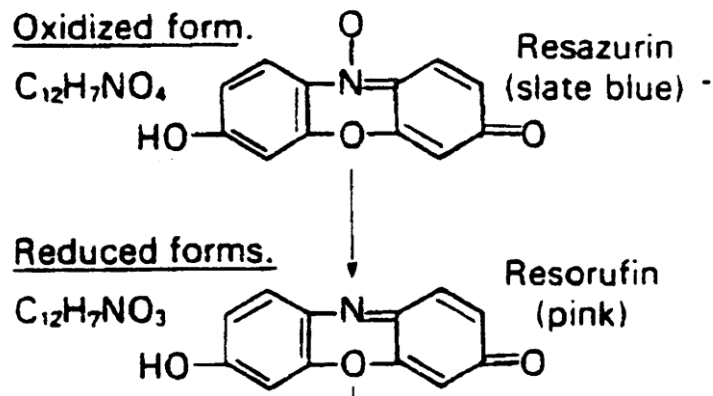


Figura 19 - Mudança na estrutura química da resazurina após reação de redução ao entrar em contato com células viáveis. Fonte: (MEYER et al, 1979).

Para isso, após o término do tempo de incubação da microplaca foram acrescentados 30 μ L de resazurina a 0,01% cada poço. Um período de 3 horas foi necessário para a reação com a resazurina e então se partiu para a interpretação dos resultados para identificação do CIM que foi observada visualmente.

4.4.4.2 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A CBM é a menor concentração de um agente microbiano capaz de matar 99 a 100% dos micro-organismos testados. A CBM foi obtida a partir da técnica de contagem das unidades formadoras de colônias (UFC).

Para a obtenção do CBM, 10 μ L de cada poço, com resultados efetivo de atividade antimicrobiana, contendo diferentes inóculos bacterianos e EEEOH foram semeados em placas de petri contendo Ágar Mueller-Hinton (AMH), em seguida incubados por mais 24 horas a 37°C para posterior leitura das UFC (Figura 20).

Todos os ensaios foram realizados com o controle positivo, o antimicrobiano comercial cloranfenicol foi utilizado em bactérias gram-positivas na concentração de 250 μ g/ml, já para bactérias gram-negativas, penicilina-estreptolisina foi o antibiótico de escolha para controle de positivo, na concentração 10000unit/10mg.

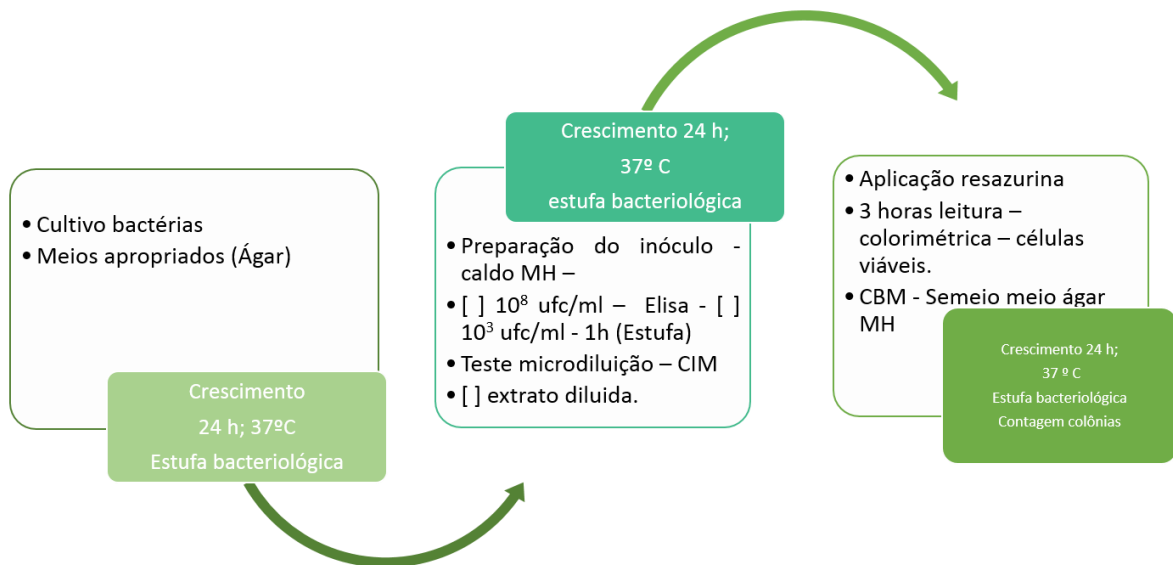


Figura 20 – Esquema sintetizado da metodologia utilizada na determinação do CIM e CBM.

4.5 2, 2'-Azinobis- (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS) radical ensaio de descoloração (ABTS)

O ensaio de descoloração do radical livre utilizando 2, 2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-Ácido-6-sulfônico (ABTS) do EEEOH e controles foram realizados com leitura em espectrofotômetro. ABTS radical livre foi gerado em 75% solução de metanol por mistura de solução de ABTS a 7mM de concentração e persulfato de potássio a 2,45 mM, e colocada no escuro durante 12-16h à temperatura ambiente. Para o ensaio, a solução ABTS foi diluída a faixa de valor de absorção de $0,70 \pm 0,02$ em 734 nm e equilibrada à temperatura ambiente. Uma alíquota de 30µL nas concentrações de 10, 25, 50, 100, 250 e 500mg/mL de EEEOH e controle (Trolox) foram adicionados a 2970µL de ABTS e a absorvância foi lida após 5 min após a o contato entre os reagentes.

4.6 Determinações de flavonoides totais pelo método colorimétrico de cloreto de alumínio

Método colorimétrico, com pequenas modificações foi usado para determinar o conteúdo total de flavonóides em diferentes concentrações dos EEEOH como descrito por Hossain (2011).

Para determinação dos flavonóides total foi utilizado o método colorimétrico de cloreto de alumínio. Preparou-se, quantitativamente, uma solução 500µg/mL da amostra em metanol em que foram misturados 1mL de metanol, 1 mL da solução do extrato 1mg/mL. Para o ensaio foram utilizados diferentes concentrações dos extratos partido da solução mãe de 500 µg/mL, que foram acrescentados uma alíquota de 40µL em 200 µL de solução de AlCl₃ a 10 %, 200 µL de solução de NaCO₃ a 15 % e 5 mL de água ultrapura (Pure Lab, Ultra, ELGA, Bucks, UK). Incubou-se por 30 minutos à temperatura ambiente e protegida da luz. A absorbância foi determinada no equipamento Elisa, no comprimento de onda 415 nm. A curva de calibração foi preparada com soluções de quercetina 0,64 a 40,00µg/mL. A quantificação de flavonóides foi determinada a partir da equação de regressão de calibração $y = 0,0214x + 0,0293$, $R^2 = 0,9932$. As análises foram realizadas em triplicata.

4.7 Atividades hemolíticas e citotóxicas

4.7.1 COLETA DO SANGUE

Participaram do presente estudo 12 indivíduos de ambos os sexos, faixa etária de 20 a 30 anos, saudáveis. Foram realizados o esclarecimento sobre a pesquisa e os voluntários assinaram o Termo de Consentimento de Livre Esclarecimento (TCLE) aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Federal do Pará (apêndice), com o parecer número 1.090.857. Foram colhidos 20mL de sangue venoso, por técnico especializado do laboratório da UFPa, para a realização dos testes de citotoxicidade, dosagem de NO, MDA e hemólise.

Para o tratamento, foram preparadas soluções para medições de NO, MDA e hemólise nas concentrações do EEEOH 10, 25, 50, 100, 250 e 500mg/mL, partindo de soluções-mãe de 500mg/mL.

4.7.2 CULTURA DE CÉLULAS – PBMC HUMANO

Nos ensaios foram utilizados as Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC) que são constituídos de linfócitos, neutrófilos, monócitos e macrófagos. Para o cultivo desse tipo célula, foram coletados 20mL de amostra sanguínea em tubo

falcon de 15mL estéril com EDTA, distribuídos o sangue em quatro tubos falcon com 5mL cada, após isso foi adicionado solução salina proporcionalmente ao volume de sangue completando 10mL. Em um novo tubo falcon, foi adicionado 3mL de Ficoll Histopaque para separação das células PBMC e preenchido com mistura do tubo com 10mL de sangue e solução salina, em seguida centrifugada durante 30min a 3000 RPM. Logo após, o plasma foi descartado e a camada de leucócitos foi transferida para um tubo falcon, onde foi adicionado PBS 1X e levado novamente para a centrífuga por 5 minutos a 1200 RPM. O sobrenadante foi descartado e adicionado o meio de cultura RPMI. Em seguida, as células foram contadas em câmara de Neubauer em solução de Turk.

4.7.3 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

A avaliação da citotoxicidade foi realizada pelo método com MTT, que se baseia na redução do brometo de 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) em MTT-formazan, pela enzima mitocondrial tetrazolium-succinato-desidrogenase, de acordo com a metodologia descrita por Mosman et al. (1983). Para isto, após a obtenção de PBMC's Humano e a contagem, as células foram distribuídas em placas de microdiluição de 96 poços, de fundo U, juntamente com diferentes concentrações de extrato etanólico (10, 25, 50, 100, 200 e 500mg/mL) diluídas em DMSO 10%. Os testes foram realizados em triplicata e Tryton 10% foi usado como controle positivo e o solvente DMSO 10% como controle negativo, e posteriormente a placa foi incubado por 24 horas em estufa a 37°C com 5% de CO₂.

Após 24h de incubação foram adicionados 20µL de MTT concentração mg/mL em todos os poços utilizados e incubou-se novamente por 3 horas, em estufa de CO₂ a 37°C. Passado o período de incubação foi adicionado 40µL de HCl 6N-isopropanol e incubado overnight na estufa de CO₂. No dia seguinte foi realizado a leitura em Leitora de ELISA a 550nm. Após esse período, as absorbâncias foram determinadas em leitora espectrômetro de placa, e utilizadas na seguinte equação:

$$\% \text{ inibição} = (\text{absorbância do controle negativo} - \text{absorbância da amostra} / \text{absorbância do controle negativo}) \times 100.$$

Nesse mesmo ensaio também foi possível avaliar a CC50 (concentração inibitória capaz de matar 50% das células). Esse valor foi calculado através de uma regressão linear (NASCIMENTO, 2009).

4.7.4 ENSAIO HEMÓLISE (MEMBRANA ESTABILIDADE)

A enzima lisossomal liberada durante a inflamação produz uma variedade de desordens. A atividade extracelular destas enzimas é dita para ser relacionado a inflamação aguda ou crônica. As drogas não esteróides agirão por inibição destas enzimas lisossomais ou estabilizando a membrana lisossomal. Desde células vermelhas do sangue humano periférico em que sua membrana celular é semelhante à membrana lisossomal, o estudo foi realizado para verificar a estabilidade da membrana do sangue periférico frente a diferentes concentrações dos extratos de prever a atividade anti-inflamatória *in vitro*. Os vários extratos, na concentração de 10 – 500mg/mL, respectivamente, foram incubados separadamente com lavadas e centrifugadas com solução PBS (VARADARASU, M et al, 2007).

Cinco mililitros de sangue foram centrifugados, foi realizado a lavagem dos eritrócitos, do qual foi retirado a papa de hemácias foi submetida a três lavagens e ressuspensas em 50mL de PBS. Desta solução foram retirados 1900µL e colocados em tubo, completando o volume de 2000µL com soluções contendo 10, 25, 50, 100, 250 e 500mg/mL do EEEOH, como controle positivo foi utilizado o triton X 10%. E a hemólise promovida foi avaliada pela liberação de hemoglobina pelas células (suspensão de eritrócitos 5%) após 2 horas e meia de incubação em 37°C, a fim de retirada do plasma. Após esse tempo, centrifugou-se e o sobrenadante foi retirado para avaliação por espectrometria em comprimento de onda de 640nm. A atividade hemolítica foi expressa utilizando-se como referência à medida espectrofotométrica obtida do sobrenadante do controle positivo (Figura 21) (VISSERS et al., 1998; YANG et al., 2006).

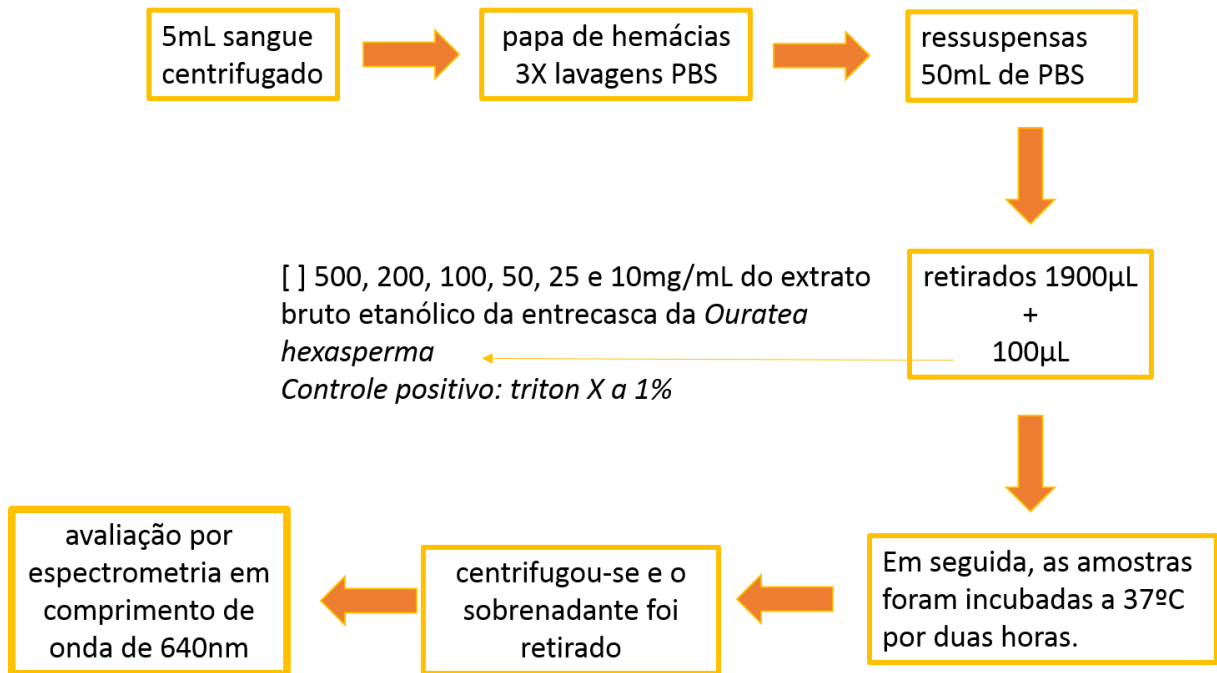


Figura 21 – Esquema da metodologia utilizada no ensaio de hemólise.

4.7.5 DOSAGEM DE NO

O óxido nítrico (NO) foi mensurado como nitrito (NO₂). PBCM (2x10⁵ em um volume final de 0,2 mL de meio RPMI) foram incubados por 24 h, na presença ou não do EEEOH, nas concentrações de 500, 250, 100, 50, 25 e 10mg/mL. A concentração de nitrito foi mensurada pela reação de Griess. Volumes iguais de sobrenadante do cultivo celular e o reagente de Griess foram incubados por 10 min à temperatura ambiente e absorvância foi mensurada a 550nm. A concentração de NO₂ foram determinadas de uma curva-padrão feita com NaNO₂ (Figura 22) (STUEHR e MALETTA, 1985). A medida de NO pela reação de Griess é uma medida indireta, através da avaliação de seus metabólitos estáveis, nitrato (NO⁻³) e nitrito (NO⁻²). Esta metodologia pressupõe a redução prévia do nitrato a nitrito, utilizando-se a enzima nitrato redutase ou cádmio e a posterior determinação do nitrito pela reação de Griess (TSIKAS, 2007).

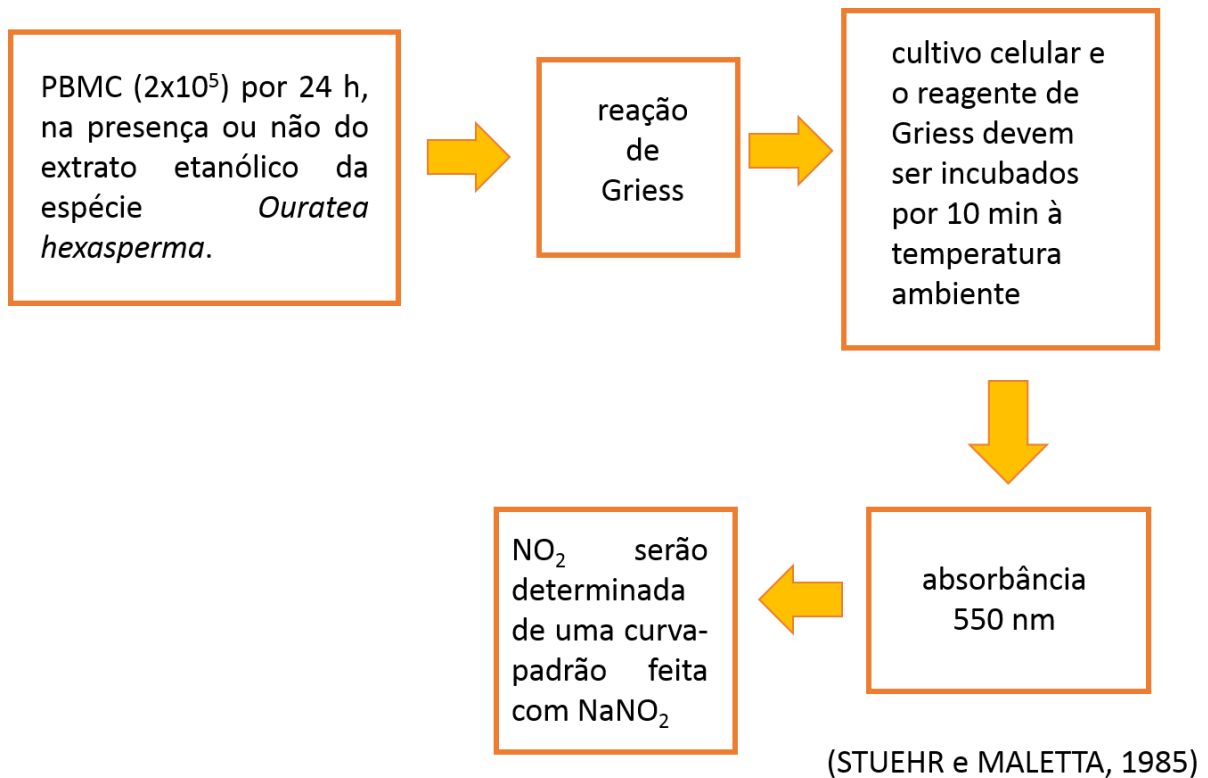


Figura 22 – Esquema sintetizado da metodologia utilizada na determinação NO.

4.7.6 DETERMINAÇÃO DE MDA

Foi utilizada a metodologia adaptada de Ohkawa et al (1979). Uma alíquota de 100µL de plasma foi adicionada às soluções de ácido tricloroacético a 10% p/v e ácido tiobarbitúrico a 1% p/v e a mistura foi levada a banho-maria por 1h, a 90°C. Em seguida esperou esfriar e foi adicionado 4mL de álcool butílico. Após se levou ao agitador automático e centrifugação por 10min à 2500 rpm, o sobrenadante foi lido em espectrofotômetro na faixa de 530nm. Os valores de absorbância foram aplicados em curva padrão de malondialdeído para determinação das concentrações do analito. Os resultados foram expressos em nmol MDA/mL de plasma (Figura 23).

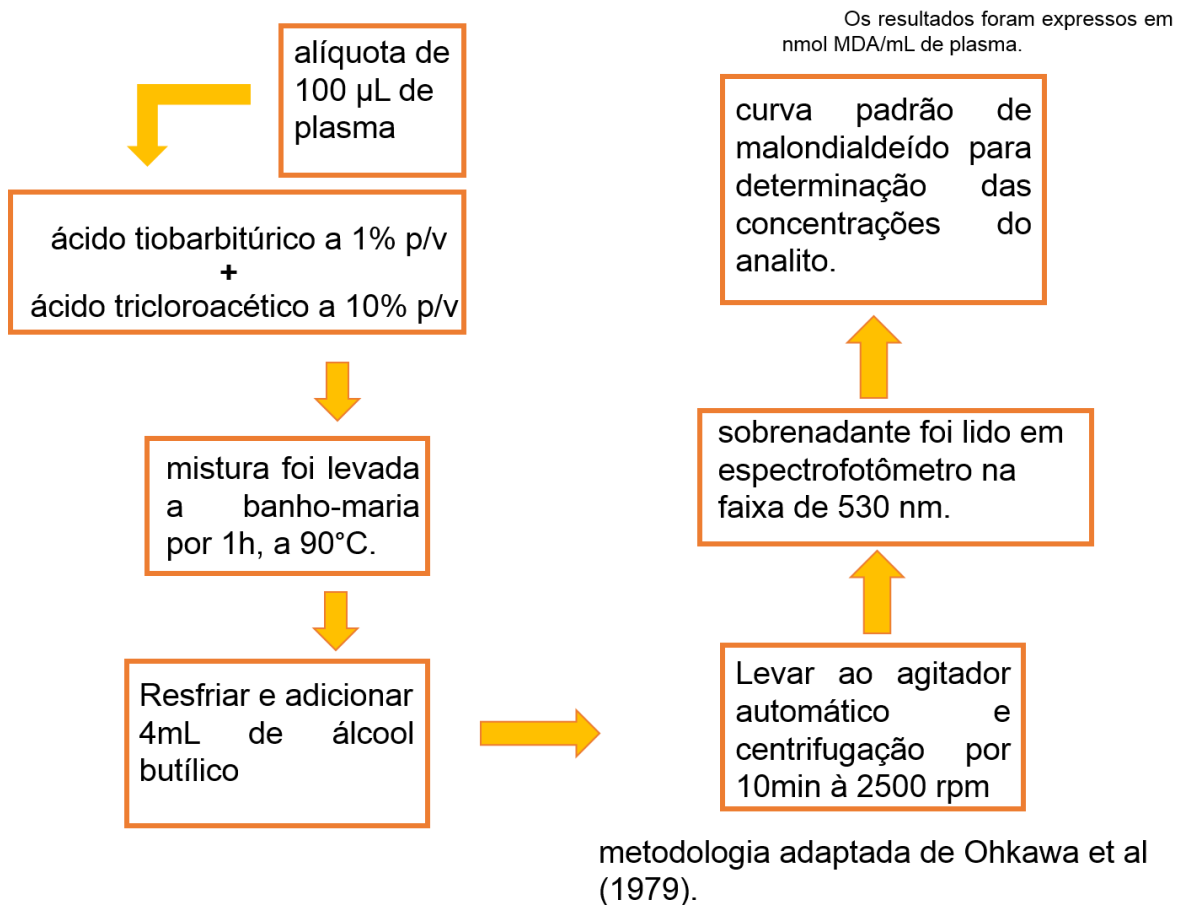


Figura 23 – Esquema da metodologia utilizada na determinação de MDA.

As substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico são normalmente formadas pela quebra dos ácidos graxos insaturados formando hidroperóxidos, os quais podem originar compostos contendo grupamentos carbonílicos, sendo o principal composto gerado, o malonaldeído (TARLADGIS; WATTS; YOUNATHAN, 1960), que reage com o ácido 2-tiobarbitúrico, permitindo a quantificação da reação de oxidação lipídica. Segue abaixo na figura 24 a reação entre o ácido 2-tiobarbitúrico e o malonaldeído.

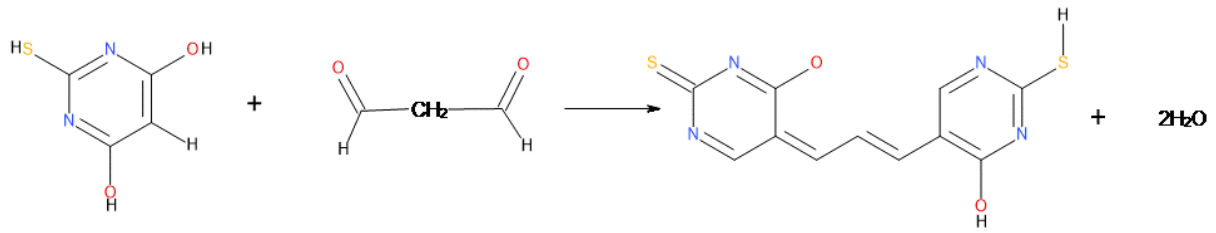


Figura 24 - Reação entre o ácido 2-tiobarbitúrico e o malonaldeído. Fonte: OSAWA; FELÍCIO e GONÇALES (2005).

4.7.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi feita usando GraphPad Prism, para análise pelo teste ANOVA uma via, seguida do teste de Tukey, os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão e considerados estatisticamente significativos para $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Obtenção dos extratos

O pó da entrecasca foi pesado 400g do material vegetal da planta e realizado o procedimento de extração, obtendo 25,04g de extrato etanólico que corresponde a 6,26% de rendimento, valores que são bons para produção de fitoterápicos e pesquisa.

5.1.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA

A análise fitoquímica foi realizada para determinar os metabólitos secundários que estão presentes no EEEOH, e obtivemos os seguintes resultados demonstrados na tabela 02:

Tabela 02 – Classes de metabólitos secundários encontrados no EEEOH.

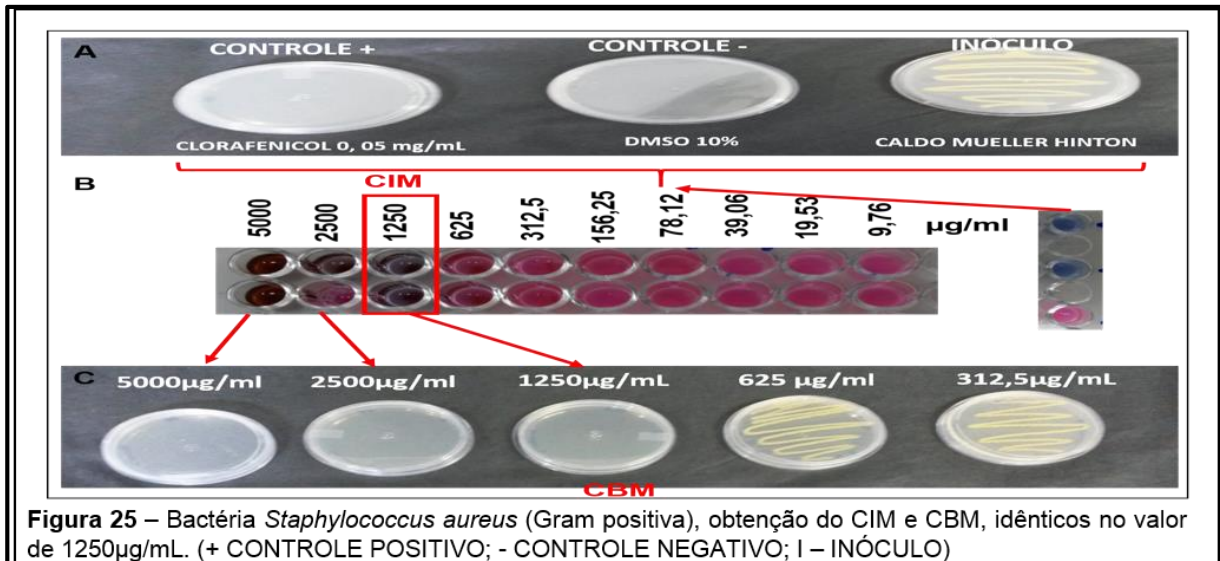
| CLASSES DE METABÓLITOS | EXTRATO ETANÓLICO |
|------------------------|-------------------|
| AÇÚCARES REDUTORES | + |
| FENÓIS E TANINOS | + |
| POLISSACARÍDEOS | NA |
| FLAVONÓIDES | + |
| ALCALÓIDES | + |
| CATEQUINAS | + |
| SAPONINAS | + |

ND – NÃO DETECTADO; + POSITIVO. Fonte: Autor.

5.2 Avaliação da atividade antibacteriana

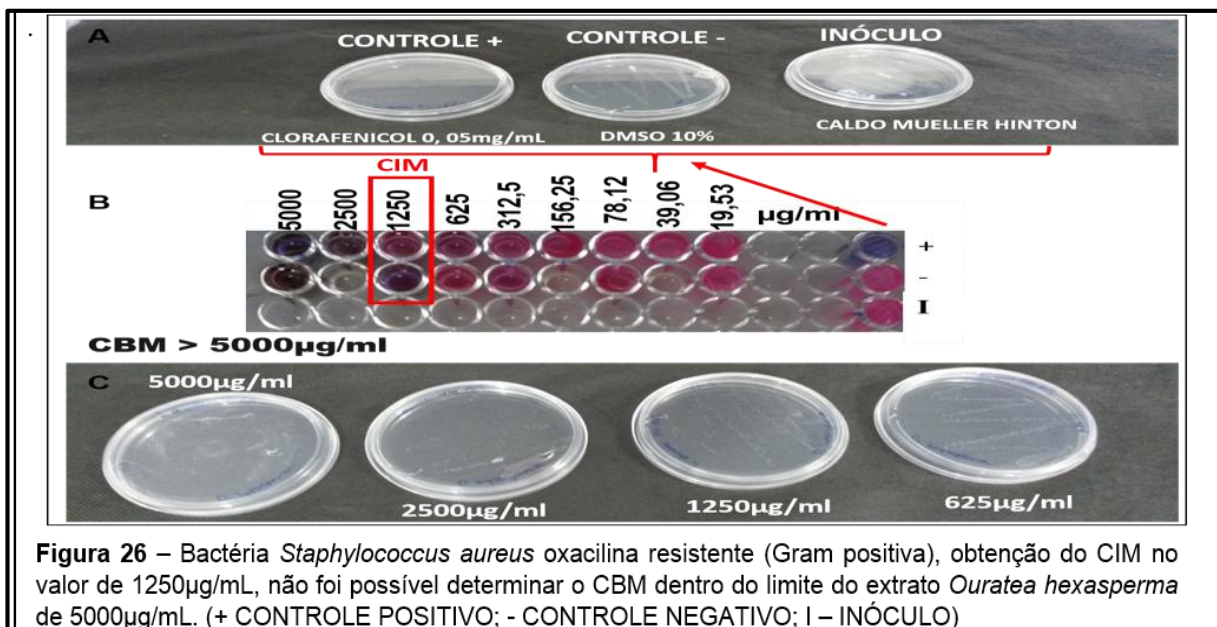
5.2.1. BACTÉRIA GRAM-POSITIVA: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Foi realizado o teste com a bactéria gram positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, foi observado o CIM e CBM do EEEOH na concentração de 1250µg/mL (Figura 25).



5.2.2 BACTÉRIA GRAM-POSITIVA: *Staphylococcus aureus* OXACILINA RESISTENTE

A bactéria apresentou CIM no valor de 2500µg/mL e não foi possível determinar o CBM, porque o extrato bruto não conseguiu eliminar e nem parar o crescimento dessa bactéria, todavia, o CBM possivelmente se encontram acima de 5000µg/mL, limite testado nesse experimento (Figura 26).



5.2.3 BACTÉRIA GRAM-POSITIVA: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

Foi realizado o teste com a bactéria gram positiva *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, o CIM foi observado na microplaca na concentração de 625µg/mL e CBM foi de 1250µg/mL do EEEOH (Figura 27).

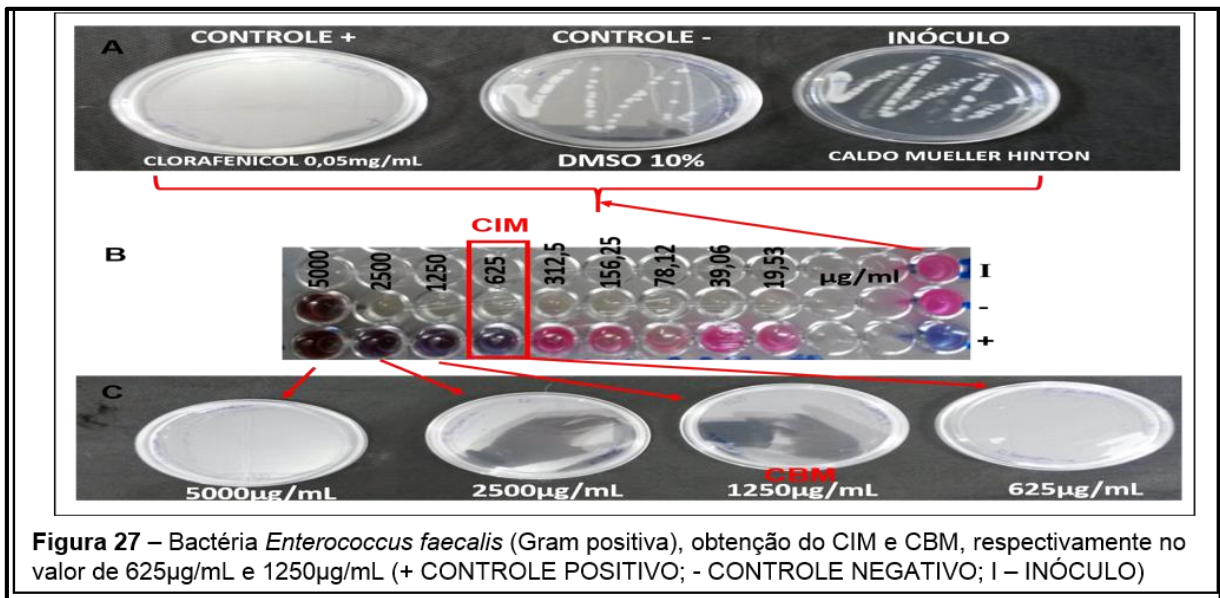


Figura 27 – Bactéria *Enterococcus faecalis* (Gram positiva), obtenção do CIM e CBM, respectivamente no valor de 625µg/mL e 1250µg/mL (+ CONTROLE POSITIVO; - CONTROLE NEGATIVO; I – INÓCULO)

5.2.4 BACTÉRIA GRAM-NEGATIVA: *Escherichia coli* ATCC 8789

Foi realizado o teste com a bactéria gram negativa *Escherichia coli* ATCC 8789, nesse tipo de bactérias com o EEEOH não inibiu o crescimento da *Escherichia coli* ATCC 8789, assim não foi possível observar o CIM e CBM tanto na microplaca, que mostrou células viáveis pelo método da rezasurina, e na determinação do CBM, as maiores concentrações (5000 a 2500µg/ml) houve crescimento bacteriano nas placas de petri (Figura 28).

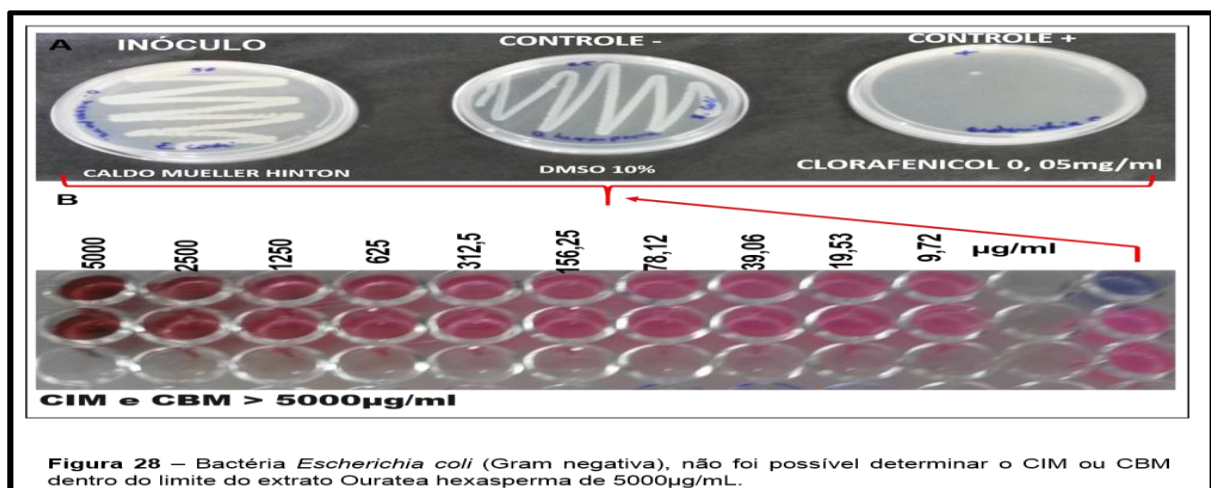
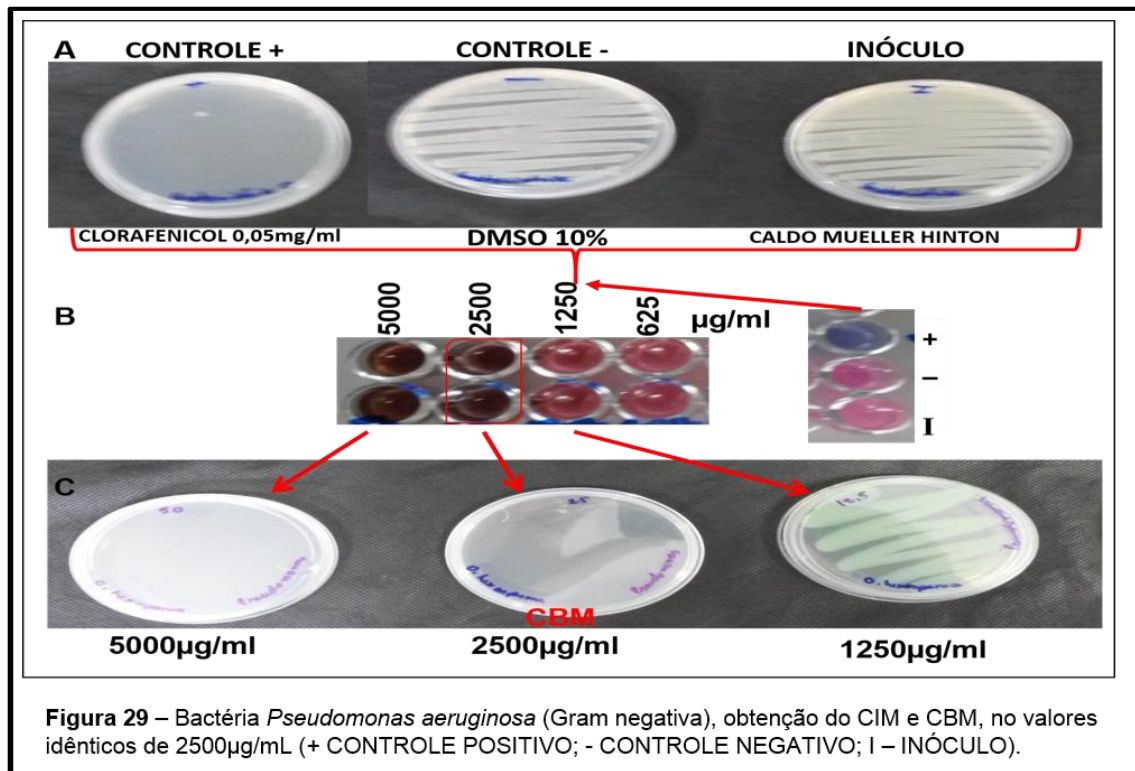


Figura 28 – Bactéria *Escherichia coli* (Gram negativa), não foi possível determinar o CIM ou CBM dentro do limite do extrato *Ouratea hexasperma* de 5000µg/mL.

5.2.5 BACTÉRIA GRAM NEGATIVA: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853

Foi realizado o teste com a bactéria gram negativa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853, observa-se que o CIM foi obtido na concentração de 2500µg/mL, similar ao valor encontrado para o CBM, como observado na figura 21.



Os resultados estão sumarizados na tabela 03, observando-se que o EEEOH apresentou atividade antimicrobiana satisfatória contra bactérias gram positivas, com valores de CIM de 625 e 1250µg/ml e, para *E. faecalis* e *S. aureus*, respectivamente. No entanto, não mostrou a mesma atividade frente ao isolado clínico de *S. aureus* oxacilina resistente, cuja CIM foi obtida em 2500µg/ml. Quanto às bactérias gram-negativas, o extrato não mostrou atividade contra *E. coli*, obtendo valor de CIM e CBM acima de 5000µg/ml, mas para a *P. aeruginosa*, o CIM e CBM foi obtido na concentração de 2500µg/ml.

Tabela 03 – Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima do EEEOH 5000 µg/mL.

| | | Bactérias | CIM (µg/mL) | CBM (µg/mL) |
|------------------|--|---------------------------------------|--------------------|--------------------|
| Gram positiva | | <i>S. aureus</i> ATCC 6538 | 1250 | 1250 |
| | | <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 | 625 | 1250 |
| | | <i>S. aureus</i> OXACILINA RESISTENTE | 2500 | > 5000 |
| Gram negativa | | <i>E. coli</i> ATCC 8739 | > 5000 | > 5000 |
| | | <i>P. aeruginosa</i> ATCC 25853 | 2500 | 2500 |

5.4 Citotoxicidade e Hemólise

Os dados de citotoxicidade e hemólise mostraram um efeito dose dependente do extrato etanólico da planta *Ouratea hexasperma* frente a estes tipos celulares, visto que quanto maior a concentração do extrato maior foi a sua atividade citotóxica (Figura 30a) e hemolítica (Figura 30b). No entanto, também é possível observar que extrato mesmo na maior concentração (500 mg/mL) apresentou baixa citotoxicidade, sendo capaz de lise celular de somente 10% leucócitos e 15% de hemácias. Além disso, por regressão linear se obteve a concentração citotóxica capaz de matar 50% das células (CC50%), cujo valor foi de 2231,5mg/mL, confirmando que o extrato bruto tem baixa citotoxicidade frente a leucócitos humanos, nas condições testadas.

Os resultados de citotoxicidade (inibição celular) para o extrato bruto foram ajustados pela seguinte equação: $Y=0,0002x + 0,0537$, com um $R^2=0,9326$. Portanto, obtivemos uma concentração de $C_{50}=2231,5\text{mg}$ do extrato bruto uma diminuição de 50% na viabilidade celular.

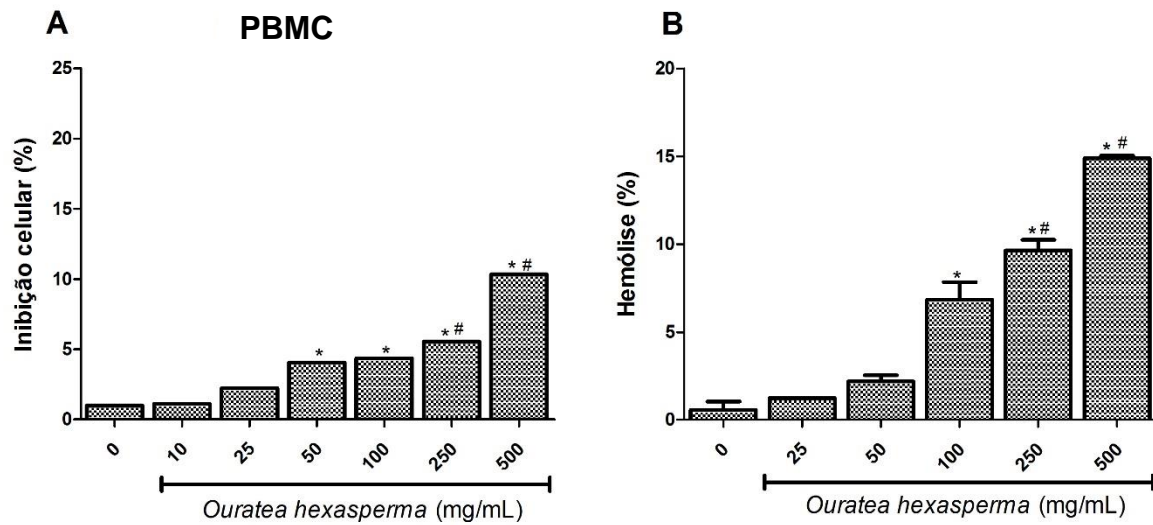


Figura 30 – Efeito citotóxico e hemolítico extrato etanólico da planta *Ouratea hexasperma*. A citotoxicidade de leucócitos humanos foi avaliada pelo método de redução do tetrazolium (MTT). Para isto, as células foram incubadas a 37°C por 24h e a viabilidade foi avaliada em absorbância de 550nm. No ensaio de hemólise, os eritrócitos foram incubados por 2 horas com diferentes concentrações dos extratos, e a leitura foi feita em absorbância de 640nm.

5.5 Atividade Antioxidante

No ensaio antioxidante utilizando o radical 2,2-azobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS^{•+}), os EEEOH apresentaram elevada atividade antioxidante equivalente ao Trolox, não havendo diferença na capacidade antioxidante (TEAC) entre as concentrações do extrato testadas (Figura 31).

Os resultados de capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) para o extrato bruto foram ajustados pela seguinte equação: $y = 0,3297x + 0,0014$, com um $R^2=0,9997$.

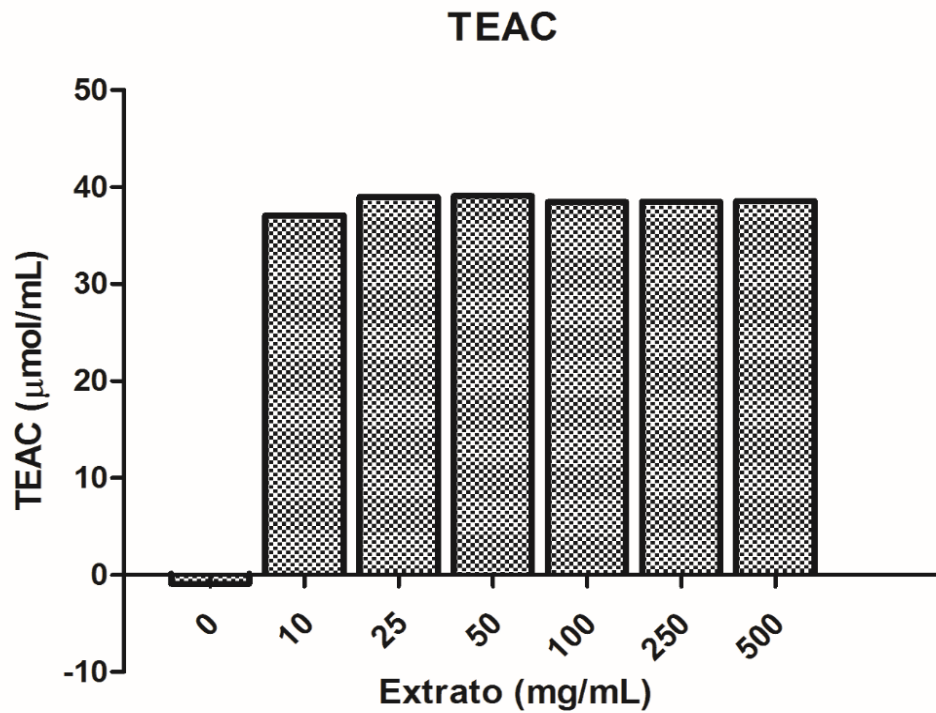


Figura 31 – Atividade antioxidante do extrato etanólico da planta *Ouratea hexasperma*. Análise da capacidade antioxidante total através do método espectrofotométrico de descoloração do radical ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfônico) - TEAC.

5.6 Quantificação Teores de Flavonoides totais

Para a determinação de teores de flavonóides totais foram utilizadas as concentrações de 0,62µg - 40µg/mL do EEEOH. A figura 32 mostra um efeito dose dependente para os teores de flavonoides totais (TFT), visto que quanto maior a concentração do extrato mais elevada foi a proporção de flavonoides no extrato. O resultado demonstrou que EEEOH apresentou valores de 1464µg/1g ± 264,46 equivalente a quercetina/g. Os teores de flavonoides totais para o extrato bruto foram ajustados seguido a equação: $Y=0,0214x+0,0293$, $R^2 = 0,9932$ equivalente a quercetina.

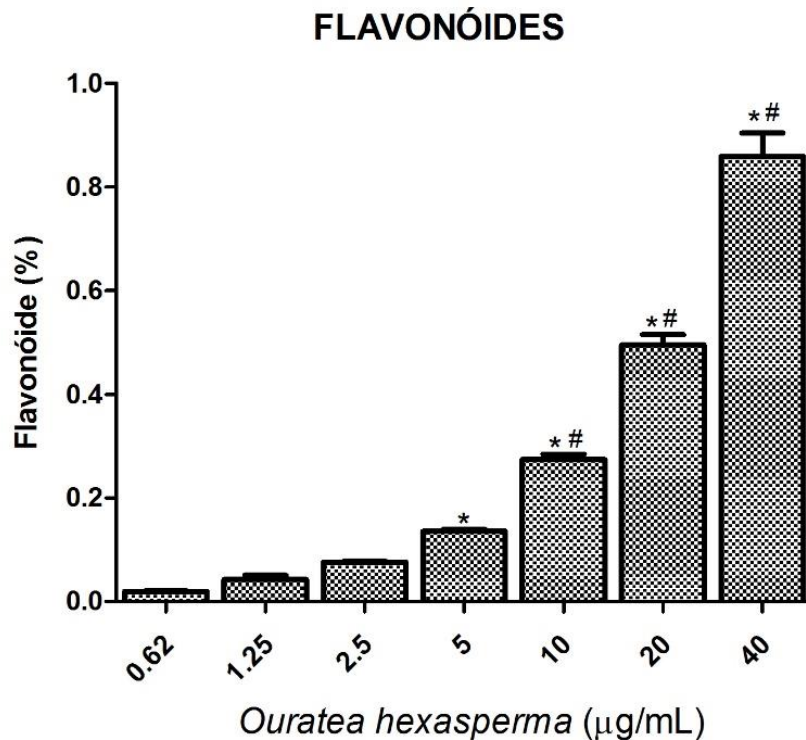


Figura 32 – Quantificação de Teores de flavonoides totais do extrato etanólico da planta *Ouratea hexasperma* pelo método colorimétrico de cloreto de alumínio.

5.7 Produção por NO induzido pelo EEEOH *in vitro*

Para avaliar a produção de NO induzida pelo EEEOH, PBMC foram incubados com diferentes concentrações do extrato (10, 25, 50, 100, 250 e 500mg/mL) e após 24 horas, o sobrenadante foi coletado para as dosagem deste mediador *in vitro*. De acordo com esses resultados, figura 33, verificou-se que o EEEOH somente foi capaz de induzir a produção de NO a partir da concentração de 250 e 500mg/mL. Para comprovação deste efeito também foi realizado este ensaio com o EEEOH diretamente, sem sua incubação com a cultura de célula. Neste ensaio também foi observado que as concentrações de 250 e 500mg/mL foram positivas para nitrato e nitrito, mostrando que este extrato interferiu na reação de Griss devido a sua coloração escura.

Os resultados do Oxido nítrico para o extrato bruto foram ajustados seguindo a equação: $Y = 0,0079x + 0,0116$, com um $R^2 = 0,987$.

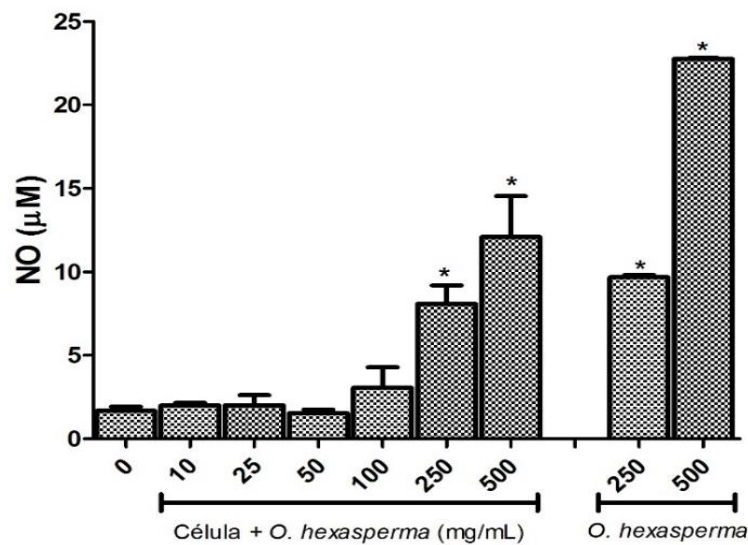


Figura 33 – Produção de NO induzido pelo extrato etanólico da planta *Ouratea hexasperma*. Os leucócitos foram incubados com diferentes concentrações do extrato, em seguida foram incubadas a 37°C, por 24h. O sobrenadante foi coletado para a dosagem de NO.

5.8 Produção por MDA induzido pelo EEEOH *in vitro*

Para avaliar a produção de MDA induzida pelo EEEOH, PBMC foram incubados com diferentes concentrações do extrato (10, 25, 50, 100, 250 e 500mg/mL) e após 24 horas, o sobrenadante foi coletado para as dosagens destes mediadores *in vitro*. De acordo com esse resultado, observado na figura 34, nenhuma concentração testada induziu aumento de MDA quando comparado ao controle negativo (RPMI), confirmando a baixa citotoxicidade do extrato *in vitro*.

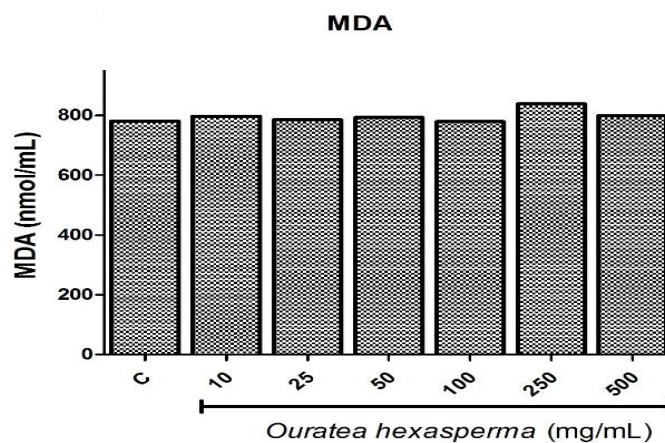


Figura 34 – Produção de MDA induzido pelo extrato etanólico da planta *Ouratea hexasperma*. Os leucócitos foram incubados com diferentes concentrações do extrato, em seguida foram incubadas a 37°C, por 24h. O sobrenadante foi coletado para a dosagem de MDA.

6 DISCUSSÃO

Na entrecasca da espécie *Ouratea hexasperma*, com sua coloração intensamente vermelha foram encontrados compostos polifenólicos, tais como os metabólitos secundários: taninos, flavonoides e saponinas, que foram comprovados pelos testes fitoquímicos. Dentre estes componentes, os constituintes químicos frequentemente encontrados no extrato dessa planta são os flavonoides e taninos. Corroborando, estudos de Fidélis (2011) também detectaram a presença de flavonoides e taninos em suas amostras, sugerindo que a presença dessas substâncias pode ser indicativa de possível ação farmacológica, como atividade antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória.

Os taninos por serem fenólicos são muito reativos quimicamente, formam pontes de hidrogênio, intra e intermoleculares. Um mol de taninos pode ligar-se a doze moles de proteínas (MELLO e SANTOS, 2001; CHUNG et al, 1998; BIANCO e SAVOLAINEN, 1997; VICKERY e VICKERY, 1981; COUTINHO, 2013). Estes compostos são facilmente oxidáveis, tanto através de enzimas vegetais específicas quanto por influência de metais, como cloreto férrico, o que ocasiona o escurecimento de suas soluções (MELLO e SANTOS, 2001; COUTINHO, 2013). Portanto, os taninos são compostos fenólicos e seus derivados também são considerados como antioxidantes primários ou sequestrantes de radicais livres (RAVELLI, 2011)

Substâncias ricas em taninos já eram conhecidas desde a antiguidade por suas reações com sais metálicos. Hoje, sabe-se que os polifenóis têm a propriedade de formar complexos com íons metálicos como ferro, vanádio, magnésio, alumínio e cálcio. Devido à importância destes íons nos processos biológicos, principalmente do ferro, suas associações com os polifenóis resultam numa menor disponibilidade de íons para o metabolismo microbiano (HASLAM, 1996).

Contudo, a escolha da parte para avaliação farmacológica tem papel fundamental na verificação das atividades esperadas, pois o conteúdo de taninos varia com parte aérea da planta, com também, a espécie vegetal, podendo ocorrer diferenças genéticas dentro de uma mesma espécie, possibilitando a seleção de variedade de acordo com o desejado (MAASS, 1996).

Essas inúmeras atividades farmacológicas dos taninos supostamente estão ligadas as características gerais da classe, independente se são hidrolisáveis ou

condensados; visto a capacidade de sequestrar radicais livres e atuar como antioxidante; complexar-se com íons metálicos (manganês, o ferro, o vanádio, o alumínio, o cobre, o cálcio, dentre outros) e também com macromoléculas (polissacarídeos e principalmente proteínas) (MONTEIRO; ALBUQUERQUE; ARAÚJO, 2005; SANTOS; MELLO, 2007).

Nesse sentido, nossos dados mostraram que EEEOH apresentou atividade antibacteriana frente aos micro-organismos pesquisados, principalmente bactérias gram-positivas. Vários estudos relatam que esta ação antimicrobiana pode ser devido à presença dos taninos. Com isso, Scalbert (1991) sugere três possíveis mecanismos de ação dos taninos sobre os micro-organismos: i) a primeira pressupõe que os taninos inibem enzimas bacterianas e fúngicas, e/ou se complexem aos substratos dessas enzimas; ii) a segunda inclui a ação dos taninos sobre as membranas celulares dos micro-organismos alterando o seu metabolismo; e iii) a terceira se fundamenta na complexação dos taninos aos íons metálicos, diminuindo a disponibilidade de íons essenciais para o metabolismo microbiano.

A formação dos complexos taninos com substratos de enzimas bacterianas pode ser devido a pontes de hidrogênio entre os grupos fenólicos dos taninos e determinados sítios das proteínas, levando uma estabilidade duradoura entre estas substâncias. Para a formação destas ligações é necessário que o peso molecular dos taninos esteja compreendido entre limites bem definidos; se este é demasiadamente elevado, a molécula não pode se intercalar entre os espaços interfibrilares das proteínas ou macromoléculas. Por outro lado, se peso molecular dos taninos é muito baixo, a molécula fenólica se intercala, mas não forma um número suficiente de ligações que assegure a estabilidade da combinação (BRUNETON, 1991). Outro mecanismo da ação de taninos na membrana celular de micro-organismos e organelas celulares é mediado pela modificação na integridade de membranas na presença de ácido tanínico (SCALBERT, 1991), sugerindo que tais mecanismos sejam responsáveis pelas suas propriedades bactericidas.

Porém vale ressaltar que os taninos podem formar complexos reversíveis ou irreversíveis, dependendo do estado de oxidação dos mesmos. As complexações reversíveis se formam a partir das ligações de hidrogênio que ocorrem entre a hidroxila presente nos taninos com a amida das proteínas, e também por meio de interações hidrofóbicas onde a porção aromática dos taninos interage com as cadeias laterais

alifáticas ou aromáticas dos aminoácidos, tal fato só ocorre com taninos não oxidados (SANTOS; MELLO, 2007).

Além disso, outros estudos confirmam com nossos dados, mostrando que os taninos apresentam melhor ação contra bactérias Gram positivas. Tal fato explicasse por estas bactérias possuírem uma estrutura de parede celular quimicamente menos complexa e com menor teor lipídico, quando comparado as Gram negativas, favorecendo assim a atuação dos taninos (KHAN et al., 2001; SRINAVASAN et al., 2001; CIMANGA et al., 2002; LOGUERCIO, 2005). Nesse sentido, compostos lipossolúveis tem maior capacidade de atravessar as membranas por processo de difusão passiva. Desta forma, como o EEEOH possui compostos que lhe confere baixa polaridade, já que o solvente utilizado para carregamento das moléculas foi o álcool etanol de densidade entre 0,803 a 0,808g/L (ANVISA, 2010), há grande possibilidade destas substâncias terem atuado na parede celular, possibilitando sua desorganização e provocando a lise bacteriana, principalmente das bactérias gram positivas. Como relatado anteriormente, vários estudos já relataram que a atividade antimicrobiana de taninos é através da inibição do sistema enzimático que leva ao rompimento da parede celular bacteriana, assim como pode inibir a formação da parede (SILVA *et al*, 2007). Apesar dos gram-negativos possuírem camada de peptidoglicano mais fina, porém mais complexas, nossos dados mostraram que o EEEOH foi pouco eficaz sobre as bactérias gram-negativas.

Por outro lado, como modo de sobrevivência, os micro-organismos usam de mecanismos de escape contra a ação antibacteriana dos compostos tanínicos, como no caso, das bactérias *E. coli* e *Staphylococcus aureus* OXACILINA RESISTENTE. Dentre os mecanismos de defesa que permitem o crescimento de alguns micro-organismos em ambientes ricos em taninos encontram-se: a secreção de polímeros capazes de se ligarem aos taninos, a produção de enzimas resistentes, a oxidação e a biodegradação de taninos (SCALBERT, 1991). Além disso, alguns micro-organismos podem secretar polímeros com alta afinidade por taninos, com estes podem se combinar e assim leva-los para fora das células. Desta maneira, os taninos se tornam indisponíveis para se combinarem com as enzimas essenciais para o desenvolvimento do micro-organismos. Outros micro-organismos também são capazes de se desenvolverem em cultura pura, onde as únicas fontes de carbono são

compostas de taninos, indicando assim a ocorrência de biodegradação (CARVALHO, 2002).

Em relação à concentração do EEEOH, não existe um consenso sobre o nível aceitável para extratos de materiais vegetais quando comparados com antibióticos padrões. Alguns autores consideram somente resultados similares aos de antibióticos conhecidos desde que se trabalhe com uma fração já determinada (ALIGIANIS *et al.*, 2001). No entanto, a atividade antimicrobiana do EEEOH foi interpretada e considerada ativa ou não, conforme os seguintes critérios que foram padronizados por MITCHER *et al.*, 1972; ALLIGIANAIS *et al.*; 2001; HOLETZ *et al.*; 2002; HOUGHTON *et al.*; 2007: concentrações entre 50-500µg/ml são consideradas excelentes/ótimas com atividade antibacteriana, valores de 600-1500µg/mL são avaliadas com atividade moderada, enquanto que > 1500µg/mL é dito como produto inativo. Nesse sentido, nossos dados de EEEOH contra bactérias gram positivas: *E. faecalis* (625µg/ml) e *S. aureus* (1250µg/ml) mostraram que o extrato apresentou uma atividade antimicrobiana moderada. No entanto, o EEEOH foi inativo frente as bactérias gram negativa *P. aeruginosa* e *E. coli*.

Outros metabólitos observados no extrato etanólico da planta *Ouratea hexasperma* são os flavonoides, que já foram relatadas por vários autores, por apresentarem atividades antioxidante, anti-inflamatórios, antimicrobiana, anticancerígeno e anti-alérgico. Atualmente, estudos demonstram que extratos etanólicos de plantas causam inibição tanto de bactérias quanto de fungos, também, sendo que esta atividade está relacionada a estes compostos fenólicos (SHAN *et al.*, 2007).

Nosso estudo foi direcionado, também, para um dos mais importantes causadores de dano celular, em sistemas aeróbicos vivos, as espécies oxidativas que são geradas endogenamente em processos tais como: a fosforilação oxidativa em mitocôndrias, oxidases hepáticas de função mista, a fagocitose microbiana, xantina oxidase atividade, catálise de metal de transição, drogas e metabolismo de xenobióticos (BUDNI *et al.*, 2007). Nesse sentido, Espécies reativas de Oxigênio (ROS) são geradas dentro da célula, com menos chance de atingir o espaço extracelular do que se fossem geradas por uma NAD(P)H-oxidase na membrana plasmática, que libera seus produtos no meio extracelular, como ocorre com os leucócitos (MAIA, M. S.; BICUDO, S.D, 2009). Um dos componentes celulares que

podem ocasionar a produção de ROS são os eicosanóides, além, dos leucócitos ativados aumentam o metabolismo oxidativo através da conversão do oxigênio molecular em intermediários reativos do oxigênio, processo chamado de “*burst*” (explosão) respiratório.

O estresse oxidativo e, portanto, de ROS desempenha um papel importante na modulação de várias funções fisiológicas, mas também é responsável por alterações que podem ser prejudiciais para as células (DROGE, 2002; SALVADOR, 2009). ROS tem a função de contribuir para os danos celulares, a apoptose e a morte celular, mas também envolvido na regulação da expressão de genes controlando a transdução do sinal através da participação direta na sinalização celular, e/ou modulação de estado redox da célula (FINKEL, 1998; DALTON et al, 1999).

A geração das espécies reativas de oxigênio ocorre através da ativação de uma enzima oxidase (NADPH oxidase) que reduz o oxigênio, formando o ânion superóxido (O_2^-). O ânion superóxido é convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), principalmente por dismutação espontânea. O H_2O_2 pode ainda formar o radical hidroxila (OH), altamente reativo (BABIOR, 1984; BAUMANN e GAUDIE, 1994; FUJIWARA e KOBAYASHI, 2005; RUTKOWSKI *et al.*, 2007; MANEA, 2010).

A atuação dos antioxidantes, exposto por Ramalho e Jorge (2006), ocorre quando o átomo de hidrogênio ativo do antioxidante é abstraído pelos radicais livres e radicais peróxidos, sendo que este ato ocorre mais facilmente do que com os hidrogênios alílicos das moléculas insaturadas, e deste ato são formadas espécies inativas para reagir em cadeia e também um radical inerte (A^\bullet) procedente do antioxidante, levando a estabilidade da reação. O radical inerte é estabilizado por ressonância, logo não tem a capacidade de iniciar ou propagar as reações oxidativas (RAMALHO; JORGE, 2006).

O nosso estudo verificou uma excelente atividade antioxidante do EEEOH, sendo que um dos metabolitos secundários associados a este efeito são os flavonoides, conforme descrito essa ação a esses compostos na literatura. Além disso, resultados benéficos à saúde humana e vários estudos epidemiológicos evidenciam que o consumo elevado de flavonóides ajuda a proteger contra doenças crônicas, como as cardiovasculares (COSTA e CARVALHO, 2003).

Diante dos resultados encontrados, observa-se que o EEEOH apresentou elevado teor de flavonoides observados nos testes teores totais de flavonóides, que são compostos que permitem a ação de sequestro de radicais livres. No entanto, até

o momento, não há relatos na literatura científica a respeito de valores expressos de flavonoides nessa espécie estudada e como também, de seu gênero.

Entre os flavonoides, seu principal constituinte são os biflavonoides que podem ser responsáveis por algumas de suas atividades biológicas tanto *in vivo* e *in vitro*, incluindo a capacidade antioxidante. Dentre os taninos, o ácido gálico que possui uma potente capacidade de inibir a formação de nitrito, devido sua potente atividade antioxidante (KARAKAYA et al., 2004). Ao analisar a estrutura do ácido gálico, o mesmo possui anel de benzeno em sua estrutura, e quando esse anel de benzeno perde um elétron na tentativa de estabilizar a molécula, ocorre o mecanismo de ressonância que impede de não se tornarem um radical livre e assim potencializar a oxidação lipídica, tais mecanismos ocorrem como outros flavonoides já que possuem estruturas semelhantes.

Vários são os mecanismos propostos para ação antioxidante dos flavonóides a considerar as diferentes formas estruturais que existem e que pode ser determinada por alguns fatores como: reatividade como agente doador de hidrogênio e elétrons, estabilidade do radical flavonoil formado, reatividade frente a outros antioxidantes, capacidade de quelar metais de transição e a ainda sua solubilidade e interação com as membranas (BARREIROS et al., 2006).

As plantas possuem constituintes químicos causadores de efeitos benéficos em nosso organismo como citados anteriormente, e que alguns constituintes químicos da planta *Ouratea hexasperma*, podem combater enfermidades, porém, falta elucidar quais danos graves em altas concentrações esses mesmos constituintes químicos podem gerar em diversos órgãos, tecidos e sistemas (MONTANARI; BOLZANI, 2001; SILVA et al. 2006; VARANDA, 2006; NETO; LOPES, 2007).

Apesar da sua ampla utilização nas comunidades tradicionais, alguns estudos avaliam os efeitos terapêuticos e tóxicos da planta *Ouratea hexasperma*. No entanto, até o momento, não foram publicadas informações na literatura quanto à sua citotoxicidade em PBMC e eritrócitos humanos e sobre sua atividade antioxidante para assegurar o seu uso popular, e quem sabe, uma futura utilização clínica.

Nos dois testes, citotoxicidade avaliado em leucócitos, e hemólise analisadas em eritrócitos, foram observadas diferenças entre os efeitos do extrato em relação a sobrevivência das diferentes células, que pode ser devido ao fato de que células anucleadas (eritrócitos) não ocorre biossíntese de proteínas, enquanto nos leucócitos há biossíntese de proteínas. A avaliação da atividade hemolítica pode ser considerada

um indicador de toxicidade geral e bioatividade, sendo importante na investigação da ação de extratos de plantas sobre o sangue humano. Os testes *in vitro* para determinar a ação hemolítica têm sido utilizados como um dos métodos de triagem para os diferentes agentes tóxicos (KUBLIK et al., 1996), incluindo a avaliação de plantas (GANDHI; CHERIAN, 2000). Além disso, as diferenças no metabolismo entre essas células e as suas possíveis interações com inúmeros componentes naturais também podem influenciar com a atividade e a expressão de enzimas antioxidantes (DREW, 2012).

Por isso, os dados das atividades citotóxica do EEEOH mostrou CC_{50} de 2234mg, mostrando baixa citotoxicidade *in vitro* e a apresentou atividade hemolítica em altas concentrações do extrato. No entanto, como demonstrado em nossos dados, as células procariontes (bacterianas) foram eliminadas em baixas concentrações (10 - 0,625mg/mL) e os efeitos tóxicos nas células eucariótica (leucócitos) foram detectados em elevadas concentrações (250 a 500mg/mL). Existe, porém, um tênue limite de concentração tissular entre a não toxicidade às células do hospedeiro e a toxicidade necessária para a ação contra agentes invasores (FLORA FILHO & ZILBERSTEIN, 2000).

Não foi observado atividade hemolítica em baixas concentrações do extrato, uma das hipóteses é que as células vermelhas interagem com os flavonóides ou outros constituintes químicos com a membrana eritrocitária e podem inibem a peroxidação lipídica, e ao mesmo tempo aumenta a sua integridade contra lise hipotônica (CHAUDHURI et al., 2007). Por outro lado, os dados mostraram atividade hemolítica nas concentrações 250 e 500mg/mL que pode ter ocorrido por distúrbio de membrana, provocado pelas moléculas presentes no extrato. Um dos possíveis mecanismos é em decorrência de interações com lipídios, proteínas e/ou carboidratos da superfície celular, ou então, um possível distúrbio eletrostático promovido pelo potencial redox destas moléculas (PASQUINI-NETTO, H. et al, 2012).

Perfil semelhante já havia sido observado por Velloso et al. (2011) para os flavonoides (kaempferol, quercetina e isoquercetrina), isolados de *P. nitens*. Estes três flavonóides apresentaram elevada ação antioxidante. Entretanto, apresentaram elevado potencial hemolítico ou oxidante na ausência de radical. Na presença de Ácido hipocloroso (HOCl), estes flavonóides haviam inibido a hemólise em baixas concentrações, mas, em elevadas concentrações, observou-se aumento da liberação de hemoglobina.

Diversos estudos também demonstram que outra estrutura encontrada na planta *Ouratea hexasperma* pode ocasionar a atividade hemolítica, é o metabólito secundário denominado de saponina, que faz parte do sistema de proteção do vegetal contra ataques de predadores (insetos, vírus, fungos e bactérias) (BRUNETON, 1999). Nossos dados fitoquímicos comprovaram a presença de compostos saponínicos do extrato etanólico da entrecasca da planta. Normalmente, as saponinas se dissolvem em água dando origem a soluções afrógenas (espumantes), devido à sua ação tensoativa e também são capazes de emulsionar óleos e produzir hemólise (HASSAN et al., 2010).

Embora o mecanismo exato da ruptura das membranas das hemácias (hemólise) por saponinas ainda não seja claramente elucidado, sabe-se que ele está correlacionado com suas propriedades anfifílicas. A principal hipótese considera que as saponinas interagem com membranas lipídicas de células e formam complexos insolúveis com o colesterol levando à formação de poros, permeabilização das células e da subsequente perda de hemoglobina no meio extracelular (GAUTHIER et al., 2009). Diniz (2006) afirma que essa propriedade é resultado da interação das suas moléculas com colesteróis presentes na membrana de eritrócitos resultando na mudança conformacional da membrana levando a uma penetração de íons e água para dentro da célula com consequente rompimento celular e liberação de hemoglobina (GLAUBERT et al., 1962; HARUNA et al., 1995). Este mecanismo também está ligado as atividades antibacteriana, antifúngica e espermicida apresentada por uma variedade de plantas (LACAILLE-DUBOIS & WAGNER, 1996).

Quanto à produção de óxido nítrico (NO) e Malondialdeído (MDA) induzido pelo EEEOH, nossos dados mostraram que o extrato é forte indutor de NO in vitro, devido a reação entre o extrato bruto etanólico com o reagente de griess, que induziu a produção de alteração na leitura da microplaca, mas não de MDA nas concentrações testadas.

O óxido nítrico tem sido descrito como um potente agente citotóxico e citostático na resposta imune celular, capaz de limitar o crescimento de vários micro-organismos intracelulares (ARTURO et al., 2010, GONTIJO, 2013). O controle apropriado da homeostase do NO faz com que este mediador seja útil em eventos fisiológicos ou, por outro lado, seja citotóxico, devido a uma geração excessiva (ACHIKE & KWAN, 2003; CARDOSO, 2006). Não existem, na literatura, até o momento, resultados que evidenciem valores exatos para referenciais normais para NO. Dessa forma, são

empregados parâmetros comparativos entre os valores detectados na amostra. NO ou os produtos de sua reação com oxigênio molecular e radicais superóxido podem modificar diferentes macromoléculas como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos para produzir tanto efeitos fisiológicos como patofisiológicos. O NO também pode reagir diretamente com metais de transição (CERQUEIRA & YOSHIDA, 2002).

A quantidade de NO produzida pode determinar se ele é protetório ou tóxico. Embora pequenas quantidades sejam necessárias para a homeostasia, grandes quantidades, como aquelas produzidas na ativação da iNOS são citotóxicas. No entanto, a produção de grandes quantidades de NO pode ser importante na defesa contra invasores celulares, tumores celulares e ainda em lesões vasculares com perda endotelial (CERQUEIRA & YOSHIDA, 2002).

Assim, substâncias que sequestram o radical óxido nítrico podem desempenhar um importante papel citoprotetor, agindo nos processos de toxicidade induzida por espécies reativas de nitrogênio (RNS), modulando os processos inflamatórios, diminuindo o estado de estresses oxidativo e podendo apresentar-se como alternativa terapêutica para algumas dessas desordens (SAHA et al., 2006).

Dessa forma, compostos que sejam capazes de sequestrar o NO podem ser alternativas para a prevenção e terapia dessas desordens. A ação possivelmente, observada do extrato etanólico nas concentrações, frente à inibição da formação de nitrito pode ser interpretada como um indicativo de uma possível capacidade anti-inflamatória, uma vez que compostos que sequestram o NO, podem agir modulando o processo inflamatório, diminuindo seus efeitos danosos ao organismo e auxiliando na manutenção da homeostase (MAIA, et al, 2009)

Apesar de todos esses diferentes mecanismos de ação mencionados, o NO exerce todas as suas ações, principalmente através da ativação da enzima Guanilato ciclase (GCs). Esta produz o segundo mensageiro 3'5' guanosina monofosfato cíclico (GMPc) que iniciará assim as cascatas bioquímicas de sinalização nas diversas células-alvo. Estas últimas estão localizadas em diversos sistemas no organismo humano (WANIR, et al, 2007).

Os radicais livres formados induzem à peroxidação lipídica e à subsequente produção de quantidades aumentadas de MDA, ocorrendo aumento da rigidez, diminuição de deformabilidade e alteração da permeabilidade da membrana eritrocitária (CHAN; CHOW; CHIU, 1999). EEEOH não mostrou níveis significativos

de MDA, de acordo com os dados observamos nenhuma diferença em relação ao controle negativo.

Dentre as classes de moléculas que podem ser lesadas pelas espécies reativas de oxigênio, os lipídeos são dos mais susceptíveis a oxidação. A destruição dos lipídeos de membrana e os produtos finais da peroxidação lipídica, como malondaldeído (MDA) e outros aldeídos são especialmente danosos reduzindo a viabilidade das células. A peroxidação lipídica caracteriza-se por uma reação em cadeia. A oxidação inicial de poucas moléculas de lipídeos pode resultar em um significativo dano tissular (TUKAMOTO, 2008).

Não se observou diferença estatística entre os parâmetros de MDA, entre as diferentes concentrações da *Ouratea hexasperma*, a peroxidação lipídica pode ser inibida por antioxidantes que interrompem a cadeia de peroxidação reagindo com os radicais peroxila ou alcoxila e, desta forma, gerando um hidroperóxido e um radical livre formado a partir do antioxidante. Entre estes antioxidantes, por exemplo, o α -tocoferol, que interage com o oxigênio singlete e fornece átomos de hidrogênio para o radical peroxila dos ácidos graxos, impedindo desta forma a reação em cadeia que se propaga nas membranas lipídicas (TIIDUS et al., 1993).

As principais consequências da lipoperoxidação da membrana são: alteração da bomba de Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺ e ATPase, permeabilidade, transporte de substâncias orgânicas e inorgânicas, danos ao DNA e morte celular (NAOUM; NAOUM, 2004).

Devido à presença de metabólitos que apresentaram atividade antimicrobiana, antioxidante é recomendável à continuação do estudo fitoquímico e microbiológico. É importante também isolar e identificar as substâncias responsáveis pela atividade e determinar as frações ativas. Para se obter um resultado mais conclusivo da toxicidade do EEEOH, bem como para comparar com os resultados obtidos in vitro, faz-se necessário um estudo da toxicidade aguda, sub-crônica e crônica in vivo.

7 CONCLUSÃO

- Na análise fitoquímica foi possível identificar taninos, flavonoides e saponinas no EEEOH.

- O extrato EEEOH apresentou melhor atividade antibacteriana contra bactéria gram positiva (*Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*). No entanto, o extrato não mostrou atividade antimicrobiana frente a *E. coli*, mas foi efetivo para *P. aeruginosa*.

- O EEEOH apresentou importante atividade antioxidante e elevada quantidade de teores de flavonoides totais, mostrando uma relação dose dependente. No entanto, o EEEOH apresentou baixa citotoxicidade frente a leucócitos humanos, com CC50% de 2231,5mg/mL e apresentou atividade hemolítica em altas concentrações.

- O EEEOH não foi capaz de induzir a produção de NO por leucócitos, como também, não levou a peroxidação lipídica, com produção e MDA *in vitro*.

Com base nos nossos dados, é possível concluir que os EEEOH têm importante ação antibacteriana e antioxidante. No entanto, mais estudos são necessários para o isolamento e identificação de seus compostos para comprovação destas atividades *in vitro* e *in vivo*, já que na literatura não há publicações a respeito destas atividades biológicas da planta *Ouratea hexasperma*. Desta forma, futuramente, objetivamos para continuação de nossos projetos, avaliar a atividade anti-inflamatória, anticonceptiva e toxicidade *in vivo* do extrato e das frações da planta *Ouratea hexasperma*, e de seus possíveis mecanismos de ação.

9 REFERÊNCIAS

- ABREU, R. M. et al. Estudo taxonômico de *Ouratea* Aubl (Ochnaceae) ocorrente na restinga da Vila José Bonifácio, Bragança – PA. Enciclopédia Conhecer, Centro científico conhecer – Goiânia, v. 10, n. 19; p. 2259, 2014.
- AGRA, M.F.; FREITAS, P.F. & BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants know medicinal and poisonous in northeast of Brazil. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.17, p.114-140, 2007.
- ALIGINIAS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. J Agric Food Chem. 2001; 49: 4168-70.
- ALONSO-CASTRO, A. J. et al. Toxicity and antinociceptive effects of *Hamelia patens*. Revista Brasileira de Farmacognosia, 2015. Acessado em: 10 Jan 2015.
- ANDRADE, Heloísa Monteiro de, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2011. Nitric oxide and tolerance to arsenic in water hyacinth. Adviser: Juraci Alves de Oliveira. Co-adviser: José Lino Neto.
- ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Farmacopeia Brasileira, volume 1. 5ª Ed. Brasilia,2010b.
- ARAÚJO, M. F. et al. Antifungal Activity of Extracts from two *Ouratea* species on *Candida albicans*. Journal of Applied Pharmaceutical Science, v. 03, p. 152, 2013.
- AYOOLA G.A, et al. Phytochemical screening and antioxidant activities of some selected medicinal plants used for malaria therapy in Southwestern Nigeria. Trop J Pharm Res 2008; 7: 1019-1024.
- BARBOSA, E. F. M. A teoria dos refúgios florestais e as evidências vegetacionais e litológicas da região sudoeste do município de Corumbá/MS. 2011. 123 f. Tese - (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Geociências e Ciências Exatas, 2011.
- BARBOSA, W. L. R.; QUIGNARD, E.; TAVARES, I. C. C.; PINTO, L. N.; OLIVEIRA, F. Q.; OLIVEIRA, R. M. Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais. Revista Científica da UFPA. Vol. 4. 2002. < > Acesso em 08/05/2014.
- BASMA, A.A., et al. Antioxidant activity and phytochemical screening of the methanol extracts of *Euphorbia hirta* L. Asian Pac J Trop Med. 2011;4:386–90.
- BATISTA, A. L. avaliação da atividade antimicrobiana e antiradicalar dos extratos e substâncias dos frutos de *buchenavia tomentosa* –eichler (combretaceae) e *Ouratea spectabilis* aubl. (ochnaceae). Campo Grande: Universidade Federal Mato Grosso do Sul, Curso de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, 2011. 176 p.
- BATTESTIN, V.; MATSUDA, L.K.; MACEDO, G.A. Fontes e Aplicações de Taninos e Tanases em Alimentos. Alim. Nutr., Araraquara, v. 15, n. 1, p. 63-72, 2004.

BIOTA/FAPESP. SinBiota (Sao Paulo State's Biodiversity Information System). Disponível em: <http://www.biota.org.br/sia> (acessado em: Janeiro 2015).

BRUNETON, J.; *Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia*, Ed. Acribia, SA: Espanha, 1991.

BUDNI, P. et al. Estudos preliminares da atividade antioxidante do extrato hidroetanólico de folhas jovens e adultas de *Tabebuia heptaphylla* (Vell.) Toledo (ipê-roxo). *Latin American Journal of Pharmacy* (formerly *Acta Farmacéutica Bonaerense*) *Lat. Am. J. Pharm.* 26 (3): 394-8 (2007).

CARBONARI, K. A. Avaliação do potencial antioxidante (in vitro e in vivo) e antiinflamatório de *Ouratea parviflora*, *polymnia sonchifolia* e *marlierea obscura*. [dissertação mestrado] UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA Florianópolis – S.C. 2005

CARBONARI. Avaliação do efeito citoprotetor do extrato bruto e frações de plantas contra danos oxidativos. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus Santo Ângelo/RS Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus Santo Ângelo/RS 26 a 29 de abril de 2006.

CARBONEZI, Carlos Alberto et al . Bioactive flavone dimers from *Ouratea multiflora* (Ochnaceae). *Rev. bras. farmacogn.*, João Pessoa , v. 17, n. 3, p. 319-324, set. 2007. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2007000300003&lng=pt&nrm=iso>. Acessos em 10 set. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2007000300003>.

CARDOSO, C. R. P. Atividade mutagênica e ativadora da resposta imune celular induzidas por *Byrsonima crassa* Niedenzu e *Byrsonima intermédia* A. Juss (Malpighiaceae). Dissertação (Mestrado), Araraquara: Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas, 2006.

CARVALHO, A. R., et al. “Extratos de plantas medicinais como estratégia para o controle de doenças fúngicas do inhame (*Dioscorea* sp.) no Nordeste, in II Simpósio Nacional sobre as Culturas do Inhame e do Taro—Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba, EMEPA, João Pessoa, Brazil, 2002.

CASAGRANDE, M. Avaliação do potencial antioxidante de coprodutos de indústrias de sucos de uva e de vinho visando sua aplicação em linguiça de frango. 2013. 121 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2014.

CASTRO, O. B. Estudo da expressão gênica de mediadores envolvidos na inibição da proliferação de mononucleares do sangue periférico humanos induzida pela lectina B_jcul isolada do veneno de *Bothrops jararacussu*. / Onássis Boeri de Castro. Porto Velho, Rondônia, 2013. 75f.

CERQUEIRA, Nereide Freire; YOSHIDA, Winston Bonetti. Óxido nítrico: revisão. Acta Cir. Bras., São Paulo, v. 17, n. 6, p. 417-423, 2002. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502002000600011&lng=en&nrm=iso>. access

on 13 Sept. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502002000600011>.

CHACON, R. G.; YAMAMOTO, K. e CAVALCANTI, T. B. *Ouratea lancifolia* (Ochnaceae), uma nova espécie do Cerrado, Brasil. Rev. bras. Bot.[online]. 2011, vol.34, n.4, pp. 603-605. ISSN 0100-8404. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-84042011000400013>.

CHAO, P.D.L.; HSIU S.L.; HOU Y.C. Flavonoids in herbs: Biological fates and potential interactions with xenobiotics. J Food Drug Anal 2002; 10(4): 219-228.

CIMANGA, K. et al. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. Journal of Ethnopharmacology, Limerick, v.79, n.2, p.213-220, 2002.

CLSI, *Clinical and Laboratory Standards Institute*; Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standart – Eighth Edition. CLSI document M07-A8, 2009.

CRUZ, A.C.F.; ROSSIELO, R.O.P.; MORENZ, J.J.F. et al. Métodos comparativos na extração de pigmentos foliares de três híbridos de *Bixa orellana* L. Revista Brasileira de Biociências, v.5, Supl .2, p.777-779, 2007.

DANIEL, J.F.S. et. al. Others flavonoids from *Ouratea hexasperma* (Ochnaceae). Journal of the Brazilian Chemical Society, v.16, p.634-638, 2004.

DARABPOUR, E et al. Antimicrobial properties of *Teucrium polium* against some clinical pathogens. Asian PacJ Trop Med 2010; 3(2): 124-127. DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide dependent mechanism. *Cancer Res.*,60: 184-90, 2000.34. Jaiswal, M. et al. Human Ogg1, a protein involved in the repair of 8-oxoguanine, is inhibited by nitric oxide. *Cancer Res.*,61: 6388-93, 2001.

ELIAS, D. B. D. Avaliação dos níveis séricos de malonaldeído (MDA), óxido nítrico (NO) e lactato desidrogenase láctica (LDH) na anemia falciforme e suas correlações com o uso de hidroxiuréia, Fortaleza: 2009, 79f.: il.

ESTEVAM, C.S., et al. Constituintes químicos e avaliação preliminar in-vivo da atividade antimalárica de *Ouratea nítida* Aubl (Ochnaceae). Rev. Bras. Farmacogn. 15, 2006,195-198.

FERNANDES, R. D. Estudo Químico e Atividades Biológicas de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl. (Ochnaceae). Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-graduação em Química, Instituto de Ciência Exatas, 2008, 101 p.

FERREIRA, Leonardo Cesar; CATANEO, Ana Catarina. Nitric oxide in plants: a brief discussion on this multifunctional molecule. *Sci. agric. (Piracicaba, Braz.)*, Piracicaba, v. 67, n. 2, p. 236-243, Apr. 2010. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90162010000200017&lng=en&nrm=iso>. access on 13 Sept. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162010000200017>.

FIDELIS, Q. C. et al. Análise do teor de fenóis totais e taninos em extratos de *Ouratea ferruginea* Engl. e *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl. In: 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis. Livro de Programas, 2011.
FIDELIS, Q. C. et al. Flavonoids and Other Compounds from *Ouratea ferruginea* (Ochnaceae) as Anticancer and Chemopreventive Agents *Molecules* 2012, 17, 7989-8000; doi:10.3390/molecules17077989.

FIDELIS, Q.C. et al. *Ouratea* genus: chemical and pharmacological aspects. *Rev. bras. farmacogn. Curitiba*, v. 24, n. 1, p. 1-19, Feb. 2014. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102695X2014000100001&lng=en&nrm=iso>. access on 19 Apr. 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/0102-695X20142413361>.

FINGER, Z. Fitossociologia de comunidades arbóreas em savanas no Brasil. Tese (doutorado), Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Pós-Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2008, 260 f.

FORZZA, R. C. et al (Org.). Catálogo de plantas e fungos do Brasil. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson. Estúdio: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. Volume 1, 2v.: il. ISBN 978-85-88742-42-0

GANDHI, V.M.; CHERIAN, K.M. Red cell haemolysis test as an in vitro approach for the assessment of toxicity of karanja oil. *Toxicology In Vitro*, v. 14, p. 513-516, 2000.

GERARD, C.; ROLLINS, B. J. Chemokines and disease. *Nat Immunol* 2001; 2:108-15.

GONTIJO, Raquel Carvalho. Avaliação do perfil imunológico e de resistência/susceptibilidade ao óxido nítrico em portadores de leishmaniose cutânea na Terra Indígena Xakriabá, Minas Gerais, Brasil. 2013.

GONZÁLEZ-TRUJANO, M. E. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of a pomegranate (*Punica granatum* L.) extract rich in ellagitannins. *International journal of food sciences and nutrition*, n. 0, p. 1-5, 2015.

GOOGLE MAPS. Retirado de: <https://www.google.com.br/maps/place/0%C2%B008'20.7%22N+51%C2%B008'31.5%22W/@0.1390833,-51.1420833,11z/data=!4m2!3m1!1s0x0:0x0?hl=pt-BR>. Acesso em: julho de 2014.

GRYNBERG, N.F. et al. DNA topoisomerase inhibitors: biflavonoids from *Ouratea* species. *Braz J Med Biol Res*, Ribeirão Preto, v.35, n.7, p.819-822, July 2002. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2002000700009&lng=en&nrm=iso>. access on 11 Sept. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2002000700009>.

HANAFY, K.A. et al. NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. *Med Sci Monit*, v. 7, n. 4, 801-19, 2001.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of Natural Products*, v. 59, p. 205-215, 1996.

HORMÔNIO E DEFESA VEGETAL. UNIDADE X: Metabólitos secundários e defesa vegetal. Acessado em: 24 maio 2014. Disponível em: [http:// pt.Slideshare.net/lucilenedeabreu/hormônio-e-defesa-vegetal](http://pt.Slideshare.net/lucilenedeabreu/hormônio-e-defesa-vegetal).

HOSSAIN, M. A.; Rahman, Mizanur, S.M. Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of tropical fruit pineapple. *V* 44, p 672–676. 2011.

HOUGHTON, P. J.; HOWES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. *Journal of Ethnopharmacology*, v.110, p.391-400, 2007.

JUNIOR, A. M. Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. *Medicina Geriatria e Gerontologia*. 06 Jul 2005. Disponível: <http://www.medicinageriatrica.com.br/2008/07/06/bacterias-gram-positivas-e-gram-negativas/>. Acessado em: 25 Agosto 2014.

JUNIOR, E. P. A. Atividade antimicrobiana do ácido gálico. Anápolis: Universidade Estadual de Goiás, unidade universitária de ciências exatas e tecnológicas, 2011.

JUNIOR, F. A. G. S. Preparação e caracterização de compósitos polímeros/semicondutores inorgânicos a partir da técnica de eletrofiação. Título de mestre. Juazeiro: Universidade Federal do Vale do São Francisco. Curso de Pós-graduação em Ciências dos Materiais, 2013, 80 p.

KHAN, M.R. et al. Antimicrobial activity of *Symplocos cochinchinensis*. *Fitoterapia*, Milão, v.72, n.7, p.825-828, 2001.

KLEIN, A. L. (organizador). *Eugen Warming, e o cerrado brasileiro: um século depois* - São Paulo: Editora UNESP; Imprensa Oficial do Estado, 2002. ISBN 85-7139-354-0 (UNESP).

KUBLIK, H.; BOCK, T. K.; SCHREIER, H.; MÜLLER, B. W. Nasal absorption of 17- β estradiol from different cyclodextrin inclusion formulations in sheep. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 42, p. 320-24, 1996.

KUMAR, A., et al. Screening of antioxidant potential of selected barks of Indian medicinal plants by multiple in vitro assays. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2008, 21, 24–29.

KUSKOSKI, E. M. et al. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. *Ciência Rural*, v.36, n.4, jul-ago, 2006. Santa maria

LASCANO, C.E.; SCHMIDT, A.; BARAHONA, R. Forage quality and the environment. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 2001, São Pedro. São Pedro: FEALQ, 2001. p.351-356.

LOGUERCIO, A. P. et al. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). *Cienc. Rural* [online]. 2005, vol.35, n.2, pp. 371-376. ISSN 0103-8478. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782005000200019>.

MAASS, B. L.; LASCANO, C.E.; CÁRDENAS, E.A. La leguminosa arbustiva Valor nutritivo y aceptabilidad en el piedemonte amazónico, Cquetá, Colombia. , v.18, p.10-16, 1996

MAGRO, C.S.M. Bioatividade de líquidos lônicos de derivados do Ácido Valpróico em bactérias gram-negativas. Dissertação de mestrado. Porto: Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto – Instituto Politécnico do Porto, 2014, 47 p.

MAIA, M.S., BICUDO, S.D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão Free radicals, antioxidant and sperm function in mammals: a review *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.33, n.4, p.183-193, Oct./Dez. 2009. Disponível em www.cbra.org.br

MAIA, Robinson M. et al . Avaliação do sequestro do óxido nítrico (NO) pelo extrato metanólico da alga *Bryothamnion triquetrum* (Gmelin) Howe. *Rev. bras. farmacogn.*, Curitiba , v. 20, n. 4, p. 489-493, Sept. 2010 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2010000400005&lng=en&nrm=iso>. access on 13 Sept. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2010000400005>.

MALACARNE, B. Ocorrência de *C. tropicalis* no Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes, estudo de sua suscetibilidade a antifúngicos com propostas de métodos modificados para aprimoramento dos testes *in vitro*. 123 f. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2010.

MATHEUS, M.E. et al . Ação de extratos do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) sobre a produção de óxido nítrico em células RAW 264.7. *Rev. bras. farmacogn.*, Maringá , v. 13, supl. 1, p. 3-5, 2003 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2003000300002&lng=en&nrm=iso>. access on 13 Sept. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2003000300002>.

MBING, J.N. et al. Two biflavonoids from *Ouratea nigroviolacea*. *Phytochemistry*. 67, 2006, 2666-2670.

McSWEENEY, C.S.; PALMER, B.; McNEILL, D.M.; KRAUSE, D.O. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants , v.91, p.83-93, 2001. MELO, A. F. Desenvolvimento preliminar de um biossensor enzimático para determinação de taninos hidrolisáveis. 2008. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

MENDES, C. M. F.; Avaliação da atividade *in vitro* do cefetamet e outros agentes antimicrobianos diante de bactérias isoladas de infecções do trato respiratório. Rev. Ass. Med. Brasil, Vol. 43(1), p47-52. 1997.

MENDES, L.P.M. et al. Atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de *Peperomia pelúcida* e *Portulaca pilosa*. Revista ciências farmacêuticas básica e aplicada, 2011, 32 (1): 121-125. ISSN 1808-4532.

METCHE, M. Tanins, nature et propriétés, Groupe Polyphénols. Nancy. v.10, p. 11-32, 1980.

MEYER, M. et al. A broth-disc technique for the assay of antibiotic synergism. CANADIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY vol. 25, no. 11, 1 November 1979, MONTREAL CANADA, pages 1232 - 1238;

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L. TANINOS: uma abordagem da química à ecologia. Quim. Nova, Recife, Vol. 28, No. 5, p. 892-896, 2005.

MOURA, M. S. P. Moura Oxidação das Lipoproteínas Humanas de Baixa Densidade, Inflamação e Aterosclerose COIMBRA 2010 DISSERTAÇÃO DE DOUTORAMENTO APRESENTADA À FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA. International journal of pharmaceutics [0378-5173] Li ano:2013 vol:447 fasc:1-2 pág:192 -198.

MURRAY, P. R; ROSENTHAL, K. S. PFALLER, M. A.; [tradução Carlos Pelleschi Tabora... et al.]. Microbiologia médica. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. il.Tradução de: Medical microbiology - ISBN 978-85-352-3446-6

NAINE S.J., et al. Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Activity of Marine *Streptomyces parvulus* VITJS11 Crude Extract. Braz Arch Biol Technol. Epub Oct 14; doi: 10.1590/S1516-8913201400173.

NUNES, B. S. et al. Lectin extracted from *Canavalia grandiflora* seeds presents potential anti-inflammatory and analgesic effects. Naunyn-Schmied Arch Pharmacol, v. 379, p. 609-616, 2009.

OLIVEIRA, S. G.; BERCHIELLI, T.T. Potentiality of tannins used in forages conservation and ruminant nutrition - a review, Archives of veterinary Science. V.12, n.1, p. 1 -9, 2007. ISSN: 1517-784X.

PALLOTTA, R. C. Avaliação do Efeito da Radiação Laser de Baixa Potência e do Plasma Rico em Fibrina na Reparação Óssea em Ratos. 2014. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

PASCOAL, K.L. et al. Atividade antioxidante e antiacetilcolinesterase das frações do óleo fixo das sementes da *Ouratea fieldingiana* (GARDNER) Engl. Química e Sociedade: motores da sustentabilidade, 54º congresso brasileiro de química 03 a 07 novembro de 2014, Natal, Rio Grande do Norte.

PASQUINI-NETTO, H. et al. Avaliação das atividades antioxidante, anti e pró-hemolítica do extrato etanólico das folhas de *Pterogyne nitens* Tul. (Fabaceae-Caesalpinioideae). Rev. bras. plantas med., Botucatu , v. 14, n. 4, p. 666-672, 2012. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722012000400014&lng=en&nrm=iso>.accesson 27 Aug. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722012000400014>.

PEREIRA, J. V. et al. Antimicrobial activity of *Arctium lappa* constituents against microorganisms commonly found in endodontic infections. Braz. Dent. J., Ribeirão Preto, v. 16, n. 3, p. 192-196, 2005.

PIZZI, A. Tanin-Based adhesives. In: PIZZI, A. (ed) wood adhesives: Chemistry and techonology, New York, Marcel Dekker, 1993, p. 177-246.

POLEWSKI, K.; KNIAT, S.; SLAWINSKA, D. Ácido gálico, um antioxidante natural, em solução aquosa e meio ambiente micelar: estudos espectroscópicos. Disponível em: Acesso em: 07 de Jul. 2014.

POZZA, G.; SILVEIRA, F.; GESSER, J. C.; SÁ, M. M.; TEREZINE, H. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. Quím. Nova. v.29, n.4, São Paulo, Jul/Ago. 2006. RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. Farmacologia. 3ed, Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1997, 692p.

QUADROS, A. U. et al, Antifungal activity of some cyclooxygenase inhibitors on *Candida albicans*: PGE2-dependent mechanism. Folia Microbiol., Vol. 56, 349–352, 2011.

RAVELLI, D. Estabilidade oxidativa de óleo de soja adicionado de extratos de especiarias: correlação entre parâmetros físico-químicos e avaliação sensorial. Dissertação de mestrado. Piracicaba (SP): Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2011.

RIOS, J.L.; MAÑEZ, S.; PAYA, M.; ALCARAZ, M.J. Antioxidant activity of flavonoids from *Sideritis javalambrensis*. Phytochemistry, v.31, n. 6, p.1947-1950, 1992.

ROUBIK, D. W. Ecology and Natural History of Tropical Bees. Cambridge University Press, Cambridge, U.K. 514pp, 1989.

SALVADOR, M. M. Efeitos do polifenol resveratrol na síntese de fatores vasoativos do endotélio em células endoteliais humanas da linhagem ECV304. Dissertação de mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto: Ribeirão Preto, 2009.

SANTOS, N.Q. O uso indiscriminado de antibióticos na ecologia das bactérias-antibiótico-resistentes associadas à problemática da infecção hospitalar: conhecimento e prática de profissionais de saúde, a luz da ética da responsabilidade de Hans Jonas [tese]. Florianópolis (SC): Programa de Pós-Graduação em Enfermagem/ UFSC; 2002.

SANTOS, R. I. Metabolismo Básico e Origem dos Metabólitos Secundários. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Org.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007. p. 323-353.

SANTOS, S.C.; MELLO, J.C.P. Taninos. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Org.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007. p. 615-656.

SCALBERT, A. Antimicrobial Properties of tannins. *Phytochemistry*, 1991, 30, 3875

SEGÓVIA, J. F. O. *et al.* A detecção de produtos naturais biologicamente ativos no estado do Amapá. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/Amapá. EMBRAPA – AP Programa Primeiros Projetos, Capítulo 4. [s.d]. Disponível a partir do <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/879679/1/AP2010ADeteccaoDeProdutos.pdf>>. Acesso em 10 de julho de 2014.

SILVA, A. S. B. Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de *Mikania lindleyana* DC: validação do uso na medicina popular. 2011.

SILVA, C. S. Estudo fitoquímico e propriedades biológicas das folhas de *Bauhinia unguilata* L., Fabaceae / Cristiane da Silva Paula – Curitiba, 2014. 227 f.

SILVA, P.T. Avaliação da citotoxicidade de cimentos endodônticos quanto a liberação de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos. Araraquara, 2002. 132p. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.

SILVA, R. M. Taxonomia e fitossociologia da vegetação arbustiva-arbóreas de dunas na restiga da vila Bonifácio, Ajuruteua e Brangança, Pará. Belém: Universidade Federal Rural da Amazônia, Museu Paraense Emílio Goeldi, 2008, 72 p.

SIMONI, I. C. et al. Avaliação da citotoxicidade de biflavonóides isolados de *Ouratea spectabilis* (Ochnaceae) em células de córnea de coelho SIRC. Arquivos do Instituto Biológico, [S.l.], v. 69, n. 4, p. 99-102, jun. 2015. ISSN 1808-1657. Disponível em: <<http://revistas.bvs-vet.org.br/arqib/article/view/26216/27263>>. Acesso em: 10 Sep. 2015.

SOLOMONS, T. W. G., FRUHLE, C. B., Química Orgânica, 7ª edição, LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S. A., Rio de Janeiro, 2012, p. 76-77.

SOUZA, R. M. et al. Potencial antioxidante e fenóis totais de *Ouratea blanchetiana* Departamento de Bioquímica – UFPE. Disponível em: http://www.fesbe.org.br/fesbe2013/arquivos/trabalhos/area_20.pdf. Acessado em: 13 Jun 2014.

SPERA, K. D. Avaliação da atividade antioxidante, fotoprotetora e antiglicação dos extratos de folhas e frutos de espécies da família annonaceae. 2014. 55f. Dissertação (Mestrado em Biociências). – Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, 2014.

SULIMAN, M. E, STENVINKEL, P. Contribution of inflammation to vascular disease in chronic kidney disease patients. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2008;19:329-45.

SUZART, L. R. *Considerações Sobre os Gêneros Ouratea e Luxemburgia, Estudo Químico de duas Espécies de Ochnaceae: Ouratea Hexasperma St. Hil E Ouratea Cuspidata St. Hil e Atividades Biológicas*, Tese, Doutorado Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Ciências Exatas, PPGQO, Seropédica-RJ, Brasil, 2007.

SUZART, Luciano R. et al. Biodiversidade flavonoídica e aspectos farmacológicos em espécies dos gêneros *Ouratea* e *Luxemburgia* (Ochnaceae). *Quím. Nova*, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 984-987, Aug. 2007. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000400038&lng=en&nrm=iso>. access on 11 Sept. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000400038>.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. *Microbiologia*. 4ed São Paulo: Atheneu, 1999.

VALADARES, Y. M., et al. Atividade vasodilatadora in vitro de espécies de *Ouratea* (Ochnaceae) e de frações de *Ouratea Semiserrata* (Mart.) Engl. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 83-91, Mar. 2003. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322003000100009&lng=en&nrm=iso>. access on 11 Sept. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-93322003000100009>.

VARADARASU, M; MOUNISAMY, S; KAVIMANI, V; BALU, S and Quine, D. Evaluation of anti-inflammatory and membrane stabilizing properties of ethanol extract of *Cansjera rheedii* J. Gmelin, (Opiliaceae), *Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics*, pp. 235–237, 2007.

VANNI, D. S. *et al.* Óxido nítrico: inibição das plaquetas e participação na formação do trombo, v. 43, n. 3, p. 181-189, junho 2007.

VELLOSA, J.C.R. et al. Biochemical and citotoxic study for kaempferol, quercetin and isoquercetrin antioxidant activities. *Ecética Química*, v.36, *in press*, 2011.

VIANNA, H. R et al. Inflamação na doença renal crônica: papel de citocinas. *J. Bras. Nefrol.*, São Paulo, v. 33, n. 3, Sept. 2011. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010128002011000300012&lng=en&nrm=iso>. Acessado em: 08 Mar. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-28002011000300012>.

ZHANG, Y. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive activities of non-alkaloids fractions from *Aconitum flavum* in vivo. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 25, n. 1, p. 47-52, 2015.