



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – PRPPG  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA – PPGBiotec**

**MÁRCIA LUANA GOMES PERFEITO**

**EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES DAS FOLHAS DE *Pilocarpus microphyllus* STAPF EX. WARDEWORTH E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E PERFIL NEUROPROTETOR**

**PARNAÍBA-PI  
2017**

**MÁRCIA LUANA GOMES PERFEITO**

**EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES DAS FOLHAS DE *Pilocarpus microphyllus* STAPF EX. WARDEWORTH E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E PERFIL NEUROPROTETOR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí – UFPI, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Bioquímica aplicada à Biotecnologia.

Orientador: José Roberto de Souza de Almeida Leite

Co-orientadora: Leiz Maria Costa Vêras

**MÁRCIA LUANA GOMES PERFEITO**

**EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES DAS FOLHAS *Pilocarpus  
Microphyllus* STAPF EX. WARDEWORTH E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
ANTIOXIDANTE E PERFIL NEUROPROTETOR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí - UFPI, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**



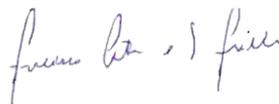
---

Prof. Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite  
Universidade de Brasília – UnB  
(Orientador)



---

Prof. Dr. Jéfferson Soares de Oliveira  
Universidade Federal do Piauí – UFPI



---

Prof. Dr. Francisco Artur e Silva Filho  
Universidade Estadual do Piauí – UESPI

PARNAÍBA-PI  
2017

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba  
Serviço de Processamento Técnico

P438e Perfeito, Márcia Luana Gomes.

Extração e identificação de flavonoides das folhas de *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex. Wardeworth e avaliação da atividade antioxidante e perfil neuroprotetor [manuscrito] / Márcia Luana Gomes Perfeito. – 2017.

123 f. : il. color.

Impresso por computador (printout).

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, 2017.

Orientação: Prof. Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite

**Dedico,**

A Trindade Santa, mãe Maria Santíssima,  
Santo Anjo e minha família.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a trindade santa: Pai, Filho e Espírito Santo, porque é dele toda honra e toda glória; alfa, ômega, princípio e fim.

A virgem santíssima e santo anjo por todos os auxílios, proteção e ensinamentos.

A minha família, principalmente minha mãe Ana, pai Enes, irmãos, avô e avó Felizolindo e Luzia e tia Rosário, pelas orações e apoio incondicional principalmente nos momentos mais difíceis.

Ao meu namorado Samuel e família pelo amor, acolhimento e cuidado que me depositaram.

A todos os meus amigos da minha terra natal, Piripiri, por fazerem parte da minha construção pessoal desde o início de minha caminhada. Sou grata também a todos as amizades que construí em Parnaíba, que por muitas vezes agíamos como família e, hoje, muitos destes estão distantes.

Ao meu orientador, José Roberto de Souza de Almeida Leite, pela confiança e paciência.

A minha super co-orientadora Leiz Maria Costa Veraz por muitas coisas, muitas delas não tenho como retribuir, mas espero um dia correspondê-la de alguma forma por todo suporte que ela significou durante este período de mestrado.

A todos do laboratório BIOTEC pelo subsídio, amizade e descontração nos momentos mais cômicos e inusitados que se possa imaginar.

As meninas a todos da Phytobios, especialmente Jéssica e Adelaide, por me acolherem e me ajudarem em todos os momentos na Phytobios.

A todos os professores e alunos que participaram direta ou indiretamente na realização dos experimentos, bem como o órgão de fomento CAPES pela bolsa durante todo período de mestrado.

A coordenação PPG-Biotec por toda assistência e cooperação.

Aos técnicos-administrativos e servidores da UFPI por me ajudarem durante este dois anos de mestrado, especialmente os trabalhadores do restaurante universitário de Parnaíba.

E finalmente, quero agradecer a todos que colaboraram de alguma forma para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

“Buscai o reino do céu e tudo lhe será acrescentado.”

## RESUMO

Os flavonoides compreendem um grupo de metabólitos secundários de grande diversidade estrutural, cujas propriedades terapêuticas têm ganhado grande interesse nas últimas décadas. O jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex. Wardeworth), de utilização medicinal comprovada, apresenta importância no mercado farmacêutico, uma vez que das suas folhas são extraídas a pilocarpina utilizada no tratamento do glaucoma. Embora, alguns flavonoides tenham sido descritos no gênero *Pilocarpus*, não existem estudos de prospecção e identificação de flavonoides das folhas de *P. microphyllus*. Nesse contexto, o presente trabalho visou extrair e identificar flavonoides das folhas do jaborandi e investigar o potencial farmacológico. A fração acetato de etila (FAcOEt) obtida a partir do extrato metanólico foi avaliada quanto a sua atividade antioxidante por meio do ensaio de captura do radical DPPH e ABTS, além da caracterização do perfil eletroquímico para observação dos processos *redox*. No ensaio de DPPH, a FAcOEt revelou CE<sub>50</sub> de 0,5 mg/mL. A fração apresentou valor de TEAC de 819 µmol de trolox/g de FAcOEt. A amostra exibiu processos *redox* em baixos potenciais, indicando promissora atividade antioxidante. O ensaio de indução de dor neuropática periférica por compressão do nervo ciático em ratos *wistar* para determinação do Limiar Nociceptivo Mecânico (LNM) no teste de Von Frey, evidenciou o provável efeito desta fração contra as formas reativas do oxigênio (EROs), envolvidas no processo fisiopatológico da dor neuropática, revelando atividade significativa na dose de 100 mg/kg. Os ensaios de caracterização dos constituintes da FAcOEt por espectrofotometria UV-Vis, espectrofotometria infravermelho, CLAE, espectrometria de massas e voltametria cíclica, levantaram a hipótese sobre o composto majoritário desta fração ser a flavona crisina, cujas propriedades de solubilidade na CLAE são muito próximas à da flavona quercetina, e revelaram a presença característica deste grupo.

**Palavras-chaves:** Flavonoides. *Pilocarpus microphyllus*. Antioxidante. Dor neuropática.

## ABSTRACT

Flavonoids comprise a group of secondary metabolites of great structural diversity, whose therapeutic properties have gained great interest in the last decades. Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardeworth), of proven medical use, is of great importance in the pharmaceutical market, since its leaves are extracted pilocarpina used in the treatment of glaucoma. Although some flavonoids have been described in the genus *Pilocarpus*, there are no studies of prospecting and identification of flavonoids of *P. microphyllus* leaves. In this context, the present work aims to extract and identify the flavonoids from jaborandi leaves and investigate the pharmacological potential. The ethyl acetate fraction (FACOEt) obtained from the methanol extract (EM) was evaluated for its antioxidant activity by means of the DPPH and ABTS radical capture assay, in addition to the characterization of the electrochemical profile of the fraction to observe the redox processes Sample. In the DPPH assay, the fraction revealed EC 50 of 0.4 mg/mL. The fraction presented TEAC value of 819  $\mu$ mol trolox/g FACOEt. The sample exhibited redox processes at low potentials, indicating promising antioxidant activity. The trial of induction of peripheral neuropathic pain by sciatic nerve compression in wistar rats to determine the Mechanical Nociceptive Threshold (LNM) in the von Frey test, evidenced the probable effect of this fraction against the reactive oxygen forms (ROS) involved in the process Pathophysiology of neuropathic pain, revealing significant activity at the dose of 100 mg / kg. The characterization of FACOEt constituents by UV-Vis spectrophotometry, infrared spectrophotometry, HPLC, mass spectrometry and cyclic voltammetry, raised the hypothesis that the major component of this fraction is flavone chrysin, whose solubility properties in HPLC are very close to of flavone quercetin, and revealed the characteristic presence of this group.

**Keywords:** Flavonoids. *Pilocarpus microphyllus*. Antioxidant. Neuropathic pain.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Rota biossintética dos metabólitos secundários em plantas. ....	21
Figura 2: Núcleo fundamental dos flavonoides (2-fenil-benzopirano) e sua numeração. ....	23
Figura 3: Esqueletos básicos das principais subclasses de flavonoides e seus representantes. ....	25
Figura 4: Representação esquemática da estrutura química do flavonoide quercetina.	25
Figura 5: Planta arbustiva <i>Pilocarpus microphyllus</i> Stapf ex Wardeworth.....	29
Figura 6: Geração das EROs a partir da redução monovalente do O <sub>2</sub> à água. Durante esse processo o O <sub>2</sub> recebe um elétron por vez.....	33
Figura 7: (A) Reação de Fenton: a formação de OH• pela reação do H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> com Fe <sup>2+</sup> . (B) Reação de Haber -Weiss: o OH• é formado a partir de O <sub>2</sub> • <sup>-</sup> e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	34
Figura 8: Sistema de proteção enzimático antioxidante. ....	35
Figura 9: Mecanismo de ação antioxidante diante de um radical.....	35
Figura 10: Estrutura química dos antioxidantes sintéticos mais conhecidos. ....	36
Figura 11: Modelos experimentais de dor neuropática.....	41
Figura 12: Fracionamento por partição líquido-líquido do extrato em funil de separação.....	45
Figura 13: Bandas de absorção UV características dos flavonoides.....	55
Figura 15: Estrutura química da Crisina. ....	59
Figura 16: Cromatogramas relacionando a intensidade (u.a.) com o tempo de corrida. Em vermelho: 370 nm; preto, 260 nm). A: Quercetina. B: FAcOEt. ....	60
Figura 18: Clivagens no anel C da quercetina resultando nos fragmentos do espectro de massa.....	63

Figura 21: Mecanismo eletroquímico proposto para quercetina.....	65
Figura 22: Espectro na região infravermelho da FAcOEt do jaborandi. ....	67
Figura 23: Região de estiramento da carbonila.....	69
Figura 24: Espectro infravermelho da crisina de acordo com Sathishkumar (2015). 69	
Figura 25: Gráfico do percentual de inibição de DPPH• da FAcOEt com ilustração da equação da reta linear.....	71
Figura 26: Coloração da reação no tempo de 30 min na concentração de 2,2 e 0,4 mg/mL da FAcOEt, respectivamente.....	71
Figura 27: Estrutura química da pinostrobina (à esquerda) e vitexina (à direita). ....	72
Figura 28: Mecanismo de redução do radical livre DPPH• da quercetina. ....	73
Figura 31: A: Curva do trolox no tempo de 6 min de reação com o radical ABTS•+. B: Curva da FAcOEt no tempo de 6 min. C: Curva da FAcOEt no tempo 30 min de reação. ....	76
Figura 33: Estrutura química de uma chalcona.....	80
Figura 34: Voltamogramas cíclicos mostrando o comportamento eletroquímico daFAcETO em tampão PBS 0,1 M, pH 6,4. Medidas realizadas em temperatura ambiente (25 °C) e $v = 0.05 \text{ V s}^{-1}$ . ....	82
Figura 35: Representação de uma dimerização entre compostos fenólicos. ....	84
Figura 36: Estrutura química do grupo catecol (à esquerda) e resorcinol (à direita). 85	
Figura 37: Esquema representativo do experimento de CCl.....	86
Figura 38: Modelo de esmagamento do nervo ciático.....	87

## LISTA DE TABELA

Tabela 1. Flavonoides isolados de <i>P. trachylophus</i> e atividade biológica relatada.	32
Tabela 2. Modelos de indução de DNP em animais.....	42
Tabela 3. Condições cromatográficas para a análise da FAcOEt por CLAE.....	46
Tabela 4. Principais flavonoides, suas subclasses e características espectrais (UV-Vis).....	58

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABTS – 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico

CE<sub>50</sub> – Concentração eficiente

CG-MS – Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas

CL-MS – Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas

DNP – Dor neuropática

DPPH – radical 2,2 difenil-1-picrilhidrazil

ECS – Eletrodo de calomelano saturado

EE – Extrato Etanólico

EGP – Haste de Grafite Pirofítico

EM – Extrato Metanólico

ERNs – Formas reativas do nitrogênio

EROs – Formas reativas do oxigênio

EtOH – etanol

FAcOEt – Fração Acetato de Etila

FT-IR – Espectrofotometria Infravermelho

IBMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente E dos Recursos Naturais Renováveis

m/z – razão *massa/carga*

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – Tampão Fosfato de Potássio

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

T<sub>R</sub> – Tempo de retenção

UV-Vis – ultravioleta-visível

λ – Comprimento de Onda

NOS – Óxido nítrico sintase

NO – Óxido nítrico

IASP – *International Association for the Study of Pain*

AINES – anti-inflamatórios não-esteroides

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>18</b>
2.1 Plantas medicinais .....	18
2.2 Metabólitos secundários.....	19
2.3 Flavonoides .....	22
2.4 Flavonoides e propriedades farmacológicas .....	26
2.5 Jaborandi.....	28
2.5.1 Botânica e ocorrência.....	28
2.5.2 Propriedades farmacológicas do jaborandi e principais componentes .....	30
2.6 Estresse oxidativo e defesas antioxidantes.....	32
2.7 Dor neuropática e EROs .....	38
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>43</b>
3.1 Geral.....	43
3.2 Específicos .....	43
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	<b>44</b>
4.1 Obtenção dos extratos e frações.....	44
4.1.1 Coleta e identificação botânica do material vegetal .....	44
4.1.2 Preparação do Material Vegetal .....	44
4.1.3 Obtenção dos extratos .....	45
4.1.4 Fracionamento do extrato.....	45
4.2 Caracterização dos Extratos e FAcOEt.....	46
4.2.1 Espectrofotometria UV-VIS .....	46
4.2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	46
4.2.3 Espectrofotometria de Massas (EM) .....	47
4.2.4 Caracterização eletroquímica do composto majoritário da FAcOEt por Voltametria Cíclica .....	47
4.2.5 Caracterização da FAcOEt por Espectrofotometria Infravermelho (FT-IR) .....	48
4.3. Ensaio antioxidante da FAcOEt.....	48
4.3.1. Determinação da Atividade Antioxidante pelo método de captura de radicais DPPH .....	48
4.3.2 Determinação da Atividade Antioxidante pelo método de captura de radicais ABTS.....	49
4.3.3 Análise estatística dos ensaios DPPH e ABTS .....	50
4.3.4 Determinação da Potencial Antioxidante por Voltametria cíclica.....	50
4.4. Determinação da atividade contra dor neuropática pelo método de Indução por compressão do nervo ciático.....	51
4.4.1 Procedimento cirúrgico.....	51
4.4.2. Avaliação antinociceptiva aguda .....	51
4.4.3 Análise estatística .....	52
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>53</b>
5.1 Rendimento da extração .....	53
5.2 Análises por Espectrofotometria UV-Vis.....	54

5.4 Perfil de metabólitos secundários da FAcOEt por CLAE.....	59
5.5 Análise por Espectrometria de massas (ESI-MS) do composto majoritário da FAcOEt.....	61
5.6 Estudo de voltametria cíclica (VC) do composto majoritário da FAcEt.....	63
5.3 Caracterização da FAcOEt por Espectrofotometria Infravermelho (FT-IR) .....	66
5.7 Ensaio biológico da FAcOEt.....	70
5.7.1 Atividade antioxidante .....	70
5.7.1.2 Teste de captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) .....	70
5.7.1.3 Teste de captura do radical ABTS (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico)...	74
5.7.1.4 Atividade antioxidante observada no perfil eletroquímico da FAcOEt .....	81
5.7.2 Teste de Indução da neuropatia pela compressão do nervo ciático.....	85
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>93</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>94</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são empregadas diretamente na terapia farmacológica por meio de extratos para a elaboração de produtos fitoterápicos ou como fonte de precursores para a síntese de princípios ativos. (FIRMO et al., 2011).

Muitos dos fármacos atuais são derivados, direta ou indiretamente de constituintes químicos de plantas superiores. Os estudos científicos em produtos naturais é, frequentemente, guiado pelo conhecimento etnobotânico e pode contribuir de forma substancial para a inovação farmacêutica, provendo novas estruturas químicas e/ou mecanismos de ação (TOMCHINSKY et al., 2014). Considerando-se, ainda, que 25% dos fármacos empregados atualmente nos países industrializados advém, direta ou indiretamente, de produtos naturais (ANDRADE, 2014), ainda assim, são relativamente escassos as pesquisas que visem validar cientificamente o uso tradicional de plantas (NGO; OKOGUNB; FOLK, 2013).

Os extratos obtidos industrialmente devem ser elaborados a partir de material vegetal de qualidade garantida, mediante um processo em que estejam padronizados, os solventes e os métodos de extração, assim como as etapas de concentração, secagem e homogeneização (DE SOUZA, 2016).

A importância dos produtos naturais é particularmente evidente nas áreas de estudo sobre doenças crônicas e degenerativas, cujas alterações nos mecanismos inflamatórios ligadas ao desequilíbrios no metabolismo dos radicais livres fazem parte do processo fisiopatológico, uma vez que grande parte das drogas descobertas possuem procedência natural (DE OLIVEIRA et al., 2009). Diversos estudos atribuem às substâncias antioxidantes oriundas do metabolismo das plantas, em destaque compostos fenólicos, um efeito protetor contra essas doenças, como câncer, enfermidades cardiovasculares e coronarianas, diabetes, entre outras (VEIGAS-JUNIOR et al., 2004; PINEOVANSA, 2016; PINELA et al., 2016).

A espécie *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardeworth, popularmente conhecida como jaborandi, é intensamente explorada como fonte do alcaloide pilocarpina. No entanto, outros grupos de metabolitos secundários, tais como cumarinas, flavonoides e terpenos foram descritos para as espécies de *Pilocarpus* nativas do Brasil (SANTOS; MORENO, 2004).

Dentre os princípios ativos de fitoterápicos mais estudados, os flavonoides têm merecido destaque em virtude da sua ampla gama de ações biológicas e terapêuticas

demonstradas tanto em condições experimentais como em seres humanos, incluindo atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, inibição enzimática, atividade antialérgica, antioxidante, vascular, e antitumoral (WILLIAMS, 2000; BEECHER, 2003; PETERSON et al., 2003; HARBORNE; LAKHANPAL; RAI, 2007; ZHANG et al., 2007; CUSHNIE; LAMB, 2011; NIJVELDT et al., 2011).

Esta grande classe de metabólitos secundários apresenta-se amplamente distribuída nos vegetais superiores (KIM et al., 2002; ROSABAL et al., 2017). O longo período de interação das plantas produtoras de flavonoides com várias espécies animais deve ter contribuído na formação da ampla atividade bioquímica e farmacológica em mamíferos e em outros sistemas biológicos (MIDDLETON et al., 2000).

A capacidade deste grupo em atuar como agentes antioxidantes nos sistemas biológicos é, talvez, sua atividade mais importante e a mais estudada nos últimos anos, seguida pela ação antimicrobiana destes compostos (SAKIHAMA et al., 2002; VAYA et al., 2003; PIOVESANA, 2016).

Nesse contexto, o presente trabalho objetiva realizar uma bioprospecção e investigação do potencial farmacológico dos flavonoides das folhas do jaborandi, tendo em vista a importância na terapêutica desse grupo e a inexistência de trabalhos sobre os flavonoides desta planta de grande valor comercial.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Plantas medicinais

A utilização de plantas no combate a enfermidades é quase tão antiga quanto à história da humanidade. Na cultura chinesa, o conhecimento popular de ervas medicinal tem sido extensamente empregado desde cinco séculos atrás. As origens desta cultura são desconhecidas, mas supostamente se iniciou no ano de 2953 - 2208 a.C. (FOGLIO et al., 2006; DE CASTRO et al., 2016). Até o início do século XIX, os recursos terapêuticos eram constituídos predominantemente por plantas e/ou extratos vegetais utilizadas de modo empírico. (ALEGRE et al., 2002; ANGOLARI; STÜLP, 2017).

Apesar da grande evolução da medicina alopática a partir da segunda metade do século XX, alguns obstáculos básicos dificultam seu emprego por populações carentes, que vão desde o acesso aos centros de atendimento hospitalares à obtenção de exames e medicamentos. Estes motivos, aliados a fácil obtenção e a antiga tradição do uso de plantas medicinais, contribuem para sua ampla utilização pelas populações dos países em desenvolvimento (VEIGA; PINTO; MACIEL, 2005; SANTOS; KOZUSNY-ANDREANI; 2016). A Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece que grande parte desses países depende da medicina tradicional em sua atenção primária à saúde, tendo em vista que práticas tradicionais correspondem cerca de 80% dos procedimentos de básicos de saúde e 85% utilizam plantas ou preparações destas (CONSELHO REGIONAL DE FARMÁCIA DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2011).

A maior parte dos produtos farmacêuticos foi desenvolvida a partir dos produtos naturais. Entretanto, estima-se que somente 15% das, aproximadamente, 300 mil espécies de plantas no mundo tenham sido submetidas a algum estudo científico para avaliar suas potencialidades na preparação de novos produtos. Nesse contexto, desde 1970, a OMS tem estimulado o estudo de plantas medicinais, no intuito de ponderar cientificamente os benefícios do uso de medicamentos fitoterápicos, bem como conhecer os riscos de seu uso impróprio. (BRANDÃO et al., 2002; NGO; OKOGUNB; FOLK, 2013).

A combinação da biodiversidade com o conhecimento tradicional de seu uso concede ao Brasil uma posição privilegiada para o desenvolvimento de novos

fitoterápicos (BRANDÃO et al., 2002). Até a primeira metade do século XX, o Brasil era predominantemente rural e utilizava largamente a flora medicinal, nativa e introduzida. Hoje, a medicina popular do país é reflexo das uniões étnicas entre imigrantes de diferentes etnias e os inúmeros povos autóctones, que difundiram o conhecimento das ervas locais e de seus usos, transmitidos e aprimorados entre as gerações (CONSELHO REGIONAL DE FARMÁCIA DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2011). Atualmente, o mercado das plantas medicinais, as preparações fitofarmacêuticas e os produtos naturais isolados representam um comércio que movimenta bilhões de dólares, tanto em países industrializados quanto em desenvolvimento (SKELLY, 1996; XISTO; HENRIQUES, 2016).

A toxicidade de plantas medicinais e fitoterápicos, comparada com a dos medicamentos usados nos tratamentos convencionais, ainda é bastante negligenciada e representa um problema sério de saúde pública. Os efeitos adversos dos fitomedicamentos, possíveis adulterações, toxidez e ação sinérgica (ação somada com outras drogas) ocorrem frequentemente. As pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são incipientes, assim como o controle da comercialização pelos órgãos oficiais em feiras livres, mercados públicos ou lojas de produtos naturais (VEIGA; PINTO; MACIEL, 2005; LEMES, 2016).

A possibilidade de utilizar partes de plantas como fonte de substâncias medicamentosas reside na capacidade destas de produzirem, a partir de seu metabolismo, substâncias químicas que exercem alguma atividade sobre outros organismos vivos. (CUNHA et al., 2016).

O interesse na prospecção de novas moléculas bioativas derivados de produtos naturais de plantas é crescente, uma vez que os produtos do metabolismo dos vegetais possuem vasta diversidade molecular e potencialidades terapêuticas, representados pelas variadas classes de metabolitos secundários (COWAN, 1999; NOVAIS et al., 2003).

## **2.2 Metabólitos secundários**

Cada tipo de célula desenvolve em seu metabolismo um conjunto de reações químicas catalisadas por enzimas. Desta forma, diversos compostos químicos são formados, degradados ou transformados; estes recebem o nome de metabólitos

(MARZZOCO; TORRES, 2007; CUNHA; BARBOSA; DOS SANTOS, 2016), que por sua vez podem ser divididos em metabólitos primários e metabólitos secundários (WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA; KOWALSKA, 2008).

A teoria evolucionista descreve que todos os seres vivos derivaram de um precursor comum, o que explica, por exemplo, porque as principais macromoléculas (carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos) são essencialmente as mesmas, quer num organismo vegetal ou animal (SIMÕES et al., 2010), e que por serem referidos como essenciais à vida e comuns aos seres vivos têm sido definidas como integrantes do metabolismo primário, compreendendo as várias reações químicas envolvidas na transformação de moléculas e nutrientes nas unidades constitutivas essenciais da célula (WATSON, 1965; COSTA, 2016), reações essas que se encontram envolvidas na manutenção da sobrevivência e do desenvolvimento celular (DIXON, 2001; TIOMNOVA, 2016). Os metabólicos secundários, por sua vez, são importantes para a sobrevivência e a perpetuação no ambiente das espécies que as produzem, são eles: compostos fenólicos, terpenoides, alcaloides, cumarinas, taninos, entre outros; e são derivados biologicamente dos metabólitos primários (LÓPEZ, 2006; RAVEN et al., 2007; ANCHONDO REGALADO, 2016).

Metabólitos secundários são produzidos por plantas, fungos, bactérias, protozoários, algas, insetos, animais marinhos, e outros seres. Possuem enorme relevância ecológica, uma vez que podem atuar na atração de polinizadores, ou representar uma defesa química contra estresse ambiental. Muitos desses compostos ou grupos deles podem provocar reações nos organismos, caracterizando os efeitos medicinais ou tóxicos, sendo estes denominados princípios ativos. Quanto à toxicidade, alguns podem ou não apresentar, dependendo da dosagem em que venham a ser utilizados. Assim, planta medicinal é aquela que contém um ou mais de um princípio ativo que lhe confere atividade terapêutica (LORENZI; MATOS, 2002; RAVEN et al., 2007, AMARAL, 2016).

Muitos podem ser considerados como materiais especiais ou químicos refinados e possuem grande valorização no mercado pelos compostos biologicamente ativos, tais como a nicotina, morfina, cocaína, pilocarpina, etc. Dado suas estruturas altamente complexas determinantes para a atividade biológica, muitos deles não possuem mecanismos de síntese economicamente viáveis (CUNHA et al., 2016). Um bom exemplo é a azadiractina extraída do Nim (*Azadiracta indica* A. Juss), com

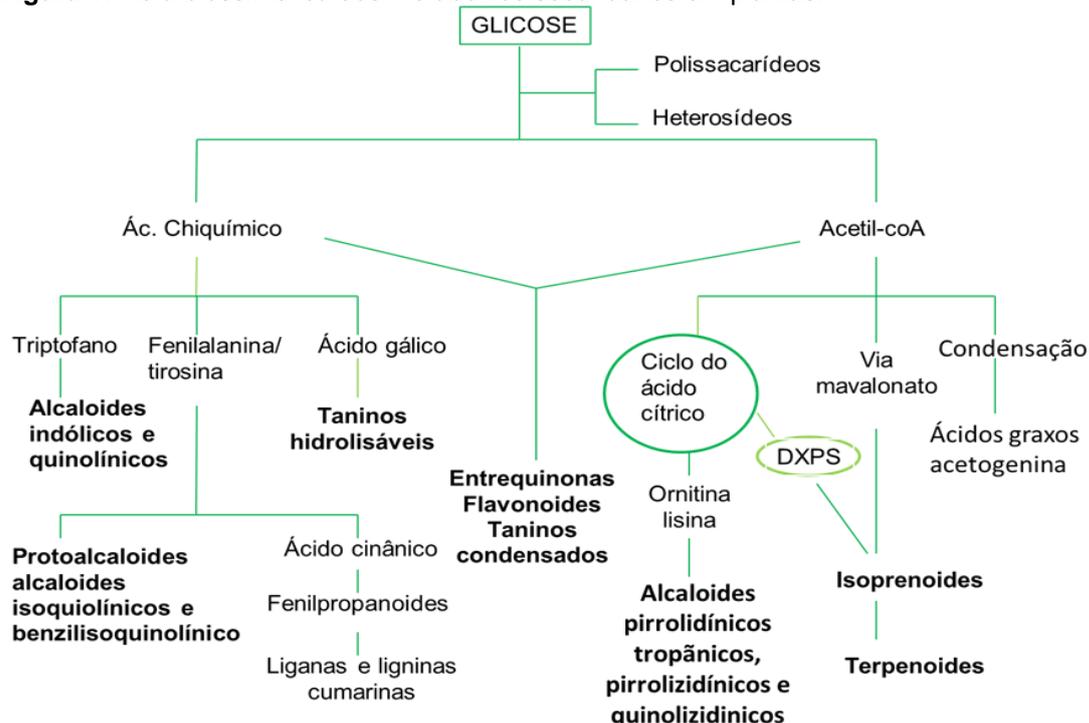
estrutura bastante complexa, é utilizada como inseticida (CHAGAS, 2004; DHANG; SURESH; 2016).

Uma vantagem econômica tanto dos metabólitos primários e secundários é a facilidade de obtenção através de processos relativamente simples, como a destilação a vapor ou por extração com solventes aquosos ou orgânicos (CHAGAS, 2004).

A elevada capacidade biossintética do metabolismo secundário chama a atenção tanto em relação ao grande número de substâncias produzidas quanto à diversidade destas em uma mesma espécie, além de ser destaque na área da farmacologia quanto aos seus benefícios para a saúde humana. (ROBBERS et al., 1996; PEREIRA; CARDOSO, 2012; MAIA, 2016).

A síntese dos metabólitos secundários tem origem no metabolismo da glicose. Esta é convertida em moléculas de ácido pirúvico que podem seguir duas vias diferentes. Na primeira, moléculas de piruvato entram na via do ácido chiquímico para formar todos os metabólitos secundários aromáticos (alcalóides, indólicos, quinolínicos, isoquinolínicos, ligninas e lignanas, cumarinas e taninos hidrossolúveis). Na segunda, o piruvato continua sendo oxidado até a formação de moléculas de acetil-coenzima A (SANTOS, 2004; SIMÕES et al., 2010; ANDRADE, 2017), como está ilustrado na figura 1.

**Figura 1:** Rota biossintética dos metabólitos secundários em plantas.



Fonte: Adaptado de Simões et al. (2010).

Em várias espécies, apesar do local de biossíntese estar restrito a um órgão, os produtos são acumulados em toda a planta ou em órgãos diferentes através do sistema de transporte intercelular. Por vezes, o local de compartimento é de fundamental importância para a sobrevivência da planta (SANTOS, 2004; LIU et al., 2017).

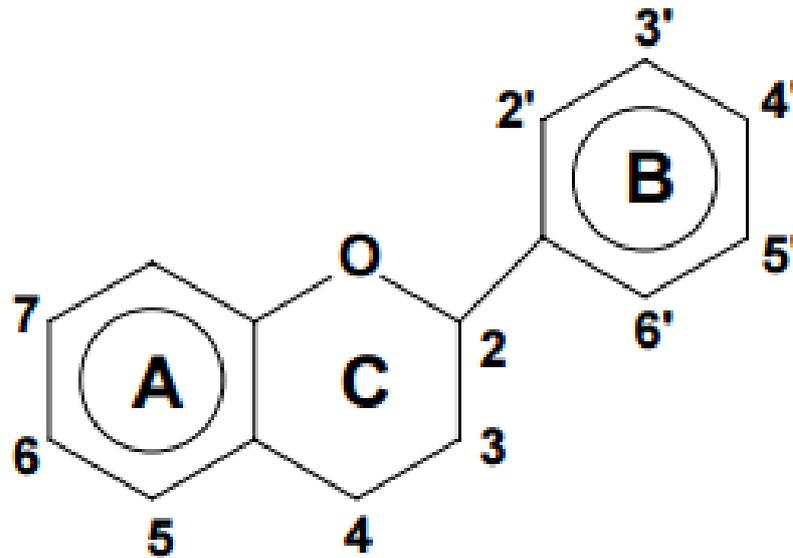
Os compostos fenólicos estão entre os mais vastos e diversificado grupo de metabólitos secundários de plantas. Já foram identificados mais de 8000 estruturas polifenólicas. O elemento estrutural que os caracteriza é o núcleo benzênico com, no mínimo, um hidrogênio substituído por uma hidroxila, sendo encontrado na forma livre ou fazendo parte de outra função como, por exemplo: éter e éster ou formando heterosídeos. Portanto, apresentam solubilidade em água e em solventes orgânicos polares. (BRUNETON, 2002; CARVALHO et al., 2007; BOADAS-VAELLO; VELA; VERDÚ, 2016).

Os polifenóis podem ser divididos em 10 diferentes classes, baseados na sua estrutura química. Dentre essas classes, os flavonoides são a maior, com uma estrutura comum de difenilpropano (DABAS, 2016). O anel A provém da molécula de resorcinol ou floroglucinol sintetizado pela rota do acetato e apresenta um padrão característico de hidroxilação na posição cinco e sete. O anel B provém da rota do ácido chiquímico e é normalmente 4'-, 3'4'-, ou 3'4'5'- hidroxilado (BRAVO, 1998; CROFT, 1998; VITALE et al., 2016).

### 2.3 Flavonoides

Os flavonoides são substâncias redutoras derivados das chalconas de ampla distribuição no reino vegetal (SIMÕES et al., 2010; DABAS, 2016). Nas plantas, apresentam-se com uma variedade de formas estruturais, todas contendo 15 átomos de carbono em seu núcleo básico arranjados na configuração C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, isto é, são dois anéis aromáticos ligados por três carbonos formando um terceiro anel, que pode estar ligado a vários substituintes (HARBONE, 1984; HOSSEINZADEH; NASSIRI-ASL, 2017). Nos compostos tricíclicos, as unidades são chamadas anéis A, B e C e os átomos de carbono recebem a numeração com números ordinários para os núcleos A e C, e os mesmos números seguidos de uma linha (') para o núcleo B (Figura 2) (SIMÕES et al., 2001).

**Figura 2:** Núcleo fundamental dos flavonoides (2-fenil-benzopirano) e sua numeração.



Fonte: Simões et al. (2010).

A descoberta dos flavonoides em 1930 rendeu o prêmio Nobel a Szent-György, que extraiu a citrina da casca do limão e constatou sua capacidade de regulação da permeabilidade dos capilares. Assim, esta classe de moléculas foi inicialmente denominada como vitamina P (de permeabilidade) e também por vitamina C<sub>2</sub>, visto que algumas substâncias pertencentes a esta classe apresentavam propriedades semelhantes às da vitamina C. Porém, esta classificação foi abandonada em 1950, uma vez que a confirmação dessas substâncias como vitaminas não foi efetuada (MARTINEZ-FLORES et al., 2002).

Os flavonoides estão presentes em todas as partes da planta, desde as raízes até as flores e frutos, sendo encontrados nos vacúolos das células epidérmicas (CAZÉ, 2016). Tem importância não somente como pigmento amarelo das flores (do latim: “*flavus*” = amarelo e “*oide*” = forma) (MA et al, 2016), mas também laranja, azul e vermelho, atuando na atração de insetos para a polinização das plantas. São também responsáveis por funções biológicas que garantem o equilíbrio ecológico, como proteção contra a radiação ultravioleta, regulação do crescimento e desenvolvimento normal das plantas, defesa contra fungos, bactérias e vírus, além de quelarem metais tóxicos e reduzirem os agentes oxidativos lesivos à própria planta. Estão ainda envolvidos no processo de transferência de energia, morfogênese, determinação do sexo das plantas, respiração e fotossíntese da

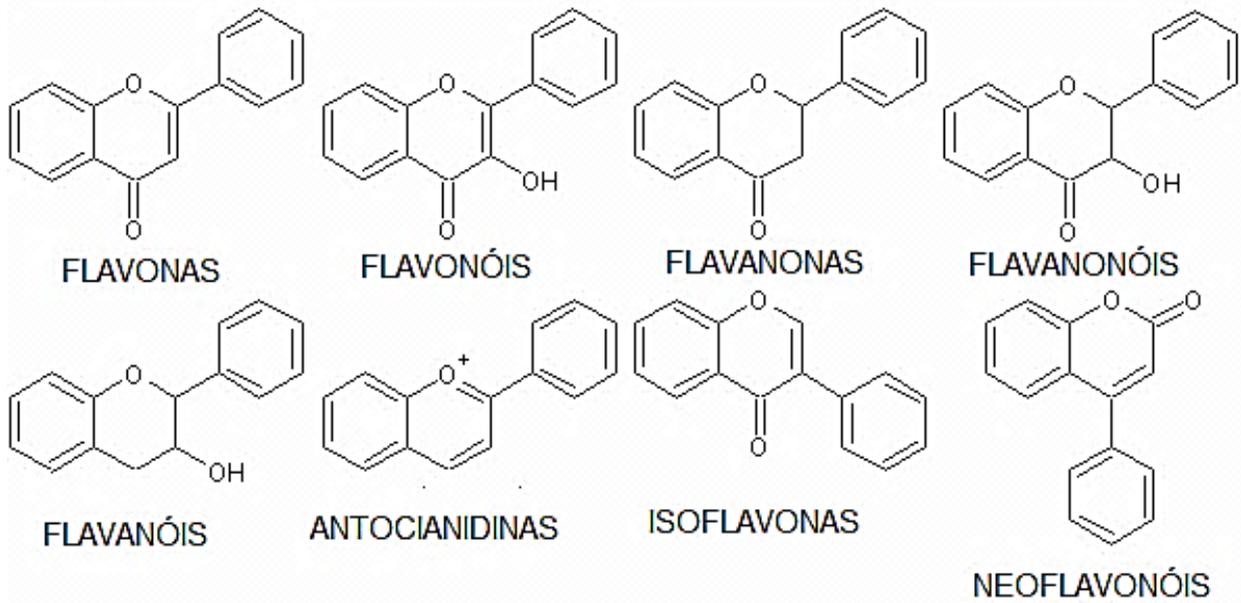
maioria das plantas (MUSCHIETTI; MARTINO, 2007; PRVULOVIĆ; MALENČIĆ; MILADINOVIĆ, 2017).

Muitos flavonoides de origem natural apresentam-se oxigenados e um grande número possui açúcar conjugado, conhecidos como heterosídeos ou glicosídeo. Uma vez que a ligação do açúcar é feita por uma hidroxila, estes recebem a denominação de O-heterosídeos, do contrário, se a ligação for intermediada por um átomo de carbono, trata-se de C-heterosídeos. São designados de aglicona ou genina os que não apresentam açúcares como grupo funcional, sendo estes as formas livres (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007; ARNHOLD; TISSOT-SQUALLI, 2016).

O processo de substituição dos grupos funcionais existentes nos anéis (hidrogenação, hidroxilação, metilação, sulfatação e glicosilação) determina as variações na estrutura química dos flavonoides. Estes possuem as propriedades químicas dos fenóis, sendo relativamente solúveis em água, principalmente os heterosídeos (YAO et al., 2004; TISSOT-SQUALLI, 2016). São levemente ácidos e solúveis em etanol, metanol e butanol e combinações de solventes com água; uma vez que são compostos polares ou moderadamente polares. Podem sofrer degradação se deixados em meio alcalino na presença de oxigênio (HARBONE; WILLIAMS, 2000; GODOS et al., 2017).

São conhecidos mais de 4200 flavonoides diferentes (YAO et al., 2004). Esse vasto grupo pode ser subdividido em seis grandes subclasses, baseado na variação do anel heterocíclico C (YILMAZ; TOLEDO, 2000), são elas: as flavonas, flavonóis, flavanonas, flavanóis, antocianidinas e isoflavonas (figura 3). Podem ser encontrados em alimentos e bebidas de origem vegetal, como frutas, vegetais, chás, cacau e vinho. No subgrupo de flavonóis e flavonas, o flavonol quercetina (figura 4) é o mais encontrado em alimentos, assim como canferol, miricetina e as flavonas apigenina e luteolina. Os chás produzidos a partir da *Camellia sinensis* (L. Kuntze) e da cebola, *Allium cepa* (Lineu), são as principais fontes alimentares de flavonóis e flavonas (SITEPU; SAPUTRA, 2016).

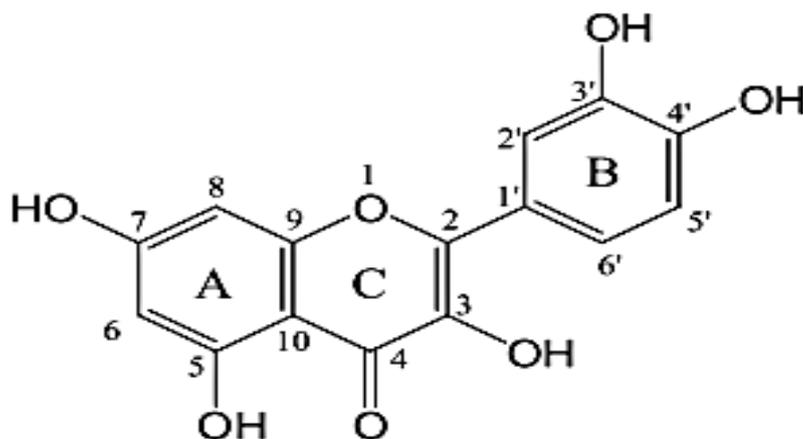
**Figura 3:** Esqueletos básicos das principais subclasses de flavonoides e seus representantes.



Fonte: Simões et al. (2010).

Essa ampla classe de metabólito secundário, cuja síntese não ocorre na espécie humana, possui notáveis propriedades farmacológicas que atuam sobre o sistema biológico, dentre elas, merecem destaque sua ação antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, antialérgica, antiviral e anticarcinogênica (HARBORNE, 1994; MANTHEY, BUSLIG, 1998; YAO et al., 2004; FRIEDMAN, 2014; SAK et al, 2014; SINDHU; BEENA, 2016). A flavona quercetina, por exemplo, (figura 4) possui propriedades de grande interesse, entre elas estão seus efeitos anticarcinogênicos, protetores do sistema renal, cardiovascular e hepático (SIMÕES et al., 2013).

**Figura 4:** Representação esquemática da estrutura química do flavonoide quercetina.



Fonte: Simões et al. (2013).

## 2.4 Flavonoides e propriedades farmacológicas

Segundo Cushnie e Lamb (2005), por séculos preparações de plantas ricas em flavonoides foram usadas por médicos e curandeiros na tentativa de tratar diversas enfermidades humanas. No antigo testamento, estão descritas as propriedades curativas da própolis, prescrito para o tratamento de feridas e úlceras por Hipócrates na Grécia Antiga (COWAN, 1999). As propriedades antimicrobianas deste bálsamo foram atribuídas principalmente aos seus flavonoides galangina, pinocembrina e crisina (CUSHNIE; LAMB, 2005; FORT; MORAES; PARK, 2016).

A ação antioxidante dos flavonoides, por sua vez, decorre de sua capacidade de reduzir a formação de radicais livres e neutralizar as espécies oxidantes, e é uma característica que depende de sua estrutura molecular. Quimicamente, são três as características que conferem aos flavonoides suas importantes propriedades antioxidantes (WANG et al, 2017). São elas: substituintes doadores de hidrogênio (grupos hidroxilos fenólicos), que permitem aos flavonoides sofrer uma reação *redox* que os ajuda a capturar radicais livres mais facilmente; um sistema de deslocamento estável (anéis aromáticos e heterociclos e múltiplas uniões insaturadas), que ajuda a deslocar a distribuição de elétrons e a presença de certos grupos estruturais capazes de formar complexos quelantes de metais de transição que podem regular a produção de espécies reativas de oxigênio (ROMÃO, 2016). A quercetina (3,5,7,3',4'-pentahidroxi-flavona) e três flavonoides com estruturas semelhantes miricetina (5,7,3',4',5'-pentahidroxi-flavona), fisetina (3,5,4',5'-tetrahidroxi-flavona) e luteolina (5,7,3',4'-tetrahidroxi-flavona), por exemplo, mostraram atividade citoprotetora *in vitro* em modelos de apoptose induzida por peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em células PC12 (DAJAS et al., 2003).

Nos últimos anos, foram publicados numerosos trabalhos sobre a atividade antioxidante *in vitro* destes compostos e a relação estrutura-atividade antioxidante (MODAK et al., 2005, MONTORO et al., 2005; SINDHU; JOSE, 2016; MANOHAR, 2017). No entanto, sua eficácia antioxidante *in vivo* é bastante negligenciada, provavelmente, por conta do limitado conhecimento sobre parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos, como absorção, biodisponibilidade e metabolismo (WILHELM FILHO et al., 2001).

Flavonóides, geralmente, são fáceis e irreversivelmente oxidados a p-hidroquinona, a qual, em uma reação reversível, é oxidada a p-quinona. Este último é facilmente polimerizado e posteriormente excretado. Então, os flavonoides são inativados por oxidação, o que justifica seu alto potencial antioxidante e baixo potencial pró-oxidante; além disso, perdem elétrons mais facilmente do que ganham (CAI et al., 1999; HAVSTEEN, 2002).

Estes compostos são capazes de proteger ácidos graxos insaturados de membranas celulares e antioxidantes endógenos da oxidação (YOKOMIZO; MORIWAKI, 2005) e suprimem a produção de peroxinitrito (ONOO-), um dos maiores causadores de danos oxidativos em situações de sepse (HAENEN et al., 1997).

Os flavonoides podem exercer ainda efeito anti-inflamatório através da inibição das enzimas ciclooxigenase (COX) e/ou lipoxigenase (VIJAYALAKSHMI; RAVICHANDIRAN; MASILAMANI, 2017). Os compostos 5,7,3',4'-tetrahidroxi-6-metoxiflavona e 5,7,4'-trihidroxi-6,3'-dimetoxiflavona inibem tanto a enzima COX quanto a lipoxigenase. Outros flavonoides com atividade anti-inflamatória são a apigenina (5,7,4'-trihidroxiflavona) e a quercetina, sendo a primeira capaz de inibir o crescimento dos fibroblastos (HARBONE; WILLIAMS, 2000; COMPAORÉ, 2016).

A atividade citotóxica de flavonoides e sua utilização como substâncias potencialmente anticancerígenas tem sido demonstradas em muitos trabalhos. Dois flavonoides isolados de *Amburana cearensis* (A.C. Smith), o isocampferídeo (3-metoxi-5,7,4'-trihidroxiflavona) e o canferol (3,5,7,4'-tetrahidroxiflavona) apresentaram atividade citotóxica em diferentes linhagens de células tumorais humanas, *in vitro*, com IC<sub>50</sub> (concentração de inibição de 50% do crescimento) variando de 2,6 a 5,5 µg/mL e 11,5 a 22,7 µg/mL, respectivamente. A única diferença na estrutura desses compostos é a presença da metoxila no carbono 3 do anel C, no lugar de uma hidroxila, demonstrando que a metoxila aumenta a atividade citotóxica (COSTA-LOTUFO et al., 2003; PEREIRA et al., 2016). A acacetina (5,7-dihidroxy-4'-metoxiflavona), flavonoide com capacidade de induzir apoptose (XI et al., 2015), inibe a proliferação do carcinoma de fígado humano (Hep G2) com tratamento de 48 horas, apresentando IC<sub>50</sub> de 10,44 µg/mL em trabalho realizado por Hsu e colaboradores (2004).

Outra subárea farmacológica da qual este grupo vem ganhando destaque é a de antibacterianos. Nos últimos anos, muitos flavonoides têm sido avaliados não somente pela capacidade antibacteriana, mas também como agente modificador de

resistência a antimicrobianos nas bactérias (GIBBONS, 2004; RESHMA et al., 2017). Várias pesquisas demonstraram a potente atividade antibacteriana destes compostos (NASCIMENTO et al., 2000; SINDHU; JOSE, 2017; RUNYORO; NGASSAPA; KAMUGISHA, 2017).

Dado o enorme potencial farmacológico dos flavonoides, sua diversidade molecular e ubiquidade nos vegetais, o presente estudo foi dirigido à prospecção destes nas folhas do jaborandi.

## 2.5 Jaborandi

### 2.5.1 Botânica e ocorrência

O gênero *Pilocarpus* pertence a subclasse Pilocarpinae, tribo Cusparieae, subfamília Rutoideae, da família Rutaceae (LIMA, 2016). Diversas famílias de plantas já foram identificadas como jaborandi, como algumas espécies de *Piper* (Piperaceae), *Verbena* (Verbenaceae) e *Herpestis* (Bacopa, Scrophulariaceae), e também outras espécies Rutaceae, como os gêneros *Esenbeckia*, *Zanthoxylum* e *Monnieria* (PINHEIRO, 2002; LIMA; ROCHA; ROSSI, 2015; GUMIER-COSTA et al., 2016;). No entanto, o verdadeiro jaborandi pertence ao gênero *Pilocarpus*, com 18 espécies descritas para o Brasil, segundo Joseph (1967) ou apenas de 13 espécies, 7 subespécies e 8 variedades de acordo com Taveira et al. (2003) de distribuição entre os trópicos de câncer e capricórnio, ocorrendo principalmente na América Latina (ROMERO, 2005).

A palavra Jaborandi deriva do tupi guarani “*y-ambor-endi*”, significa aquele que causa gotejamento na boca (HOLMSTED et al., 1975), fazendo alusão à ação agonista colinérgica da pilocarpina em receptores muscarínicos do tipo M3 nas glândulas salivares promovendo um aumento considerável na salivação (LIMA, 2016).

A espécie *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardeworth (Rutaceae) se destaca como uma das mais importantes da flora brasileira já utilizada há séculos pelos indígenas e comunidades tradicionais. Trata-se de um arbusto ou arvoreta de 3-7,5 m de altura (figura 5) de grande ocorrência no Brasil na região Nordeste (Maranhão e Piauí) e Norte (Pará) (TAVEIRA et al., 2003; FLORA DO BRASIL, 2016).

Segundo Skorupa (2000), é freqüentemente encontrada em florestas ombrófilas densas, e também em afloramentos rochosos em que as matas são menos densas. No interior das matas é encontrado, preferencialmente, em ambientes mais iluminados, como em clareiras. Apresentam folhas compostas medindo, em média, 40 cm e folíolos coriáceos, de forma lanceolada. As flores são pequenas arranjadas em ráculos (cachos) compactos. Os frutos estão organizados em cachos brancos contidos em cápsulas de córtex acinzentado e liso (SABÁ et al., 2002).

**Figura 5:** Planta arbustiva *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardeworth.



Fonte: Acervo pessoal.

### 2.5.2 Propriedades farmacológicas do jaborandi e principais componentes

Entre as plantas que possuem efeito medicinal comprovado, o jaborandi é considerado planta obrigatória em programas de conservação (VIEIRA, 1999). Das suas folhas, são extraídas sais de pilocarpina, um alcaloide imidazólico utilizado na fabricação de um colírio que contrai a pupila, indicado para o controle de tipos primários de glaucoma (GUMIER-COSTA et al, 2016). Dentre as treze espécies do gênero que ocorrem no Brasil, *P. microphyllus* é considerado o jaborandi verdadeiro por possuir maiores teores de pilocarpina em suas folhas e, por isso, é a espécie mais usada para a aquisição deste alcaloide (COSTA, 2005; SANDHU et al., 2006; GRABHER, 2015).

A pilocarpina não apresenta efeitos colaterais, ao contrário das demais utilizadas no controle do glaucoma. Por esta razão, nos anos 80, iniciou-se uma intensa corrida para a exploração das folhas do jaborandi pelas indústrias farmacêuticas, a coleta das folhas passou a ser uma atividade quase predatória. No final desta mesma década, a extração atingiu seu clímax. Tal fato teve muitos efeitos negativos para a população nativa do jaborandi, uma vez que a coleta das folhas deixava as plantas muito danificadas, levando-as à morte. Em 1992, o IBAMA classificou o jaborandi como espécie em extinção. Frente à redução dos recursos naturais, principalmente, no estado do Maranhão. As indústrias farmacêuticas passaram, então, a desenvolver meios para domesticar o jaborandi (SCHEERER, 2000; PINHEIRO, 2002; GUMIER-COSTA et al., 2016). A Embrapa Amazônia Oriental (Brasil), por sua vez, criou, ainda em 1992, um banco de germoplasma visando a domesticação e conservação da espécie (SABÁ et al., 2002; MOURA et al., 2005).

A espécie *P. microphyllus* também é conhecida no leste da Amazônia como "jaborandi-do-maranhão", e suas folhas são usadas na medicina popular como diurético, sudorífico, digestivo, sialogogo, tônico capilar e para a inflamação dos olhos (TAVEIRA et al., 2003).

Nas espécies do jaborandi já foram identificados vários outros alcaloides: isopilocarpina, pilocarpidina, isopilocarpidina, pilosina, isopilosina, epiisopilosina, epiisopiloturina, 13-nor(11)-dehidro-pilocarpina, N,N-dimetil-5-metoxi-triptamina,

N,N-dimetiltriptamina, plastidesmina, (1H)-4-metoxi-2-quinolona e dictamina. Alguns deles já tiveram as suas estruturas determinadas por RMN (SANTOS; MORENO, 2004; ; LIMA, 2016; ROCHA, 2017).

A epiisopiloturina demonstrou excelente atividade, *in vitro*, contra as formas adulto e jovem de *Schistosoma mansoni* (BH strain, Belo Horizonte, Brasil) na concentração de 150 µg/mL e 300 µg/mL, respectivamente. Além da morte, a dose sub-letal (100 µg/mL) deste alcaloide promove a redução total da postura de ovos por casal de vermes emparelhados, obtendo melhor atividade que o praziquantel, fármaco padrão de referência. Portanto, a epiisopiloturina representa uma alternativa promissora na intervenção terapêutica contra a esquistossomose, uma vez que não mostrou citotoxicidade para macrófagos peritoneais, e pode ser obtido, em grande escala, de forma sustentável e econômica (LEITE et al., 2009; VERAS et al., 2012).

Taveira et al. (2003) analisou os óleos essenciais obtidos por hidrodestilação das folhas e galhos finos de *P. microphyllus*, coletados no sudeste do Estado do Pará (Brasil) durante as estações chuvosa e seca e os avaliou por GC-MS. Os principais compostos identificados foram 2-tridecanona, β-cariofileno, 2-pentadecanona, óxido de cariofileno e germacreno D. O estudo observou ainda uma variação sazonal dos teores percentuais destes componentes variados, sendo os maiores valores detectados na estação chuvosa. Para 2-tridecanona os valores mais elevados foram observados nos óleos de galhos finos, por outro lado, para β-cariofileno, 2-pentadecanona, óxido de cariofileno e germacreno D, os maiores números estavam nos óleos das folhas. Tais resultados apontam que, mesmo para a mesma espécie, os óleos das folhas e os dos galhos finos se apresentam distintos quanto a sua composição.

Apesar das folhas *P. microphyllus* ser um produto de enorme valor comercial, estudos prospectivos para as demais classes de metabólitos secundários, tais quais os flavonoides, ainda são incipientes, embora as propriedades farmacológicas excepcionais desses compostos tenham ganhado muito espaço nos últimos anos.

Bertrand, Fabre, Moulis (2001), isolaram e identificaram quatro flavonoides (tabela 1), dois terpenóides e uma mistura de três poliprenóis das folhas de *Pilocarpus trachylophus* Holmes.

**Tabela 1.** Flavonoides isolados de *P. trachyllophus* e atividade biológica relatada.

FLAVONOIDES	ATIVIDADE	REFERÊNCIAS
3,4',5,7-tetrahydroxy-3',6-dimethoxyflavone 3-O-β-D-rutinoside	-	Bertrand <i>et al.</i> , 2001
3,4',5,7-tetrahydroxy-6-methoxyflavone 3-O-β-D-rutinoside	-	Bertrand <i>et al.</i> , 2001
Patuletin 3-O-β-D-rutinoside	Antioxidante	Bertrand <i>et al.</i> , 2001
Axilarina	Antioxidante	Bertrand <i>et al.</i> , 2001 Kim <i>et al.</i> , 2002
Heperidina	Antioxidante Sedativa	Andrade <i>et al.</i> , 1996 Kim <i>et al.</i> , 2002

Fonte: Santos; Moreno, 2004

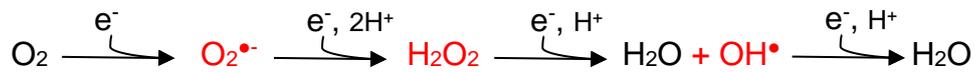
A hesperidina isolada de *P. trachyllophus* (BERTRAND *et al.*, 2001) também foi encontrada em outras Rutaceae, como em espécies de *Citrus* e *Zanthoxylum* (KANE *et al.*, 1993). Este flavonoide tem várias atividades farmacológicas, algumas delas são anti-inflamatória, bactericida, fungicida, antiviral, abortiva, analgésica e antipirética (GARG *et al.*, 2001).

## 2.6 Estresse oxidativo e defesas antioxidantes

Encontramos frequentemente em textos científicos a expressão “radical livre”, que se origina da tradução do inglês *free radical*. Esta expressão não está verdadeiramente correta do ponto de vista químico, uma vez que todo radical apresenta em sua última camada elétrons livres. Para entender o que é um radical, deve-se compreender que os elétrons de um átomo estão distribuídos em níveis e em subníveis de energia (COTINGUIBA, *et al.*, 2015). Nestes subníveis, os elétrons se dispõem em orbitais e possuem spins, isto é, momento magnético, os quais são expressos pelos números quânticos  $+ \frac{1}{2}$  e  $- \frac{1}{2}$ . De acordo com o princípio de Pauli, dois elétrons ocupando o mesmo orbital, apresentam spins opostos e, portanto, o momento magnético é zero para espécies com elétrons pareados. Entretanto, nos radicais, existe um saldo no momento magnético, pois estas espécies apresentam número ímpar de elétrons na última camada, tornando-as então espécies paramagnéticas (VILLA, 2006; SANTOS, 2014; DE JESUS *et al.*, 2015).

Os radicais são altamente reativos e danosos aos constituintes celulares (DE VASCONCELOS, 2015), ao mesmo tempo, possuem um importante papel na homeostase celular. São formados naturalmente durante os metabolismo celular aeróbico com a produção de ATP, que ocorre por meio da transferência de elétrons ao longo da cadeia mitocondrial. Para a realização desses processos bioquímicos é necessária a presença de oxigênio ( $O_2$ ), porém, sua estrutura eletrônica com dois elétrons desemparelhados favorece a formação de intermediários metabólicos, as chamadas espécies reativas de oxigênio (EROs) (KEHRER; KLOTZ, 2015). Essas moléculas são potentes oxidantes e responsáveis pela toxicidade do  $O_2$ . O ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) são as EROs formadas durante a redução do oxigênio à água (KOHEN; NYSKA, 2002; HORST, 2011). A figura 6 abaixo mostra a formação das EROs.

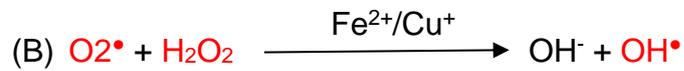
**Figura 6:** Geração das EROs a partir da redução monovalente do  $O_2$  à água. Durante esse processo o  $O_2$  recebe um elétron por vez.



Fonte: Adptado de Koury e Donangelo, 2003.

Níveis elevados de EROs são citotóxicos e podem reagir com qualquer molécula biológica e, assim, resultar em danos que incluem a morte celular, mutações, aberrações cromossômicas e carcinogênese (FILHO-CIDRAL, 2013). O  $O_2^{\bullet-}$  apresenta menor reatividade e por isto pode difundir-se por distâncias consideráveis até encontrar um alvo. Assim, este pode provocar grandes danos celulares por meio da formação de radicais OH. O radical hidroxil, por sua vez, é a ERO com maior reatividade e toxicidade, pois inicia rapidamente as reações em cadeia que formam lipoperóxidos e radicais orgânicos, os quais são altamente prejudiciais à atividade celular normal. O  $H_2O_2$  não é um radical, por não possuir elétrons desemparelhados, mas é um agente oxidante, pois na presença de metais de transição essa ERO leva a formação do radical hidroxil, que é representada pela reação de Fenton (figura 7 A). O ânion superóxido, juntamente com o  $H_2O_2$ , participa da formação do radical hidroxil através da reação de Haber-Weiss (figura 7, B) (VASCONCELOS, 2005; VALKO et al., 2007; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

**Figura 7:** (A) Reação de Fenton: a formação de  $\text{OH}^\bullet$  pela reação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  com  $\text{Fe}^{2+}$ . (B) Reação de Haber -Weiss: o  $\text{OH}^\bullet$  é formado a partir de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



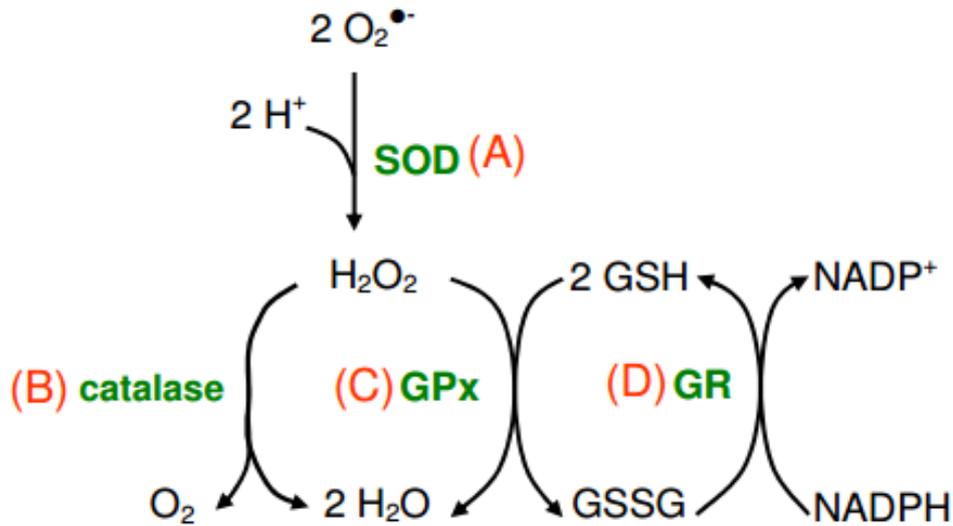
Fonte: Adaptado de Falco e colaboradores, 2015.

Estima-se que cerca de 1-4% do oxigênio utilizado na célula é incompletamente reduzido pela ação da enzima citocromo mitocondrial devido ao “escape fisiológico” durante a produção de ATP (GUEDES, 2007; AUMONDE et al, 2015).

Um dos efeitos mais destrutivos das EROs é a iniciação da peroxidação lipídica, que pode levar à destruição da membrana celular, com graves repercussões metabólicas, sendo este um dos eventos oxidativos mais freqüentes em nosso organismo (OGA, 2003; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

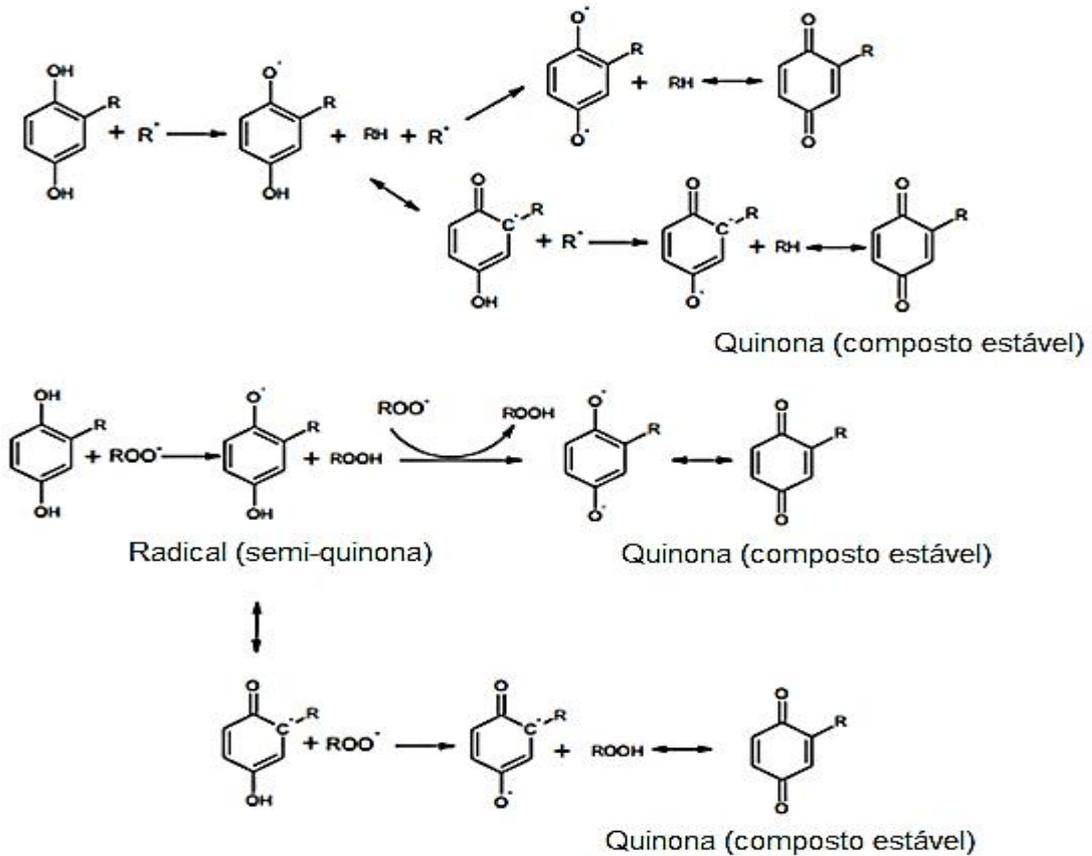
Fisiologicamente, deve haver um equilíbrio entre a produção de radicais e a atividade de sistemas de defesa antioxidante (figura 8). A concentração de EROs intracelular depende da produção e/ou remoção do sistema antioxidante (ASLANI; GHOBADI, 2016). Em geral, as células contêm um grande número de moléculas antioxidantes, chamadas de *scavengers*, que previnem ou reparam os danos causados pelas EROs, bem como regulam as vias de sinalização redox-sensíveis. Algumas das enzimas antioxidantes primárias contidas em células de mamíferos são a superóxido dismutase, a catalase, a peroxidase e a glutathiona peroxidase (figura 8) (SCHENK; FULDA, 2015). Além das defesas enzimáticas, as células possuem defesas não-enzimáticas, tais como as vitaminas C e E, carotenoides, flavonoides, pigmentos biliares, urato e os tióis (JAMES et al., 2012). O mecanismo de ação dos antioxidantes (figura 9) é bem variado, desde a remoção do oxigênio do meio, a varredura das EROs, o sequestro dos metais catalizadores da formação de EROs, o aumento da geração de antioxidantes endógenos ou mesmo a interação de mais de um destes mecanismos (WEYDERT; CULLEN, 2010; ASLANI; GHOBADI, 2016).

**Figura 8:** Sistema de proteção enzimático antioxidante.



Legenda: (A) Formação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pela superóxido dismutase (SOD). (B) Redução do  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$  pela catalase. (C) Redução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  à  $\text{H}_2\text{O}$  pela glutatona peroxidase (GPx), o que resulta na formação de dissulfeto de glutatona (GSSG) a partir da glutatona reduzida (GSH). (D) Regeneração da GSSG pela glutatona redutase (GR). Fonte: Adaptado de Garófalo, 2010.

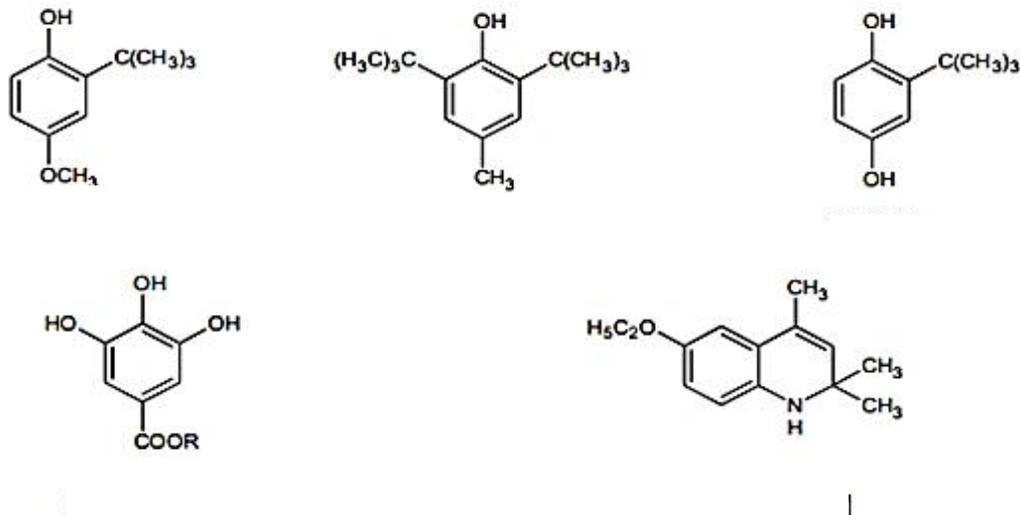
**Figura 9:** Mecanismo de ação antioxidante diante de um radical.



Legenda: R= grupo alquila;  $\text{R}^{\bullet}$ = radical do ácido graxo;  $\text{ROO}^{\bullet}$ = radical peróxido; RH= ácido graxo; ROOH= composto hidroperóxido. Fonte: Adaptado de Garófalo, 2010.

Uma ampla definição para antioxidante pode ser: “qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparada ao substrato oxidante, retarda ou inibe o processo de oxidação” (VILA, 2006). Não obstante, do ponto de vista biológico, define-se antioxidantes como compostos que protegem sistemas biológicos contra efeitos potencialmente lesivos de processos ou reações que promovem a oxidação de macromoléculas ou de estruturas celulares (OGA, 2003; BARBOSA, 2016).

**Figura 10:** Estrutura química dos antioxidantes sintéticos mais conhecidos.



Fonte: Adaptado de Ramalho, 2006.

O ascorbato e a glutathiona são os antioxidantes de baixo peso molecular mais abundantes no Sistema Nervoso Central (SNC), estando o primeiro em maior concentração em neurônios e o segundo em células da glia (BASHRI; PRASAD, 2016).

As EROs também estão envolvidas em diversos processos fisiológicos (FINKEL; HOLBROOK, 2000; KEHRER; KLOTZ, 2015), como em mecanismos de defesa (NASCIMENTO; BARRIGOSI, 2014) e processos proliferativos (DRÖGE, 2002). Estas moléculas podem regular a condutância iônica nas membranas e a liberação de neurotransmissores e participam ainda dos processos de sinalização celular (CHEN et al., 2002; CANATA, 2016) como a ativação de guanilato ciclase que culmina na formação de GMPc (guanilato monofosfato cíclico) (RIBEIRO et al., 2013), dentre outras.

No entanto, as EROs estão envolvidas na gênese de várias doenças devido aos danos ocasionados aos constituintes celulares (LEROUET et al., 2002; BOLL et al., 2003; DE LIMA JUNIOR; BUGS; DE OLIVEIRA, 2016), incluindo doenças cardiovasculares, respiratórias, doenças neurodegenerativas e gastrointestinais, sendo ainda associado ao envelhecimento e à dor, incluindo a dor neuropática (YOUNG; WOODSIDE, 2001; KIM; SHIN; LEE, 2012).

Além das EROs, outros radicais também podem interferir nos processos fisiológicos celulares, como é o caso das espécies reativas de nitrogênio (ERN). O óxido nítrico (NO), além de participar da transmissão sináptica no SNC, apresenta efeitos citotóxicos, pois pode combinar-se com o ânion superóxido formando ONOO<sup>-</sup>, uma ERN altamente reativa que pode danificar diversos constituintes celulares (RADI et al., 2002; KAMDEM, 2013).

O estresse oxidativo ou o estresse nitrosativo ocorrem quando são evidenciados os efeitos nocivos das ERO e ERN, respectivamente, ou seja, quando as defesas apresentam-se reduzidas ou a produção dessas moléculas tóxicas torna-se demasiadamente aumentada. Nesses casos, ocorre dano a macromoléculas, tais como proteínas, DNA e lipídios (VALKO et al., 2007; SCHENK; FULDA, 2015).

As ERO e ERN estão intimamente ligadas aos mecanismos envolvidos nos processos de nociceptivos. A ativação de nociceptores provoca liberação de glutamato e ativação de seus receptores, ocasionando posteriormente produção de NO, eventos-chaves na sensação dolorosa e hiperexcitabilidade da medula espinal (CHEN et al., 2004; XU et al., 2007; RAMOS, 2013). O NO é produzido a partir da L-arginina pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Os neurônios da medula espinal possuem NOS e o aumento bilateral da atividade desta enzima após estímulo nocivo sugere participação do NO no processamento da informação nociceptiva (LAM et al., 2003; BELLÓ et al., 2013). Esta molécula, por sua vez, parece participar também de mecanismos antinociceptivos (KHALIL; KHODR, 2001); porém, um excesso na sua produção promove dano tecidual em virtude do aumento de radicais (LEVY; ZOCHODNE, 2004; KRÜGER et al., 2015).

Foi sugerido que o aumento dos disparos dos nociceptores após dor neuropática, e a conseqüente ativação de células na medula espinal, ocasionaria, nesta região do SNC, acréscimos na respiração mitocondrial e influxo de cálcio no meio intracelular com conseqüente aumento na produção de ERO e NO (NAIK et al., 2006; CURY et al., 2011).

Nas últimas décadas, foram realizadas inúmeras pesquisas para esclarecer o papel dos radicais em processos fisiopatológicos como envelhecimento e doenças degenerativas associadas ao envelhecimento: câncer, aterosclerose, inflamação, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (COTINGUIBA et al., 2015).

## **2.7 Dor neuropática e EROs**

De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, *International Association for the Study of Pain*), a dor é uma experiência sensorial desagradável adjunta a um dano tecidual real ou potencial ou descrita em termos que arremete tal dano, envolvendo não somente componentes sensoriais, como também emocionais (LOESER; TREEDE, 2008; VICENTE, 2016 CARDOSO et a, 2016).

Existe um intrincado trajeto envolvendo diferentes regiões do sistema nervoso no estímulo nocivo percebido como doloroso. No entanto, nem sempre um estímulo periférico é necessário para que ocorra a sensação de dor (ex. dor talâmica) e, em contrapartida, pode haver estimulação nociceptiva sem que ocorra dor (LOPES, 2004; SAGALAJEV et al., 2017). Nesse contexto, é importante distinguir o fenômeno de dor, que é subjetivo, do fenômeno de nocicepção, que diz respeito aos processos neurais de codificação e processamento do estímulo nocivo (LOESER; TREEDE, 2008). Desta forma, nocicepção aparece como objeto de estudo mais adequado nas abordagens para a compreensão da dor em que são empregados modelos animais, incapazes de verbalizar sua percepção do fenômeno doloroso (KAVALIERS, 1988).

A dor nociceptiva tem como principal desígnio sinalizar o acometimento de processos danosos à integridade física e decorre da ativação fisiológica dos nociceptores (terminações nervosas de alto limiar que são ativados por estímulos químicos, térmicos ou mecânicos intensos). Desta forma, a sensação de dor está diretamente relacionada à presença do estímulo nocivo, e cessa assim que este se encerra ou, havendo dano tecidual (não neural) e consequente processo inflamatório, sua duração é limitada ao processo de cura da lesão (BONICA; LOESER, 2001; POVOROZNIUK; PRYIMYCH, 2016). A dor neuropática (DNP), por sua vez, decorre de uma lesão ou doença que atinge o sistema somatossensorial (NICKEL et al., 2012) por meio de traumas mecânicos, distúrbios metabólicos ou nutricionais (diabetes,

hipotireoidismo, pelagra), alcoolismo, uso de fármacos (anti-retrovirais, anti-neoplásicos), exposição a toxinas (acrilamida, óxido de etileno, arsênio), neoplasias, lesões vasculares (isquemia, hemorragias, malformações), entre outros (BARON; BINDER; WASNER, 2010; ZENG; ALONGKRONRUSMEE; VAN RIJN, 2017).

A IASP define DNP como “dor iniciada ou causada por lesão primária, disfunção, ou perturbação transitória do sistema nervoso central ou periférico”. É um acometimento relativamente comum, com incidência estimada na população mundial em torno de 1 a 3% (BOUHASSIRA et al., 2008; CHEN et al., 2017). Pode ser contínua ou episódica e é percebida de várias maneiras, como por exemplo, queimação, formigamento, em picadas, tipo choque elétrico, na forma de espasmo ou frio (ECKELI; TEIXEIRA; GOUVÊA, 2016).

Tanto o sistema nervoso periférico quanto o central podem ser acometidos por tais injúrias, o que caracteriza a DNP periférica ou central, respectivamente. Como resultado, ocorrem diversas alterações (ditas mal adaptativas) ao longo de todo neuroeixo (COHEN; MAO, 2014). A partir da sensibilização podem surgir alterações sensoriais características da dor patológica que são observadas através da existência de hiperalgesia e alodínia. A hiperalgesia é definida como um aumento da sensibilidade aos estímulos potencialmente nocivos, enquanto que a alodínia representa uma reposta dolorosa a estímulos considerados inócuos (GUEDES, 2007; SCHESTATSKY, 2008; DA SILVA; MEDEIROS; SCHIRMANN, 2012).

A sequência de eventos que pode ocorrer no nervo após a indução da lesão (SAADE; JABBUR, 2008) incluem: (1) produção de disparos nervosos ocasionados pela lesão, que podem se estender por um longo período de tempo; (2) liberação de neuropeptídeos e outros mediadores pró-inflamatórios no local da lesão bem como no SNC; (3) sensibilização de nociceptores e ativação de nociceptores silenciosos por meio da liberação de mediadores inflamatórios ou expressão de novos receptores ou canais iônicos; (4) mudanças na expressão gênica e na expressão de diversos peptídeos e receptores; (5) crescimento anormal de fibras nervosas periféricas e centrais; (6) mudanças nos campos receptivos de fibras nervosas periféricas lesionadas e intactas.

A compreensão dos mecanismos abrangidos na nocicepção possibilita o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o alívio da dor (JULIÃO et al., 2011). Por esta razão, esse tema é foco de vários estudos no mundo. Entretanto, apesar do grande número de publicações e do conhecimento cada vez mais

aprofundado sobre os mecanismos fisiológicos relacionados à nocicepção, ainda existem muitas questões sem resposta, especialmente em relação ao tratamento de casos clínicos de dor crônica (CRUCCU, 2007; VANOTTI et al., 2007; WU et al., 2007).

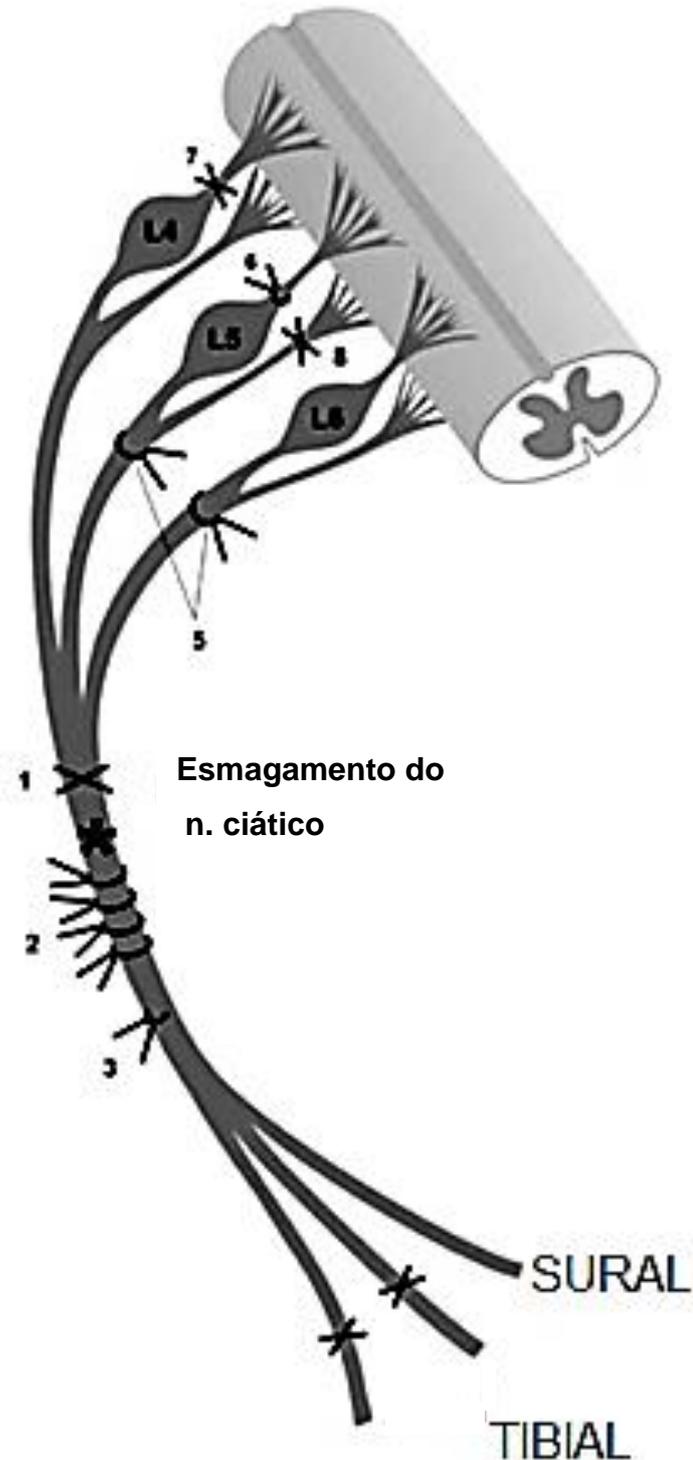
Por sua complexidade, a DNP, geralmente crônica e incapacitante, é um desafio para os profissionais da área. O tratamento baseado nas etiologias não é eficaz por virtude da maior importância representada pelos mecanismos subjacentes à expressão dolorosa. Contudo, o tratamento da etiologia obviamente deve ser realizado buscando minimizar os mecanismos e sintomas (ALVES NETO et al., 2009; WANG et al., 2016).

Em muitos casos, a DNP é resistente ou pouco responsiva a AINEs e opioides, no entanto, pode responder a fármacos antiepilépticos, antidepressivos, ou anestésicos (DWORKIN et al., 2003; ATTAL et al., 2010). Entretanto, estas drogas apresentam limitada eficácia e/ou significativos efeitos adversos que comprometem sua utilização por um período prolongado (BARON, 2009; KOPSKY, 2016).

Os modelos animais são amplamente utilizados nos estudos sobre a nocicepção (ANDRADE, 2016). Embora não possuam capacidade de comunicação verbal, quando em contato com estímulos nocivos, os animais exibem respostas motoras similares aos humanos. Tais respostas permitem inferir sobre a existência de dor (DUBNER, 1983; KAVALIERS, 1988; MORRIS, 2016). A hiperalgesia e a alodínia são exemplos dessas respostas, ou seja, são alterações sensoriais observadas após a indução de dor (DA SILVA; MEDEIROS; SCHIRMANN, 2012).

Atualmente, há uma grande variedade de modelos animais úteis para o estudo da dor DNP associada a diversas etiologias e relacionada a um quadro extenso de manifestações clínicas de neuropatias periféricas (MORRIS, 2016). Assim, a DNP pode ser induzida por lesão mecânica (secção; esmagamento ou compressão), química, metabólica ou imunológica dirigida ao nervo, gânglio ou medula espinal. A figura 11 demonstra as lesões especificamente geradas por trauma físico do nervo periférico (KLUSAKOVA; DUBOVY, 2009).

**Figura 11:** Modelos experimentais de dor neuropática.



Legenda: Ligadura de raízes (SNL), constrição crônica do nervo (CCI), rizotomia, lesão poupadora de nervo, ligadura parcial do nervo (PNL), conclusão mecânica da medula. (1) Transecção do nervo isquiático (BISCOLA, 2016). (2) Lesão por constrição crônica (SOUZA, 2015). (3) Ligadura parcial do nervo isquiático (DA SILVA; DA SILVA; CARPES, 2014). (4) Modelo de lesão do nervo poupada (SCHEID, 2014). (5) Ligadura dos nervos espinais L5/L6 (MORIARTY et al., 2016). (6) Constrição da raiz dorsal (MIYAKAWA et al., 2014). (7) Rizotomia dorsal (JOSENBY et al., 2014). (8) Rizotomia Ventral (LI et al., 2016). Fonte: Adaptado de Klusakova e Dubovy (2009). Ilustração esquemática dos modelos experimentais de dor neuropática, com base em danos às estruturas nervosas periféricas: \*Esmagamento do nervo isquiático.

**Tabela 2.** Modelos de indução de DNP em animais.

<b>Dor central</b>	<b>Injúria nervosa periférica</b>	<b>Induzida por patologias</b>	<b>Induzida por quimioterápicos</b>	<b>Induzida por irritação</b>
<b>Síndrome talâmica</b>	Nervo ciático	Pós-herpética	Vincristina	Irritação espontânea
<b>Injúria da espinha dorsal</b>	Plexo branquial	Associada ao vírus do HIV	Paclitaxel	Gênica
<b>Excitotóxico</b>	Ligação nervosa espinhal	Esclerose múltipla	Cisplatina	
<b>Fotoquímico</b>	Injúria parcial do nervo da cauda e da safena	Neuropatia Diabética periférica		
	Neuralgia trigeminal	Relacionada ao Câncer		

Fonte: Adaptado de Sousa et al., 2016.

O modelo de compressão do nervo ciático ou isquiático (CCI, do inglês *Chronic Constriction Injury*) utilizado neste trabalho é um dos modelos mais empregados para analisar a DNP periférica, simulando muitas síndromes dolorosas dos humanos onde o nervo é comprimido, como é o caso da Síndrome do Túnel do Carpo. Neste modelo a estrutura do nervo é preservada ao menos em parte, facilitando a regeneração e seu estudo, bem como a avaliação da hipersensibilidade aos estímulos mecânico e DNP observada em humanos (KONTINEN; MEERT, 2002; SOUZA, 2015). Finalmente, este modelo é de fácil execução e alta reprodutibilidade (BEZERRA; MAIA; GUZEN, 2016) exigindo o mínimo de conhecimento de técnica microcirúrgica e de instrumental e com reduzido custo de material (BOCCABELLA et al., 1964).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Extrair e identificar flavonoides das folhas de *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardeworth, bem como avaliar seu potencial farmacológico em modelos *in vitro* e *in vivo*.

#### 3.2 Específicos

- Extrair flavonoides das folhas de *P. microphyllus* a partir do extrato etanólico (EE), extrato metanólico (EM) e fração acetato de etila (FACOEt) do extrato que obtiver melhor rendimento;
- Caracterizar a FACOEt por técnicas analíticas como espectrofotometria UV-Visível e Infravermelho, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Espectrometria de Massas e voltametria cíclica.
- Comparar os resultados obtidos nos ensaios de caracterização da FACOEt para estabelecer uma relação entre a estrutura química do(s) principal(is) componente(s) e classificação quanto as subclasses de flavonoides.
- Avaliar o potencial antioxidante *in vitro* da FACOEt pelo teste DPPH, ABTS e voltametria cíclica;
- Verificar o perfil de proteção da FACOEt contra a dor neuropática *in vivo* por modelo de indução por constricção do nervo isquiático.

## **4. METODOLOGIA**

Na primeira etapa deste trabalho, a meta foi a obtenção da fração acetato de etila (FAcOEt) das folhas do jaborandi, uma vez que a literatura a apontou como eficaz para extração de grande número de flavonoides (KEINÄNEN, 1993; CARDOSO, 2011). Desta forma, optou-se pela produção do extrato metanólico e etanólico, para então, produzir a FAcOEt a partir do extrato que tivesse maior rendimento em massa.

A preparação dos extratos se deu pelo método convencional de maceração das folhas do Jaborandi à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C). Os ensaios de caracterização da FAcOEt, bem como triagem da atividade antioxidante e perfil neuroprotetor foram subsequentes a esta etapa.

Durante a realização de todos os experimentos deste trabalho, a amostra e padrões foram protegidas da luz e calor, a fim de impedir eventuais processos oxidativos e mantidos sobre refrigeração para evitar contaminação microbiana e degradação dos componentes.

### **4.1 Obtenção dos extratos e frações**

#### **4.1.1 Coleta e identificação botânica do material vegetal**

A identificação da espécie foi supervisionada pela Dra. Ivanilza Moreira de Andrade (Departamento de Biologia, Campus Ministro Reis Velloso, UFPI), cujo número de exsicata (TEPB 27152) depositado no Herbário do Centro de Ciências da Natureza, UFPI, Teresina, Piauí. As folhas foram coletadas na cidade de Parnaíba, PI em Junho de 2015.

#### **4.1.2 Preparação do Material Vegetal**

As folhas foram devidamente limpas, para eliminar contaminantes. Após a secagem das folhas em estufa ventilada a temperatura ambiente, as mesmas seguiram para moagem em moinho de facas, obtendo-se o material vegetal bruto.

### 4.1.3 Obtenção dos extratos

O processo de extração foi determinado segundo a metodologia de Mujwah, Mohammed e Ahmed (2010) com algumas modificações.

Para obtenção do extrato metanólico, as folhas moídas (250 g) foram submetidas à maceração exaustiva com 1 L de metanol (MeOH) 85% à temperatura ambiente (25°C) por 5 dias com coleta do filtrado. O MeOH do resíduo foi removido no rotaevaporador, restando uma suspensão aquosa. Em seguida, esta suspensão foi submetida à liofilização, resultando no extrato bruto.

A aquisição do extrato etanólico se deu sob o mesmo processo e proporções ditados para o extrato metanólico. O rendimento foi calculado em percentagem, de acordo com a fórmula:  $[\text{peso extrato bruto (g)}/\text{peso do material vegetal (g)}] \times 100$ . O extrato que obteve melhor rendimento foi dirigido para a etapa posterior de fracionamento.

### 4.1.4 Fracionamento do extrato

Uma porção do extrato metanólico (10g) foi ressuspensa em metanol: água (30:10, v/v) e, em seguida, transferida para um funil de decantação (figura 12). Alíquotas de 50 mL de acetato de etila (AcOEt) foram utilizadas para o fracionamento por partição líquido-líquido. Ao final, foi obtida a FAcOEt. Posteriormente, a fração foi seca em banho-maria (50°C) e seguiu para os ensaios subsequentes.

**Figura 12:** Fracionamento por partição líquido-líquido do extrato em funil de separação.



Fonte: Acervo próprio.

## 4.2 Caracterização dos Extratos e FAcOEt

### 4.2.1 Espectrofotometria UV-VIS

A FAcOEt foi analisada no espectrofotômetro UV Shimadzu (UV-1800), utilizando o programa UV-probe, versão 2.33. A diluição da amostra, incluindo o padrão quercetina, foi realizada em MeOH com concentração de 0,05 mg/mL, e 0,005 mg/mL para a quercetina, em cubetas de quartzo com capacidade para 1,0 mL e caminho óptico de 1 cm. As amostras e padrão foram analisados em temperatura similar (aproximadamente 25°C). A varredura compreendeu  $\lambda$  entre 800 a 200 nm. Os resultados dos espectros de absorbância das amostras determinaram os comprimentos de onda a serem analisados na CLAE.

### 4.2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para este trabalho foi utilizado o Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com detector UV/VIS modelo SPD-20A, utilizando sistema binário de bombeamento LC-6AD e Controlador CBM-20A. O programa de aquisição e processamento de dados empregado foi o *Lc Solution* (versão 1.24 SP1). Soluções da FAcOEt (2 mg/mL), previamente filtrada por membranas com poros 0.22  $\mu$ m, foi submetida à CLAE em análises distintas, a fim de definir o perfil de composição. As condições de análise estão apresentadas na tabela 2. O MeOH utilizado foi da Biosolve Chimie SARL, água (H<sub>2</sub>O) ultrapura Mili-Q e ácido acético (glacial) P.A. (Vetec).

**Tabela 3.** Condições cromatográficas para a análise da FAcOEt por CLAE.

<b>Condições de análise:</b>	
<b>Coluna</b>	Phenomenex Luna C18 250 mm X 4,6 mm x 10 $\mu$ m
<b>Comprimento de onda (<math>\lambda</math>)</b>	260 e 370 nm
<b>Vazão</b>	0,5 mL/min.
<b>Concentração das amostras em MeOH para injeção</b>	2 mg/mL
<b>Volume da injeção</b>	50 $\mu$ L
<b>Fase Móvel</b>	MeOH 1% (v/v) de AcOH (B); H <sub>2</sub> O com 1% (v/v) AcOH (A).
<b>Gradiente</b>	0-5 min.: 10% B 5-20 min.: 50% B 20-40 min.: 50% B 40-50 min.: 100% B 50-70 min.: 10% B

Além da amostra, foi injetado sob as mesmas condições cromatográficas listadas acima uma solução contendo quercetina (0,025 mg/mL em MeOH) como padrão. Os comprimentos de onda analisados foram correspondentes àqueles onde houve evidência de absorção no espectrofotômetro UV-Vis, cujas bandas estavam presentes em todas as amostras incluindo o padrão.

#### 4.2.3 Espectrofotometria de Massas (EM)

O composto majoritário isolado por CLAE da FAcOEt, juntamente com o padrão quercetina (0,1 mg/mL em MeOH), foram submetidos a análise no Espectrômetro de massas da Bruker, com ionização por elétron-spray, quadrupólo e um analisador de massas do tipo *ion trap*. Nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização e dessolvatação hélio como gás de colisão para realização das fragmentações. A detecção foi realizada em modo positivo de ionização sob pressão atmosférica. As condições de ESI-MS utilizadas foram: capilar de + 6000 V e temperatura de dessolvatação de 50°C, bomba de seringa marca Hamilton, com fluxo de 3  $\mu\text{Lmin}^{-1}$ . A aquisição e o processamento de dados foram realizados utilizando o software *Trap control* (versão 3.2).

#### 4.2.4 Caracterização eletroquímica do composto majoritário da FAcOEt por Voltametria Cíclica

Na caracterização eletroquímica foi utilizada a técnica de Voltametria Cíclica (VC) para avaliar os potenciais de oxirredução tanto da quercetina quanto do isolado da FAcOEt obtido por CLAE. Para obtenção dos voltamogramas ciclos utilizou-se um potenciostato/galvanostato da AUTOLAB modelo PGSTAT 128N acoplado a uma célula eletroquímica com capacidade para 10,0 mL de eletrólito suporte e tampa de teflon contendo encaixe para três eletrodos, além de entrada e saída para gás. Como eletrodo de trabalho foi utilizado uma haste de grafite pirolítico (EGP) ( $A = 2,1 \text{ mm}^2$ ) e como contra eletrodo uma placa de platina ( $A = 2,0 \text{ cm}^2$ ). Já o eletrodo de calomelano saturado (ECS) foi utilizado como eletrodo de referência. Durante o registro dos voltamogramas, todos os eletrodos permaneceram imersos numa solução a 0,7 mg/mL de quercetina ou de FAcOEt, solubilizadas em tampão fosfato de potássio (PBS) 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$ , pH 5,6 (eletrólito suporte). Vale ressaltar que o eletrodo de trabalho

passou por um procedimento de limpeza eletroquímica, onde o potencial foi repetidamente ciclado entre - 0,9 V e + 0,9 V para remoção de impurezas do eletrodo, até que a corrente registrada tornou-se constante (por volta do décimo ciclo).

#### **4.2.5 Caracterização da FAcOEt por Espectrofotometria Infravermelho (FT-IR)**

A FAcOEt foi caracterizada através de Espectroscopia do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). Os espectros de FTIR foram coletados utilizando resolução com janela de KBr em um espectrômetro Shimadzu IRAffinity-1 e número de onda na faixa espectral de 4000 – 400  $\text{cm}^{-1}$ , comumente utilizada para caracterização de compostos orgânicos. A partir do gráfico número de onda x frequência, os principais grupos orgânicos presentes na molécula foram identificados.

### **4.3. Ensaio antioxidantes da FAcOEt**

#### **4.3.1. Determinação da Atividade Antioxidante pelo método de captura de radicais DPPH**

Este método se baseia na redução do radical [2,2 difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)], que ao fixar um H (removido do antioxidante em estudo), leva a uma diminuição da absorbância, permitindo calcular, após o estabelecimento do equilíbrio da reação, a quantidade de antioxidante gasta para reduzir 50% do radical DPPH.

Esse teste teve metodologia segundo Lima (2008), desenvolvida por Blois (1958) e adaptado por Brand-Williams (1995). Preparou-se uma solução etanólica de DPPH a 0,3 mM (3,068 mg de DPPH dissolvido em etanol em um balão volumétrico de 26 mL). O padrão foi obtido realizando-se a leitura da absorbância da solução de DPPH sem amostra em espectrofotômetro a 517 nm. A mensuração da atividade antioxidante da FAcOEt por este método foi realizada em triplicata, acrescentando-se, 170  $\mu\text{L}$  de amostra em 830  $\mu\text{L}$  de DPPH, para cada fração e realizando-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 517 nm, após 30 min do início da reação. Foi realizado este procedimento de leitura com cinco diluições/concentração diferentes (0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0 mg/mL) da fração, obtidas a partir de uma solução inicial de 4 mg/mL. O álcool etílico foi utilizado para calibrar o espectrofotômetro.

A queda na leitura da densidade ótica das amostras foi correlacionada com o controle que continha solução de DPPH sem amostra, estabelecendo-se a porcentagem de descoloração do radical DPPH conforme a fórmula abaixo:

$$\% \text{ de proteção} = (\text{Abs controle} - \text{Abs amostra}) \times 100 / \text{Abs controle}$$

Após o cálculo do percentual de proteção plotou-se em gráfico os resultados contendo os valores das concentrações (mg/mL) utilizadas no eixo X e os percentuais de proteção encontrados no eixo Y e foi determinada a equação da reta que foi utilizada para encontrar o valor do EC<sub>50</sub> (quantidade de amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH). Portanto, quanto menor o valor do EC<sub>50</sub>, maior a atividade antioxidante da amostra analisada.

Cálculo do EC<sub>50</sub>:

Equação da reta  $y = ax \pm b$ , onde:

$y = 50\%$  (quantidade em percentual de proteção)

$x = \text{CE}_{50}$  (mg/mL).

Como controle, foi realizado a determinação do CE<sub>50</sub> da vitamina C, um composto com propriedades antioxidante bastante conhecidas, a partir das concentrações de 40, 50, 60, 70 e 80 µg/mL nas mesmas condições de análise que a FAcOEt.

#### **4.3.2 Determinação da Atividade Antioxidante pelo método de captura de radicais ABTS**

Segundo Re et al (1999), inicialmente, o radical ABTS 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) é formado a partir da reação de 7 mM de ABTS com 2,45 mM de persulfato de potássio, os quais foram incubados à temperatura ambiente e na ausência de luz, por 16 horas. Transcorrido esse tempo, a solução foi diluída em etanol até a obtenção de uma solução com absorvância de 0,70 ( $\pm 0,01$ ). Para realizar as análises, foram adicionados 30 µL da amostra diluída a 1970 µL da solução contendo o radical e determinou-se a absorvância em espectrofotômetro

(Shimadzu UV-1800) a 734 nm, após 6 e 30 minutos de reação. Como solução-padrão, usou-se o antioxidante sintético Trolox nas concentrações de 100; 200; 400; 800 e 1.000 mM em etanol. Avaliou-se as seguintes concentrações da fração: 0,2, 0,4, 0,8, 1,0, 1,2 mg/mL. Todas as leituras foram realizadas em triplicata, e os resultados foram expressos em mM de Trolox por grama de FAcOEt. Em seguida, foi realizada a determinação da EC<sub>50</sub> da fração a partir do gráfico relacionando os valores das concentrações (mg/mL) e os percentuais de proteção, semelhante ao calculado pelo método DPPH.

#### **4.3.3 Análise estatística dos ensaios DPPH e ABTS**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio-padrão. Para a comparação das médias aritméticas, empregaram-se a análise de variância (ANOVA) e o Turkey, usando o software Prisma 4.0 (GraphPad). Adotou-se o nível de significância de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ). Para o estudo das correlações lineares das atividades antioxidantes pelo método de captura de ABTS e DPPH, foi utilizado o programa Origin 5.0.

#### **4.3.4 Determinação da Potencial Antioxidante por Voltametria cíclica**

A FAcOEt foi avaliada pela técnica de Voltametria Cíclica (VC) para analisar os potenciais de oxirredução. Para obtenção dos voltamogramas ciclos utilizou-se um bipotenciostato/galvanostato Dropsens  $\mu$ Stat 400 (Metrohm Pensalab). Um volume de 50  $\mu$ L da FAcOEt foi adicionado a 100  $\mu$ L de tampão fosfato de potássio (PBS) 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 6,4, o qual foi utilizado como eletrólito suporte. Dessa mistura foram retirados 100  $\mu$ L e espalhados sobre a superfície de um eletrodo *Screen-printed*, o qual possuía como trabalho o grafite pirolítico, como contra-eletrodo um semicírculo de platina e como referência uma parte de Ag/AgCl. Todas as medidas foram feitas em temperatura ambiente (25° C).

#### **4.4. Determinação da atividade contra dor neuropática pelo método de Indução por compressão do nervo ciático**

##### **4.4.1 Procedimento cirúrgico**

Sob a ação anestésica de cloridrato de xilasina (20 mg/kg, i.p.) associado a cloridrato de cetamina (120 mg/kg, i.p.) foi conseguida a Compressão Parcial do Ciático (CPC). Uma assepsia e tricotomia da região posterior da pata traseira direita de ratas *Wistar* fêmeas foi inicialmente realizada como preparação para o procedimento cirúrgico. Após a instalação da anestesia o nervo ciático foi localizado através da separação do músculo bíceps femoral, com a utilização de equipamentos cirúrgicos, o nervo ciático foi exposto e liberado do tecido conjuntivo circundante. Posteriormente o nervo foi, então, envolvido com um fio de sutura de seda (3-0, Shalon®) comprimindo, assim, o seu diâmetro original. O procedimento foi finalizado com aproximação das bordas da incisão, sutura da pele do animal e tratamento com solução tópica de clorexidina (2%), que perdurou até a cicatrização da incisão cirúrgica. Os animais foram colocados em gaiolas metabólicas com assepsia diária. Em um grupo (Sham) o procedimento foi apenas simulado, onde o nervo foi exposto, tocado pelo instrumental cirúrgico, mas não foi ligado (MOSCONI; KRUGER, 1996).

##### **4.4.2. Avaliação antinociceptiva aguda**

Antes do procedimento cirúrgico foi realizado o teste de von Frey, para mensurar o Limiar Nociceptivo Mecânico (LNM) de resposta basal desses animais. Nesse teste a pata traseira direita foi tocada com três repetições, por diferentes filamentos partindo das menores concentrações, em gramas, para as maiores. O teste de von Frey foi realizado também no quarto dia a fim de acompanhar a instalação da neuropatia e no sétimo dia, onde foi realizado o tratamento e avaliação da atividade antinociceptiva da fração (CHAPLAN et al., 1994).

Para avaliar o efeito de uma única administração da FAcOEt, realizamos o mesmo procedimento acima descrito. Os animais foram tratados com FAcOEt 50 ou 100 mg/kg, morfina 5mg/kg ou veículo (água destilada com DMSO 1%, i.p.) no sétimo dia. Após os tratamentos, foi realizado o teste de von Frey nos tempos de 0, 60, 120 e 180 minutos. Nesse teste houve também, um grupo de animais com tratamento

semelhante ao do grupo veículo, onde o procedimento cirúrgico foi apenas simulado (CHAPLAN et al., 1994). Os experimentos receberam autorização do Comitê de Ética e Pesquisa (Teresina, Piauí) com número de protocolo 082/2014.

#### **4.4.3 Análise estatística**

Para a comparação das médias aritméticas, empregaram-se a análise de variância (ANOVA) , usando o software Prisma 6.0 (GraphPad). Adotou-se o nível de significância de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Rendimento da extração

Miranda et al (2015) relatou que quase todas as substâncias bioativas identificadas a partir de plantas são compostos aromáticos ou orgânicos saturados, sendo mais facilmente obtidos através de extração inicial com etanol ou metanol. Entre as substâncias bioativas, cabe destaque as antocianinas, terpenóides, saponinas, taninos, flavonas e polifenóis. Desta forma, optou-se pela utilização destes solventes e, com isso, a produção do extrato etanólico (EE) e metanólico (EM).

Partindo-se de 250 g de material vegetal, foram conseguidos 18,4 g de EM e 12,4 g de EE, com maceração exaustiva, o rendimento da extração obtido, por conseguinte, foi de 7,4% para EM e 4,9% para EE. O metanol mostrou-se mais eficiente para a extração em massa dos compostos que o etanol. Por esta razão, o EM foi escolhido para a produção da FAcOEt. Vários autores concordam que AcOEt é o solvente mais eficaz para fracionamento quando se fala em isolamento de flavonoides (WU et al, 2008; SANNIGRAHI et al, 2010; PAULA, 2014).

Em conformidade com estes resultados, Souza et al (2015) obteve maior desempenho para a extração de flavonoides da casca de *Passiflora edulis* utilizando solução hidroalcoólica de MeOH/H<sub>2</sub>O (80:20, v:v) em relação a extração por EtOH/ H<sub>2</sub>O (80:20, v:v).

Sanvido et al (2015), com o objetivo de purificar flavonoides por fracionamento líquido-líquido para mensuração da atividade antioxidante da parte aérea de *Baccharis uncinella*, avaliou a utilização dos solventes diclorometano, n-hexano e AcOEt na produção das frações e constatou que este último apresentou teor de flavonoides cerca de duas vezes maior e, conseqüentemente, atividade antioxidante superior.

Quando trabalhamos com produtos vegetais, deve-se ter o conhecimento das melhores condições que levarão a uma extração eficaz de substâncias. A qualidade da solução extrativa é dada principalmente pelo solvente empregado na extração (SIMÕES et al., 2007; NEHRING et al, 2016).

O processo extrativo é marcado por dois fenômenos que ocorrem em paralelo: a lixiviação de compostos solúveis de células lisadas e a dissolução e difusão das substâncias solúveis nas células intactas. O solvente ao transpassar as células suscita um momento dipolar nas moléculas a extrair, ocorrendo uma associação química às

moléculas do solvente. Essa capacidade de ligação pode ser expressa em termos de constante dielétrica, que é uma função derivada das propriedades eletroquímicas do solvente, sendo que, quanto mais polar for o solvente maior será sua constante dielétrica. Assim, compostos ionizáveis ou altamente polares se dissolvem em líquidos de elevada constante dielétrica, e compostos apolares se dissolverão em solventes de baixa constante dielétrica (MARQUES; VIGO, 2009; POPOVICI; BERTRAND; COMTE, 2014).

A escolha dos solventes para extração deve basear-se principalmente na seletividade que o mesmo apresenta pelas substâncias a serem extraídas, e corresponde uma etapa crucial no trabalho. No entanto, outras características do solvente não podem ser ignoradas, como a facilidade de manuseio, custo, proteção ao ambiente e toxicidade (LIST; SCHMIDT, 2000; ADEBAYO; OGUNSINA; GBADAMOSI, 2015; MIRANDA et al, 2015; SILVA; SILVA, 2016). Em uma extração inicial com solventes de baixa polaridade obtêm-se compostos mais lipofílicos, enquanto que o uso de solventes alcoólicos proporciona a extração de um amplo espectro de substâncias polares e apolares, permitindo assim fracionamentos posteriores, resultando em frações de distintas polaridades. Métodos de extração são utilizados como passo de pré-purificação para remover seletivamente componentes interferentes e ou isolar os compostos ativos (STICHER, 2007; SANVIDO et al, 2015).

Quanto à toxicidade, durante o processo de eliminação do extrato, parte do solvente pode permanecer no extrato e, por isso, o uso de solventes tóxicos [como o MeOH, que segundo DO et al. (2014), é um ótimo solvente para extração de flavonoides] é limitado (SONAGLIO et al, 2007; FIUZA et al, 2015). Dessa forma, apesar da extração por MeOH ter mostrado maior eficiência, deve ser considerado o efeito residual do mesmo no extrato nos ensaios biológicos.

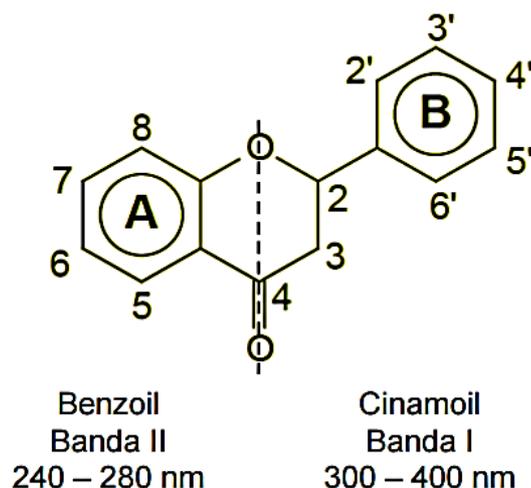
## **5.2 Análises por Espectrofotometria UV-Vis**

O conhecimento da constituição fitoquímica das plantas e seus extratos é importante porque se constitui em uma ferramenta a ser utilizada no controle de qualidade físico-químico, por exemplo (SOUZA, 2007). A espectrofotometria mensura a energia radiante absorvida por um sistema químico em função do comprimento de onda ( $\lambda$ ). Como consequência das interações entre os fótons e as moléculas do soluto,

a intensidade da luz incidente é atenuada devido à absorção pela solução (SKOOG et al., 2006; MEDEIROS, 2016).

Um gráfico espectral é específico para uma dada molécula e, algumas vezes, é empregado para auxiliar na atribuição ou confirmação da identidade de uma espécie em particular (SKOOG et al., 2006). As classes de flavonoides, por sua vez, podem ser caracterizadas através da análise dos espectros de absorção característicos no ultravioleta, determinados pelo núcleo comum da benzopirona, com dois máximos de absorção: um ocorrendo entre 240 - 285 nm (banda II) e outro entre 300 - 400 nm (banda I). Em geral, a banda II pode ser atribuída à existência do anel A e a banda I ao anel B (SANTOS, 2006; FERREIRA et al, 2016; DE OLIVEIRA et al, 2016), como pode ser observado na figura 13.

**Figura 13:** Bandas de absorção UV características dos flavonoides.

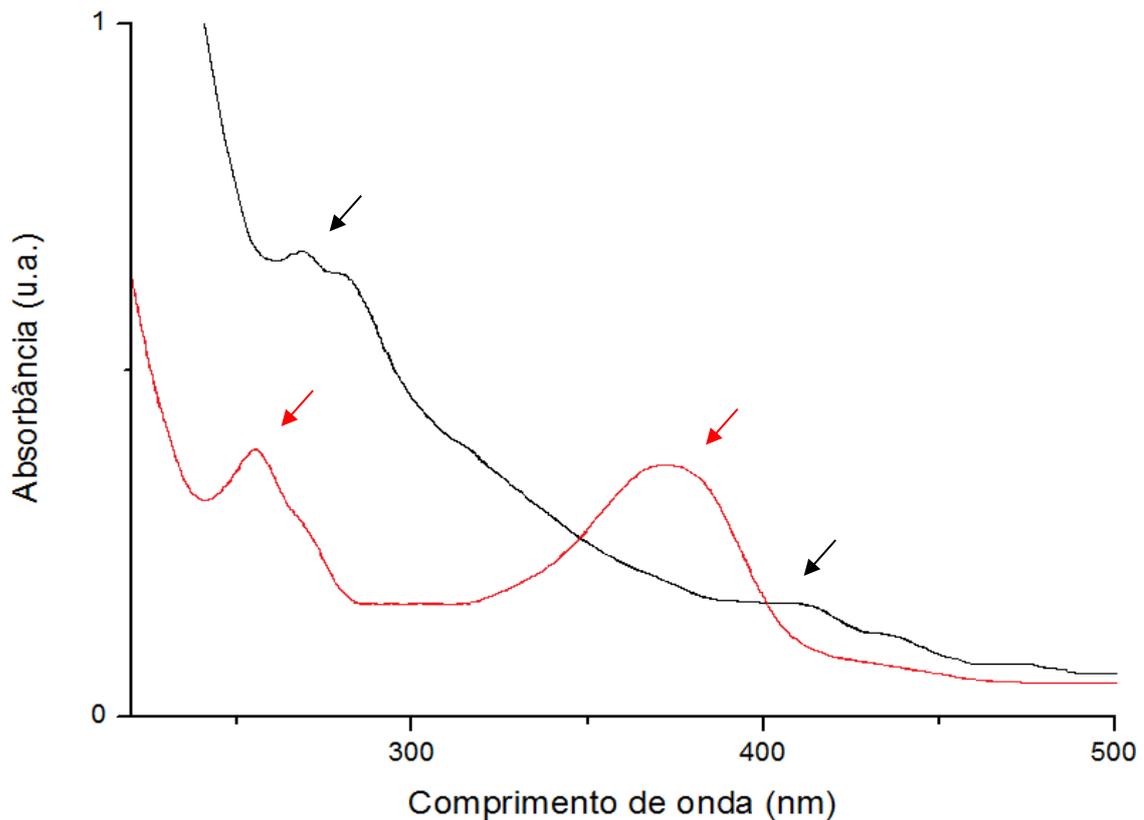


Fonte: Simões et al. (2013)

O gráfico espectral do padrão quercetina (figura 14) na concentração de 0,005 mg/mL em MeOH permitiu a observação das bandas correspondentes a absorção dos anel A em 269 nm (banda II) e o anel B em 373 nm (banda I) (figura 15). De maneira semelhante, Simões et al. (2013) analisou o espectro na região UV-Vis da quercetina em mesmo solvente e observou duas bandas: uma em 375 nm, correspondente ao sistema conjugado entre o anel B e a carbonila do anel C (sistema cinamoil), e outra em 255 nm referente ao sistema conjugado entre o anel A e a carbonila do anel C (sistema benzoil) (figura 13).

É importante ressaltar que, para a análise dos espectros UV-Vis, deve ser levado em consideração o solvente utilizado, as condições da solução e a pureza da amostra (SKOOG et al., 2006). A exemplo, Timbola et al. (2006) analisou os espectros da quercetina em solução hidroalcoólica e observou duas bandas de absorção a 257 e 373 nm, porém a mesma substância em solução eletrolisada manifesta nova banda em torno de 290 nm, enquanto as bandas em 257 e 373 nm exibiram intensidades baixas. A polaridade do solvente, frequentemente, influencia a posição do máximo de absorção. Solventes polares, como a água, tendem a obliterar os espectros vibracionais das moléculas e devem ser evitados para preservar os detalhes espectrais (MOREIRA et al, 2014).

**Figura 14:** Espectros de absorção UV da FAcOEt (em preto) e da quercetina (em vermelho) em MeOH. Em evidência, as bandas em 269 e 405 nm no espectro da FAcOEt e as bandas em 255 e 375 nm no espectro da quercetina.



Legenda: em vermelho o espectro da quercetina e em preto o gráfico espectral da FAcOEt do jaborandi.

O espectro de absorbância da FAcOEt (figura 14) revelou características espectrais típicas dos flavonoides, uma vez que ficaram evidentes as bandas de

absorção entre os limites estabelecidos para o cinamoil e benzoil, 269 e 405 nm, respectivamente.

A composição química de cada amostra influencia no deslocamento das bandas observadas nos espectros dos complexos formados entre os flavonoides. Segundo Denni e colaboradores (2012), os diferentes substituintes presentes principalmente no anel B do núcleo dos flavonoides, provocam diferentes desvios batocrômicos, isto é, os espectros deslocam-se no sentido dos maiores comprimentos de onda pela presença de substituintes químicos.

A posição das bandas e intensidade fornece informações importantes a natureza do flavonoide e seu padrão de oxigenação. Os espectros em MeOH das flavonas e flavonóis (quercetina, canferol, miricetina e crisina) apresentam duas bandas de maior absorção na região de 240-400 nm. O aumento do grau de oxigenação do núcleo leva ao aumento do efeito batocrômico. Flavonas e flavonóis oxigenados no anel A, mas não no B, tendem a ter a banda II mais pronunciada que a I, semelhante ao observado no espectro da figura 15 para a FAcOEt. Em moléculas que também possuem o anel B oxigenado, o espectro apresenta a banda I mais pronunciada que aparece em  $\lambda$  não muito distantes (MARSTON; HOSTETTMANN, 2006).

A posição da banda I nos dá informação sobre o tipo de flavonoide e também sobre o grau de oxidação. A banda I das flavonas ocorre na faixa de 304 – 380 nm, enquanto que a dos flavonóis aparece em 352 - 400 nm. Entretanto os flavonóis com o grupo 3-hidroxil substituído (metilado ou glicosilado) possuem a banda I em 328 - 357 nm, e em geral os seus espectros são próximos aos das flavonas (MARSTON; HOSTETTMANN, 2006).

O espectro das flavanonas, isoflavanonas e flavanonóis são parecidos por apresentarem pouca ou nenhuma conjugação entre os anéis A e B. Esses espectros apresentam uma banda II de grande intensidade de absorção com somente um ombro, ou então uma banda com baixa intensidade representando a banda I. A banda II das isoflavanonas ocorre normalmente na região de 245 - 270 nm e não é muito afetada pela hidroxilação do anel B. O espectro das flavanonas e flavanonóis possui a banda II na faixa de 270 - 295 nm. A remoção do grupo 5- hidroxil de uma flavanona ou flavanonol provoca um deslocamento hipsocrômico (deslocamento da banda de absorção para um comprimento de onda menor devido a efeitos de substituição) de

10 - 15 nm na banda II. O aumento da oxigenação no anel B de flavanonas e flavanonóis não possui efeitos relatados no espectro UV (MARSTON; HOSTETTMANN, 2006). De acordo com esses dados, o composto presente na FAcOEt pode pertencer ao grupo dos flavonóis, flavanonas, isoflavanonas ou flavanonóis.

As chalconas e auronas, por sua vez, apresentam espectro de UV com uma banda I dominante e uma banda II relativamente pequena. Nas chalconas observa-se uma banda II com máximos entre 220 e 270 nm e banda I com máximos entre 340 e 390 nm. As antocianinas e antocianidinas apresentam uma banda I com máximo de absorção entre 465 e 550 nm e banda II representada por um sinal de pequena intensidade, ocorrendo entre 270 e 280 nm (MARSTON; HOSTETTMANN, 2006).

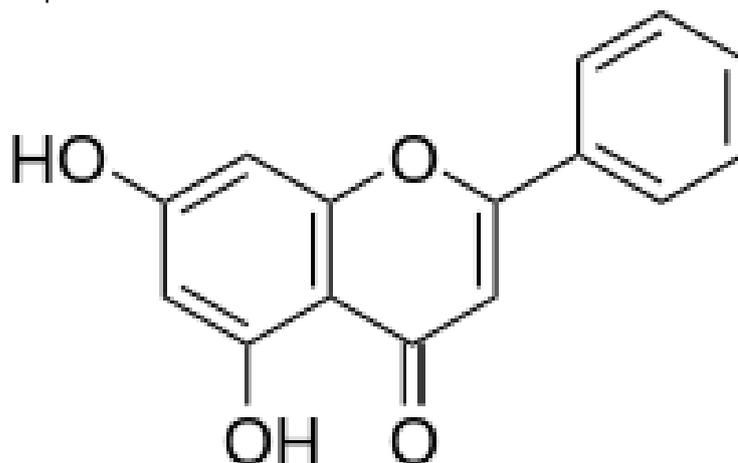
Na tabela 4 estão dispostos alguns flavonoides e suas subclassificações com respectivos máximos de absorção para os anéis A e B em MeOH. O estudo espectroscópico da flavona crisina (figura 15) realizado por Beg, Bhatia e Baig (2014) revelou absorção na região 268 nm, correspondendo a absorção de seu anel B, semelhante a banda observada na fração AcOEt, porém a região que, provavelmente, corresponde ao anel B apareceu em comprimento de onda diferente.

**Tabela 4.** Principais flavonoides, suas subclasses e características espectrais (UV-Vis).

Flavonoide	Subclasse	Absorção máxima (nm)	
		Banda A	Banda B
Quercetina	Flavonol	372	256
Fisetina	Flavonol	362	248
Canferol	Flavonol	366	267
Luteolina	Flavona	350	254
Apigenina	Flavona	336	269
Crisina	Flavona	314	268
Eriodictiol	Flavanona	336	288
Hesperidina	Flavanona	336	288
Taxifolina	Flavanonol	340	288

Fonte: adaptado de Tsimogiannis et al. (2007).

**Figura 145:** Estrutura química da Crisina.



Fonte: Autoria própria (2016).

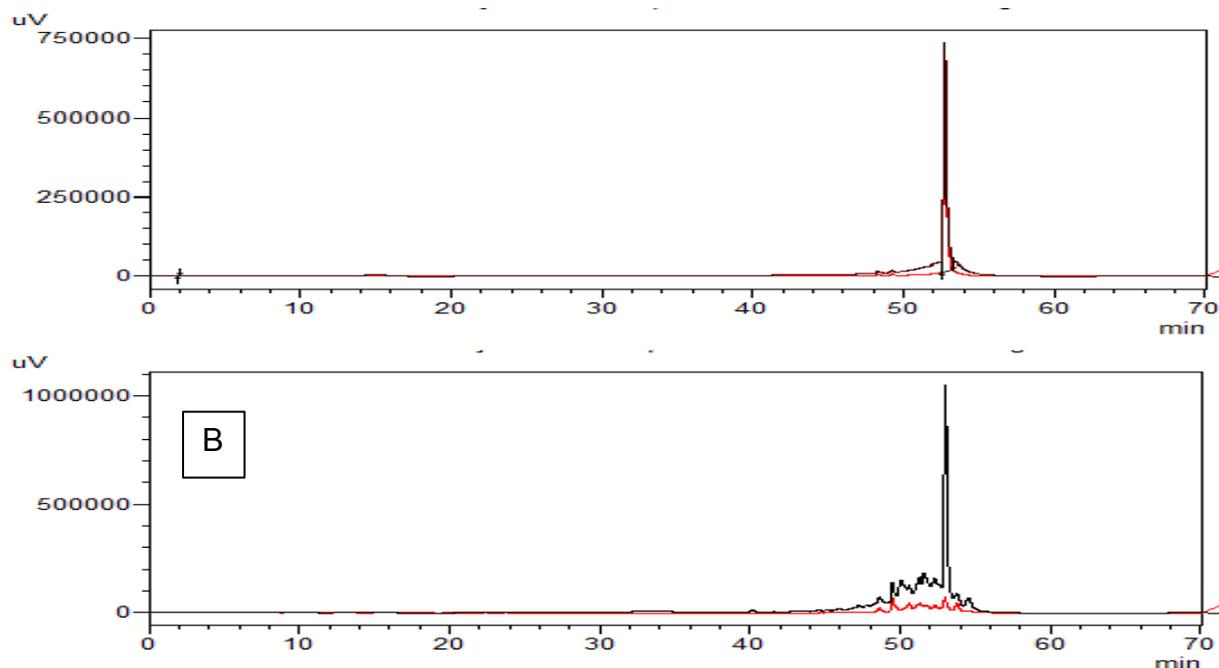
Em decorrência do aparecimento de deslocamentos no gráfico espectral e sobreposição de grupos funcionais em mesmos comprimentos de onda, principalmente em amostras não puras, esta técnica não possibilita por si só a identificação inequívoca dos compostos presentes no analito. Assim, dados qualitativos no ultravioleta devem ser suplementados com outras evidências químicas ou físicas, como espectros infravermelhos, de ressonância magnética nuclear e de massas, bem como informações sobre solubilidade, ponto de fusão e ebulição (SKOOG et al., 2006).

Os gráficos espectrais são importantes para a CLAE. A análise no UV-vis é fundamental para se determinar os comprimentos de onda utilizado no ensaio cromatográfico. Por esta razão, optou-se pelo  $\lambda$  de 260 nm, com alta absorção na FAcOEt e 370 nm, onde houve absorção no padrão quercetina.

#### **5.4 Perfil de metabólitos secundários da FAcOEt por CLAE**

O cromatograma da FAcOEt revelou um pico intenso e bem definido com tempo de retenção ( $t_R$ ) de 53 minutos (figura 16-B), correspondente a substância majoritária na amostra. O  $t_R$  representa o tempo gasto por um componente desde a sua injeção até a sua detecção na saída do sistema. Desta forma,  $t_R$  engloba todo o tempo que um componente fica no sistema cromatográfico, seja diluído na fase móvel, seja retido na fase estacionária.

**Figura 15:** Cromatogramas relacionando a intensidade (u.a.) com o tempo de corrida. Em vermelho: 370 nm; preto, 260 nm). A: Quercetina. B: FAcOEt.



A seletividade de um método analítico é medida pela capacidade que este apresenta em detectar exatamente um dado composto na presença de outros componentes, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. A avaliação da seletividade é feita pela identificação das substâncias detectadas na amostra por meio da comparação do  $t_R$  do pico da substância padrão pura com o  $t_R$  do composto investigado na amostra (BRAZIL, 2003; YANG et al., 2015), no caso deste trabalho, a substância padrão é a quercetina.

A intensidade de absorção do pico  $t_R$  53 min da FAcOEt foi de, aproximadamente, 1000 mAU para uma solução de injeção de 2 mg/mL, que está diretamente relacionada com a concentração do composto na fração. Tal afirmação se apóia no princípio de detecção por UV-Vis, que é definido através da concentração do analito relacionada à fração da luz transmitida pela célula do detector de acordo com a lei de Bee-Lambert, onde a absorbância é, geralmente, proporcional à concentração da amostra. A intensidade de absorção da molécula também depende dos grupos funcionais presentes e da influência que estes podem exercer sobre outros grupos (SKOOG; DOUGLAS, 1992; MÄNTELE; DENIZ, 2017).

A quercetina evidenciou um pico com mesmo  $t_R$  (53 min) da FAcOEt, como se pode perceber na figura 17-A. Desta forma, pode-se inferir grande similaridade entre

o composto majoritário presente na fração e o padrão, uma vez que estes foram submetidos as mesmas condições cromatográficas.

Em geral, as separações dos flavonoides por CLAE são realizadas em colunas de fase reversa C18, e as diferenças nas características dos métodos de identificação e quantificação estão associadas com o sistema de detecção. (GOMES, 2010).

Nas separações de flavonoides levadas a cabo em fase reversa, espera-se uma eluição que começa pelos compostos mais polares e acaba nos compostos menos polares. Assim, de um modo geral, os primeiros compostos a sair da coluna cromatográfica serão os que pertencem, por exemplo, à subclasse dos flavanóis, as catequinas e as epicatequinas. Em seguida sairão as antocianinas e depois os compostos membros das subclasses dos flavonóis, flavonas e flavanonas. A polaridade do anel básico das últimas três subclasses é muito similar, mas a adição de grupos hidroxila à estrutura do anel B resulta numa alteração substancial da polaridade da molécula (MERKEN; BEECHER, 2000).

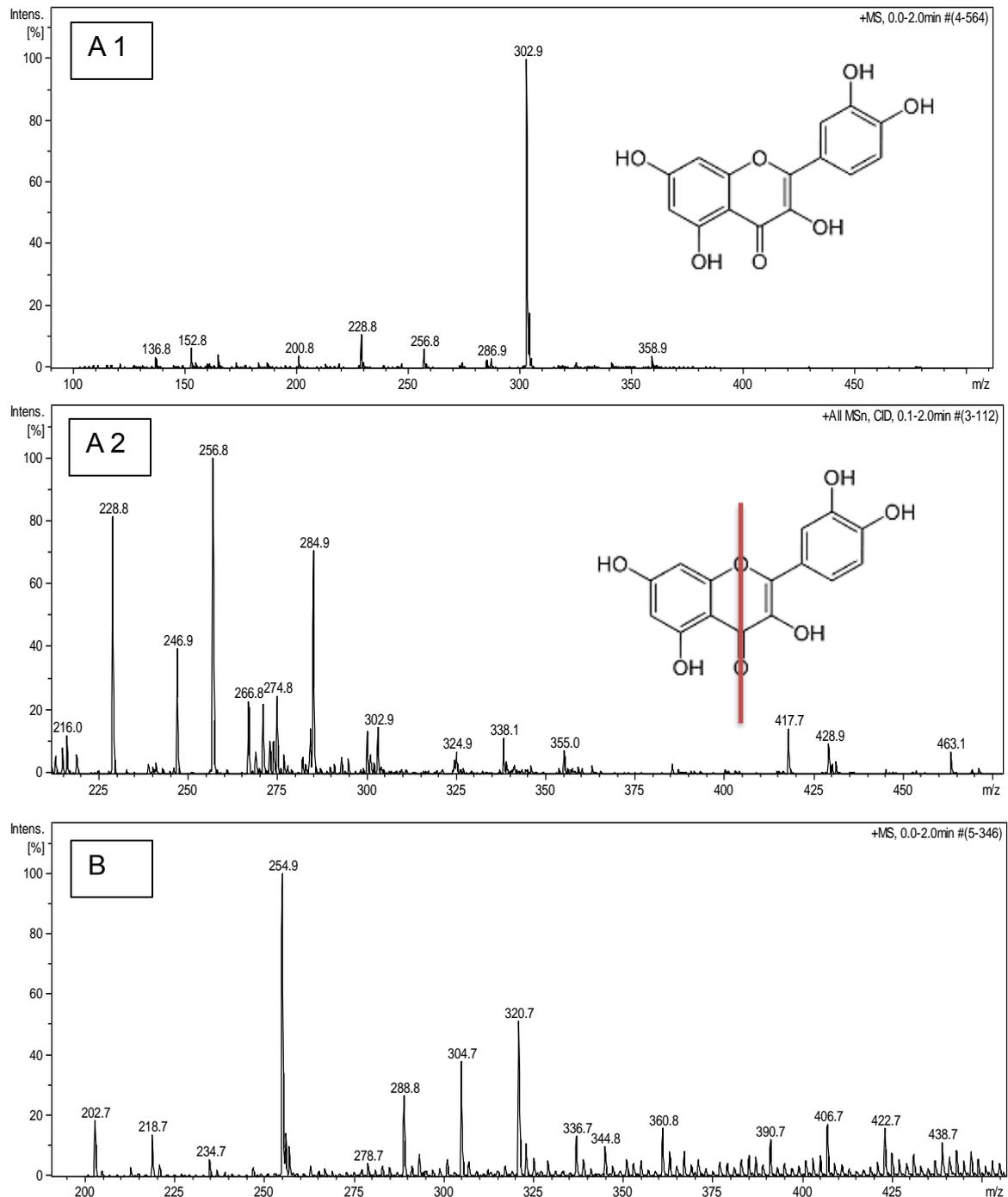
O composto  $t_R$  53 min FAcOEt foi coletado para posterior análise por Espectrometria de massas e voltametria cíclica.

### **5.5 Análise por Espectrometria de massas (ESI-MS) do composto majoritário da FAcOEt**

A espectrometria de massas pode ser entendida como uma técnica analítica que permite a identificação da composição química de um determinado composto isolado, ou de diferentes compostos em misturas complexas, através da determinação de suas massas moleculares na forma iônica (ou seja, com carga elétrica líquida, positiva ou negativa), baseada na sua movimentação através de um campo elétrico. Esta movimentação é determinada pela razão entre a massa de um determinado composto (analito) e sua carga líquida, designada por razão  $m/z$ . Assim, conhecendo o valor  $m/z$  de uma molécula é possível inferir sua composição química elementar, e com isso determinar sua estrutura (BRAMER, 1998; CROTTI et al, 2006; CAVALCANTI, 2016).

Em virtude da elevada sensibilidade e rápida análise desta técnica, a espectrometria de massas tem se tornado cada vez mais indispensável na caracterização estrutural de biomoléculas, sendo possível distinguir mínimas alterações estruturais entre moléculas idênticas (SOUZA, 2008; CAVALCANTI, 2016). Por esta razão, a FAcOEt foi submetida a análise por Espectrometria de massas.

**Figura 17:** A1: Espectro de massas do padrão quercetina. A2: Espectro M/S da quercetina. B: Espectro de massas do composto  $t_R = 53$  min da FAcOEt.

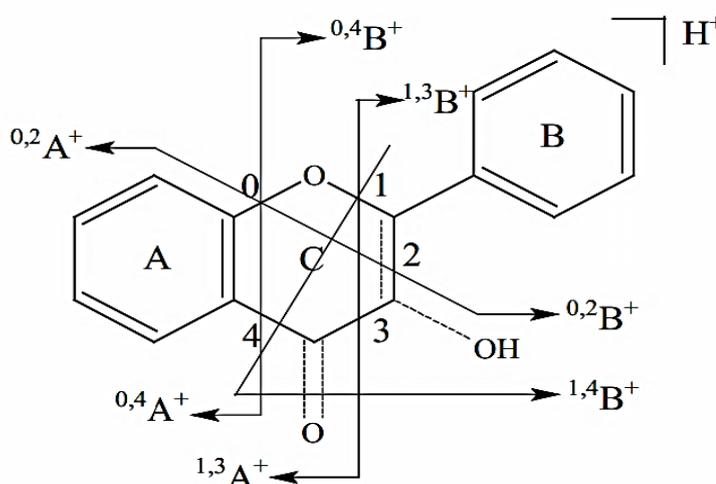


O espectro de massas da fração revelou um principal íon molecular de  $m/z$  254.9  $[M+H]^+$  (figura 17- B). Esse valor de  $m/z$  é encontrado na literatura para o íon molecular da crisina (figura 15) em modo de ionização positiva (HUGHES et al., 2001; CARTER-WIENTJES et al., 2003; TSIMOGIANNIS et al., 2007; BOUÉ et al., 2013) levantando a hipótese de que esta flavona seja o composto predominante das FAcOEt.

A análises do padrão quercetina, por sua vez, diluída em MeOH por ESI-MS evidenciaram um íon molecular com  $m/z$  302.9  $[M+H]^+$  (figura 18- A1). Espectros  $m/z$  idênticos foram encontrados na literatura para a quercetina.

Tsimogiannis et al. (2007), estudou a fragmentação de doze flavonoides selecionados pertencentes aos subgrupos dos flavonóis, flavonas, dihidro-flavonóis, flavanonas e flavanóis. As análises foram realizadas por LC-MS no modo de ionização positivo e solvente MeOH. O perfil de fragmentação específico de cada flavonoide revelou a desidratação e perdas de monóxido de carbono do íon  $[M + H]^+$ , e permitiu a caracterização dos subgrupos de flavonoides. O estudo concluiu que os fragmentos resultantes da cisão do anel C são específicos de cada subgrupo e revelou o padrão de substituição dos anéis A e B. Dentre os flavonoides estudados estava a quercetina, tais resultados se sobrepõem a fragmentação do íon molecular quercetina ( $m/z=302.9$ ) do espectro ESI-MS da figura 17-A2, em que foram observados os fragmentos de  $m/z$ : 229, 257 e 285.

**Figura 16:** Clivagens no anel C da quercetina resultando nos fragmentos do espectro de massa.



Fonte: Tsimogiannis et al. (2007)

A figura 18 indica os pontos onde ocorrem as quebras no anel heterocíclico C da quercetina e formação dos fragmentos. Além disso, relaciona os sites de quebra com a numeração dos átomos da molécula.

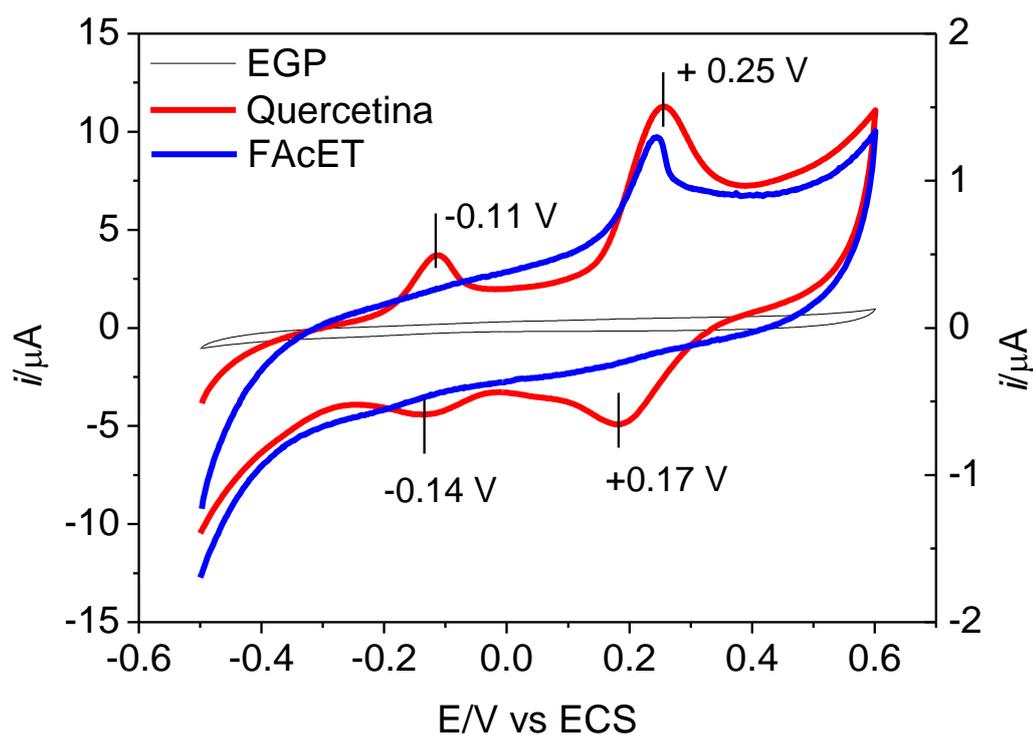
## 5.6 Estudo de voltametria cíclica (VC) do composto majoritário da FAcEt

A voltametria é uma técnica eletroquímica onde as informações qualitativas e quantitativas de uma espécie química são obtidas a partir do registro de curvas

corrente-potencial, realizadas durante a eletrólise dessa espécie em uma cela eletroquímica constituída de dois ou três eletrodos, sendo um deles um microeletrodo (o eletrodo de trabalho) e o outro um eletrodo de superfície relativamente grande (usualmente o eletrodo de referência). O potencial é aplicado entre os dois eletrodos em forma de varredura, isto é, variando-o a uma velocidade constante em função do tempo. O potencial e a corrente resultante são registrados simultaneamente. A curva corrente vs. potencial obtida é chamada de voltamograma. (SOUZA et al., 2003; SKOOG et al., 2006).

Utilizando a técnica de VC foi possível discriminar diferenças significativas no perfil de oxirredução da quercetina do isolado da FAcOEt. A figura 19 revela os voltamogramas cíclicos obtidos em solução de quercetina ou do composto da FAcOEt, a 0,7 mg/mL. Para fins comparativos, também é mostrado o voltamograma do EGP (eletrodo de calomelano saturado) registrado em eletrólito puro. Nestas condições, o EGP não mostrou nenhum processo *redox* no intervalo de potencial analisado e ainda apresentou baixa corrente capacitiva, o que impulsionou o seu emprego nos experimentos posteriores.

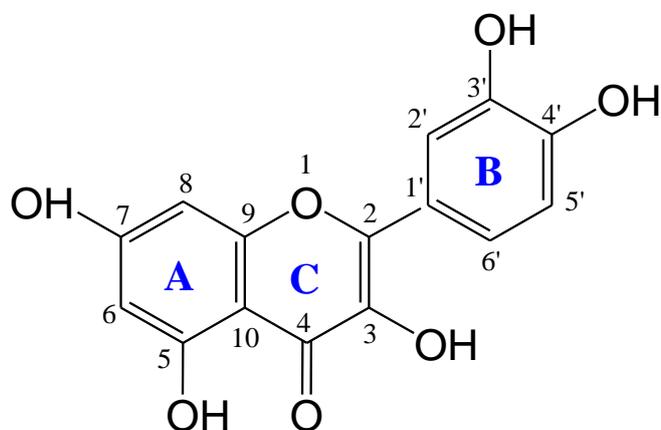
**Figura19:** Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de quercetina ou de FAcOEt a 0,7 mg/mL em eletrólito suporte de PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 5,6,  $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ . A escala de corrente da direita corresponde aos valores obtidos no voltamograma da quercetina enquanto que a da esquerda resultou dos voltamogramas do EGP em eletrólito puro ou na presença da FAcOEt.



Em etapa seguinte, registrou-se o voltamograma do EGP na presença da quercetina, e neste caso foram observados dois pares *redox* bem definidos, os quais foram diretamente atribuídos a resposta eletroquímica da quercetina nas condições experimentais estabelecidas, figura 19.

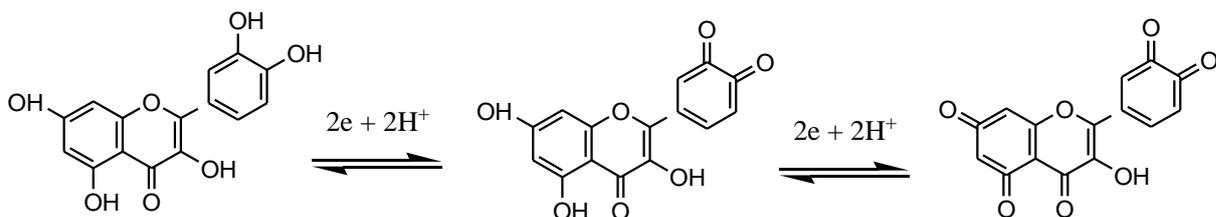
O perfil eletroquímico observado para a quercetina na figura 20 corrobora com os dados já existentes na literatura (HENDRICKSON et al., 1994; YANG et al., 2001; TIMBOLA et al., 2006; GIL; RENÊ, 2013). Durante a varredura no sentido anódico, o primeiro pico observado em -0,11 V vs ECS corresponde à transferência de carga causada pela oxidação das hidroxilas na posição 3'e 4' do anel B da quercetina, figura 20. Já o segundo pico de oxidação (em + 0,25 V) tem sido relacionado ao processo de oxidação das hidroxilas nas posições 5 e 7 do anel A da molécula, figura 20. Na varredura catódica, observou-se a respectiva redução desses processos em + 0,17 V e -0,14 V vs ECS. Na figura 21 é possível observar um provável mecanismo para a oxirredução da quercetina, proposto a partir dos resultados obtidos e dados da literatura.

**Figura 20:** Estrutura da quercetina e indicação da posição dos carbonos na molécula.



Fonte: Adaptado de Timbola et al. (2006).

**Figura 171:** Mecanismo eletroquímico proposto para quercetina.



Fonte: Hendrickson et al. (1994) e Timbola et al. (2006).

Ainda na Figura 19, é possível observar que o voltamograma cíclico obtido para o isolado da FAcOEt é totalmente diferente daquele registrado para a quercetina. Apenas um pico de oxidação não reversível foi observado próximo de + 0,2 V vs ECS para o composto da FAcOEt. Tais resultados sugerem que este possa ser uma molécula diferente da quercetina, apesar de apresentar comportamento semelhante durante o processo de purificação por CLAE.

As diferenças entre o anel B das duas substâncias foi mais uma vez evidenciada, já que não foram observados os processos desses grupamentos no voltamograma do composto da FAcOEt, somente na quercetina; assegurando a teoria de que o composto seja a crisina, uma vez que esta não apresenta hidroxilas na posição 3' e 4' do anel B, porém possui anel A com oxigenação nos carbonos 5 e 7.

Tendo em vista que a intensidade máxima de corrente resulta da reação de oxidação no pico de corrente anódica, é esperada para o composto isolado atividade antioxidante envolvendo um processo de transferência de carga irreversível.

Vale ressaltar que existe a possibilidade da substância FAcOEt ser uma variação da quercetina obtida em um diferente estado de oxidação, induzido pelo solvente empregado durante a cromatografia. Entretanto, investigação mais profunda deverá ser efetuada em busca de elucidar esses resultados preliminarmente obtidos. Futuras análises de cristalografia e RMN poderão subsidiar as hipóteses aqui levantadas.

### **5.3 Caracterização da FAcOEt por Espectrofotometria Infravermelho (FT-IR)**

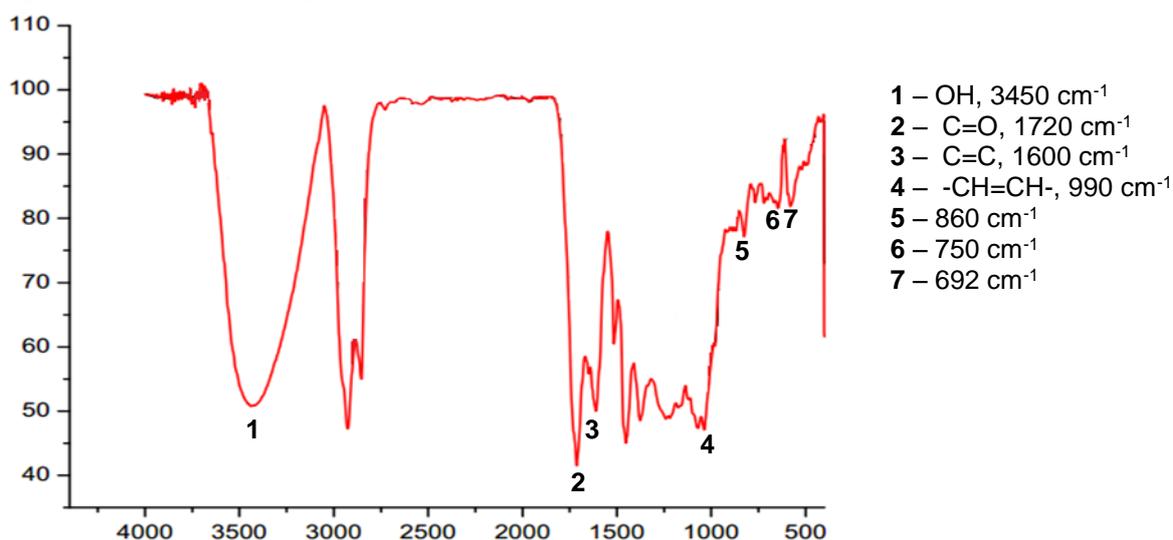
A espectroscopia de absorção no infravermelho consiste em provê informações relativas aos modos de vibração molecular, que dependem da estrutura da molécula. As vibrações moleculares abrangem energias que equivalem a energias de fótons infravermelhos. Na espectroscopia molecular, tais fótons podem ser absorvidos pela(s) molécula(s) objeto do estudo, excitando modos de vibração das moléculas, resultando em espectros de absorção ou transmitância na região do infravermelho a partir dessa interação entre fóton-molécula. Desta forma, podem-se levantar informações sobre a geometria e as forças de interação entre os átomos que compõem a molécula, uma vez que seus espectros se correlacionam com esses fatores (LARKIN, 2011; DOS SANTOS et al., 2012).

O espectro de absorção no infravermelho é obtido quando uma radiação eletromagnética incidente tem uma componente com valor de frequência igual à frequência correspondente a uma transição entre dois níveis vibracionais. São observados nos espectros IRN apenas os modos de vibração que levam a variação no momento dipolar elétrico (COLTHUP, 2012).

Especificamente para flavonoides, as bandas relacionadas aos grupos que contenham carbono, oxigênio e hidrogênio destacam-se na análise do espectro destes compostos (MAI, 2011).

No gráfico espectral da figura 22, as bandas funcionais da FAcOEt, evidenciam claramente grupos funcionais presentes nos flavonoides: OH, C=O, C=C, C-H (HENECZKOWSKI et al., 2001; BEG, BHATIA, BAIG, 2014).

**Figura 18:** Espectro na região infravermelho da FAcOEt do jaborandi.



Legenda: no eixo y: transmitância (%), no eixo x: comprimento de onda (cm<sup>-1</sup>).

A absorção na região de 3.600 - 2.700 cm<sup>-1</sup> está associada às vibrações de deformação axial nos átomos de hidrogênio ligados a carbono, oxigênio e nitrogênio (C-H, O-H e N-H). O intervalo de 3.600 - 3.200 cm<sup>-1</sup> diz respeito especificamente ao grupo OH associado na molécula, ou seja, não livre ou quelado (STUART, 2005). Na FAcOEt, foi observado uma intensa banda em 3450 cm<sup>-1</sup> (figura 23) que, provavelmente, corresponde ao grupamento hidroxila. Uma banda forte, dentro desse intervalo, significa que a intensidade da mesma depende da concentração, portanto, há uma quantidade considerável deste agrupamento na amostra. Bandas fortes em torno de 2900 cm<sup>-1</sup>, como a que aparece no espectro da figura 23, revelam-se em

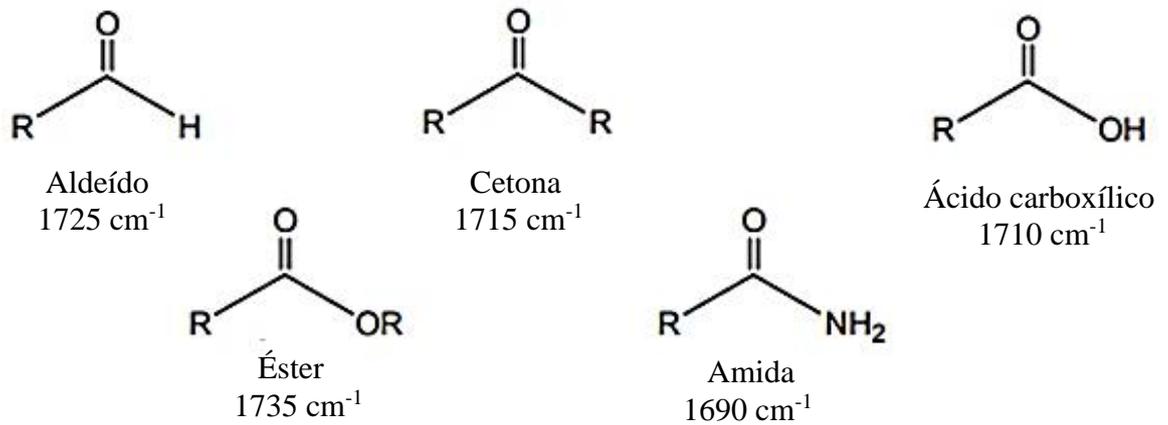
quase todos os espectros de compostos orgânicos, pois são decorrentes da presença do estiramento C–H (STUART, 2005).

Foi possível identificar o grupo C=C presente nos anéis aromáticos dos flavonoides que aparece na 2.300-1.900  $\text{cm}^{-1}$ . A absorção nesta região é relacionada às vibrações de deformação axial de duplas ligações (não acumuladas). Na maioria dos casos, a posição da banda pode ser mudada por efeitos de conjugação ou indutivo dos substituintes químicos. O intervalo de frequência de absorção que corresponde o grupo C=C de aromáticos é de 1600-1650, 1450-1500  $\text{cm}^{-1}$ . Nas vibrações de núcleos aromáticos, a banda de 1.580 é intensa quando o grupo fenila é conjugado com insaturações ou mesmo ligado a átomos com pares de elétrons livres. A banda de 1450  $\text{cm}^{-1}$ , geralmente, é obscurecida e a banda de 1500  $\text{cm}^{-1}$  é, normalmente, mais forte (SIESLER et al, 2008). Segundo Heneckowski, 2001, grupos substituintes em posições meta ou para doadores de elétrons diminuem ainda a frequência de estiramento de aromáticos das flavonas. Estes podem ser vistos na posição de 900-860, 810-750 e 710-690  $\text{cm}^{-1}$  para anel benzeno meta-dissubstituído, tal qual existe na molécula da quercetina e crisina. Observou-se no espectro NIR absorção em 860, 750 e 692  $\text{cm}^{-1}$  (figura 23) que pode corresponder a esta banda de aromáticos (MANTSCH; CHAPMAN, 1996; STUART, 2005)

A banda de absorção do grupo -CH=CH- constituinte do anel aromático foi identificada no espectro dentro do intervalo esperado de 970-960  $\text{cm}^{-1}$ . O espectro de compostos aromáticos apresentam na região de 5-6 micrometros as chamadas bandas de combinação. Estas bandas são obtidas a partir da combinação (pela soma ou diferença dos números de onda) a fim de fornecer uma única banda e sua presença no espectro Infravermelho indica que as vibrações não são independentes (SOUZA et al., 2013). Na região de 700-690  $\text{cm}^{-1}$  aparecem as bandas de absorção de -CH angular fora do plano, essas bandas mostram informações a respeito da posição dos substituintes no anel aromático (BOAS et al, 2014).

A região do estiramento da carbonila (figura 23) está representada entre 1850-1650  $\text{cm}^{-1}$ . Bandas intensas neste intervalo relacionam a presença do grupo carbonila dos vários compostos carbonilados. Essas absorções são deslocadas de 30-40 $\text{cm}^{-1}$  para frequências mais baixas em sistemas  $\alpha,\beta$  insaturados (STUART, 2005). Pôde ser observado no espectro NIR da FAcOEt a região de 1720  $\text{cm}^{-1}$  (figura 23) que provavelmente, corresponde a região do grupo carbonila da função cetona, existente no anel C dos flavonoides.

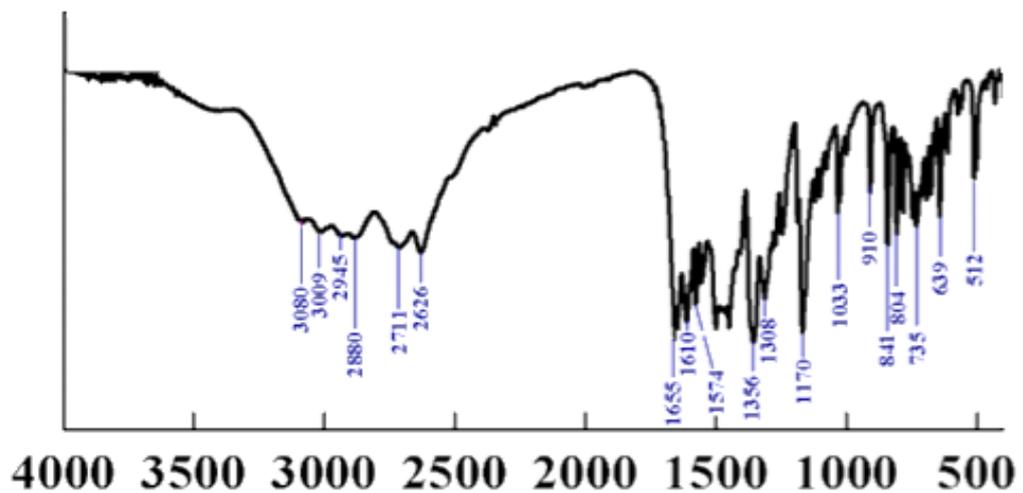
**Figura 193:** Região de estiramento da carbonila.



Legenda: Banda de absorção de carbonila de algumas funções.

Outras bandas características são decorrentes da vibração do grupo fenol; C-OH vibrações de deformação ( $1308\text{-}1370\text{ cm}^{-1}$ ) e C-OH vibrações de estiramento ( $1112\text{-}1172\text{ cm}^{-1}$ ) (STUART, 2005). De maneira geral, o espectro NIR obtido mostrou similaridade aos encontrados na literatura para a crisina (figura 24) (BEG, BHATIA, BAIG, 2014; SATHISHKUMAR, 2015; XIE et al., 2017).

**Figura 20:** Espectro infravermelho da crisina de acordo com Sathishkumar (2015).



Legenda: No eixo y: absorvância (%), no eixo x: comprimento de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ).

Os grupos funcionais que compõem o núcleo básico dos flavonoides podem sofrer variação na frequência de vibração entre os membros deste grupo. O grupo carbonila ( $\text{-CO}$ ), por exemplo, apresenta frequência em  $1619\text{ cm}^{-1}$  para a fisetina,  $1653\text{ cm}^{-1}$  para hesperidina e  $1649\text{ cm}^{-1}$  para flavona (HENECZKOWSKI et al., 2001).

## 5.7 Ensaios biológicos da FacOEt

### 5.7.1 Atividade antioxidante

#### 5.7.1.2 Teste de captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila)

As frutas e os vegetais, geralmente, possuem em sua composição vários compostos com poder antioxidante, dentre eles o ácido ascórbico, os carotenóides e os polifenóis, estes importantes para a redução do risco de doenças degenerativas (NAVARRO et al., 2010). O potencial antioxidante desses fitoquímicos pode ser medido por alguns métodos com princípios diferentes.

A atividade antioxidante mensurada pelo método DPPH se baseia na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um radical livre, o DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), que ao se reduzir, formando o difenil-picril-hidrazina, perde sua coloração púrpura a um comprimento de onda máximo de, aproximadamente, 516 nm e fica de cor amarelada (ver figura 26) com consequente desaparecimento da absorção, sendo monitorado o decréscimo da absorvância que serviu para determinar a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais. Assim, quanto maior a concentração da amostra e menor a absorvância, maior o consumo de DPPH• (CHRISTODOULEAS et al, 2015).

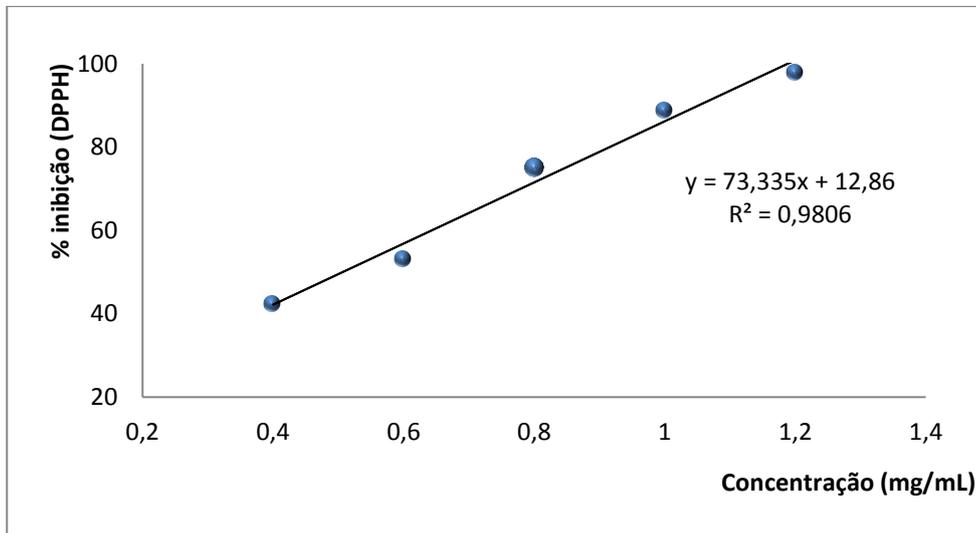
A reação do radical DPPH• com um antioxidante (AH) ou uma espécie radical (R.) ocorre de acordo com as equações 1 e 2 (MILARDOVIC, 2005):



A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante. A concentração eficiente ( $CE_{50}$ ), ou também chamada de concentração inibitória ( $CI_{50}$ ), refere-se a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH• em 50%. Quanto maior o consumo de DPPH• por uma amostra, menor será a sua  $CE_{50}$  e maior a sua atividade antioxidante (SOUSA et al., 2007; CASARIN et al, 2016). Geralmente, esta atividade tem sido correlacionada à atuação de flavonoides (DO et al, 2014; ALBUQUERQUE et al., 2016).

A curva cinética (figura 25) de degradação do radical DPPH• reveladas pelos valores de absorvância expressos como média  $\pm$ SD, demonstraram que a FAcOEt do jaborandi apresentou capacidade em sequestrar elétrons livres, uma vez que, após reação de DPPH• com as diferentes concentrações, as absorvâncias foram significativamente menores a partir da comparação com o controle negativo (DPPH + solvente). O valor obtido de CE<sub>50</sub> foi de 0,5 mg/mL. O controle com vitamina C revelou CE<sub>50</sub> de, aproximadamente, 30  $\mu$ g/mL semelhante ao encontrado na literatura (43  $\mu$ g/mL) (RAVICHANDRAN et al., 2016) utilizando-se igual metodologia.

**Figura 21:** Gráfico do percentual de inibição de DPPH• da FAcOEt com ilustração da equação da reta linear.



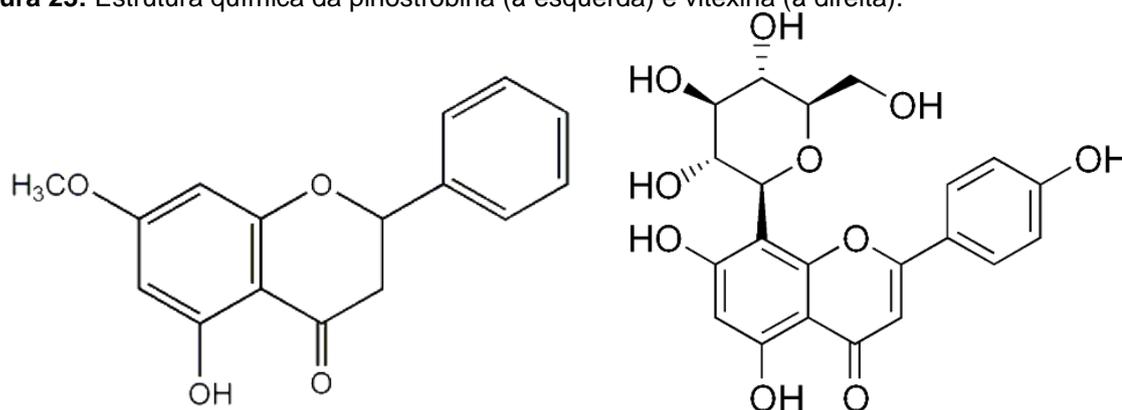
**Figura 22:** Coloração da reação no tempo de 30 min na concentração de 2,2 e 0,4 mg/mL da FAcOEt, respectivamente.



Fonte: acervo pessoal (2016).

Os números para  $CE_{50}$  podem variar entre membros diferentes da classe dos flavonoides.  $CE_{50}$  inferiores podem ser encontrados na literatura para frações acetato de etila de outras plantas. Wu et al. 2009, por exemplo, encontrou  $CE_{50}$  de 0,19 mg/mL no estudo das folhas de *Cajanus cajan* (L.) Millsp. No entanto, este mesmo trabalho revelou valores altos de  $CE_{50}$  para os flavonoides isolados desta fração: pinostrobinina (> 0,5 mg/mL), vitexina (> 0,5 mg/mL) e orientina (0,4 mg/mL); apesar da vitexina apresentar um número maior de hidroxilas ligadas ao anel A e B, que favorecia a atividade antioxidante (ver figura 27). Os autores atribuíram o poder antioxidante encontrado na fração ao efeito sinérgico destes componentes. Deste modo, apesar do grande interesse na ação antioxidante de flavonoides, pouco ainda se sabe sobre os mecanismos envolvidos nesse processo e, apesar das muitas especulações que existem, escassos são os trabalhos que descrevam as particularidades das diferentes subclasses nas reações *redox* tanto *in vitro* como *in vivo*.

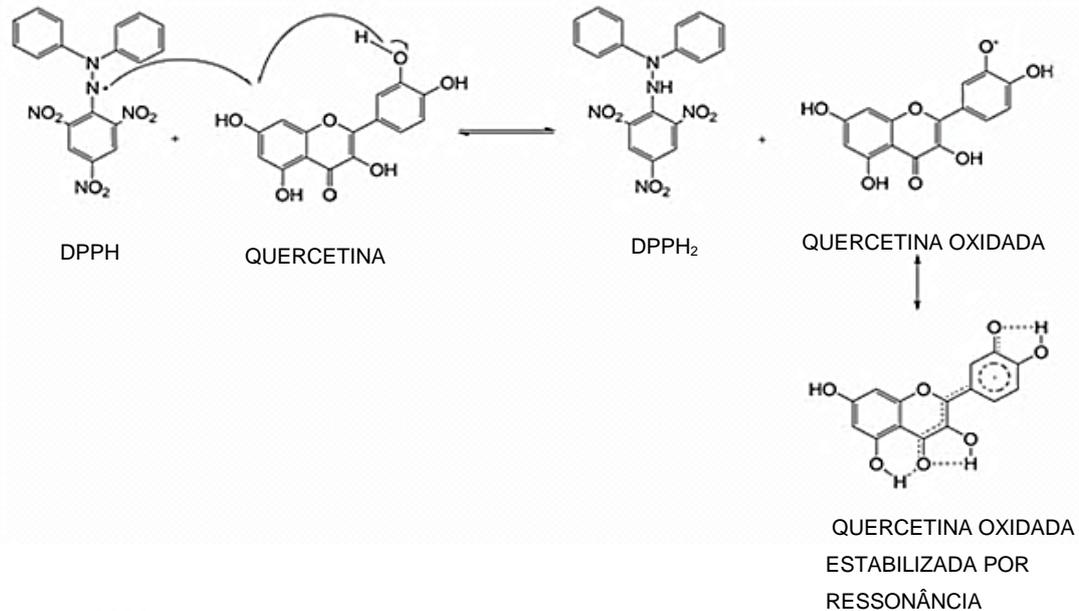
**Figura 23:** Estrutura química da pinostrobinina (à esquerda) e vitexina (à direita).



Fonte: autoria própria (2016).

O sistema DPPH avalia somente o potencial redutor dos compostos antioxidante, que ao doar um elétron se oxida, e não detecta substâncias pró-oxidantes (DUARTE-ALMEIDA, 2006). Porém, diferentes autores vêm empregando este mesmo método para avaliação da capacidade antioxidante de espécies vegetais, tendo-se observado resultados semelhantes e significativos (LIMA et al., 2006; SOUSA et al., 2007; ROESLER et al., 2007; IHA et al., 2008; NUNES et al., 2008; AYRES; CHAVES, 2010; FADA et al, 2014; KASHYAP, 2014; TSIMOGIANNIS et al, 2017).

**Figura 24:** Mecanismo de redução do radical livre DPPH• da quercetina.



Fonte: Teixeira, 2008.

Fonseca e colaboradores (2015) avaliaram o potencial antioxidante *in vitro* da crisina bem como de seus derivados organocalcogênicos. O estudo revelou que a crisina não apresentou efeito protetivo antioxidante significativo pelo método DPPH. Para o teste de captura do radical ABTS, no entanto, foi encontrado CE<sub>50</sub> de 5 µM (1,27 mg/mL). O artigo destaca ainda um efeito bastante superior para os compostos semi-sintéticos derivados da crisina contendo telúrios em todos os ensaios *in vitro*. Os experimentos de SIM et al. (2007) revelaram baixos efeitos inibitórios para a crisina no teste de DPPH: 6.4% em 0,254 mg/mL.

Sathiavelu et al. (2009) estudaram a atividade antioxidante *in vivo* da crisina em análises bioquímicas e histológicas dos tecidos e da circulação sanguínea de ratos, avaliando a peroxidação lipídica na hepatotoxicidade induzida pelo etanol. Os resultados mostraram que a administração de crisina (20 mg/kg de peso corporal) em ratos com lesão hepática diminuiu significativamente os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, hidroperóxidos lipídicos e dienos conjugados, bem como elevou fortemente a atividade da enzima superóxido dismutase, catalase, glutatona peroxidase, glutatona redutase, glutatona-S-transferase e os níveis de glutatona reduzida, vitamina C e vitamina E nos tecidos e na circulação em comparação com os dos ratos não tratados com etanol. As alterações histológicas observadas no fígado e nos rins correlacionaram-se com os achados bioquímicos. Por fim, o estudo conclui

que a crisina oferece forte proteção contra o estresse oxidativo mediado por radicais em ratos com lesão hepática induzida pelo etanol.

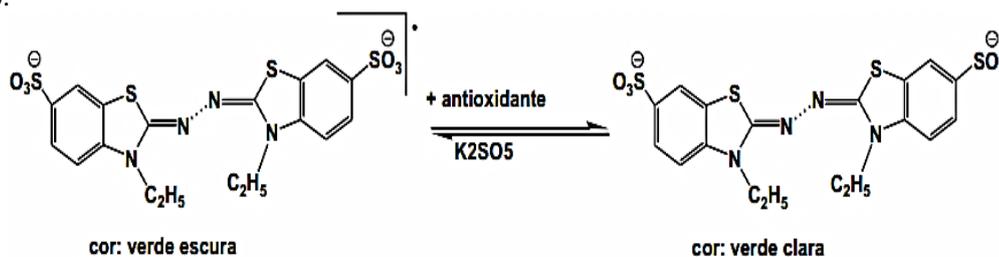
O efeito antioxidante diverso observado nos trabalhos de Fonseca et al. (2015) e Sathiavelu e colaboradores (2009) apontam para a estabilidade fragilizada da crisina em sistemas *in vitro*, uma vez que um efeito antioxidante bastante superior foi observado nos estudos *in vivo*, no entanto, novos estudos ainda são necessários para atestar esta hipótese.

### 5.7.1.3 Teste de captura do radical ABTS (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

Em decorrência da existência de tipos distintos de radicais livres e as suas diferentes maneira de atuação nos organismos vivos, dificilmente existirá um método simples e universal pelo qual a atividade antioxidante possa ser medida precisa e quantitativamente. Assim, a prospecção por testes mais eficientes e com maior rapidez tem favorecido o aumento no número de métodos para avaliar a atividade de antioxidantes naturais por conta da grande quantidade de sistemas geradores de radicais (COTINGUIBA et al, 2015).

Um dos métodos mais utilizados para mensuração da atividade antioxidante é através da captura do radical catiônico 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS<sup>•+</sup>) que, diferente do radical DPPH obtido diretamente sem nenhuma preparação prévia, o ABTS se forma após uma reação (figura 29), podendo esta ser química (dióxido de manganês, persulfato de potássio, ABAP); enzimática (peroxidase, mioglobulina), ou também eletroquímica (KUSKOSKI et al., 2005; GOMEZ et al., 2016).

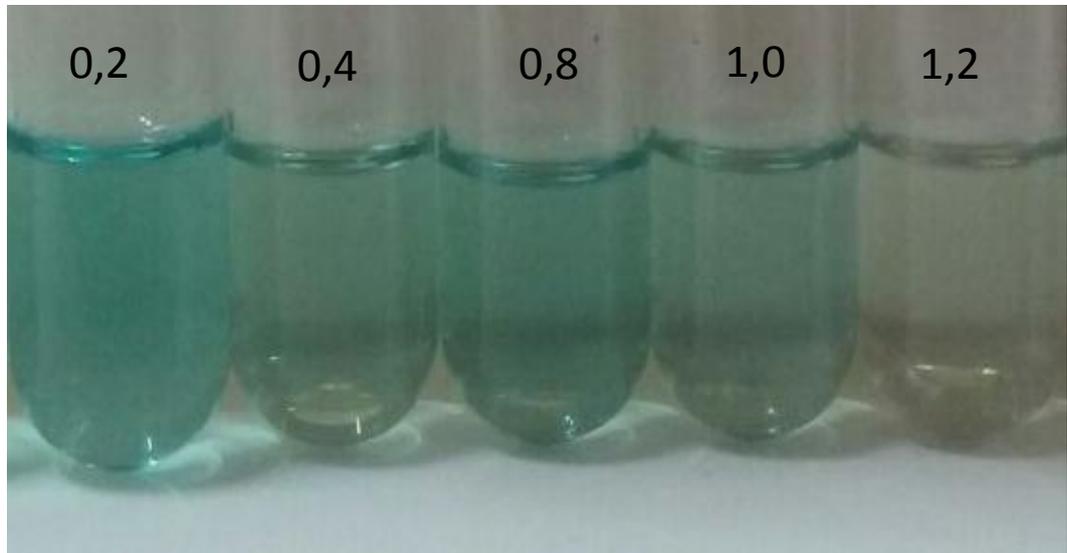
**Figura 29:** Estabilização do radical ABTS<sup>•+</sup> por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.



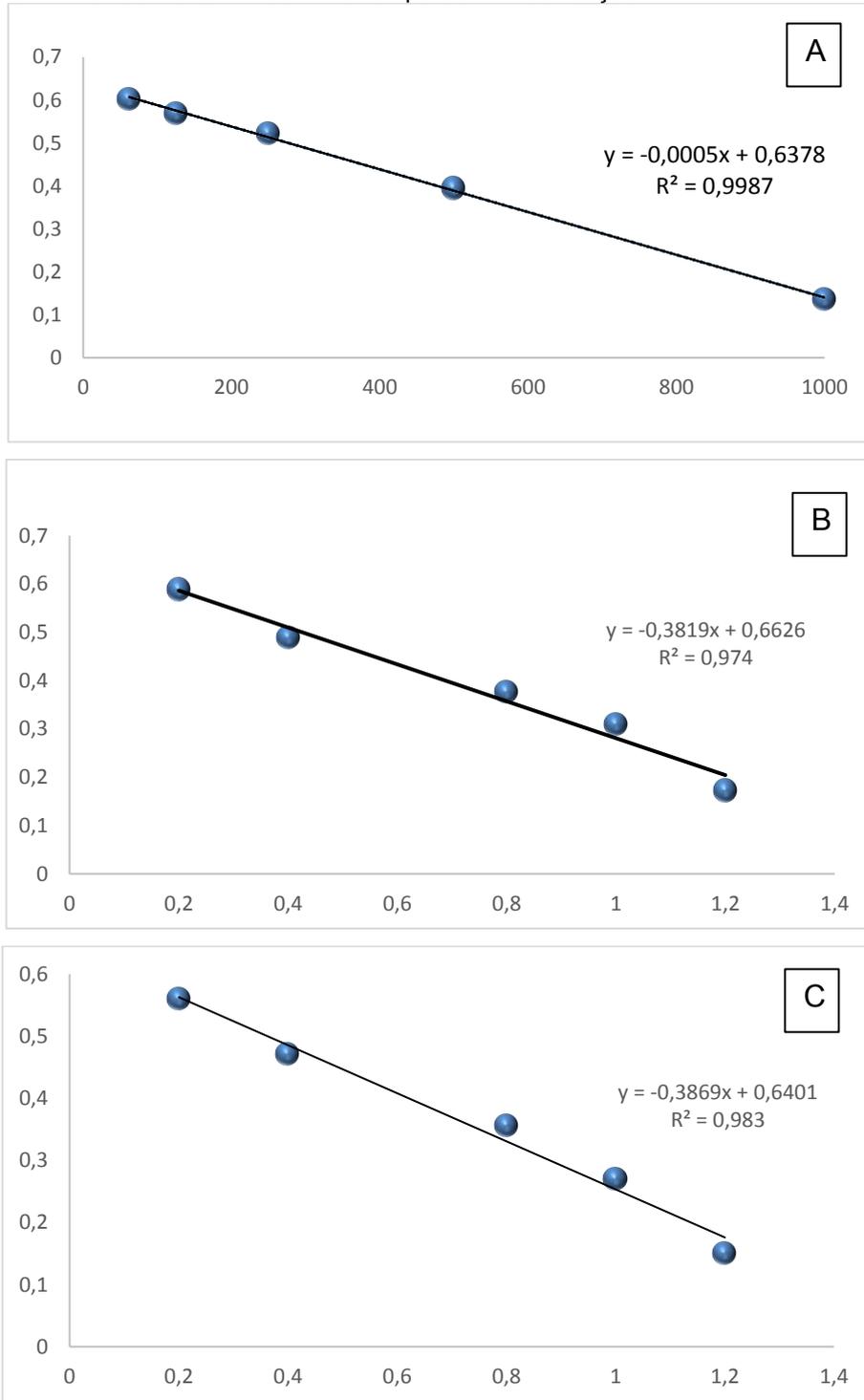
Fonte: Adaptada de Sousa et al., 2007.

A fração acetato de etila revelou TEAC (Atividade Antioxidante Total Equivalente ao Trolox) de 819 mM de trolox/g de amostra e  $EC_{50}$  de 0,81 mg/mL. Comparando-se os dados de ABTS aqui encontrados com alguns trabalhos, percebeu-se que a similaridade entre resultados de outros extratos de plantas que contem altos teores de flavonóides. Leite-Legatti et al. (2012) detectaram valores bastante altos de TEAC (945 mM de Trolox/g de amostra) na casca do fruto da jaboticaba e relacionaram o efeito ao alto teor de compostos fenólicos, principalmente, flavonoides.

**Figura 30:** Reação de captura do radical ABTS pela FAcOEt nas concentrações variadas (mg/mL).

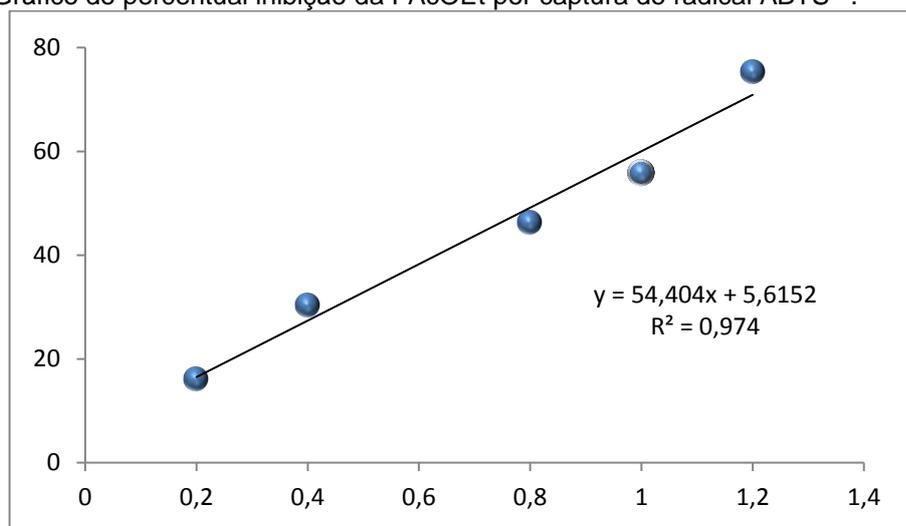


**Figura 25:** A: Curva do trolox no tempo de 6 min de reação com o radical ABTS<sup>•+</sup>. B: Curva da FAcOEt no tempo de 6 min. C: Curva da FAcOEt no tempo 30 min de reação.



Legenda: Y: absorbância, X: concentração (A:  $\mu\text{M}$ , B; C:  $\text{mg/mL}$ .)

**Figura 32:** Gráfico do percentual inibição da FAcOEt por captura do radical ABTS•+.



Legenda: Y: % de inibição; X: concentração (mg/mL)

O método ABTS foi descrito primeiramente por Miller et al. (1993) para medir a capacidade antioxidante (doador de hidrogênio ou de elétrons) total de fluidos corpóreos e soluções de fármacos, e se baseia na degradação do radical azul/verde ABTS•+, convertendo-o em um produto incolor. O grau de descoloração reflete a quantidade de ABTS•+ que foi degradado pelo antioxidante e pode ser determinado por espectrofotometria UV-Vis (FERREIRA et al., 2015).

A relativa simplicidade do teste ABTS permite sua aplicação na rotina laboratorial. O resultado pode ser expresso como valor TEAC (do inglês *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*), que se define como a concentração do composto de referência que apresenta percentual de inibição correspondente a concentração de 1 mM deste, no caso o trolox (WANG et al., 2013). Dessa forma, o valor TEAC caracteriza a capacidade da amostra testada em reagir com o radical ABTS•+, bem como em inibir processos oxidativos. Em muitos compostos fenólicos e em outras substâncias isso ocorre lentamente (CAMPOS, 1997). Contudo, a pequena seletividade das reações de doação de hidrogênio apresentada pelo método ABTS•+, quando em comparação com o DPPH, corresponde uma limitação considerável. O radical ABTS•+ reage com qualquer composto aromático hidroxilado, independentemente da sua real capacidade antioxidante (ROGINSKY et al., 2005). No entanto, a técnica de ABTS possui a vantagem em relação à DPPH de possibilitar um resultado mais rápido e ter menor custo (KUSKOSKI et al., 2005; IKEDA, 2013).

O trolox, é um derivado do tocoferol, hidrossolúvel, análogo à vitamina E, e antioxidante sintético que doa, tal como o tocoferol, átomos de hidrogênio aos radicais

(CHIRINOS et al., 2008; HALL et al., 2010; PARKER et al., 2014). O valor do TEAC é dependente do tempo de reação, assim como da concentração da amostra quantificada (EVANS et al., 1996). Esta dependência aliada a baixa seletividade do ABTS.+ na reação com átomos doadores de hidrogênio constituem uma limitação desse método (MOURA, 2013). Deste modo, divergências nos resultados de TEAC podem ser atribuídas a fatores limitantes, como a diferença no tempo de incubação ou na estratégia de obtenção de ABTS•+. Para tanto, esses parâmetros devem também ser considerados durante a análise dos resultados.

O radical ABTS•+ pode ser formado em solução aquosa ou orgânica a partir do cromógeno ABTS ( $\lambda$  max = 342 nm), que é solúvel em água e quimicamente estável (ANTOLOVICH et al., 2002; OPITZ et al., 2014). No entanto, o radical ABTS•+ gerado, menos estável, apresenta novas características espectrais, com máximos de absorção a 414, 645, 734 e 815 nm (PRIOR; CAO, 1999; ZHANG et al., 2014). A habilidade relativa dos antioxidantes doadores de átomos de hidrogênio em evitar a acumulação de radicais ABTS•+, pode ser mensurada espectrofotometricamente a 414 ou 734 nm. A monitorização do ABTS•+ a 414 nm revela limites de detecção baixos, no entanto, as interferências de compostos das amostras são minimizadas efetuando leituras de absorvância a 734 nm (ANTOLOVICH et al., 2001; LABRINEA et al., 2004; ZHANG et al., 2014).

Alguns trabalhos que estudaram o potencial antioxidante de extratos de própolis, rico em flavonoides tal qual a crisina, confirmaram a forte correlação entre os valores de TEAC e os de flavonoides em amostras de diferentes localidades. Bonvehí e Gutiérrez (2011) observaram valores de 560 a 1430 mM Trolox/g de extrato etanólico de própolis encontrada na Espanha. Isla et al. (2009), trabalhando com própolis da Argentina obtida em épocas diferentes do ano, obtiveram valores de 867,85 a 809,58 mM de Trolox/g de extrato nos meses de outubro a dezembro e de 570 a 600 mM de Trolox/g de amostra nos meses de abril a julho. Miguel et al (2010) associaram a atividade antioxidante de própolis portuguesas com a quantidade de fenólicos/flavonoides.

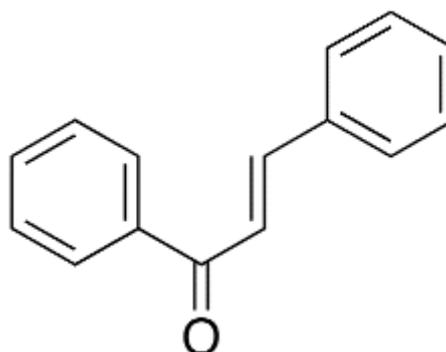
Da Silva (2011) o extrato alcóolico de própolis, observou atividade antioxidante superior para o ensaio do radical ABTS•+ que no DPPH, utilizando-se o trolox como padrão em ambos e o perssulfato de potássio na reação geradora de ABTS•+. No entanto, relação inversa foi observada quando os dados foram expressos em percentagem de inibição. Assim, o autor conclui que seria mais indicada a utilização do

ensaio do radical ABTS<sup>•+</sup> quando a atividade antioxidante é representada em TEAC. Relação semelhante entre os resultados expressos para os ensaios de DPPH e ABTS foi observada com a FAcOEt do jaborandi, corroborando com a estimativa de que os valores de TEAC são os mais indicados para análise por ABTS.

O valor TEAC, no entanto, pode não se correlacionar exatamente com a capacidade antioxidante. No estudo de Arts e colaboradores (2004), avaliou a atividade da crisina frente ao radical ABTS<sup>•+</sup> com leitura realizada por CLAE. Os autores observaram que este flavonoide, possui um valor de TEAC bastante alto e maior que o trolox, ao passo que sua capacidade antioxidante é dita como moderada. A razão deve-se ao fato de que na reação com crisina forma-se um radical que reage rapidamente com uma segunda molécula de ABTS<sup>•+</sup>, contribuindo assim para o valor de TEAC. Ou seja, os produtos resultantes da reação do ABTS<sup>•+</sup> também podem reagir com o radical, acarretando no aumento do valor de TEAC. Deste modo, pode acontecer que estes produtos tenham melhor capacidade antioxidante do que o composto de partida. Conforme o demonstrado nesse estudo, o TEAC da crisina é, na verdade, a soma de vários compostos, incluindo crisina, radical de crisina e o produto detectado por CLAE. Apesar desta limitação, no que diz respeito aos ensaios de avaliação da atividade antioxidante, o método TEAC é uma ferramenta útil na detecção de antioxidantes desconhecidos em misturas complexas (ARTS et al., 2004).

Espera-se que o produto formado a partir da crisina seja mais hidrofílico do que o composto original. Além disso, a taxa de reação do produto da crisina com ABTS<sup>•+</sup>, excede a da crisina com o mesmo radical enormemente. No trolox, há um anel com abertura para gerar a quinona na reação com ABTS. Uma abertura de anel comparável na crisina resultaria numa chalcona (figura 33), que possui potente ação antioxidante. (REZK et al., 2002). Com base nestas informações, o estudo de Arts et al. (2004) especula que o produto formado na reação da crisina com o radical ABTS<sup>•+</sup> possa ser semelhante a chalcona.

**Figura 26:** Estrutura química de uma chalcona.



Fonte: acervo pessoal.

Desta forma, alguns trabalhos apontam que determinados flavonoides, tal qual a quercetina e a crisina, podem ter atividade antioxidante substancial quando parcialmente oxidados. (KONDO et al., 1999; DANGLES et al., 2000; GARDI et al, 2015).

Ainda sobre o trabalho de Arts e colaboradores (2004), comparando-se a ação antioxidante do trolox a crisina, o primeiro mostra uma redução na absorbância e, conseqüentemente, na quantidade de ABTS<sup>•+</sup> em uma reação que se completa em segundos. A crisina, por outro lado, apresentou um maior grau de descoloração que o trolox, porém com reação mais lenta. Desta forma, os autores concluíram que valor de TEAC para a crisina dever ser calculado a partir do tempo de 6 minutos para leitura da absorbância.

Sobre o tempo de medida de reação, inúmeros trabalhos apresentam grande divergência quanto o período mais adequado para análise. Alguns autores sugerem a medida aos 2 minutos, pois nesse tempo o trolox já reagiu completamente com o radical. Justificam eles que quanto mais rápido um antioxidante reagir com um radical, melhor será sua atividade antioxidante em organismos animais, haja vista que os radicais livres, no organismo, possuem uma meia vida muito curta (6 - 10 segundos). Muitos trabalhos utilizam, entretanto, tempos mais longos de reação (4, 6, 10, 30 e 60 minutos), pois os antioxidantes alimentares normalmente não reagem tão prontamente com o radical, assim sua medida a um tempo muito curto subestimaria o seu Valor TEAC (LIMA, 2008).

A FAcOEt do jaborandi foi avaliada nos seguintes tempos de reação com o radical: 6 e 30 minutos. O valor de TEAC foi calculado no tempo de 6 min a partir da equação da reta obtida no ensaio com o trolox (tempo 6 min) da figura 31-A. O gráfico

do tempo de 30 min revelou que a FAcOEt continuou reagindo com o radical ABTS•+ ao longo do tempo de reação (figura 31-C), apresentando valores absolutos de TEAC maiores com tempos mais longos. Observou-se que a reação, de uma forma geral, tende a estabilizar-se aos 30 minutos; assim como foi percebido em outros trabalhos (ARUMUGAM, 2006; LIMA, 2008).

A explicação para o uso de tempos mais longos é que certos antioxidantes seguem uma reação bifásica frente ao radical ABTS, com uma fase inicial rápida e, posteriormente, uma fase lenta (VAN DENBERG et al., 1999). Existem duas possíveis explicações: a formação de produtos da reação em um primeiro momento, que depois reagem lentamente com o ABTS•+; e a existência de um reordenamento molecular dos antioxidantes.

Os compostos antioxidantes podem agir de maneira diferente nos diversos métodos (MOURA, 2010; SANTOS et al, 2014), não sendo, portanto, pertinente a comparação quantitativa do efeito antioxidante entre técnicas distintas. Deve-se, contudo, confrontar os resultados das diferentes técnicas para se chegar às conclusões, principalmente sobre o comportamento da amostra frente às condições e reações estabelecidas no método.

#### **5.7.1.4 Atividade antioxidante observada no perfil eletroquímico da FAcOEt**

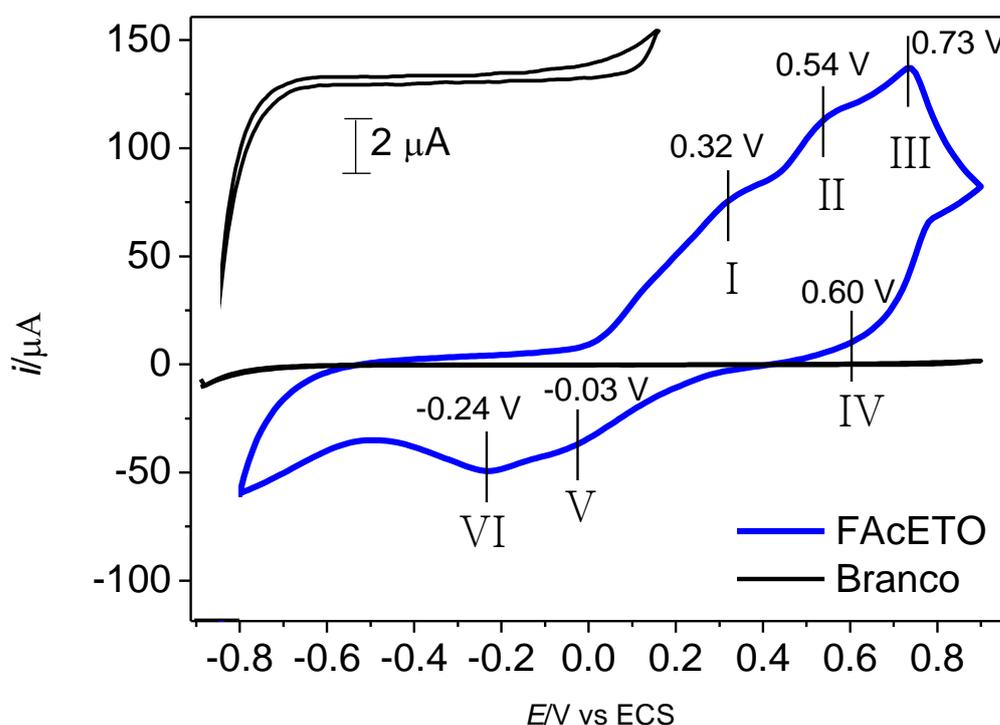
As técnicas de voltametria, em especial a voltametria cíclica são uma poderosa ferramenta para auxiliar na determinação da atividade antioxidante de uma grande variedade de moléculas e/ou extratos. De acordo com a literatura, os compostos considerados melhores antioxidantes são, geralmente, os que apresentam oxidação em potenciais menores e com maior intensidade de corrente, isto é, que se oxidam com maior facilidade (ARRIBAS; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ; CHICHARRO, 2012).

Neste sentido, os métodos eletroanalíticos têm sido bastante empregados na determinação do potencial redutor de compostos fenólicos, abrangendo o estudo de mecanismos de proteção antioxidante de flavonoides (ANGELO; JORGE, 2007). Parâmetros como a corrente de pico anódica ( $i_{pa}$ ) e potencial de pico anódico ( $E_{pa}$ ) são comumente utilizados para demonstrar a capacidade de transferência de elétrons nos flavonoides, possibilitando prever ou atestar a atuação deles como agentes antioxidantes em meio biológico (MASEK; ZABORSKI; CHRZESCIJANSKA, 2011).

Dessa forma, o presente estudo foi conduzido com o objetivo de investigar os potenciais *redox* da fração FAcOEt.

Na Figura 34 é mostrado um voltamograma cíclico obtido para a FAcOEt em tampão PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 6,4. Para fins comparativos também está evidenciado um voltamograma cíclico do eletrodo somente com o eletrólito suporte puro. Como era esperado, para o eletrólito puro, não foi observado nenhum processo *redox* dentro das condições experimentais empregadas. Por outro lado, no voltamograma registrado para a FAcOEt foi observado um conjunto de processos *redox*. Durante a varredura anódica, observou-se 3 processos de oxidação ( I, II e III) , os quais aparecem, respectivamente em 0,32 V, 0,54 V e 0,73 V vs Ag/AgCl. Já na varredura catódica, observou-se 3 processos de redução (processos IV, V e VI), nos respectivos potenciais: 0,60 V, -0,03 V e -0,24 V vs Ag/AgCl. A reversibilidade de cada um desses processos ainda está sendo investigada. De uma forma geral, os vários processos de oxidação observados numa gama entre 0.3 V e 0.7 V indicam que a fração FAcOEt tem uma potencial atividade antioxidante. Entretanto, por voltametria ainda não foi possível quantificarmos tal atividade, porém, esses estudos estão em andamento em nosso grupo.

**Figura 27:** Voltamogramas cíclicos mostrando o comportamento eletroquímico da FAcETO em tampão PBS 0,1 M, pH 6,4. Medidas realizadas em temperatura ambiente (25 °C) e  $v = 0.05 \text{ V s}^{-1}$ .



Como exemplo de estudos que empregam a voltametria cíclica para avaliação de atividade antioxidante, pode-se destacar o trabalho de Bianchini (2014), o qual estudou a atividade antioxidante de extratos de plantas ricas em flavonoides. O autor observou que aqueles extratos que apresentaram processos de oxidação em baixos potenciais também possuíam uma maior concentração de compostos fenólicos. O extrato etanólico de *Eugenia anomala* (D. Legrand), por exemplo, apresentou grande quantidade destes compostos e exibiu picos de oxidação no potencial de 0,4 V.

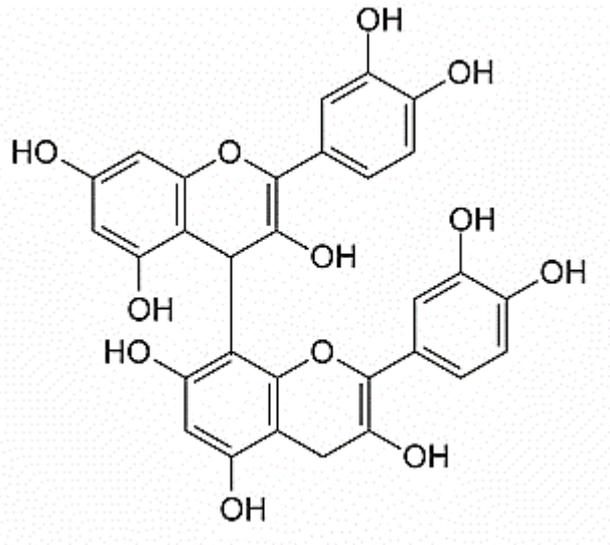
Hilgemann e colaboradores (2013) utilizaram a voltametria cíclica para a verificação da atividade antioxidante de infusões (chás) de folhas de vegetais empregando eletrodos de carbono. Os autores verificaram que esta técnica pode prover informações sobre os constituintes do substrato estudado assim como dados pertinentes sobre a capacidade antioxidante. Demonstraram ainda que a aplicação de eletrofotocímica para a mensuração desta atividade possui suas vantagens e desvantagens, bem como outras técnicas de detecção disponíveis. Entre as vantagens destacam-se: a rapidez do teste, a necessidade de uma pequena quantidade de amostra e a observação da ação antioxidante, mesmo em amostras turvas como extratos vegetais.

Carvalho et al (2013) destacaram que os métodos voltamétricos que se fundamentam em reação direta de antioxidantes são de grande valor e vantajosos, pois possibilitam o estudo apenas da amostra, sem que ocorra reações secundárias ou paralelas, como as que existem em estudos *in vivo* ou em outros métodos que são mais passíveis de erros analíticos, como os que empregam radicais para atestar o poder antioxidante.

Muitos autores já estudaram o mecanismo eletroquímico dos flavonóides (JORGENSEN et al., 1998; HOTTA et al., 2001; BRETT; GHICA, 2003; TIMBOLA et al., 2006; MEDVIDOVIC-KOSANOVIC et al., 2010). Tais trabalhos expuseram principalmente o processo oxidativo sofrido pelos grupos OH, que resultam na formação da o-quinona correlativa. Outros pesquisadores também propõem a geração deste mesmo produto, sendo este um composto bastante instável e capaz de sofrer reações químicas homogêneas, como rearranjos intramoleculares, formando compostos poliméricos gerados a partir de dímeros (Figura 35) ou oligômeros semelhantes as quinonas (JORGENSEN et al., 1998; YANG et al., 2001; BRETT; GHICA, 2003; ARSLAN; YAZICI; ERBIL, 2005). Estes rearranjos devem ser

considerados principalmente em se tratando de amostras não puras, que contenham várias moléculas ou princípios ativos, como é o caso da FAcOEt.

**Figura 28:** Representação de uma dimerização entre compostos fenólicos.

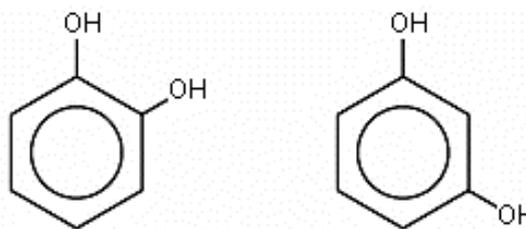


Fonte: Adaptado de Sá et al, 2012.

É válido ressaltar que os fatores mais relevantes que influenciam na via oxidativa e, assim, na quantidade de cada um dos produtos a serem gerados são: eletrólito suporte, o pH, os aditivos, a densidade de corrente, o potencial aplicado ao eletrodo e a concentração de espécies em solução. Geralmente, em amostras ricas em compostos fenólicos, a via de polimerização dos fenóis na superfície do eletrodo é, prevalente, enquanto que a formação de quinonas é favorecida quando as concentrações destes são menores (ARSLAN; YAZICI; ERBIL, 2005; FERREIRA et al., 2006).

Os flavonóides exibem diferentes potenciais de oxidação dependendo da subclasse a que pertencem e dos grupos substituintes que possuem (ISAQUE, 2010). O grupamento catecol (Figura 36) no anel B desses compostos, tal qual da quercetina, é, muitas vezes, visto em compostos com alta capacidade antioxidante já que a oxidação do grupamento 3'4'-di-hidroxil acontece em potenciais inferiores a 0,5 V, o qual é considerado um potencial baixo. Esta reação envolve a transferência de dois elétrons e dois prótons, e é reversível (DE SÁ, 2013).

**Figura 29:** Estrutura química do grupo catecol (à esquerda) e resorcinol (à direita).



Fonte: Adaptado de Santos, 2012.

A desprotonação é facilitada em pH básico, dessa forma o pH exerce forte influência sobre a oxidação de flavonoides. A reação ocorre, predominantemente, em potenciais maiores que 0,8 V em meios ácidos e tal característica é relevante para a estabilidade dos flavonoides no estômago, que possui pH em torno de 1,5 e 2,0, possibilitando maior biodisponibilidade desses compostos após ingestão (JOVANOVIĆ, et al., 1998). Nesse contexto, é provável que o potencial de oxidação dos compostos da fração tenham sofrido algum aumento mediante o pH levemente ácido do tampão PBS utilizado no experimento.

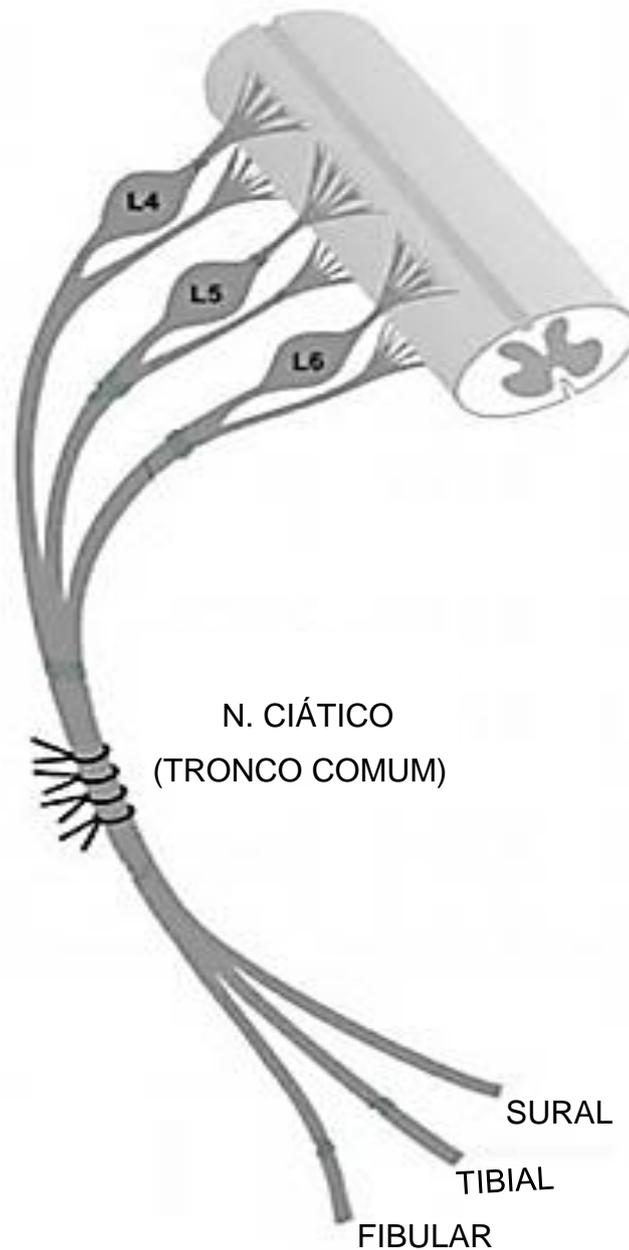
A reversibilidade das reações *redox* dos flavonoides pode ser explicada pelo fenômeno de ressonância nas formas quinônicas com substituintes nas posições para e orto, pois esta estrutura é capaz de estabilizar os compostos formados (NASR, 2005). Os compostos derivados de resorcinol como a crisina, entretanto, muitas vezes passam por processos oxidativos irreversíveis, uma vez que não há ressonância em compostos meta substituídos, dessa forma, não ocorre a estabilização do radical, acarretando em um potencial mais elevado para, em média 1,0 V. Em discrepância ao resorcinol, os produtos formados pela oxidação podem sofrer processos de transferência de elétrons reversíveis em potenciais menores (JANEIRO; OLIVEIRA-BRETT, 2005).

### 5.7.2 Teste de Indução da neuropatia pela compressão do nervo ciático

A dor neuropática (DNP) resulta no aparecimento de alterações sensoriais, como a hiperalgesia e alodinia (KLUSÁKOVÁ; DUBOVÝ, 2009; VARCELINO et al., 2015). Estes sintomas podem também ser observados em animais submetidos a modelos experimentais, como a CCI (do inglês *Chronic Constriction Injury*). A observação dessas respostas permite inferir sobre a existência de dor (DUBNER, 1983; KAVALIERS, 1988; WILKERSON et al., 2015). A CCI, proposta por Bennet e Xie (1988), utilizada neste

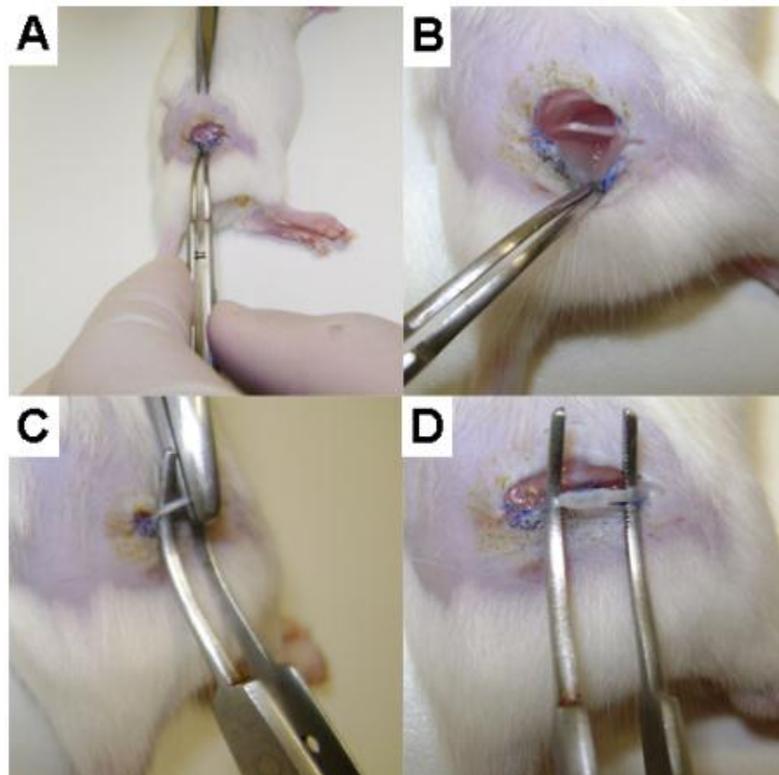
estudo, consiste em aplicar quatro amarraduras no tronco comum do nervo isquiático do animal, unilateralmente (figura 37 e 38), com fio bioabsorvível. Este modelo permite detectar tanto a dor espontânea como a evocada.

**Figura 30:** Esquema representativo do experimento de CCI.



Legenda: Esquema de um segmento da medula espinal ilustrando a formação do nervo isquiático pela união das raízes dorsais e ventrais da medula espinal. Nas raízes dorsais estão mostrados os gânglios das raízes dorsais (L4, L5, L6) do nervo isquiático, o qual é composto por dois nervos, o tibial, que posteriormente se divide também no nervo sural, e o fibular. No tronco comum do nervo isquiático estão mostradas as quatro amarraduras (adaptada de Klusáková e Dubový, 2009; Hughes et al., 2013).

**Figura 31:** Modelo de esmagamento do nervo ciático.



Legenda: (A) Incisão; (B) Nervo isquiático exposto; (C) Constricção do nervo isquiático; (D) Nervo após constricção. Fonte: Filho, 2013.

Alterações em distintas regiões do neuroeixo são resultantes da compressão ao nervo e podem ser observadas já a partir dos primeiros dias após a lesão. Localmente, observa-se isquemia, liberação de substâncias pró-inflamatórias, edema intraneural (MARCHAND; PERRETI; MCMAHON, 2005; LU et al., 2014) e degeneração de fibras mielinizadas e não mielinizadas (GABAY; TAL, 2004). Estes eventos periféricos conduzem a modificações na excitabilidade e conectividade em regiões espinais e supraespinais (SAADÉ; JABBUR, 2008; BLOM et al.; 2014), cuja mediação parece envolver a liberação/formação de citocinas, neurotrofinas (MARCHAND; PERRETI; MCMAHON, 2005; AL-AMIN et al., 2011) e EROs (PATHAK et al., 2014). As alterações comportamentais que se seguem, como hiperalgesia mecânica e térmica, podem ser observadas a partir dos primeiros dias após a lesão (GOECKS et al., 2012; HORST et al. 2014) e persistem por várias semanas (JAGGI; JAIN; SINGH, 2011).

A CCI induziu o desenvolvimento de hiperalgesia térmica e mecânica nas ratas tratadas com salina. A administração da FAcOEt nas doses de 50 e 100 mg/kg preveniu, significativamente ( $p < 0.05$ ), esses eventos, como é possível observar na figura 41. Pode-se perceber na figura 39 que o processo de neuropatia já foi instituído

a partir do 4 dia de experimento e perdura no sétimo dia, onde apenas no controle sham, os animais não manifestaram esse comportamento. Após o sétimo dia, foi realizado o tratamento nos grupos e avaliados os tempos: 0, 6, 120 e 180 minutos. Os controles testados: grupo morfina, sham e veículo, se mantiveram satisfatórios quanto a seus resultados (figura 39). Apenas a dose maior de 100 mg/kg da FAcOEt mostrou-se estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) na inibição das alterações comportamentais da neuropatia (figura 40).

Figura 39: Período de instalação da neuropatia.

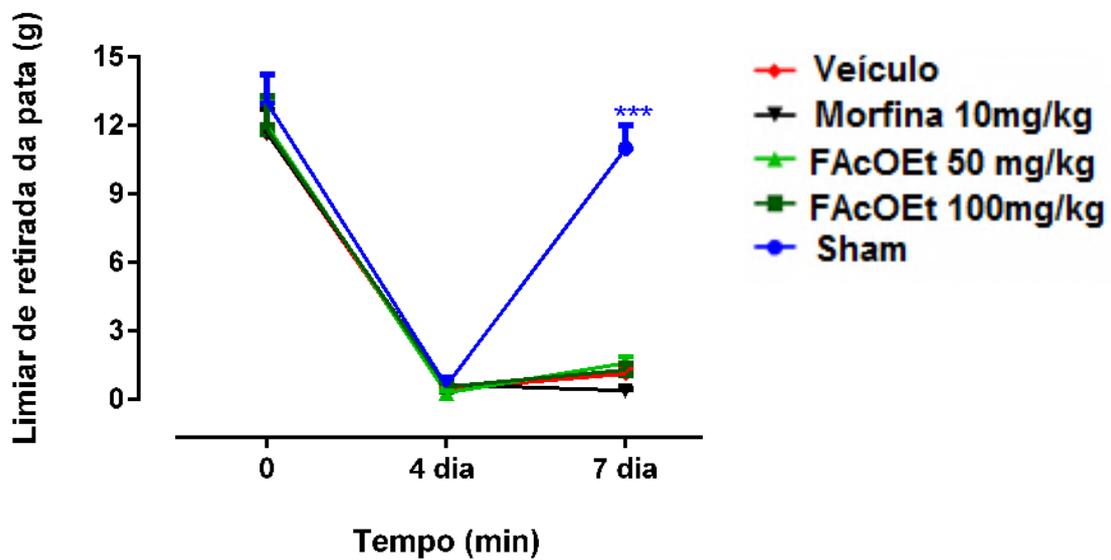
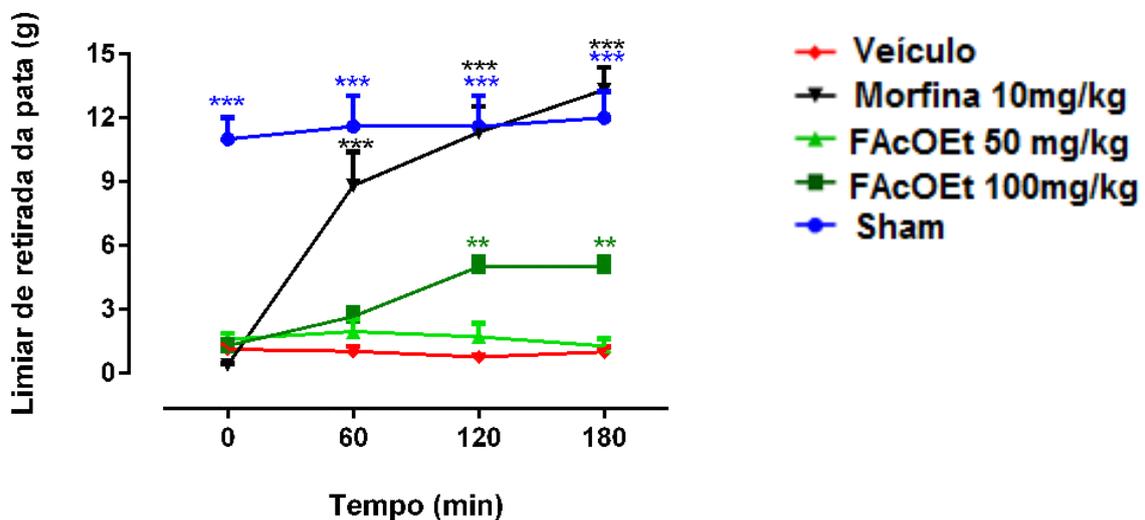


Figura 40: Teste de Indução da neuropatia pela compressão do nervo ciático. Ilustração de grupos-controle.



Barbosa (2014) avaliou o extrato hidroetanólico de própolis na dose de 1 e 10 mg/kg em ratos. A administração do extrato na dose de 10 mg/Kg apresentou resultados significativos sobre a recuperação do nervo ciático após constrição do mesmo. Os resultados foram percebidos tanto em testes histológicos como comportamentais, tais como a escala de Basso, Beattie e Bresnahan (BASSO, BEATTIE E BRESNAHAM, 1995), que tem como objetivo avaliar a evolução da recuperação funcional motora dos animais; testes sensoriais de posicionamento tátil; proprioceptivo e sensibilidade dolorosa. Os resultados mostraram que os animais apresentaram maior número de fibras mielinizadas e maior índice funcional ciático do que o grupo controle ibuprofeno. Desta forma, os autores concluíram que o extrato de própolis promove um efeito neuroprotetor induzindo a recuperação do nervo ciático estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em comparação com o fármaco anti-inflamatório convencional (ibuprofeno).

Muitos moduladores neuroquímicos estão envolvidos no surgimento e na manutenção da DNP. Em virtude da lesão nervosa, diversos mediadores inflamatórios são produzidos no local da lesão e atuam tanto nesse local como no SNC. Estes mediadores contribuem com os sinais característicos desse tipo de dor (ZIMMERMANN, 2001; MOSLEY et al., 2006, BASBAUM et al., 2009; TIWARI et al., 2014). Dentre os mediadores químicos, será destacada a produção de EROs (KHODR; KHALIL, 2001; MOSLEY et al., 2006; GARDINER et al., 2009; MARTINS, 2016).

Com relação às EROs, estudos demonstraram que o estresse oxidativo é um importante determinante das conseqüências neuropatológicas e comportamentais decorrentes da constrição de nervo periférico (WAGNER et al., 1998; KOMIRISHETTY et al., 2016). Ratos com constrição crônica no nervo isquiático tiveram aumento na concentração do metabólito malondialdeído nesse nervo, havendo ainda redução da glutathione reduzida e acréscimo na atividade da superóxido dismutase. A catalase não alterou sua atividade local nestes animais (NAIK et al., 2006; DOS SANTOS, 2013). Ainda, houve acréscimo no TBARS (substância reativa ao ácido tiobarbitúrico) e na concentração total de cálcio também nesse nervo (MUTHURAMAN et al., 2008). Estes resultados mostram a importante participação das EROs no local da lesão, que podem derivar de várias fontes, especialmente, a partir de neutrófilos ativados (KHODR; KHALIL, 2001; HORST, 2011). Porém, está demonstrado que as alterações nas atividades das enzimas superóxido dismutase e catalase, e aumento na

lipoperoxidação, também ocorrem em regiões do SNC após constrição no nervo isquiático (GOECKS, 2011).

Rokyta e colaboradores (2003) utilizaram um modelo de estimulação dolorosa pela compressão das patas dos animais, diariamente por 10 minutos. Nesse estudo, foi demonstrado um aumento da lipoperoxidação no córtex sensorio-motor 5 dias após o início da estimulação nociva. Assim, a ativação das vias nociceptivas causa estresse oxidativo em diferentes regiões do SNC envolvidas com a transmissão e o processamento da informação dolorosa.

Assim, o emprego deste modelo de dor neuropática é útil para a observação e o conhecimento de fenômenos e moléculas envolvidos na DNP, especialmente aquela resultante da compressão nervosa.

O envolvimento de EROs na indução e manutenção da DNP tem sido sugerido desde pouco mais que duas décadas. Já foi relatado na literatura que o tratamento sistêmico ou intratecal com antioxidantes é capaz de reduzir o estresse oxidativo em diversos modelos experimentais (JENSEN; FINNERUP, 2007; CRUCCU, 2009; PINTOS, 2015). Estes efeitos são mediados por ações ao nível da medula espinhal (KIM, 2004; PARK, 2006; PINTOS, 2015), estando também descritas no gânglio da raiz dorsal (MAO, 2009; KOMIRISHETTY et al., 2016). Não se podem, contudo, excluir possíveis ações supraespinhais. No entanto, apesar da multiplicidade de estudos realizados, o papel das EROs na fisiopatologia da DNP e as suas reais possibilidades terapêuticas estão ainda longe de ser esclarecidas (MORAIS; PINHO; TEIXEIRA, 2010). Portanto, o potencial neutralizante de EROs da FAcOEt decorrente de sua ação antioxidante pode ter influenciado na resposta observada que se opõe a DNP periférica induzida por compressão do nervo isquiático.

Não existem estudos na literatura que relacionem a ação da crisina frente a DNP induzida por lesões em nervos periféricos. Porém, alguns trabalhos já foram publicados revelando a ação moduladora da crisina sobre os processos de nocicepção em condições de estresse. Farkhondeh e colaboradores (2015) investigaram o efeito deste flavonoide sobre os comportamentos nociceptivos induzidos pela formalina e os níveis séricos de corticosterona e noradrenalina em ratos. Este modelo de dor está associado à lesão tecidual, no qual se quantifica a resposta comportamental provocada pela injeção subcutânea de formalina diluída na pata traseira do animal, e é eficazmente utilizado para determinar a atividade antinociceptiva de agonistas opióides, agonistas parciais de opióides e anti-inflamatórios não esteroidais.

A vantagem deste teste sobre outros métodos de nocicepção é a possibilidade de avaliar dois tipos diferentes de dor ao longo de um período prolongado de tempo e, assim, permite o teste de analgésicos com diferentes mecanismos de ação. As respostas comportamentais à formalina possuem um padrão bifásico que apresenta uma fase inicial aguda (primeira fase), e um período mais prolongado (segunda fase) de atividade comportamental aumentada, que pode durar até cerca de uma hora.

Ainda no estudo de Farkhondeh e colaboradores (2015), a crisina revelou sua ação analgésica. Esta flavona inibiu, significativamente ( $p < 0,05$ ), a primeira fase da dor na dose de 50 e 100 mg/kg. A segunda fase da dor revelou a notável atividade para a morfina (10 mg/kg), uma droga analgésica de ação central, e a crisina (150 mg/kg). O estudo revelou ainda a diminuição dos níveis séricos de corticosterona e noradrenalina pela crisina. Sajedianfard et al. (2005) propuseram que o nível de noradrenalina no cerúleo (*locus coeruleus*) aumenta em grande parte pela administração de formalina, resultando em seu aumento na corrente sanguínea.

Kandhare et al. (2014) concluíram que a crisina, em seu potencial antioxidante e propriedade antiapoptótica, causou a recuperação subsequente de ambas as funções motora e sensorial via modulação de biomarcadores endógenos e apoptose neuronal por inibir a incidência de *déficits* neurológicos devido lesão medular espinhal. Neste estudo, foi avaliada a capacidade neuroprotetora da crisina em ratos pela indução de aneurisma extradural por compressão, sendo avaliados vários parâmetros comportamentais, bioquímicos, e moleculares. Foi percebido que o tratamento crônico com crisina (20 e 40 mg/kg) atenuou, significativamente ( $p < 0,05$ ) e dependente da dose, a diminuição do peso corporal. Melhorou, consideravelmente, o limiar nociceptivo, a velocidade de condução nervosa motora e sensorial. A alteração da atividade da superóxido dismutase, glutatona reduzida e fosfato inorgânico ligado à membrana foram, consideravelmente, restauradas pelo tratamento com crisina. A lesão na medula espinhal resultou em aumento significativo na peroxidase lipídica, no óxido nítrico, no fator de necrose tumoral alfa, na interleucina-1 $\beta$  e no bax, enquanto que a expressão de bcl-2 e caspase-3 (genes reguladores dos processos apoptóticos) foi consideravelmente, reduzida. As aberrações histológicas induzidas após lesão na medula espinhal, testículo, rim e bexiga urinária também foram restauradas a partir do tratamento com crisina (20 e 40 mg/kg), indicando o caráter neuroprotetor deste flavonoide.

A crisina é referida na literatura como eficaz no tratamento de diversas doenças neurológicas incluindo doenças crônicas como a hipoperfusão, bem como a neuroinflamação mediada pela microglia (HE et al., 2012). Segundo Há e colaboradores (2010), esta propriedade de neuroproteção pode ser atribuída às múltiplas facetas da crisina. Primeiramente, é uma 2,4- dihidroxicalona com um núcleo de biflavonoides. Tem o potencial lipofílico para atuar em várias doenças neuronais. Em segundo lugar, por seus anéis característicos dos flavonoides que apresentam um potencial antioxidante e exerce papel neuroprotetor com proficiência clínica. Apresenta um potencial comprovado de neutralizar os radicais, exercendo assim um efeito citoprotetor através de sua atividade antioxidante.

Os flavonoides em geral apresentam atividade anti-inflamatória que é invariavelmente associada a ações inibitórias de citocinas (KANDHARE et al., 2012). Têm sido bastante mencionado a preservação da integridade neuronal por este grupo através da inibição da morte por apoptose celular e proteção neurológica. Tal papel protetor em distúrbios do sistema nervoso central já foi comprovado por vários autores e apontam o potencial de restauração na homeostase neuronal. (MAHER; AKAISHI; ABE, 2006; HA et al., 2010; HE et al., 2012; KANDHARE et al., 2014).

## 6. CONCLUSÕES

Os ensaios de caracterização farmacognóstica da FAcOEt das folhas do jaborandi (*P. microphyllus*) revelaram a presença característica de flavonoides e apontaram a flavona crisina como provável composto majoritário da mesma. Porém, outros métodos analíticos, como RMN e cristalografia de raio X, devem ser realizados para se confirmar esta hipótese.

Esta mesma fração manifestou ação antioxidante moderada nos métodos baseados em captura de radicais, apontando uma melhor atividade no método ABTS (TEAC de 819  $\mu\text{mol}$  de trolox/g de fração) que no ensaio DPPH ( $\text{CE}_{50}$  de 0,5 mg/mL). Este resultado pode ser explicado pelo efeito dos produtos da oxidação da crisina frente ao radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ , provavelmente semelhante a uma chalcona, que possui potente ação antioxidante e superior a da crisina. A FAcOEt revelou ainda processos *redox* em baixos potenciais no teste de voltametria cíclica, indicando atividade antioxidante, uma vez que se oxida mais facilmente.

O teste *in vivo* de indução de neuropatia pela compressão do nervo ciático realizado em ratas *Wistar* a partir da determinação do Limiar nociceptivo mecânico realizadoem Von Frey após o 7º dia de neuropatia, revelou atividade significativa ( $p < 0,05$ ) da FAcOEt na dose de 100 mg/kg em comparação com o grupo controle do fármaco de referência morfina. Este efeito se deve, provavelmente, pela sua ação protetora contra as EROs, intimamente relacionadas com a fisiopatologia da dor neuropática periférica.

Desta forma, os ensaios biológicos realizados neste trabalho revelaram a capacidade de ação antioxidante da FAcOEt das folhas do jaborandi registrada tanto *in vitro* como *in vivo*, no entanto, estudos mais aprofundados devem ser realizados para determinação inequívoca do(s) princípio(s) ativo(s) contido(s) na FAcOEt e seu comportamento *in vivo*, ainda pouco explorado na literatura para os antioxidantes.

## REFERÊNCIAS

- ACKLAND, M. L.; VAN DE WAARSENBURG, S.; JONES, R. Synergistic Antiproliferative action of the Flavonols Quercetin and Kaempferol in Cultured Human Cancer Cell Lines. **In vivo**, Atenas, v. 19, n. 1, p. 69-76, 2005.
- ADEBAYO, A. W.; OGUNSINA, B. S.; GBADAMOSI, O. S. The effect of cold-pressing and solvent extraction on some characteristics of kariya (*Hildegardia barteri*) seed oil. **Nutrition & Food Science**, v. 45, n. 4, p. 625-633, 2015.
- AL-AMIN, H.; SARKIS, R.; ATWEH, S.; JABBUR, S.; SAADÉ, N. Chronic dizocilpine or apomorphine and development of neuropathy in two animal models II: effects on brain cytokines and neurotrophins. **Experimental Neurology**, v. 228, n. 1, p. 30-40, 2011.
- ALVAREZ, M. A.; DEBATTISTA, N. B.; PAPPANO, N. B. Antimicrobial activity and synergism of some substituted flavonoids. **Folia Microbiologica**, v. 53, n. 1, p. 23–28, 2008.
- ALVES NETO, O. **Dor: princípios e prática**. 1 ed. São Paulo: Artmed, 2009.
- AMANTÉA, B. E. **Desenvolvimento de catalisadores sem platina: estudos comparativos da oxidação de metanol em 'PD/RU/C'e'PT/RU/C' em meio alcalino**. 2015. 73 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, 2015.
- AMARAL, J. M.; LANDIM, L. A.; DOMINGUES, R. L.; RAMOS, M. P. O. Estudo fitoquímico das folhas e do caule da *Davilla elliptica*. **Engenharias e Arquitetura-CENAR**, v. 2, n. 2, p.47-54, 2016.
- ANDERSEN, A.; MARKHAM, C. **Flavonoids: Chemistry, Biochemistry, and Applications**. 1. ed. Boca Raton: Revise Proof, 2005, p. 11-23.
- ANDRADE NETO, M.; MAFEZOLI, J.; CUNHA, U.A.; SILVEIRA, S.C.; SILVEIRA, E.R. Volatile constituents of *Pilocarpus trachyllophus* Holmes. **Journal of Essential Oil Research**, v. 7, n. 6, p. 671-674, 1995.
- ANDRADE, A. L. M. **Efeito da terapia laser de baixa intensidade (808 nm) no controle da dor neuropática em camundongos**. 2016. 93 f. Dissertação (mestre em fisioterapia), Universidade
- ANDRADE, A. W. L. Avaliação das propriedades antioxidantes e toxicológicas da agatisflavona: subsídio para o desenvolvimento de um medicamento. 2016. 120 f. Dissertação (Ciências farmacêuticas)- Departamento de Bioquímica e Farmacologia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2016.
- ANDRADE, S. R. A. D. (2014). **Atividade antimicrobiana in vitro de extratos hidroalcoólicos sobre cepas resistentes de *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Providencia rettgeri***. 2013. 19 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia)- Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2013.

ANDREI, V.; BUNEA, A. I.; TUDORACHE, A.; GÁSPÁR, S.; VASILESCU, A. Simple DPPH Based Electrochemical Assay for the Evaluation of the Antioxidant Capacity: a Thorough Comparison with Spectrophotometric Assays and Evaluation with Real-World Samples. **Electroanalysis**, v. 26, n. 12, p. 2677-2685, 2014.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos—uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**: São Paulo, v. 66, n. 1, p. 232-240, 2007.

ANTAL, D. S.; PINZARU, I.; BORCAN, F.; MARTI, T. D.; LEDETI, I.; CORICOVAC, D.; SOICA, C. Inclusion Complexes of the Aurone Sulfuretin and the Chalcone Butein from *Cotinus coggygria* Wood in Two Cyclodextrin Types. **Revista de Chimie, Bucharest, Original Edition**, v. 67, n.6, p.1104-1109, 2016.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K.; Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, v.127, n.11, p. 183-198, 2002.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, v. 127, n. 2, p. 183-198, 2002.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Séries temáticas**: Guia para Avaliação da Segurança de Produtos Cosméticos. 2003. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 08, Maio. 2016.

ARNHOLD, A. L.; TISSOT-SQUALLI, M. L. Análise preliminar por cromatografia em camada delgada dos extratos da fração hexânica das folhas de três espécies de *eriocaulaceae* mart. **Salão do Conhecimento**, v. 2, n.2, p. 169-174, 2016.

ARORA, R.; NAIR, M.G.; TRASBURG, G.M. Structure–activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. **Free Radical Biology and Medicine**, Nova York, v. 24, n. 9, p. 1355-1363, 1998.

ARSLAN, G.; YAZICI, B.; ERBIL, M. The effect of pH, temperature and concentration on electrooxidation of phenol. **Journal of Hazardous Materials**, v. B124, n. 7, p.37 – 43, 2005.

ARTHUR, H. R.; WUI, W.H.; MA, C.N. An examination of the Rutaceae of Hong Kong (Part I), Flavonoid glycosides from *Zanthoxylum* species and occurrence of optically active hesperidin. **Journal of the Chemical Society**, v. 13, n. 1, p. 632-635, 1956.

ARTS, M. J. T. J.; HAENEN, G. R. M. M.; VOSS, H. P.; BAST, A. Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 3, p. 45–49, 2004.

ARTS, M. J. T. J.; HAENEN, G. R. M. M.; VOSS, H. P.; BAST, A. Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 12, p. 45–49, 2004.

ARUMUGAM, P.; RAMAMURTHY, P.; SANTHIYA, S. T.; RAMESH, A. Antioxidant activity measured in different solvent fractions obtained from *Mentha spicata* Linn.: An analysis by ABTS.+ decolorization assay. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 12, p. 119-124, 2004.

ASLANI, B. A.; GHOBADI, S. Studies on oxidants and antioxidants with a brief glance at their relevance to the immune system. **Life sciences**, v. 146, n.12; p. 163-173, 2016.

ATTAL, N.; Cruccu, G.; Baron, R.; Haanpää, M.; Hansson, P.; Jensen, T. S.; Nurmikko, T. EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision. **European journal of neurology**, v. 17, n. 9, p. 1113-88, 2010.

AUMONDE, T. Z.; MARTINAZZO, E. G.; PEDÓ, T.; BORELLA, J.; DO AMARANTE, L.; VILLELA, F. A.; DE MORAES, D. M. Desempenho fisiológico e metabolismo antioxidativo de plântulas de arroz-vermelho sob ação do extrato de *Philodendron bipinnatifidum* Schott. *Iheringia. Série Botânica*, v.70, n.1, p. 47-56, 2015.

AYRES, M. C.; CHAVES, M. H. Constituintes químicos e atividade antioxidante de extratos as folhas de *Terminalia fagifolia* Mart et Zucc. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 141-145, 2010.

BANSKOTA, A. H.; TESUKA, Y.; TRAN, K. O.; TANAKA, K.; SAIKI, I.; KADOTA, S. Methyl quadrangularatis A-D and related triterpenes from *Combretum quadrangulare*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, Oxford, v. 48, n. 24, p. 496-504, 2000.

BAO, F.; LIU, D. Hydroxyl Radicals Generated in the Rat Spinal Cord at the Level Produced by Impact Injury Induce Cell Death by Necrosis and Apoptosis: Protection by A Metalloporphyrin. **Neuroscience**, v. 126, n. 21, p. 285-295, 2004.

BARBOSA, L. B. G. **Compostos bioativos e capacidade antioxidante em abóboras-gila (*Cucurbita ficifolia* Bouché)**. 2016. 31 f., Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana)- Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

BARON, R. Neuropathic pain: a clinical perspective. **Handbook of Experimental Pharmacology**, n. 194, v.9, p. 3-30, 2009.

BARON, R.; BINDER, A.; WASNER, G. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. **The Lancet Neurology**, v. 9, n. 8, p. 807-819, 2010.

BASHRI, G.; PRASAD, S. M. Exogenous IAA differentially affects growth, oxidative stress and antioxidants system in Cd stressed *Trigonella foenum-graecum* L. seedlings: Toxicity alleviation by up-regulation of ascorbate-glutathione cycle. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 132, n.12, p. 329-338, 2016.

BEG, F.; BHATIA, A. M.; BAIG, U. I. Biological Activity of Modified Chrysin. **Multidisciplinary and Current research**, v. 2, n. 2, p. 126- 130, 2014.

BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHINI, M. L. P. Flavonoide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BELLÓ, C.; SCHEMBERGER, J. A.; MACHADO, W. M.; FERNANDES, D.; VELLOSA, J. C. R. O cetoprofeno como oportunidade terapêutica no estresse oxidativo: uma

revisão. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 36, n.1, p.125-130, 2015.

BELLO, C.M., MONTANHA, J. A., SCHENKEL, E. P. Análise das bulas de medicamentos fitoterápicos comercializados em Porto Alegre, Brasil. **Revista Brasileira Farmacognia**, v. 12, n. 2, 2002.

BELOTTI, V.; BARROS, M. A. F.; NERO, L. A. Frequency of 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) non-reducing bacteria in pasteurized milk. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 137-140, 1999.

BENNET, G. J.; XIE, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, v. 33, n. 1, p. 87-107, 1988.

BENZIE, I. F. F. Evolution of dietary antioxidants. Comparative **Biochemistry and Physiology Part A**, v. 136, n. 23, p. 113-126, 2003.

BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S.; McCOY, K. D.; WANG, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. **Biochemica**, Nova Zelândia, v. 4, n. 4, p. 14-19, 1996.

BERTRAND, C.; FABRE, N.; MOULIS, C. Constituents of *Pilocarpus trachylophus*. **Fitoterapia**, v. 72, n. 7, p. 844–847, 2001.

BEUTLER, J. A.; HAMEL, E.; VLIETINCK, A. J.; HAEMERS, A.; RAJAN, P.; ROITMAN, J. N.; CARDELLINA, I. I. J.H.; BOYD, M. R. Structure-Activity Requirements for Flavone Cytotoxicity and Binding to Tubulin. **Journal of Medicinal Chemistry**, Easton, v. 41, n. 13, p. 2333-2338, 1998.

BEZERRA, C. M. V.; DA SILVA, M. F. E.; GUZEN, F. P. Lesão do nervo isquiático e os aspectos regenerativos voltados ao fator de crescimento fibroblástico-2. **Revista Brasileira de Neurologia e Psiquiatria**, v. 20, n.1, p. 121-126, 2016.

BISCOLA, N. P. **Efeitos neuroprotetor e regenerativo do selante de fibrina derivado da peçonha**. 2016. 95 f. Tese (Doutorado em Doenças tropicais)-Faculdade de Medicina, Universidade Estadual, Paulista, Botucatu. 2016.

BLOM, S. M.; PFISTER, J. P.; SANTELLO, M.; SENN, W.; NEVIAN, T. Nerve injury-induced causes neuropathic pain desinhibition of the anterior cingulate cortex. **The Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 17, p. 5754-5764, 2014.

BOADAS-VAELLO, P.; VELA, J. M.; VERDÚ, E. New pharmacological approaches using polyphenols on the physiopathology of neuropathic pain. **Current drug targets**, Espanha, v. 8, n.2, p. 160-173, 2016.

BONICA, J. J.; LOESER, J. D. History's of pain concepts and therapies. In: LOESER, J. D (eds). **Bonica's management of pain**. Fildelfia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001, p.- 3-25.

BONNER, M. Y.; ARBISER, J. L. The antioxidant paradox: what are antioxidants and how should they be used in a therapeutic context for cancer. **Future medicinal chemistry**, v. 6, n. 12, p. 1413-1422, 2014.

BOUÉ, S. M.; CARTER-WIENTJES, C. H.; SHIH, B. Y.; CLEVELAND, T. E. Identification of flavone aglycones and glycosides in soybean pods by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. **Journal Of Chromatography**. v. 991, n. 1, p. 61–68, 2003.

BOUHASSIRA, D.; MINET M. L.; ATTAL, N.; LAURENT, B.; TOUBOUL, C. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. **Pain**, v. 136, n. 3, p. 380-7, Jun 2008.

BRANDÃO, M. G. L.; SOUZA, P. J.; GRAEL, C. F. F.; SCALON, V.; SANTOS, A. C. P.; SALIMENHA, M. F., MOR, R. L. M. M. Biodiversidade, uso tradicional de plantas medicinais e produção de fitoterápicos em Minas Gerais. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 3, n. 1, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria MS 2.616/98. Regulamenta as ações de controle de infecção hospitalar no país, em substituição a Portaria MS 930 / 92. As principais alterações são comentadas a seguir, ao lado de uma análise crítica a respeito de suas repercussões para a assistência à saúde em nosso país. 12 de maio de 1998. **Diário Oficial República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 12 mai. 1998. Seção 1, p. 29514.

BRAVO L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, Madri, v 11, n.9, p. 317-33, 1998.

BRETT, A. M. O.; GHICA, M. E., Electrochemical oxidation of quercetin. **Electroanalysis**, v. 15, n. 1, p. 1745-1750, 2003.

BRUGGINK, C. **Backgrounds and possibilities for electrochemical detection in conjunction with anion exchange chromatography**. 7 ed. Reims: AVH Association Symposium, 2000.

BRUNETON, J. **Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas medicinales**. 2. ed. Espanha: Acribia. 1993, p. 227-400.

CAMPOS, A., LISSI, E. Kinetics of the reaction between 2,20-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) derived radical cations and phenols. **Int. Journal of Chemical Kinetics**. v. 29, n. 1, p. 219–224, 1997.

CAMPOS, A.; LISSI, E. Kinetics of the reaction between 2,20-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) derived radical cations and phenols. **International Journal Chemistry Kin**, v.29, n,12, p. 219–224, 1997.

CANATA, D. M. **Perfil redox da classificação clínica de polipose nasal**. 2016. 51 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular)- Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

CARDOSO, P. D. S. **Análise fitoquímica e antibacteriana da planta *Hibiscus AcOetsella* WeLw ex Hiern**. 2011. 57 f. Monografia (Graduação em Farmácia)-

Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2011.

CARDOSO, R. M. **Aplicação de nanotubos de carbono no desenvolvimento de sensores amperométricos para compostos fenólicos**. 2016. 144 f. Tese (Doutorado em Ciências)- Departamento de Química, Universidade Federal do São Carlos, São Carlos, 2016.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL. **Farmacognosia da Planta ao medicamento**. 3. ed. Santa Catarina: UFSC, 2007. p. 481-483.

CARVALHO, L. M.; MONSERRAT, J. M.; SCHOLZ, F.; LIMA, O. L.; ROSA, M. B.; HILGEMANN, M.; MULLER, L. S.; FACCIN, H.; RAMOS, P. B.; VIANA, C. Substrate-free Determination of the Radical Scavenging Activity of Phenolic Compounds by Photochemical Generation of Hydroxyl Radicals and HPLC-UV Detection. **Separation Science and BDU**, v. 48, n.1, p. 1123–1131, 2013.

CASARIN, F.; MENDES, C. E.; LOPES, T. J.; MOURA, N. F. D. Experimental design of blackberry (*Rubus* sp.) drying process for production of flour enriched with bioactive compounds. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 19, n.7, p. 123-128, 2016.

CAVALCANTI, R. C. Espectrometria de massa acoplada à cromatografia líquida e gasosa: sua aplicação nas ciências forenses. **Acta de Ciências e Saúde**, v. 1, n. 1, p. 1-5, 2016.

CAZÉ, A. L. R. **Desvendando os processos bioquímicos e moleculares envolvidos com as diferentes síndromes de polinização nas espécies *Calibrachoa parviflora* e *Calibrachoa pygmaea***. 2016. 105 f. Tese (doutorado em Ciências)- Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

CHAGAS, A. C. S. Controle de parasitas utilizando extratos vegetais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Ouro Preto, v. 13, n. 1, p. 156-160, 2004.

CHAN, C.; YUSOFF, R.; NGOH, G.; KUNG, F. W.; Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 1218, p. 6213-6225, 2011.

CHEN, S. P.; ZHOU, Y. Q.; LIU, D. Q.; ZHANG, W.; MANYANDE, A.; GUAN, X. H.; OMAR, D. M. PI3K/Akt pathway: a potential therapeutic target for chronic pain. **Current pharmaceutical design**, v. 1, n. 4, p. 123-127, 2017.

CHIRINOS, R.; CAMPOS, D.; WARNIER, M.; PEDRESCHI, R.; REES, J.F.; LARONDELLE, Y. Antioxidant properties of mashua (*Tropaeolum tuberosum*) phenolic extracts against oxidative damage using biological in vitro assays. **Food Chemistry**, v.11, n. 1, p.98-105, 2008.

CHIRINOS, R.; CAMPOS, D.; WARNIER, M.; PEDRESCHI, R.; REES, J.F.; LARONDELLE, Y. Antioxidant properties of mashua (*Tropaeolum tuberosum*) phenolic extracts against oxidative damage using biological in vitro assays. **Food Chemistry**; v. 111, n. 1, p. 98-105, 2011.

CHRISTODOULEAS, D. C.; FOTAKIS, C.; NIKOKAVOURA, A.; PAPADOPOULOS, K.; CALOKERINOS, A. C. Modified DPPH and ABTS assays to assess the antioxidant profile of untreated oils. **Food Analytical Methods**, v. 8, n. 5, p. 1294-1302. 2015.

COHEN, S. P.; MAO, J. Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. **British Medical Journal**, v. 348, n. 8, p. 7656, 2014.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos em Cromatografia**. Ed. Unicamp, Campinas, 2006. p. 300-600

COLTHUP, N. B.; DALY, L. H.; WIBERLEY, S. E. **Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy**. 3 ed. New York: Academic Press; 1997. 101 p.

COLTHUP, N. **Introduction to infrared and Raman spectroscopy**. 3 ed. Elsevier, 2012. 123 p.

COMPAORÉ, M. Antioxidative, anti-inflammatory potentials and phytochemical profile of *Commiphora africana* (A. Rich.) Engl. (Burseraceae) and *Loeseneriella africana* (Willd.) (Celastraceae) stem leaves extracts. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n.8, p. 665-670, 2016.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, Canadá, v. 7, n. 2, p. 66-76, 1996.

COSTA, A.F. **Farmacognosia V**. 5 ed. Portugal: Fundação CalousteGulbenkian, 1999. 379 p.

COSTA, E. N. (2016). **Metodologia de pesquisa, categorias e mecanismos de resistência em milho a Diabrotica speciosa (GERMAR) e Oligonychus pratensis (BANKS)**. 2016. 136 f. Tese (Doutorado em Agronomia), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jabotical. 2016.

COSTA, F. G.; MCGRATH, D. G.; PEZZUTI, J. C. B.; HOMMA, A. K. O. Parcerias institucionais e evolução do extrativismo de jaborandi na Floresta Nacional de Carajás, Pará, Brasil. **Sustentabilidade em Debate**, v. 7, n. 3, p. 91-111, 2016.

COSTA, F.G. **Extrativismo de jaborandi na região de Carajás**: histórico, situação atual e perspectivas. 2005. 41 f. Monografia (Especialização em Gestão e Manejo Ambiental em Sistemas Florestais) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.2005.

COSTA-LOTUFO, L. V.; JIMENEZ, P. C.; WILKE, D. V.; LEAL, L. K. A. M.; CUNHA, G. M. A.; SILVEIRA, E. R.; CANUTO, K. M.; VIANNA, G. S. B.; MORAES, M. O.; PESSOA, C. Antiproliferative Effects of Several Compounds Isolated from *Amburana cearensis* A. C. Smith. **Zeitschrift fuer Naturforschung**, Berlim, v. 58, n. 9, p. 1-5, 2003.

COTINGUIBA, G. G.; SILVA, J. R. DO N.; AZEVEDO, R. R. DE S.; ROCHA, T. J. M.; DOS SANTOS, A. F. Método de avaliação da defesa antioxidante: uma revisão de literatura. **Journal of Health Sciences**, v.15, n. 3, p.126-132, 2015.

CROFT, K. D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. In: Towards Prolongation of the Healthy Life Span: Practical Approaches to Intervention. 1. ed. New York: **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1998. 854p.

CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Espectrometria de massas com ionização por "electrospray": Processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química nova**, v. 29, n. 2, p. 287-292, 2006.

CRUCCU, G. Treatment of painful neuropathy. **Current Opinion in Neurology**, v. 20, n. 5, p. 531-535, 2007.

CRUCCU, G.; TRUINI, A. Tools for assessing neuropathic pain. **PLOS Medicine**, v. 6, n. 1, p.10-45, 2009.

CUNHA, A. L.; MOURA, K. S.; BARBOSA, J. C.; DOS SANTOS, A. F. Os metabólitos secundários e sua importância para o organismo. **Diversitas Journal**, v. 1, n. 2, p. 175-181, 2016.

DA SILVA, G. J.; MEDEIROS, M. F. S.; SCHIRMANN, J. S. Experiência e descarte: dores humanas e não humanas em um laboratório de neurotoxicidade e psicofarmacologia. **Sociedade e Cultura**, v. 14, n. 2, p. 10-5216, 2012.

DABAS, D. Polyphenols as colorants. **Advances in Food Technology and Nutritional Sciences**, v. 2, n. 1, p. 1-6, 2016.

DAJAS, F.; RIVERA-MEGRE, F.; BLASTINA, F.; ARREDONDO, F.; ABIN-CARRIQUIRY, J. A.; COSTA, G.; ECHEVERRY, C.; LAFON, L.; HEIZEN, H.; FERREIRA, M. A.; MORQUIO, A. Neuroprotection by flavonoids. **Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research**, São Paulo, v. 36, n. 12, p. 1613- 1620. 2003.

DE JESUS, W. D. J. P.; FERNANDES, C. C.; SANTOS, F. G. A.; LACERDA, R. F.; TRETO, R. R. R. O Paradoxo da Vida Aeróbica. **Journal of Amazon Health Science**, v. 1, n. 1, 11-35, 2015.

DE LIMA JUNIOR, C. R.; BUGS, C. A.; DE OLIVEIRA, M. G. Senescência celular e sinalização de espécies reativas de oxigênio. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 7, n. 2, 2016.

DE LIMA, A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, e identificação dos compostos fenólicos presentes no Pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.)**. 219 f. Tese (Doutorado em Química)- Departamento de alimentos e nutrição experimental, Universidade de São Paulo. São Paulo. 2008.

DE OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARAI, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. T. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v.32, n.3, p. 543-56, 2009.

DE OLIVEIRA, C. A.; DARIO, M. F.; SARRUF, F. D.; MARIZ, I. F. A.; VELASCO, M. V. R.; ROSADO, C.; BABY, A. R. Safety and efficacy evaluation of gelatin-based

nanoparticles associated with UV filters. **Colloids and Surfaces Biointerfaces**, v. 140, p. 531-537, 2016.

DE SOUZA, C. C.; PINTO, G. I.; KERPPERS, I. I.; DE PAULA, D. DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FORMULAÇÃO TÓPICA DE EXTRATO DE UVARANA PARA TRATAMENTO DE FERIDAS. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 30, n 4, p. 191-200, 2016.

DE VASCONCELOS, T. B. Radicais Livres e Antioxidantes: Proteção ou Perigo? **Journal of Health Sciences**, v.16, n. 3, p.12-17, 2015.

DHANG, P.; SURESH, P. Plants as source for biopesticide against Urban Pests. **International Pest Control**, Filipinas, v. 58, n.5, p. 264, 2016.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. Flavonoids old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, Nápoles, v. 65, n. 4, p. 337-353, 1999.

DIXON, R. A. Natural products and plant disease resistance. **Nature**, v. 411, n. 5, p.843–847, 2001.

DO, Q. D.; ANGKAWIJAYA, A. E.; TRAN-NGUYEN, P. L.; HUYNH, L. H.; SOETAREDJO, F. E.; ISMADJI, S.; JU, Y. H. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. **Journal of food and drug analysis**, v 22, n. 3, p. 296-302, 2014.

DO, Q. D.; ANGKAWIJAYA, A. E.; TRAN-NGUYEN, P. L.; HUYNH, L. H.; SOETAREDJO, F. E.; ISMADJI, S.; JU, Y. H. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. **Journal of food and drug analysis**, v. 22, n. 3, p. 296-302, 2014.

DOS SANTOS, P. M.; CARDOSO, M. A. G.; KHOURI, S.; DE PAULA-JUNIOR, A. R.; UEHARA, M. SAKANE, K. K. Utilização da microespectroscopia infravermelha (FT-IR) para teste de algoritmos estatísticos na diferenciação dos micro-organismos *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* e *Candida parapsilosis*. **Revista brasileira de engenharia biomédica**, v. 28, n. 4, p. 398-409, 2012.

DOS SANTOS, R. S. **Avaliação dos mecanismos fotobiológicos envolvidos na antinocicepção induzida pela terapia por diodo emissor de luz em camundongos**. 2013. 76 f. Tese (Doutorado em Química) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 11, p. 47-95, 2002.

DUARTE-ALMEIDA; J., M.; DOS SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos: Campinas**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

DUBNER, R. Pain research in animals. **New York Academy of Sciences**, v. 406, n.13, p. 128-132, 1983.

DWORKIN, R. H.; Backonja, M.; Rowbotham, M. C.; Allen, R. R.; Argoff, C. R.; Bennett, G. J.; Bushnell, M. C.; Farrar, J. T.; Galer, B. S.; Haythornthwaite, J. A.; Hewitt, D. J.; Loeser, J. D.; Max, M. B.; Saltarelli, M.; Schmader, K. E.; Stein, C.; Thompson, D.; Turk, D. C.; Wallace, M. S.; Watkins, L. R.; Weinstein, S. M. Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. **Archives of neurology**, v. 60, n. 11, p. 1524-34, Nov 2003.

DWORKIN, R. H.; O'CONNOR, A. B.; BACKONJA, M. Pharmacologic management of neuropathic pain: evidencebased recommendations. **Pain**, v. 51, n.1, p.132:237, 2007.

ECKELI, F. D.; TEIXEIRA, R. A.; GOUVÊA, Á. L. Neuropathic pain evaluation tools. **Revista Dor**, v. 17, n. 3, p. 20-22, 2016.

FADDA, A.; SERRA, M.; MOLINU, M. G.; AZARA, E.; BARBERIS, A.; SANNA, D. Reaction time and DPPH concentration influence antioxidant activity and kinetic parameters of bioactive molecules and plant extracts in the reaction with the DPPH radical. **Journal of Food composition and analysis**, v. 35, n. 2, p. 112-119, 2014.

FARKHONDEH, T.; SAMARGHANDIAN, S.; AZIMIN-NEZHAD, M.; SAMINI, F. Effect of chrysin on nociception in formalin test and serum levels of noradrenalin and corticosterone in rats. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 2, p. 2465–2470, 2015.

FERREIRA, M.; VARELA, H.; TORRESI, R. M.; TREMILIOSI-FILHO, G. Electrode passivation caused by polymerization of different phenolic compounds. **Electrochimica Acta**, v. 52, n. 2, p. 434-442, 2006.

FERREIRA, A. A. P.; RIBEIRO, S. J. L.; FUGIVARA, C. S.; CAIUT, M. A.; SARGENTELLI, V.; BENEDETTI, A. V. Eletrodo de pasta de carbono em minicavidade de contato solido, **Eclética química**, v. 36, n. 2, p. 183-204, 2011.

FERREIRA, L.; CALIMAN, F.; COSTA, E.; VIEIRA, K.; BORGES, J.; Pirozi, M. R.; GOMES, F. Atividade antioxidante e aceitação sensorial de pão de queijo contendo gengibre. **Slaca**, v. 2, n. 1, p. 35248, 2015.

FERREIRA, R. O.; CARVALHO JUNIOR, A. R. D.; RIGER, C. J.; CASTRO, R. N.; SILVA, T.; CARVALHO, M. G. D. Chemical constituents and in vivo antioxidant activity of flavonoids isolated of *Clusia lanceolata* (clusiaceae). **Química Nova**, v. 39, n. 9, p.1093-1097, 2016.

FINNERUP, N. B.; OTTO, M.; MCQUAY, H.J.; JENSEN, T. S.; SINDRUP, S. H. Algorithm for neuropathic pain treatment: an evidence based proposal. **Pain**, v. 118, n. 3, p. 289-305, 2005.

FIRMO, W. C A.; DE MENEZES, V. J. M; PASSOS, C. E. C; DIAS, C. N.; ALVES, L. P. L; DIAS, I. C. L.; NETO, M. S.; VARGA, I. V. D.Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de Pesquisa**, São Luís, v. 18, n. especial, p. 12-18, 2011.

FIUZA, T. S.; SILVA, P. C.; PAULA, J. R.; TRESVENZOL, L. M. F.; FERREIRA, H. D.; MORAIS, S. M. T. S. Effect of the crude ethanol extract and fractions of *Hyptidendron canum* (Pohl ex Benth.) Harley on the gills of *Oreochromis niloticus* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 1-8, 2015.

FONSECA, S. F.; LIMA, D. V, ALVES, D.; JACOB, R. G.; PERIN, G.; LENARDÃO, E. J.; SAVEGNAGOB, L. Synthesis, characterization and antioxidant activity of organoselenium and organotellurium compounds derivatives of chrysin. **The Royal Society of Chemistry Journal Name**, v. 1, n. 13, 100–109, 2015.

FORT, P.; MORAES, C. S.; PARK, Y. K. Própolis brasileira: ingrediente funcional e atividades biológicas. **Sínteses: Revista Eletrônica do SIMTEC**, v. 2, n. 2, p. 210-216, 2016.

FREIESLEBEN, S. H.; SOELBERG, J.; JÄGER, A. K. Medicinal plants used as excipients in the history in Ghanaian herbal medicine. **Journal of ethnopharmacology**, v. 174, n. 23, p. 561-568, 2015.

FREYNHAGEN, R.; BENNETT, M. I. Diagnosis and management of neuropathic pain. **British Medical Journal**, v.339, n.3, p. 3002, 2009.

FRIEDMAN, M. Antibacterial, antiviral, and antifungal properties of wines and winery byproducts in relation to their flavonoid content. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 26, p. 6025-6042, 2014.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. C. **Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 1074 p.

FURTADO, A. M. S. **Evolução da composição físico-química e das características cromáticas de vinhos durante a vida de prateleira secundária**. 2013. 86 f. Dissertação (Mestre em Ciências)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

GABAY, E.; TAL, M. Pain behavior and nerve electrophysiology in the CCI model of neuropathic pain. **Pain**, v. 110, n. 1, p. 354-360, 2004.

GABBITA, S.P.; ROBINSON, K.A.; STEWART, C.A.; FLOYD, R.A.; HENSLEY, K. Redox regulatory mechanisms of cellular signal transduction. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.376, n. 9, p. 1-13, 2002.

GÁLVEZ, M.; MARTIN-CORDERO, C.; LÓPEZ-LÁZARO, M.; CORTES, F.; AYUSO, M. J. Cytotoxic effects of *Plantago* ssp. on cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 88, n. 2, p. 125- 130, 2003.

GARDI, C.; BAUEROVA, K.; STRINGA, B.; KUNCIROVA, V.; SLOVAK, L.; PONIST, S.; BILOTTO, S. Quercetin reduced inflammation and increased antioxidant defense in rat adjuvant arthritis. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 583, p. 150-157, 2015.

Godos, J.; Marventano, S.; Mistretta, A.; Galvano, F.; Grosso, G. Dietary sources of polyphenols in the Mediterranean healthy Eating, Aging and Lifestyle (MEAL) study

cohort. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.1, n.7, p.152-165, 2017.

GOECKS, C. S. B.; HORST, A.; MORAES, M. S.; SCHEID, T.; KOLBERG, C.; KLEIN, A. B.; PARTATA, W. A. Assessment of oxidative parameters in rat spinal cord after chronic constriction injury of the sciatic nerve. **Neurochemical Research**, v. 37, n. 9, p. 1952-1958, 2012.

GOMES, S. M. C. **Determinação de Antioxidantes por Cromatografia Líquida de Alta Pressão com Detecção Electroquímica**. 2010. 61 f. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade de Coimbra, Coimbra, 2010.

GOMEZ, F. A.; KORBEE, N.; FIGUEROA, F. L. Analysis of antioxidant capacity and bioactive compounds in marine macroalgal and lichenic extracts using different solvents and evaluation methods. **Ciências Marinas**, v. 42, n. 4, p. 271-288, 2016.

GRABHER, C. **A governança e a sustentabilidade do extrativismo do jaborandi na Amazônia e transição para o Cerrado e a Caatinga**. 2015. 315 f. Dissertação (mestre em Desenvolvimento rural)- Faculdade de Ciências Econômicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

GUEDES, R. P. **Efeito da secção do nervo ciático, como modelo de dor neuropática, sobre marcadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes na medula espinal de ratos**. 114 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológica), Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2007.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HA, S. K.; MOON, E.; KIM, S. Y. Chrysin suppresses LPS-stimulated proinflammatory responses by blocking NF-kappaB and JNK activations in microglia cells. **Neurosci Lett**, v. 485, n.1, p. 143–147, 2010.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. USA: Oxford University Press, 2015, p.123.

HARBONE, J. B. **Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis**. 2. ed., Londres: **Chapman and Hall**, 1984.136 p.

HARBONE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, Reading, v. 55, n. 10 p. 481-504, 2000.

HARBORNE, J. B. **The Flavonoids**. 1. ed. New York: **Chapman & Hall**, 1994. 676 p.

HE, X. L.; WANG, Y. H.; BI, M. G.; DU, G. H. Chrysin improves cognitive deficits and brain damage induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats. **Europe Journal Pharmacology**, v. 680, n. 25, p. 41–48, 2012.

HERTOG, M. G. L.; FESKENS, E. J. M.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B.; KROMHOUT, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart-disease. **The Zutphen Elderly Study**, *Lancet*, v. 342, n. 8878, p. 1007-11, 1993

HESSE, M.; MEIER, H.; ZEEH, B., **Métodos espectroscópicos en química orgánica**. Madrid: Sintesis. 1999. 369 p.

HILGEMANN, M.; BASSETTO, V. C.; KUBOTA, L. T. Electrochemical Approaches Employed for Sensing the Antioxidant Capacity Exhibited by Vegetal Extracts: A Review. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 16, n. 7, p. 1386-2073, 2013.

HOLMSTED, B.; WASSEN, S.H.; SCHULTES, R.E. Jaborandi: An interdisciplinary appraisal. **Journal of Ethnopharmacology**, Graz, v. 1, n. 1, p. 3-21, 1979.

HOROWITZ, R. M.; GENTILI, B. Flavonoids of Citrus. **Tetrahedron**, v. 19, n. 1 p. 773-782, 1963.

HORST, A. **Efeito do tratamento com n-acetilcisteína sobre parâmetros nociceptivo e de estresse oxidativo e nitrosativo em medula espinal de ratos com constrição no nervo isquiático**. 73 f. 2011. Dissertação (Mestrado em Fisiologia)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2011.

HORST, A.; KOLBERG, C.; MORAES, M. S.; RIFFEL, A. P.; FINAMOR, I. A.; BELLÓ-KLEIN, A.; PAVANATO, M. A.; PARTATA, W. A. Effect of N-acetylcysteine on the spinal cord glutathione system and nitric oxide metabolites in rats with neuropathic pain. **Neuroscience Letters**, v. 569, n. 8, p. 163-168, 2014.

HOSSEINZADEH, H.; MARJAN, N. A. Neuroprotective Effects of Flavonoids in Epilepsy. **Neuroprotective Natural Products**, v.14, n.11, p. 1004–1012, 2017.

HOTTA, H.; SAKAMOTO, H.; NAGANO, S.; OSAKAI, T.; TSUJINO, Y., Unusually large numbers of electrons for the oxidation of polyphenolic antioxidants. **Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects**, v. 1526, n. 1, p. 159-167, 2001.

HSU, Y. L.; KUO, P. L.; LIN, C. C. Acacetin inhibits the proliferation of Hep G2 by blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 67, n. 3, p. 823-829, 2004.

HUGHES, R. J.; HUGHES, R. J.; CROLEY, R. M.; METCALFE, C. D.; MARCH, R. E. A tandem mass spectrometric study of selected characteristic flavonoids. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 210, n. 11, p. 371–385, 2001.

HUGHES, S. W.; HICKEY, L.; HULSE, R. P.; LUMB, B. M.; PICKERING, A. E. Endogenous analgesic action of the pontospinal noradrenergic system spatially restricts and temporally delays the progression of neuropathic pain following tibial nerve injury. **Pain**, v. 154, n. 9, p. 1680-1690, 2013.

IHA, S. M., MIGLIATOK, F.; VELLOSA, J. C. R.; SACRAMENTO, L. V. S.; PIETRO, R. C. L. R.; ISSAC, V. L. B.; BRUNETTII, L.; CORRÊA, M. A.; SALGADO, H. R. N. Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para

o desenvolvimento de formulação fitocosmética. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 18, n.3, p. 387-393, 2008.

INACIO, M. DE F.; DE CARVALHO, M. G. Atividade inseticida de extratos diclorometano e metanólico de *Azadirachta indica* (A. Juss), *Melia azedarach* (L.) e *Carapa guianensis* (Aubl.) (Meliaceae) sobre cupim subterrâneo *Coptotermes gestroi* (Wasmann) (Isoptera, Rhinotermitidae). **Bioscience Journal**, v. 28, n. 5, p. 676–683, 2012.

JAGGI, A. S.; JAIN, V.; SINGH, N. Animal models of neuropathic pain. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 25, n. 9; p. 1-28, 2011.

JANA, A. G.; DEBIDAS, G. *In vitro* antioxidant potentiality of ethyl acetate fraction of seed of *Eugenia jambolana* kishalay. **Asian of journal pharmaceutical and clinical research**, v. 8, n. 1, p. 974-2441, 2015.

JANEIRO, P.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Solid State Electrochemical Oxidation Mechanisms Of Morin in Aqueous Media. **Electroanalysis**, v. 17, n. 9. 2005.

JENSEN, T. S.; FINNERUP, N. B. Management of neuropathic pain. **Curr Opin Support Palliat Care**, v.1, n. 1, p. 126-31, 2007.

JORGENSEN, L. V.; CORNETT, C.; JUSTESEN, U.; SKIBSTED, L. H.; DRAGSTED, L. O. Two-electron electrochemical oxidation of quercetin and kaempferol changes only the flavonoid C-ring. **Free Radical Research**, v. 29, p. 339-350, 1998.

JOSENBY, A. L.; WAGNER, P.; JARNLO, G. B.; WESTBOM, L.; NORDMARK, E. Functional performance in self-care and mobility after selective dorsal rhizotomy: a 10-year practice-based follow-up study. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v. 57, n. 3, p. 286-293, 2015.

JOSEPH, C. J. **Revisão sistemática do gênero *Pilocarpus* (ssp. brasileiras)**. Rio de Janeiro: Mecânica Popular. 1967. p. 1-9.

JOVANOVIC, S. V.; STEENKEN, S.; HARA, Y.; SISMIC, M. G. Reduction potential of flavonoid and model phenoxyl radicals: which ring in flavonoids is responsible for antioxidant activity. **Journal of the Chemical Society Perkin Transactions**, v. 2, n. 1, p. 2497 – 2504. 1998.

JULIÃO, M.; FARELEIRA, F.; COSTA, J.; CARNEIRO, A. V. Norma de orientação clínica para o tratamento da dor neuropática localizada. **Dor**, v. 19, n.3, p. 6-48, 2011.

KAMDEM, J. P. **Antioxidant and neuroprotective properties of *Trichilia catigua* (catuaba) against ischemia-reperfusion and pro-oxidants agents in rat hippocampal slices**. 2013. 117 f. Tese (Doutorado em Bioquímica)- Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2013.

KANDHARE, A. D.; RAYGUDE, K. S.; GHOSH, P.; GHULE, A. E.; BODHANKAR, S. L. Therapeutic role of curcumin in prevention of biochemical and behavioral aberration

induced by alcoholic neuropathy in laboratory animals. **Neurosci Lett** v. 511, n.7, p. 18–22, 2012.

KANDHARE, A. D.; SHIVAKUMAR, V.; RAJMANE, A.; GHOSH, P. G.; BODHANKAR, S. L. Evaluation of the neuroprotective effect of chrysin via modulation of endogenous biomarkers in a rat model of spinal cord injury. **Journal Natural Medicine**, v. 68, n. 13, p. 586-603, 2014.

KANES, K.; TISSERAT, B.; BERHOW, M.; VANDERCOOK, C. Phenolic composition of various tissues of Rutaceae species. **Phytochemistry**, v. 324, n. 4, p. 967-974, 1993.

KASHYAP, S. **Antioxidant profiling and activity in some important medicinal plant species of Uttarakhand**. 124 f. Tese (Doutorado em Química)- University of Agriculture and Technology, Uttarakhand, 2014.

KAVALIERS, M. Evolutionary and comparative aspects of nociception. **Brain Research Bulletin**, v. 21, n. 3, p. 923-931, 1988.

KEHRER, J. P.; KLOTZ, L. O. Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for Health. **Critical reviews in toxicology**, v. 45, n. 9 p. 765-798, 2015.

KEINÄNEN, M. Comparison of Methods for the Extraction of Flavonoids from Birch Leaves (*Betula pendula* Roth.) Carried Out Using High-Performance Liquid Chromatography. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 1, p. 1986–1990, 1993.

KHODR, B.; KHALIL, Z. Modulation of inflammation by reactive oxygen species implications for aging and tissue repair. **Free Radical Biological Medicine**, v. 30, n. 26, p. 30: 1-8, 2001.

KIM, H. K.; PARK, S. K.; ZHOU, J. L. Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. **Pain**, v.111, n.15, p. 116-24, 2004.

KIM, S.R.; PARK, M.J.; LEE, M.K.; SUNG, S.H.; PARK, E.J.; KIM, J.; KIM, S.Y.; OH, T.H.; MARKELONIS, G.J.; KIM, Y. C. Flavonoids of *Inulabritannica* protect cultured cortical cells from necrotic cell death induced by glutamate. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 32, n. 7, p. 596-604, 2002.

KLUSAKOVA, I.; DUBOVY, P. Experimental models of peripheral neuropathic pain based on traumatic nerve injuries - an anatomical perspective. **Annals of Anatomy**, v. 191, n. 3, p. 248-59, 2009.

KLUSÁKOVA, I.; DUBOVÝ, P. Experimental models of peripheral neuropathic pain based on traumatic nerve injuries – an anatomical perspective. **Anatomy**, v. 191, p. 248- 259, 2009.

KOMIRISHETTY, P.; ARETI, A.; SISTLA, R.; KUMAR, A. Morin mitigates chronic constriction injury (CCI)-induced peripheral neuropathy by inhibiting oxidative stress

induced PARP over-activation and neuroinflammation. **Neurochemical research**, v. 41, n. 8, p. 2029-2042, 2016.

KOPSKY, D. J. Extending the Therapeutic Scope for the Treatment of Neuropathic Pain with Topical Analgesics. **Journal of Pain & Relief**, v. 5, n. 251, p. 2167-0846, 2016.

KOSANOVIC, M.; SERUGA, M.; JAKOBEK, L.; NOVAK, I. Electrochemical and Antioxidant Properties of (+)-Catechin, Quercetin and Rutin. **Croatica Chemica Acta**, v. 83, n. 3, p. 197-207, 2010.

KOWALSKI, J.; SAMOJEDNY, A.; PAUL, M. P. G.; WILCZOK, T. Effect of kaempferol on the production and gene expression of monocyte chemoattractant protein-1 in J774.2 macrophages. **Pharmacological Reports**, v. 57, n.3, p. 107-112, 2005.

KRÜGER, R. L.; FARINHA, J. B.; TEIXEIRA, B. C.; REISCHAK-OLIVEIRA, A. Oxidative stress and endothelial function: effects of physical exercise on results of postprandial lipemia. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 14, n. 4, p. 328-340, 2015.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R.; Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia Alimentar**, v. 25, n. 1, p. 726-732, 2005.

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

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

LABRINEA, E. P.; GEORGIU, C. A. Stopped-flow method for assessment of pH and timing effect on the ABTS total antioxidant capacity assay. **Analytica Chimica Acta**, v. 526, n.13, p. 63-68, 2004.

Labrinea, E. P.; Georgiou, C. A.; Stopped-flow method for assessment of pH and timing effect on the ABTS total antioxidant capacity assay. **Analytica Chimica Acta**, v. 526, n. 24, p. 63-68, 2004.

LARKIN, P. **Infrared and Raman spectroscopy: principles and spectral interpretation**. 2 ed. Elsevier, 2011. 54 p.

LEITE, J.R.S.A.; MIURA, L.M.C.V.; LIMA, D.F. CARNEIRO, S.M.P.; CARVALHO, F.A.A.; MORAES, J. ; BATISTA, M.C.S. **Processo de obtenção da epiisopiloturina e sua aplicação no combate à infecções parasitárias**.Revista de Propriedade Industrial, Instituto Nacional de Propriedade Industrial. BR n. PI 0904110-9 A2, 30 set. 2009, 31 mai. 2011.

LEMOS, M. **Prospecção toxicológica e farmacológica in vitro e in vivo de oleorresinas, extratos das folhas e compostos isolados de *Copaifera oblongifolia* Mart. ex Hayne e *C. duckei* Dwyer**. 2016. 169 f. Tese (Doutorado em

Ciências)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2016.

LEROUET, D.; BERTHAT, V. B.; PALMIER, B.; PLOTKINE, M.; MARGAILL, I. Changes in oxidative stress, iNOS activity and neutrophil infiltration in severe transient focal cerebral ischemia in rats. **Brain Reponse**, v. 958, n. 6, p.166-175, 2002.

Li, W.; Wang, J. X.; Zhou, Z. H.; Lu, Y.; Li, X. Q.; Liu, B. J.; Chen, H. S. Contribution of capsaicin-sensitive primary afferents to mechanical hyperalgesia induced by ventral root transection in rats: the possible role of BDNF. **Neurological research**, v. 38, n. 1, p. 80-85, 2016.

LIMA, A. R.; BARBOSA, V. C.; SANTOS, FILHO, P. R.; GOUVEA, C. M. C. P. *In vitro* evaluation of the antioxidant activity of the hydroalcoholic extract of leaves of *bardana*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 531-536, 2006.

LIMA, David Fernandes. **Prospecção tecnológica, perfil químico sazonal de alcaloides imidazólicos, aspectos polimórficos moleculares e morfológicos de *Pilocarpus microphyllus* stapt ex wardleworth (jaborandi)**. 2016. 116 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia)- Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2016.

LIMA, J. DOS S.; ROCHA, V. D.; ROSSI, A. A. Atividade alelopática de extratos do fruto de *Piper aduncum* L. na germinação e crescimento inicial de cebola. **Horticultura Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 211-219, 2015.

LIST, P.H.; SCHMIDT, P.C. **Phytopharmaceutical technology**. 2. ed. Flórida: CRS Press, 2000. p. 34-30.

LIU, D.; LIU, J.; WEN, J. Elevation of Hydrogen Peroxide After Spinal Cord Injury Detected By Using The Fenton Reaction. **Free Radical Biological Medicine**, v. 27, p. 478-482, 1999.

LIU, J.; LIU, Y.; WANG, Y.; ABOZEID, A.; ZU, Y. G.; TANG, Z. H. The integration of GC-MS and LC-MS to assay the metabolomics profiling in *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius* reveals a tissue- and species-specific connectivity of primary metabolites and ginsenosides accumulation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.135, n. 13, p. 176-185. 2017.

LIU, T.; KNIGHT, K. R.; TRACEY, D. J. Hyperalgesia Due to Nerve Injury – Role of Peroxynitrite. **Neuroscience**, v. 91, n. 33, p. 125-131, 2000.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP basic pain terminology. **Pain**, v. 137, n. 23, p. 473-477, 2008.

LÓPEZ, C.A. A. Considerações gerais sobre plantas medicinais. **Ambiente: Gestão e Desenvolvimento**, Roraima, v.1, n. 1, p.19-27, 2006.

LORENZI, H., MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. Nova Odessa, São Paulo: **Instituto Plantarum**. 2002. 512 p.

LU, M.; WANG, Y.; YUE, L.; CHIU, J.; HE, F.; WU, X.; JIANG, Z. Follow-up evaluation with ultrasonography of peripheral nerve injuries after an earthquake. **Neural regeneration research**, v. 9, n. 6, p. 582, 2014.

LUNA, E. J. A. A emergência das doenças emergentes e as doenças infecciosas emergentes e reemergentes no Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 5, n. 3, p. 229-243, 2002.

MA, Y., XU, X., ZHANG, N., GUO, J., & ZANG, D. (2016). cDNA Cloning and Expression Analysis of the Chalcone Synthases (CHS) in *Osmanthus fragrans*. **American Journal of Molecular Biology**, v. 7, n.1, p. 41. 2016.

MAHER, P.; AKAISHI, T.; ABE, K. Flavonoid fisetin promotes ERK-dependent long-term potentiation and enhances memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n.12, p. 16568-16573, 2006.

MAMMEN, D.; DANIEL, M. A critical evaluation on the reability of two aluminum chloride chelation methods for quantification of flavonoids. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1365-1368, 2012.

MANOHAR, C. **Antioxidant and Antiproliferative Activity of Flavonoids from Ontario Grown Onions by Pressurized Low Polarity Water Technology**. 2017. 106 f. Tese (Doutorado em Engenharia)- Universidade de Guelph, Canadá, 2017.

MÄNTELE, W.; DENIZ, E. UV–VIS absorption spectroscopy: Lambert-Beer reloaded. **Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy**, v. 173, n. 1, p. 965-968, 2017.

MANTHEY, J. A.; BUSLIG, B. S. **Flavonoids in the living system**. 1 ed. New York: **Plenum Press**, 1998. 278 p.

MANTSCH, H. H.; CHAPMAN, D. **Infrared spectroscopy of biomolecules**. 2 ed. USA: Wiley-Liss, 1996. 286 p.

MAO, Y. F.; YAN, N.; XU, H.; SUN, J. H.; XIONG, Y. C.; DENG, X. M. Edaravone, a free radical scavenger, is effective on neuropathic pain in rats. **Brain Research**, v. 1248, p. 68-75, 2009.

MARCHAND, F.; PERRETI, M.; MCMAHON, S. B. Role of immune system in chronic pain. **Nature Reviews: Neuroscience**, v. 6, n. 1, p. 521-532, 2005.

MARKHAM, K. R. **Techniques of flavonoid identification**. 4 ed. New York: Academic Press, 1982. 113 p.

MARQUES, L. C.; VIGO, C. L. S. Preparação e padronização de extratos vegetais. In: LEITE, J. P. V. **Fitoterapia: Bases científicas e tecnológicas**. São Paulo: Atheneu, 2009. 328 p.

MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Separation and Quantification of Flavonoids. In: ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. (Org.). **Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006.

MARTINEZ-FLÓREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J.M.; TUÑÓN, M.J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, León, v. 17, n. 6, p. 271-278, 2002.

MARTINS, D. O. **Uso do laser de baixa intensidade e os mecanismos celulares e moleculares no processo de reparação no sistema nervoso periférico**. 2016. 93 f. Tese (doutorado em Ciências Morfofuncionais)- Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

MARZZOCO, A. E.; TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 736 p.

MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent flavonoid aglycones. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 897, n. 3, p.177-184, 2000.

MILARDOVIC, S.; IVEKOVIC, D.; GRABARIC, B. S. A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. **Bioelectrochemistry**, v. 68, n. 1, p. 180-185, 2005.

MIRANDA, J. A. L.; ROCHA, J. A.; ARAÚJO, K. M.; QUELEMES, P. V.; MAYO, S. J.; ANDRADE, I. M. Atividade antibacteriana de extratos de folhas de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott (Araceae). **Revista brasileira de plantas medicinais**, v.17, n. 4, p. 3-13, 2015.

MITTAL, C. K.; MURAD, F. Properties and oxidative regulation of guanylate cyclase. **Journal Cyclic Nucleotide Research**, v. 3, n. 6, p. 381-91, 1977.

MIYAKAWA, T.; TERASHIMA, Y.; TAKEBAYASHI, T.; TANIMOTO, K.; IWASE, T.; OGON, I.; YAMASHITA, T. Transient receptor potential ankyrin 1 in spinal cord dorsal horn is involved in neuropathic pain in nerve root constriction rats. **Molecular pain**, v. 10, n 1, p. 58, 2014.

MODAK, B.; CONTRERAS, M.L.; GONZÁLES-NILO, F.; TORRES, R. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from the resinous exudate of *Heliotropium sinuatum*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. Oxford, v.15, n.2, p.309-312, 2005.

MONTORO, P.; BRACA, A.; PIZZA, C.; DE TOMMASI, N. Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. **Food Chemistry**, v. 92, n. 2, p. 349-355, 2005.

MORAIS, M.; PINHO, D.; TEIXEIRA, A. A. **Dor neuropática: avaliação de mecanismos num modelo experimental**. 2010. 101 f. Dissertação (Mestrado em Medicina)- Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Porto-Portugal, 2010.

MOREIRA, I.; SCHEEL, G. L.; HATUMURA, P. H.; SCARMINIO, I. S. Efeito do solvente na extração de ácidos clorogênicos, cafeína e trigonelina em *Coffea arabica*. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 39-43, 2014.

MORIARTY, O., GORMAN, C. L., MCGOWAN, F., FORD, G. K., ROCHE, M., THOMPSON, K.; FINN, D. P. Impaired recognition memory and cognitive flexibility in the rat L5–L6 spinal nerve ligation model of neuropathic pain. **Scandinavian Journal of Pain**, v. 10, n. 1, p. 61-73, 2016.

MORRIS, D. B. Animal Pain: The Limits of Meaning. In: **Meanings of Pain**. Springer International Publishing, 2016. p. 389-401.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunology Methods**, Amsterdam, v. 65, n. 16, p. 55-63, 1983.

MOURA, E.F.; PINTO, J. E. B. P.; SANTOS, J. B.; LAMEIRA, O. A. Genetic diversity in a jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf.) germplasm bank assessed by RAPD markers. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 7, n. 3, p. 1–8, 2005.

MOURA, L. M. **Compostos bioativos em frutas cítricas: quantificação, avaliação da atividade antioxidante, parâmetros de cor e efeito da pasteurização**. 2010. 153 f. Tese (Mestrado em Alimentos e Nutrição, Faculdade de Ciências farmacêuticas), Universidade Estadual Paulista, Departamento de Alimentos e Nutrição. Araraquara, São Paulo, 2010.

MOURA, R. J. P. **Validação do método analítico para a determinação da atividade antioxidante do fruto do *Crataegus monogyna***. 140 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- à Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2013.

MUSCHIETTI, L.V.; MARTINO, V.S. Atividades biológicas dos flavonoides naturais. In: YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 2. ed. Itajaí: Univali, 2007. p. 183-207.

NARDONE, R. M. Toxicity testing in vitro. In: ROTBBLAT, G. H.; CRISTOFALO, V. J. (Org.). **Growth, nutrition and metabolism of cells in culture**. New York: Academic, 1977. p.471-495.

NASCIMENTO, J. B.; BARRIGOSSO, J. A. F. O papel das enzimas antioxidantes na defesa das plantas contra insetos herbívoros e fitopatógenos. **Agrarian Academy**, v.1, n. 1, p. 234-250, 2014.

NEHRING, P.; SERAGLIO, S. K. T.; GONZAGA, L. V.; FETT, R.; COSTA, A. C. O. Influência dos diferentes solventes na avaliação da capacidade antioxidante in vitro de frutos e sementes de pitaia (*Hylocereus polyrhizus*). **Revista Congresso Sul Brasileiro de Engenharia de Alimentos**, v. 2, n. 1, p. 12, 2016.

NGO, L. T.; OKOGUNB, J. I.; FOLK, W. E. 21st Century natural product research and drug development and traditional medicines. **Natural Product Reports**, v. 30, n. 4, p. 584-592, 2003.

NICKEL, F. T. FLORIAN T. N.; FRANK, S.; STEFAN, L.; CHRISTIAN, M. Mechanisms of neuropathic pain. **European Neuropsychopharmacology**, v. 22, n. 2, p. 81-91, 2012.

NOVAIS, T. S.; COSTA, J. F. O.; DAVID, J. L. P.; DAVID, J. M.; QUEIROZ, L. P.; FRANÇA, F.; GIULIETTI, A. M.; SOARES, M. B. P.; SANTOS, R. R. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.14, n. 5, p.5- 8. 2003.

NUNES, X. P.; MESQUITA, R. F.; SILVA, D. A.; LIRA, D. P.; COSTA, V. C. O.; SILVA, M. V. B.; XAVIER, A. L.; DINIZ, M. F. F. M.; AGRA, M. F. Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 718-723, 2008.

OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2003. p. 474.

OPITZ, S. E.; SMRKE, S.; GOODMAN, B. A.; KELLER, M.; SCHENKER, S.; YERETZIAN, C. Antioxidant generation during coffee roasting: A comparison and interpretation from three complementary assays. **Foods**, v. 3, n. 4, p. 586-604, 2014.

PARK, E. S.; GAO, X.; CHUNG, J. M.; CHUNG, K. Levels of mitochondrial reactive oxygen species increase in rat neuropathic spinal dorsal horn neurons. **Neurosci Lett**, v. 391, n. 3, p. 108-11, 2006.

PARKER, A. W.; BISBY, R. H.; GREETHAM, G. M.; KUKURA, P.; SCHERER, K. M.; TOWRIE, M. Ultrafast vibrational spectroscopic Studies on the photoionization of the  $\alpha$ -Tocopherol analogue Trolox C. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 118, n. 42, p. 12087-12097, 2014.

PATHAK, N. N.; BALAGANUR, V.; LINGARAJU, M. C.; KANT, V.; LATIEF, N.; MORE, A. S.; KUMAR, D.; KUMAR, D.; TANDAN, S. K. Atorvastatin attenuates neuropathic pain in rat neuropathy model by down-regulating oxidative damage at peripheral, spinal and supraspinal levels. **Neurochemistry International**, v. 68, 3., p. 1-9, 2014.

PATRICK, G. L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. 2005. 51 f. Monografia (Graduação em Bioquímica) - Oxford University Press, Nova York. 2005.

PAULA, C. S.; CANTELI, V. C. D.; VERDAM, M. C. S.; KALEGARI, M.; CAMPOS, R.; HIROTA, B. C. K.; MIGUEL, O. G. M.; MIGUEL, M. D. Antioxidant activity and preliminary toxicity of the extracts and fractions obtained from the leaves and stem bark of *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.) Cabrera. **Revista brasileira de plantas medicinais**: Botucatu, v.16, n. 2, p. 12-19, 2014.

PEREIRA, E. P.; SOUZA, S. B.; SANTOS, C. C.; SANTOS, L. O.; CERQUEIRA, M. D.; RIBEIRO, P. R.; COSTA, S. L. *Amburana cearensis* seed extracts protect PC-12 cells against toxicity induced by glutamate. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 3, n. 2, p. 323-330, 2016.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PÉREZ, R. D. L. C. S.; CANAVACIOLO, V. L. G.; MURILLO, R. V.; RICO, C. L. M.; LEYES, E. A. R.; DELANGE, D. M. Material vegetal seco y molido del fruto de

acrocomia crispa para la producción de D005. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 20, n. 2, p. 246-252, 2015.

PINHEIRO, C. U. B. Extrativismo, cultivo e privatização do jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Holm.; Rutaceae) no Maranhão, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 16, n. 2, p. 141–150, 2002.

PINTO, R. B. **Nrf2 como potencial alvo farmacológico no tratamento da depressão e da dor neuropática associadas ao diabetes**. 2015. 87 f. Dissertação. (Mestrado em farmacologia)- Universidade Federal do Paraná, 2015.

PIOVESANA, A. **Extração, identificação, quantificação e microencapsulamento por atomização e liofilização de compostos bioativos dos cálices de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.)**. 2016. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2016.

PISCO, L.; KORDIAN, M.; PESEKE, K.; FEIST, H. MICHALIK, D.; ESTRADA, E.; CARVALHO, J.; HAMILTON, G.; RANDO, D.; QUINCOSES, J. Synthesis of compounds with antiproliferative activity as analogues of prenylated natural products existing in Brazilian propolis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 41, p. 401-407, 2006.

POVOROZNIUK, V. V.; PRYIMYCH, U. I. Identification of Neuropathic Pain Component in Patients with Knee Osteoarthritis. **Trauma**, v.17, n.3, p.114-119, 2016.

PROPPENGA, R. H. Introduction to Poisonous Plants of Veterinary Importance. Disponível em: < <http://cal.vet.upenn.edu/poison/ppstintro.htm>.>. Acesso em 12 fev. 2016.

PRVULOVIĆ, D.; MALENČIĆ, D.; MILADINOVIĆ, J. Antioxidant Activity and Phenolic Content of Soybean Seeds Extracts. **Agro-knowledge Journal**, v.17, n.2, p. 121-132, 2017.

RAMOS, J. M. D. O. Identificação dos constituintes químicos e estudo farmacológico do óleo essencial das folhas da *Croton argyrophyllus* kunth. 2013. 83 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, 2013.

RAVEN, P. H., EVERT, R. F., CURTIS, H. *Biologia Vegetal*. 7. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**. 2007. 906 p.

RAVICHANDRAN, V; VASANTHI, S.; SHALINI, S.; SHAH, S. A. A.; HARISH, R. Green synthesis of silver nanoparticles using *Atrocarpus atilis* leaf extract and the study of their antimicrobial and antioxidant activity. **Materials Letters**, v. 180, n. 4, p. 264-267, 2016.

RESHMA, M. V.; JACOB, J.; SYAMNATH, V. L.; HABEEBA, V. P.; KUMAR, B. D.; LANKALAPALLI, R. S. First report on isolation of 2, 3, 4-trihydroxy-5-methylacetophenone from palmyra palm (*Borassus flabellifer* Linn.) syrup, its antioxidant and antimicrobial properties. **Food Chemistry**. v. 228, n. 1, p. 491–496, 2017.

RIBEIRO, R.; DE SOUSA, D. W. N.; OLIVEIRA, T. S.; FERNANDES, K. P. S.; JUNIOR, J. A. S. Atividade Física Intensa: Papel do Óxido Nítrico na Apoptose. **Manual Therapy, Posturology & Rehabilitation Journal**, v. 10, n. 48, 2013.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Pharmacognosy and pharmaco biotechnology**. 1. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996. 337 p.

ROCHA, L.M. Controle de qualidade de produtos fitoterápicos. In: SHARAPIN, N. **Fundamentos de tecnologia de produtos fitoterápicos**. Santa fé de Bogotá: Quebecor-Impreandes, 2000. p. 231.

ROCHA, T. M. (2017). **Efeito anti-inflamatório e antinociceptivo de alcaloides imidazólicos de *Pilocarpus microphyllus*: estudo in vitro, in vivo e in silico**. 2017. 96 f. Dissertação (mestrado em farmacologia)- Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia Alimentar**, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, n. 3, p. 235-254, 2005.

ROMÃO, G. B. **Estudo in vitro da ação de extrato hidroetanólico de *Cordia verbenacea* DC. em espécies reativas de oxigênio de importância biológica**. 2016. 137 f. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de São Paulo (UNESPI), Araquara, São Paulo, 2016.

ROSABAL, M. T.; DEL VALLE SUÁREZ, B.; HERNÁNDEZ, Y. P.; NAITE, I. M.; MAS, Y. L.; ORTEGA, L. R. Caracterización fitoquímica de la especie amenazada *Fraxinus caroliniana* Mill subsp. *cubensis* (Griseb.) Borhidi. **Biotecnologia Vegetal**, v.16, n.2, p. 213-220, 2017.

RUNYORO, D. K. B.; NGASSAPA, O. D.; KAMUGISHA, A. Antimicrobial Activity of Propolis from Tabora and Iringa Regions, Tanzania and Synergism with Gentamicin. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 7, n. 1, p. 171-176, 2017.

SAADE, N. E.; JABBUR, S. J. Nociceptive behavior in animal models for peripheral neuropathy: spinal and supraspinal mechanisms. **Progress in Neurobiology**, v. 86, n. 1, p. 22-47, 2008.

SAADÉ, N. E.; JABBUR, S. J. Nociceptive behavior in animal models for peripheral neuropathy: spinal and supraspinal mechanisms. **Progress in Neurobiology**, v. 86, n. 1, p. 22-47, 2008.

SABÁ, R. T.; Lameira O. A.; LUZ, J. M. Q.; GOMES, A. N. P. R.; INNECCO, R. Micropropagação do jaborandi. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 106–109, 2002.

SABÁ, R. T.; LAMEIRA, O. A.; LUZ, J. M. Q.; GOMES, A. P. D. R.; INNECCO, R. Micropropagation of the jaborandi. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 1, p.106-109. 2002.

SAGALAJEV, B.; VIISANEN, H.; WEI, H.; PERTOVAARA, A. Descending antinociception induced by secondary somatosensory cortex stimulation in experimental neuropathy: role of the medullospinal serotonergic pathway. **Journal of Neurophysiology**, v.117, n. 3, p. 1200-1214, 2017.

SAJEDIANFARD, J.; KHATAMI, S.; SEMNANIAN, S.; NAGHDI, N.; JORJANI, M. *In vivo* measurement of

SAK, K. Site-specific anticancer effects of dietary flavonoid quercetin. **Nutrition and cancer**, v. 66, n. 2, p. 177-193, 2014.

SALA, O. **Fundamentos da espectroscopia Raman e no Infravermelho**. 1 ed. São Paulo: Editora UNESP; 1995. 152 p.

SANDHU, S. S.; ABREU, I. N.; COLOMBO, C. A.; MAZZAFERA, P. Pilocarpine content and molecular diversity in jaborandi. **Scientia Agricola**, v. 63, n.5, p.478-482, 2006.

**SANNIGRAHI, S.; MAZUDER, U. K.; PAL, D. K.; PARIDA, S.; JAIN, S.** Antioxidant Potential of Crude Extract and Different Fractions of *Enhydra fluctuans* Lour. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 1, p. 75–82, 2010.

SANTOS, A. P.; MORENO, P. R. H. *Pilocarpus spp.*: a survey of its chemical constituents and biological activities. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, p. 116–137, 2004.

SANTOS, A. P.; MORENO, P. R. H. *Pilocarpus spp.*: A survey of its chemical constituents and biological activities. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**, São Paulo, v.40, p. 115 – 137, 2004.

SANTOS, F. A.; CUNHA, G. M. A.; VIANAT, G. S. B.; RAO, V. S. N.; MANOEL, A. N.; SILVEIRA, E. R. Antibacterial Activity of Essential Oils from *Psidium* and *Pilocarpus* species of plants. v. 11, n. 1, p. 67–69, 1997.

SANTOS, F. C. C.; FISCHER, P.; FCHTNER, S. S.; SANTOS, E. E.; VEIGA, L. S. Efeitos experimentais negativos da fava de “faveira”, *Dimorphandramollis* Benth., como causa de aborto em bovinos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 5, n. 1, p. 23-29, 1975.

SANTOS, F. D. N.; WATANABE, M.; VASCO, C. F.; FONSECA, C. D. D.; VATTIMO, M. D. F. F. Antioxidant protection of statins in acute kidney injury induced by sepsis. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 48, n. 5, p. 820-826, 2014.

SANTOS, G. A. B.; DORA, I. K. A. Utilização de Extratos Plantas no Controle In Vitro de Micro-Organismos Componentes da Microbiota Oral. **Archives Of Health Investigation**, v. 4, n. 3, 2016.

SANTOS, J. DA S. Configurações eletrônicas: análises e evidências. **Revista Química: ciência, tecnologia e sociedade**, v. 2, n.1, p. 2-10, 2014.

SANTOS, M. H; BATISTA, B. L.; DUARTE, S. M. S.; DE ABREU, C. M. P.; GOUVÊA, C. M. C. P. G. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade do café (*Coffea arabica*). **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 604-610, 2007.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5. ed. Rio Grande do Sul: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004. 1102 p.

SANVIDO, M. E.; SCOPEL, J. M.; CASSEL, E.; LUCAS, A. M. Análise comparativa do teor de flavonoides e da atividade antioxidante de extratos de *Baccharis uncinella* obtidos por extração supercrítica e maceração. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 3, p. 708-713, 2015.

SCHEERER, J. Jaborandi- *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth. Zeitschrift für. **Phytotherapie**, v. 21, n. 4, 220-230, 2000.

SCHEID, T. **Efeitos da administração de uma fração antioxidante de *Schinus terebinthifolius* sobre parâmetros nociceptivos e de estresse oxidativo em sistema nervoso central de ratos submetidos a um modelo de dor neuropática**. 2014. 105 f. Dissertação (mestrado em Ciências Biológicas)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2014.

SCHENK, B.; FULDA, S. Reactive oxygen species regulate Smac mimetic/TNF $\alpha$ -induced necroptotic signaling and cell death. **Oncogene**, v. 34, n. 47, p. 5796-5806, 2015.

SCHESTATSKY, P. Definição, diagnóstico e tratamento da dor neuropática. **Revista HCPA**, v. 28, n. 3, p. 177-87, 2008.

SILVA, C. D.; SILVA, S. B. Avaliação de solventes e condições experimentais para extração do óleo de sementes de nabo forrageiro (*Raphanus sativus* L.). **Engevista**, v. 18, n. 2, p. 348-362, 2016.

SILVERSTEIN, RM., WEBSTER, J. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 7 ed. Editora: Copyrighted, 2006. 175 p.

SIM, G. S.; LEE, B. C.; CHO, H. S.; LEE, J. W.; KIM, J. W.; LEE, D. W.; KIM, J. H.; PYO, H. B.; MOON, D. C.; OH, K. W.; YUN, H. P.; HONG, J. T. **Archives of Pharmacal Research**, v. 30, n. 7, p. 290-298, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosiada planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade Federal do Rio Grande do Sul/ Universidade Federal de Santa Catarina, 2010. 1102 p.

SIMÕES, V. N.; FAVARIN, L. R. V.; CABEZA N. A.; DE OLIVEIRA, T. D.; FIORUCCI, A. R.; STROPA, J. M.; RODRIGUES, D. C. M.; CAVALHEIRO, A. A.; DOS ANJOS, A. Síntese, caracterização e estudo das propriedades de um novo complexo mononuclear contendo quercetina e íon Ga (III). **Química Nova**, v. 36, n. 4, p. 495-501, 2013.

SIMON, L.; GAUVIN, F.; AMRE, D. K., SAINT-LOUIS, S.; LACROIX, J. Serum Procalcitonin and C-Reactive Protein Levels as Markers of Bacterial Infection: A Systematic Review and Meta-analysis. **Clinical Infectious Diseases**. v. 39, n.4, p. 206–17, 2004.

SINDHU, C.; JOSE, B. Evaluation of antioxidant, antibacterial and cytotoxic activity, quantitative estimation of phenols, flavonoids and carotenoids in different parts of *Samadera indica* from South India. **Medicinal Plants-International Journal of Phytomedicines and Related Industries**, v.8, n. 4, p. 319-327, 2016.

SINDHU, C.; JOSE, B. Evaluation of antioxidant, antibacterial and cytotoxic activity, quantitative estimation of phenols, flavonoids and carotenoids in different parts of *Samadera indica* from South India. **Medicinal Plants-International Journal of Phytomedicines and Related Industries**, v. 8, n. 4, p. 319-327, 2016.

SINDHU, C.; JOSE, Beena. Evaluation of antioxidant, antibacterial and cytotoxic activity, quantitative estimation of phenols, flavonoids and carotenoids in different parts of *Samadera indica* from South India. **Medicinal Plants-International Journal of Phytomedicines and Related Industries**, v. 8, n. 4, p. 319-327, 2016.

SITEPU, R. J.; SAPUTRA, O. O. Pengaruh Konsumsi Flavonoid terhadap Fungsi Kognitif Otak Manusia. **Jurnal Fk Unila**, v. 5, n. 3, p.134, 2016.

SKEHAN, P., STORENG, R., SCUDIERO, D., MONKS, A., MCMAHON, J., VISTICA, D., WARREN, J.T., BODESCH, H., KENNEY, S., BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.

SKELLY, A. **The Blooming of Botanicals**.1. ed. Londres: The Nutrition, p. 13, 1996.

SKOOG, D. A. **Fundamentals of analytical chemistry**. 6 ed., Fort worth: Saunders College, 1992. p. 300-600.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; WEST, T. A. **Principios de análises instrumental**. 5 ed. Cidade do México: McGraw Hill. 2000. 141 p.

SKOOG, D. A.; SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; WEST, D. M. **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2006. 1121 p.

SKORUPA, L. A. New chromosome numbers in *Pilocarpus* Vahl (Rutaceae). **Acta Botanica Brasilica**, São Carlos, v. 14, n.1, p.11-14, 2000.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G.G.; PETROVICK,P.R.; BASSANI, V.L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PALAZZO de MELLO, J.C.; MENTZ, L.A.; ROS PETROVICK, P.

**Farmacognosia da planta ao medicamento.** 6 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS/ Ed. Universidade UFSC, 2007. p. 577-611.

SONODA, M.; NISHIYAMA, T.; MATSUKAWA, Y.; MORIYASU, M. Cytotoxic Activities from two *Scutellaria* plants in chinese medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 91, n. 1, p. 65-68, 2004.

SORKIN, L. S.; YAKSH, T. L. Behavioral models of pain states evoked by physical injury to the peripheral nerve. **Neurotherapeutics**, v. 6, n. 4, p. 609-19, 2009.

SOUSA, A. M.; LAGES, G. V.; PEREIRA, C. L.; SULLITE, A. S. Modelos experimentais para o estudo da dor neuropática. **Revista Dor**: São Paulo, v. 17, n. 1, p. 27-30, 2016.

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

SOUZA, L. M. D. **Aplicações da Espectrometria de Massas e da Cromatografia Líquida na Caracterização Estrutural de Biomoléculas de Baixa Massa Molecular.** 2008. 182 f. Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2008.

SOUZA, T. M. **Estudo farmacognóstico e avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de preparações cosméticas contendo o extrato de folhas de *Myrciaria cauliflora* O. Berg. (Myrtaceae) e de casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.).** Araraquara: Universidade Estadual Paulista. 2007. 171 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

STICHER, O. Natural Product Isolation. **Natural Product Reports Articles**, Londres, v. 25, n. 4, p. 517-557, 2007.

STOBINSKI, L.; LESIAK, B.; KOVER, L. Multiwall carbon nanotubes purification and oxidation by nitric acid studied by the FTIR and electron spectroscopy methods, **Journal of Alloys and Compounds**, v. 501, n. 1, p. 77– 84, 2010.

STUART, B. **Infrared spectroscopy: Fundamentals and Applications.** 1 ed., USA: David J. Ando. 2005. 245 p.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. Assays related to cancer drug discovery. In: HOSTETTMANN, K. (Org.) **Methods in plant biochemistry: assays for bioactivity.** 6. ed. Londres: Academic Press, 1990. p. 71-133.

SZABO, C. Role of poly (ADP-ribose) synthetase in inflammation. **Europe Journal Pharmacolgy**, v. 350, n. 1, p. 1-19, 1998.

TAPIA, C. **Estudio electroquímico del extracto de mimosa tenuiflora como sustancia convertidora de óxidos para la protección de aceros de carbono.** 2015. 102 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química)- Faculdade de Ciências Química, Xalapa, 2015.

TAVEIRA, F. S. N.; TAVEIRA, F. N.; ANDRADE, E. H. A.; LIMA, W.; MAIA, J. G. S. Seasonal variation in the essential oil of *Pilocarpus microphyllus* Stapf. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 75, n. 1, p. 27–31, 2003.

TIMBOLA, A. K.; DE SOUZA, C. D.; GIACOMELLI, C.; SPINELLI, A., Electrochemical oxidation of quercetin in hydro-alcoholic solution. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 3, p. 139-148, 2006.

TIMBOLA, A. K.; SOUZA, C. D.; GIACOMELLI, C.; SPINELLI, A. Electrochemical oxidation of quercetin in hydro-alcoholic solution. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 1, p. 139–148, 2006.

TIOMNOVA, O. T.; MORALES, J. E. T.; JORGE, A. S. S.; CHANFRAU, E. R. Evaluación del tiempo de destilación y el tratamiento hidrotermal sobre la obtención de colofonia y trementina a partir de resina de pino cubano.

TIWARI, V.; GUAN, Y.; RAJA, S. N. Modulating the delicate glial–neuronal interactions in neuropathic pain: Promises and potential caveats. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 45, p. 19-27, 2014.

TOMCHINSKY, B.; MING, L. C.; DE FREITAS HIDALGO, A.; DE CARVALHO, I.; KFFURI, C. W. Impactos da legislação na pesquisa etnobotânica no Brasil, com ênfase na Região Amazônica. **Amazônica-Revista de Antropologia**, v. 5, n. 3, p. 734-761, 2014.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 718 p.

TSIMOGIANNIS, D. SAMIOTAKI, M.; PANAYOTOU, GEORGE, OREOPOULOU, V. Characterization of flavonoid subgroups and hydroxy substitution by HPLC-MS/MS. **Molecules**, v. 12, n. 3, p. 593–606, 2007.

TSIMOGIANNIS, D.; BIMPILAS, A.; OREOPOULOU, V. DPPH Radical Scavenging and Mixture Effects of Plant o-Diphenols and Essential Oil Constituents. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 34, n. 7, p.234-239. 2017.

VAN BRAMER, S. E. **An introduction to mass spectrometry**. Chester: Widener University, 1998. 153 p.

VANDER HOOGERSTRAETE, T.; BINNEMANS, K. HIGHLY. Efficient separation of rare earths from nickel and cobalt by solvent extraction with the ionic liquid trihexyl (tetradecyl) phosphonium nitrate: a process relevant to the recycling of rare earths from permanent magnets and nickel metal hydride batteries. **Green Chemistry**, v.16, n. 3, p. 1594-1606, 2014.

VANOTTI, A.; OSIO, M.; MAILLAND, E.; NASCIMBENE, C.; CAPILUPPI, E.; MARIANI, C. Overview on pathophysiology and newer approaches to treatment of peripheral neuropathies. **CNS Drugs**, v. 21, n. 1, p. 3-12, 2007.

VARLEY, A. J., SULE J., ABSALOM A. R. Principles of antibiotic therapy: continuing Education in Anaesthesia. **Critical Care & Painj**. v. 9, n. 6, p. 133-200, 2009.

VASCONCELOS, G. R. R.; CARDOSO, L. A.; LIMA, M. H. Seasonal modulation of free radical metabolism in estivating land snails *Helix aspersa*. **Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**: Chicago, v. 140, n. 2, p.165-74, 2005.

VEIGA, A. A. S. Isolamento e quantificação de flavonóides e abordagem das atividades antioxidante e antimicrobiana de *Jatropha gossypifolia* L. 2008. 67 f. Dissertação ( Mestrado em Ciências farmacêuticas)- Universidade Federal do Pará, Belém, 2008.

VEIGA, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: Cura segura? **Quimica Nova**, v. 28, n. 3, p. 519–528, 2005.

VERAS, L. M.; GUIMARÃES, M.A.; CAMPELO, Y. D.; VIEIRA, M. M.; NASCIMENTO, C.; LIMA, D.; VASCONCELOS, L.; NAKANO, E.; KUCKELHAUS, S.; BATISTA, M.C.; LEITE, J.R.; MORAES, J. Activity of epiisopiloturine against *Schistosoma mansoni*. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 19, n. 13, p. 2051-2058, 2012.

VIEIRA, R.F. Conservation of medicinal and aromatic plants in Brazil. In: JANICK, J. **Perspectives on new crops and new uses**. Alexandria: ASHS Press. 1999. p. 152-159.

VIJAYALAKSHMI, A.; RAVICHANDIRAN, V.; MASILAMANI, K. Inhibition of cyclooxygenase activity by standardized extract of *Givotia rottleriformis* Griff. ex Wight bark. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, v.12, n.1, p. 976-512, 2016.

VITALE, M.; MASULLI, M.; RIVELLESE, A. A.; BONORA, E.; CAPPELLINI, F.; NICOLUCCI, A.; BIANCHINI, F. Dietary intake and major food sources of polyphenols in people with type 2 diabetes: The TOSCA. It study. **European Journal of Nutrition**, p. 1-10. 2016.

WAGNER, R.; MYERS, R. R. Schwann cells produce tumor necrosis factor alpha: expression on injured and non-injured nerves. **Neuroscience**, v. 73, n. 1, p. 625-629, 1996.

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. **Thin layer chromatography in phitochemistry**. Paris: Chromatographic Science Series, 2008. 896 p.

WANG, L.; WANG, Z.; LI, X. Preliminary phytochemical and biological activities study of solvent extracts from a cold-field fruit *Malus baccata* (Linn.) **Borkh. Industrial Crops and Products**, v. 47, n.3. p. 20-28, 2013.

WANG, N.; YI, W. J.; TAN, L.; ZHANG, J. H.; XU, J.; CHEN, Y.; ZHANG, R. Apigenin attenuates streptozotocin-induced pancreatic  $\beta$  cell damage by its protective effects on cellular antioxidant defense. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 1, n.10, p.210-221, 2017.

WANG, Y.; YANG, H.; SHEN, C.; LUO, J. Morphine and pregabalin in the treatment of neuropathic pain. **Experimental and Therapeutic Medicine**. v.13, n.10, p. 1393-1397, 2016.

WATSON, J. D. Molecular biology of the gene. 1. ed. New York: **W. A. Benjamin**, 1965.

WHO. World Health Organization Overcoming Antimicrobial Resistance World Health Report on Infectious Diseases. 2000. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/en/>> Acesso em: 15, set. 2015.

WILHELM FILHO, D.; SILVA, E. L.; BOVERIS, A. Flavonoides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas. In: CALIXTO, J.B.; YUNES, R.A. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal**. 2 ed. São Paulo: Argos, 2001. p. 317-346.

WILKERSON, J.; HSU, K. L.; NIPHAKIS, M.; VAN DER STELT, M.; CRAVATT, B.; LICHTMAN, A. Marble Burying: A Novel Measure of Murine Neuropathic Pain Depressed Behavior. **The FASEB Journal**, v. 29, n.1, p. 616-11, 2015.

WINROW, V. R.; WINYARD.; P. G.; MORRIS, C. J.; BLAKE, D. R. Free radicals in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction. **British Medical Bulletin**, v. 49, n. 2, p. 506-522, 1993.

Wu, N.; Fu, K.; Fu, Y. J.; Zu, Y. G.; Chang, F. R.; Chen, Y. H.; Liu, X. L.; Kong, Y.; Liu, W.; Gu, C. B. Antioxidant activities of extracts and main components of Pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] leaves. **Molecules**, v. 14, n. 3, p. 1032-43, 2009.

WU, S. C.; WROBEL, J. S.; ARMSTRONG, D. G. Assessing the impact of pharmacologic intervention on the quality of life in diabetic peripheral neuropathic pain and fibromyalgia. **Pain Medicine**, v. 8, n. 2, p. S33-S42, 2007.

XIE, Z.; LI, G.; FU, Y.; SUN, M.; YE, B. Sensitive, simultaneous determination of chrysin and baicalein based on Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-chitosan composite modified carbon paste electrode. **Talanta**, v. 30022, v. 17, p. 9149-9140, 2017.

XU, H. X.; LEE, S. F. Activity of Plant Flavonoids Against Antibiotic – Resistant Bacteria. **Phytotherapy Research**, Londres, v.15, n. 3, p. 39–43, 2001.

YANG, B.; ARAI, K.; KUSU, F. Electrochemical behaviors of quercetin and kaempferol in neutral buffer solution. **Analytical Sciences**, v. 17, p. 987-989, 2001.

YANG, W.; LI, R.; WANG, Q.; WEI, Q.; FU, C.; LIN, Z.; CHEN, G. A micro-pressure sensor-based analytic platform and its application in thrombin quantification. **Analytical Methods**, v. 7, n. 19, p. 7985-7988, 2015.

YAO, L. H.; JIANG, Y. M.; SHI, J.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; DATTA, N.; SINGANUSONG, R.; CHEN, S. S. Flavonoids in Food and their Health Benefits. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 59, p. 113-122, 2004.

YAO, L. H.; JIANG, Y. M.; SHI, J.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; DATTA, N.; SINGANUSONG, R.; CHEN, S. S. Flavonoids in Food and their Health Benefits. **Plant Foods for Human Nutrition**, China, v. 59, p. 113-122, 2004.

ZENG, L.; ALONGKRONRUSMEE, D.; VAN RIJN, R. M. An integrated perspective on diabetic, alcoholic, and drug-induced neuropathy, etiology, and treatment in the US. **Journal of Pain Research**, v. 10, n. 3, p. 219, 2017.

ZHANG, L.; LI, M.; QIN, Y.; CHU, Z.; ZHAO, S. A convenient label free colorimetric assay for pyrophosphatase activity based on a pyrophosphate-inhibited  $\text{Cu}^{2+}$ -ABTS- $\text{H}_2\text{O}_2$  reaction. **Analyst**, v. 139, n. 23, p. 6298-6303, 2014.

ZHANG, W.; ZHENG, J.; LIN, Z.; ZHONG, L.; SHI, J.; WEI, C.; HU, S. Highly sensitive simultaneous electrochemical determination of hydroquinone, catechol and resorcinol based on carbon dot/reduced graphene oxide composite modified electrodes. **Analytical Methods**, v. 7, n. 15, p. 6089-6094, 2015.

ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A. Flavonoides. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PALAZZO de MELLO, J.C.; MENTZ, L.A.; ROS PETROVICK, P. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS/ Ed. Universidade UFSC, 2007. p.577-611.