

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Monitoramento sazonal da atividade antioxidante das
folhas de *Erythroxylum suberosum* A.St.-Hil.: correlação
com o teor de hiperosídeo e isoquercitrina**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

NATHALIA DE ALMEIDA MORAIS

BRASÍLIA-DF

2015

NATHALIA DE ALMEIDA MORAIS

**Monitoramento sazonal da atividade antioxidante das
folhas de *Erythroxylum suberosum* A.St.-Hil.: correlação
com o teor de hiperosídeo e isoquercitrina**

Dissertação apresentada ao
programa de Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas da Faculdade de Ciências
da Saúde, Universidade de Brasília, como
requisito parcial para obtenção do Título de
Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Profa Dra Yris Maria Fonseca-Bazzo

Orientadora

BRASÍLIA-DF

2015

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

dm de Almeida Moraes, Nathalia
Monitoramento sazonal da atividade antioxidante
das folhas de *Erythroxylum suberosum* A.St.-Hil.:
correlação com o teor de hiperosídeo e isoquercitrina
/ Nathalia de Almeida Moraes; orientador Yris Maria
Fonseca-Bazzo. -- Brasília, 2015.
90 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências
Farmacêuticas) -- Universidade de Brasília, 2015.

1. *Erythroxylum suberosum* A.St.-Hil. 2. Atividade
antioxidante. 3. Hiperosídeo. 4. Isoquercitrina. 5.
Sazonalidade. I. Fonseca-Bazzo, Yris Maria, orient.
II. Título.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Dissertação intitulada Monitoramento sazonal da atividade antioxidante das folhas de *Erythroxylum suberosum* A.St.-Hil.: correlação com o teor de hiperosídeo e isoquercitrina, de autoria de Nathalia de Almeida Moraes, aprovada pela banca examinadora constituída pelos seguintes professores:

Aprovada em ____ de _____ de 2015

BANCA EXAMINADORA

Dra. Yris Maria Fonseca-Bazzo - Presidente
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Dra. Dâmaris Silveira
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Dr. Christopher William Fagg
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Dra. Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista – Suplente
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Dedico aos meus avós, que minha mãe ama plenamente e sempre sonhavam com futuro brilhante para seus netos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela conclusão deste trabalho e por me iluminar e me dar ombros fortes para suportar a caminhada.

Agradeço a minha mãe e ao meu pai pela força quando pensava em desistir do meu grande sonho.

À minha orientadora Yris Maria Fonseca por me apoiar e amparar no momento em que eu mais precisava.

Ao professor Luiz Simeoni por guiar a um caminho melhor e poder mudar meu destino.

À professora Dâmaris Silveira que encantou a todo o momento com seu dom e valorização pela carreira acadêmica.

Aos companheiros de laboratório que incentivaram a todo o momento por meio simples palavras. Aos amigos, que me tornaram mais forte e me ensinaram com conhecimentos adquiridos.

Agradeço ao meu namorado, Pedro Marins, pela contribuição emocional e incentivadora, para o término deste trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro junto a bolsa de pesquisa. Aos outros colaboradores, FAPDF, CNPQ, FINATEC, DPP-UNB pelo auxílio financeiro à apresentação da pesquisa realizada.

*“Tenho apenas duas mãos e
o sentimento do mundo”.*

(Carlos Drummond de
Andrade)

RESUMO

Erythroxylum suberosum A.St.-Hil. (Erythroxylaceae) é conhecida popularmente como “cabelo de negro” e utilizada popularmente como antidiarreico, adstringente, antirreumático, anestésico e para indigestão. Esta espécie pode ser encontrada em ambientes úmidos como a Mata Atlântica, nas regiões semiáridas e Cerrado. No presente trabalho, foi avaliada a sazonalidade da atividade antioxidante da espécie *E. suberosum* A.St.-Hil. correlacionada com o teor de hiperosídeo e isoquercitrina. Foram feitas 4 coletas de folhas no período compreendido entre novembro de 2013 a maio de 2014 e preparados extratos aquosos (EA), etanólicos (EE) e hexânicos (EH) a partir das folhas secas. A avaliação do perfil cromatográfico dos extratos permitiu a identificação de isoquercitrina e hiperosídeo nos extratos EA e EE. No período avaliado, o teor de flavonoides nos extratos EA variou de 41,8 µg/mg a 23,3 µg/mg (hiperosídeo) e 18,0 µg/mg a 12,9 µg/mg (isoquercitrina). Nos extratos EE, hiperosídeo e isoquercitrina foram quantificados entre 25,5 a 19,0 µg/mg e 10,9 a 14,4 µg/mg, respectivamente. Para o ensaio de atividade sequestradora de radicais DPPH*, todos os extratos mostraram atividade. O extrato mais ativo foi o EA2, referente à coleta em novembro de 2013 (CI₅₀= 4,45 µg/mL), semelhante ao padrão BHT. Para o método de redução do complexo fosfomolibdênio, os extratos referentes à coleta em agosto de 2013 EA1 (186,28 µg/mL equivalente AA) e EE1 (206,39 µg/mL equivalente AA) foram os mais ativos. As correlações relativas ao EA indicaram que à medida que os teores de isoquercitrina e hiperosídeo aumentaram, o poder antioxidante dos extratos pelo método do fosfomolibdênio também aumentou, sendo encontradas correlações fortes positivas significativas. Desta forma, a atividade antioxidante de EA pôde ser atribuída em grande parte à presença destes flavonoides. As correlações relativas ao EE indicaram que à medida que os teores de isoquercitrina e hiperosídeo aumentaram, o poder antioxidante dos extrato EE pelo ensaio de atividade redutora de DPPH* reduziu. Desta forma, a atividade redutora de DPPH* de EE pode não ser atribuída a estes flavonoides. Foi também observado que à medida que a umidade relativa aumentou, o teor de hiperosídeo e isoquercitrina tendeu a diminuir, bem como a atividade antioxidante. Por outro lado, o teor de hiperosídeo e isoquercitrina foi inversamente proporcional à redução da temperatura e diretamente proporcional que ao aumento da radiação. Essa tendência foi observada também no que se refere à atividade antioxidante, o aumento da temperatura e da radiação global incrementaram a atividade redutora de fosfomolibdênio. Quanto à atividade sequestradora dos radicais DPPH*, à medida que a radiação aumentou, a atividade tendeu a diminuir, apesar do aumento do teor dos flavonoides. Os resultados obtidos revelaram que para obter um extrato a partir das folhas de *E. suberosum* A.St.-Hil., o melhor período de coleta, para se obter melhores teores de isoquercitrina e hiperosídeo e maior atividade antioxidante, é no mês de agosto. E o melhor solvente extrativo foi a água, utilizando processo de infusão.

Palavra-chave: *Erythroxylum suberosum* A.St.-Hil.; Atividade antioxidante; Hiperosídeo; Isoquercitrina; Sazonalidade.

ABSTRACT

Erythroxylum suberosum A.St.-Hil (Erythroxylaceae), is popularly known as "cabelo-de-nego" and used for indigestion and as antidiarrheal, astringent, antirheumatic, anesthetic remedy. This species can be found at Atlantic Forest, at the Semi-Arid and Savannah regions. In this study, we evaluated the seasonality of the antioxidant activity of the species *E. suberosum* A.St.-Hil correlated to hyperoside and isoquercitrin content. Leaves were collected during August 2013, and May 2014. Aqueous (EA), ethanol (EE) and hexane (EH) extracts were prepared from the dried leaves. The chromatographic profile of extracts shows isoquercitrin and hyperoside. The flavonoid content on EA extracts varied from 41,8 µg/mg to 23,3 µg/mg (hyperoside), and from 18,0 µg/mg to 12,9 µg/mg (isoquercitrin), while EE extracts show ranges of 25,5-19,0 µg/mg and 10,9-14,4 µg/mg to hyperoside and isoquercitrin, respectively. All extracts presented antioxidant activity. For DPPH• assay, the most active extract was an EA2, obtained from leaves collected in November 2013 (CI₅₀ = 4.45 µg/mL), similar to standard (BHT). For the reduction of phosphomolybdenum complex method, EA1 and EE1 extracts (August 2013) - 186.28 µg/mL AA equivalent and 206.39 µg/mL AA equivalent, respectively – were the most active. The correlations for the EA extracts indicated that as higher isoquercitrin and hyperoside content, as higher antioxidant activity in both methods. Regarding DPPH• assay, in EE, the concentration of isoquercitrin and hyperoside is inversely proportional to antioxidant activity. It was also observed that as the rainfall was increased, flavonoid content tended to decrease, as well as antioxidant activity measured by both DPPH• and phosphomolybdenum methods. Also, as the temperature decayed, the flavonoid content tended to increase. Moreover, as the temperature and global radiation increased, the activity by phosphomolybdenum method tended to increase, while for the DPPH• scavenging, as the radiation is increased, the activity tended to decrease, despite the increased content of flavonoids isoquercitrin, and hyperoside. The lack of correlation between radiation and activity (by DPPH• method) confirmed the negative correlation between the observed radical scavenging activity and content of flavonoids. The results showed that the best collection period to obtain an extract from the leaves of *E. suberosum* A.St.-Hil, with high isoquercitrin and hyperoside content, is August (dry weather). The extractive solvent to give best-improved yields of these flavonoids was water, by using the infusion process.

Keyword: *Erythroxylum suberosum* A.St.-Hil; Antioxidant activity; Hyperoside; Isoquercitrin; Seasonality.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	<i>Erythroxylum suberosum</i> A.St.-Hil. A) galhos; B) árvore; C) folhas.....	16
Figura 2:	Hipóteses para o valor significativo dos tecidos para as plantas.....	28
Figura 3:	Hipóteses para evolução dos metabólitos secundários causadas pela herbivoria.....	29
Figura 4:	Estrutura do DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl).....	37
Figura 5:	Comparação dos valores de CI_{50} referentes à atividade redutora do radical DPPH* dos diferentes extratos e padrões em cada período de coleta do estudo de sazonalidade.....	39
Figura 6:	Padrões de flavonoides e ácidos fenólicos e suas estruturas.....	45
Figura 7:	Comparação dos valores de equivalente AA ($\mu\text{g/mL}$) referentes à atividade antioxidante pelo método fosfomolibdênio dos diferentes extratos em cada período de coleta do estudo de sazonalidade.....	49
Figura 8:	Perfil cromatográfico por CCD dos padrões Hiperosídeo e quercetrina e pontos mistos com extratos de <i>E. suberosum</i> A.St.-Hil.....	52
Figura 9:	Perfil cromatográfico por CCD dos padrões isoquercitrina e isovitexina e pontos mistos com extratos de <i>E. suberosum</i> A.St.-Hil.....	53
Figura 10:	Perfil cromatográfico por CCD do padrão kaempferol e pontos mistos com extratos de <i>E. suberosum</i> A.St.-Hil.....	54
Figura 11:	Perfil cromatográfico por CCD dos extratos aquoso EA e EE das folhas de <i>E. suberosum</i> A.St.-Hil.....	55
Figura 12:	Padrões de rutina, isoquercitrina e hiperosídeo e pontos mistos com extratos de <i>E. suberosum</i> A.St.-Hil.....	55
Figura 13:	Perfil cromatográfico por CLAE do extrato aquoso de folhas de <i>E. suberosum</i> A.St.-Hil.....	57
Figura 14:	Perfil cromatográfico por CLAE do extrato etanólico de folhas de <i>E. suberosum</i> A.St.-Hil.....	58
Figura 15:	Espectro para hiperosídeo (Tempo de retenção: 28,813 Min e Lambda max: 256, 353) e isoquercitrina (Tempo de retenção: 30,380 Min e Lambda max: 256, 354), respectivamente.....	59
Figura 16:	Teor de hiperosídeo nos diferentes extratos de folhas de <i>E. suberosum</i> A.St.-Hil. em cada período de coleta do estudo de sazonalidade.....	60
Figura 17:	Teor de isoquercitrina nos diferentes extratos de folhas de <i>E. suberosum</i> A.St.-Hil. em cada período de coleta do estudo de sazonalidade.....	61
Figura 18:	Correlação linear de Pearson entre atividade antioxidante pelo método com fosfomolibdênio e teor de hiperosídeo de EA.....	64
Figura 19:	Correlação linear de Pearson entre atividade redutora de DPPH* e teor de hiperosídeo de EE.....	64
Figura 20:	Correlação linear de Pearson entre atividade antioxidante pelo método com fosfomolibdênio e teor de isoquercitrina de EA.....	65
Figura 21:	Correlação linear de Pearson entre atividade redutora de DPPH* e teor de isoquercitrina de EE.....	66
Figura 22:	Correlação linear de Pearson entre temperatura mínima e teor de isoquercitrina de EA.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Concentração inibitória de 50% para plantas brasileiras.....	20
Tabela 2:	Valores estimados para cada classe de metabólito secundário.....	24
Tabela 3:	Dados climáticos correspondentes aos períodos das coletas da espécie <i>E. suberosum</i> A.St.-Hil.....	41
Tabela 4:	Rendimento dos extratos obtidos de origem aquosa, etanólica e hexânica.....	43
Tabela 5:	Valores de Cl_{50} ($\mu\text{g/mL}$) referentes à atividade redutora do radical DPPH* dos diferentes extratos e padrões em cada período de coleta do estudo de sazonalidade.....	46
Tabela 6:	Valores de equivalente AA ($\mu\text{g/mL}$) referentes à atividade antioxidante pelo método fosfomolibdênio dos diferentes extratos em cada período de coleta do estudo de sazonalidade.....	50
Tabela 7:	Correlação linear de Pearson entre atividade antioxidante e teor de hiperosídeo de EA e EE.....	65
Tabela 8:	Correlação linear de Pearson entre atividade antioxidante e teor de isoquercitrina de EA e EE.....	66
Tabela 9:	Correlação linear de Pearson entre teor de hiperosídeo dos extratos de <i>E. suberosum</i> A.St.-Hil. e variáveis climáticas.....	68
Tabela 10:	Correlação linear de Pearson entre teor de isoquercitrina dos extratos de <i>E. suberosum</i> A.St.-Hil. e variáveis climáticas.....	69
Tabela 11:	Correlação linear de Pearson entre a atividade redutora de fosfomolibdênio dos extratos de <i>E. suberosum</i> A.St.-Hil. e variáveis climáticas.....	71
Tabela 12:	Correlação linear de Pearson entre a atividade redutora de DPPH* dos extratos de <i>E. suberosum</i> A.St.-Hil. e variáveis climáticas.....	71

LISTA DE SIGLAS

- EROs – Espécies reativas de oxigênio
- SOD – Superóxido dismutase
- CAT – Catalase
- GPx – Glutathione peroxidase
- GSH – Glutathione
- SNC – Sistema Nervoso Central
- LDL – Lipoproteína de baixa densidade
- AR – Artrite Reumatoide
- PMN – Polimorfonucleares
- ERNS – Espécies reativas de nitrogênio
- MDA – Malondialdeído
- GSH-peroxidase – Glutathioneperoxidase
- EA – Extrato aquoso (1= Agosto/2013 ao 4= Maio/2014)
- EH – Extrato hexânico (1= Agosto/2013 ao 4= Maio/2014)
- EE – Etanólico (1= Agosto/2013 ao 4= Maio/2014)

SUMÁRIO

1.0 Introdução	13
2.0 Objetivo Geral	32
2.1 Objetivos Específicos.....	32
3.0 Materiais e Métodos.....	32
3.1 Equipamentos e Reagentes.....	32
3.2 Material botânico.....	34
3.3 Obtenção dos extratos.....	34
3.4 Determinação do potencial antioxidante	35
3.4.1 Atividade doadora de H ⁺ ao radical DPPH [•]	35
3.4.2 Redução do complexo fosfomolibdênio	36
3.5 Avaliação da composição química.....	37
3.5.1 Perfil cromatográfico por cromatografia em camada delgada (CCD)	37
3.5.2 Perfil cromatográfico por CLAE e determinação do teor de hiperosídeo e isoquercitrina	38
3.5.3 Correlação do teor de marcadores e atividade antioxidante.....	38
3.5.4. Correlação variáveis ambientais e marcadores	40
3.5.5. Correlação variáveis ambientais e atividade antioxidante	40
3.5.6. Análise estatística	41
4.0 Resultados e discussão.....	41
4.1 Obtenção dos extratos	41
4.2 Determinação do potencial antioxidante	43
4.2.1 Atividade redutora do radical DPPH [•]	43
4.2.2 Redução do complexo fosfomolibdênio.....	46
4.3 Avaliação da composição química	49
4.3.1 Perfil cromatográfico por cromatografia em camada delgada (CCD)	49
4.3.2 Perfil cromatográfico por CLAE e determinação do teor de hiperosídeo e isoquercitrina	55
4.4 Sazonalidade da espécie <i>E. suberosum</i> A.St.-Hil.....	62
4.4.1 Correlação do teor de marcadores e atividade antioxidante.....	62
4.4.2 Correlação variáveis ambientais e marcadores.....	66
5.0 Conclusão.....	71
6.0 Referências.....	73

INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Família Erythroxylaceae e gênero *Erythroxylum*

A família Erythroxylaceae apresenta distribuição pantropical com quatro gêneros e cerca 240 espécies, tendo seus maiores centros de extensa variedade e incidência na Venezuela, Brasil e Madagascar (DALY et al., 2004; IRACEMA et al., 2007). *Erythroxylum* P.Browne é o gênero que possui a maior quantidade de espécies, com distribuição ampla, podendo ser vistas nos quatro continentes, principalmente na América tropical (PLOWMAN et al., 2001). Os demais gêneros, *Aneulophus* Benth., *Nectaropetalum* Engl. e *Pinacopodium* Exell & Mendonça, possuem poucas espécies e se apresentam exclusivamente no continente africano (DALY et al., 2004; PLOWMAN & HENSOLD, 2004).

Existem 230 espécies do gênero *Erythroxylum*, correspondendo a 97% das espécies da família Erythroxylaceae entre árvores e arbustos. Cerca de 187 destas, podem ser encontradas na região neotropical. Para identificação do gênero, se considera as estípulas da planta, como uma parte importante a ser analisada (PLOWMAN & HENSOLD, 2004; RIBEIRO et al., 2013).

O principal centro de diversidade e endemismo da *Erythroxylum* se concentra na América do Sul, especialmente no Brasil e na Venezuela (PLOWMAN & HENSOLD, 2004). Esse grupo disponibiliza uma grande versatilidade ecológica, onde as espécies podem ser encontradas tanto em ambientes úmidos, tais como: a Mata Atlântica e a Floresta Amazônica, como também, nas regiões semiáridas, tendo ocorrência em diferentes níveis de elevações, desde o nível do mar, até habitats montanhosos (DALY et al., 2004).

Os dados mais abrangentes para Erythroxylaceae no território nacional foram descritos por Peyritsch (1878) que descreveu 82 espécies de *Erythroxylum*, pertencentes a quatro seções, embasado no tamanho e formato das folhas, morfologia das sépalas e número de flores na inflorescência. Outras informações são encontradas em descrições de novas espécies (AMARAL & LEONI, 1992; PLOWMAN, 1983, 1986, 1987).

O interesse pelos estudos do gênero intensificou-se no século XIX, após o isolamento, em 1855, da substância ativa (alcaloide) de *Erythroxylum coca* Lam, cujas folhas apresentavam atividades farmacológicas e são ainda hoje empregadas pelos

indígenas da região andina da América do Sul (ZUANAZZI et al., 2001). Quimicamente, o gênero caracteriza-se, pela presença de alcaloides do grupo tropano, dentre eles, destaca-se a cocaína, um alcaloide natural sintetizado por *Erythroxylum coca*, útil como anestésico local em pequenas cirurgias (BOHM et al., 1982; GRIFFIN & LIN, 2000).

Porém, a cocaína ganhou visibilidade por sua atuação psicoativa no Sistema Nervoso Central (SNC), tornando-se atualmente um dos grandes problemas da saúde pública no mundo, devido ao seu consumo ilícito, causando dependência no usuário (ALAGILLE et al., 2005). A cocaína representa 80% do total dos alcaloides nas folhas da coca. A sua estrutura química foi totalmente elucidada em 1898 (FERREIRA & MARTINI, 2001).

Cinquenta e uma espécies diferentes do gênero *Erythroxylum* foram analisadas para investigação da presença de cocaína. Destas, 28 não haviam sido pesquisadas anteriormente. Foi detectada a cocaína em 23 espécies silvestres, com o destaque para a espécie *Erythroxylum laetevirens*, onde a quantidade relatada foi 10 vezes maior do que aquelas encontradas em outras espécies estudadas, apresentando grande semelhança às espécies comumente cultivadas. Devido à sua distribuição, foi sugerido não utilizar a cocaína como marcador específico para o gênero (BIERI et al., 2006).

1.2. *Erythroxylum suberosum* A.St.-Hil.

A espécie *E. suberosum* A.St.-Hil. vem sendo utilizada, no Brasil, por cerca de 200 anos no Brasil, de acordo com descrições relatadas por naturalistas europeus. Ainda sobre seu uso tradicional brasileiro, ela é comumente utilizada em patologias relacionadas à produção espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), como por exemplo, em alguns tipos de reumatismos. Porém, existe uma escassez de estudos sobre a composição química, como também a atividade biológica da *E. suberosum* (OLIVEIRA, 2015).

Esta espécie é conhecida popularmente como “cabelo-de-negro”, “mercúrio do campo” e “galinha choca”. De acordo com o trabalho de Nascimento e colaboradores (2012), *E. suberosum* pode ser também utilizada como abortivo e tem apresentado ação antibacteriana frente a linhagem *Staphylococcus aureus* e antifúngica para

cepas de *Cryptococcus neoformans*, *Candida krusei* e *C. glabrata* (MARIA et al., 2012).

Tem potencial anti-hipertensivo, apresentando ação vasodilatadora dependente de óxido nítrico, em anéis de aorta de camundongos normotensos (LUCAS-FILHO, 2009). Neste mesmo trabalho, foram analisadas outras espécies do gênero *Erythroxylum*, que responderam a esta mesma ação anti-hipertensiva. O autor citou outras atividades encontradas para extratos das espécies de *Erythroxylum* como, anti-inflamatória, antibacteriana, ação estimulante em disfunções hepáticas, vesiculares, doenças venéreas e respiratórias. A Figura 1 apresenta imagens da espécie *E. suberosum* A.St.-Hil.

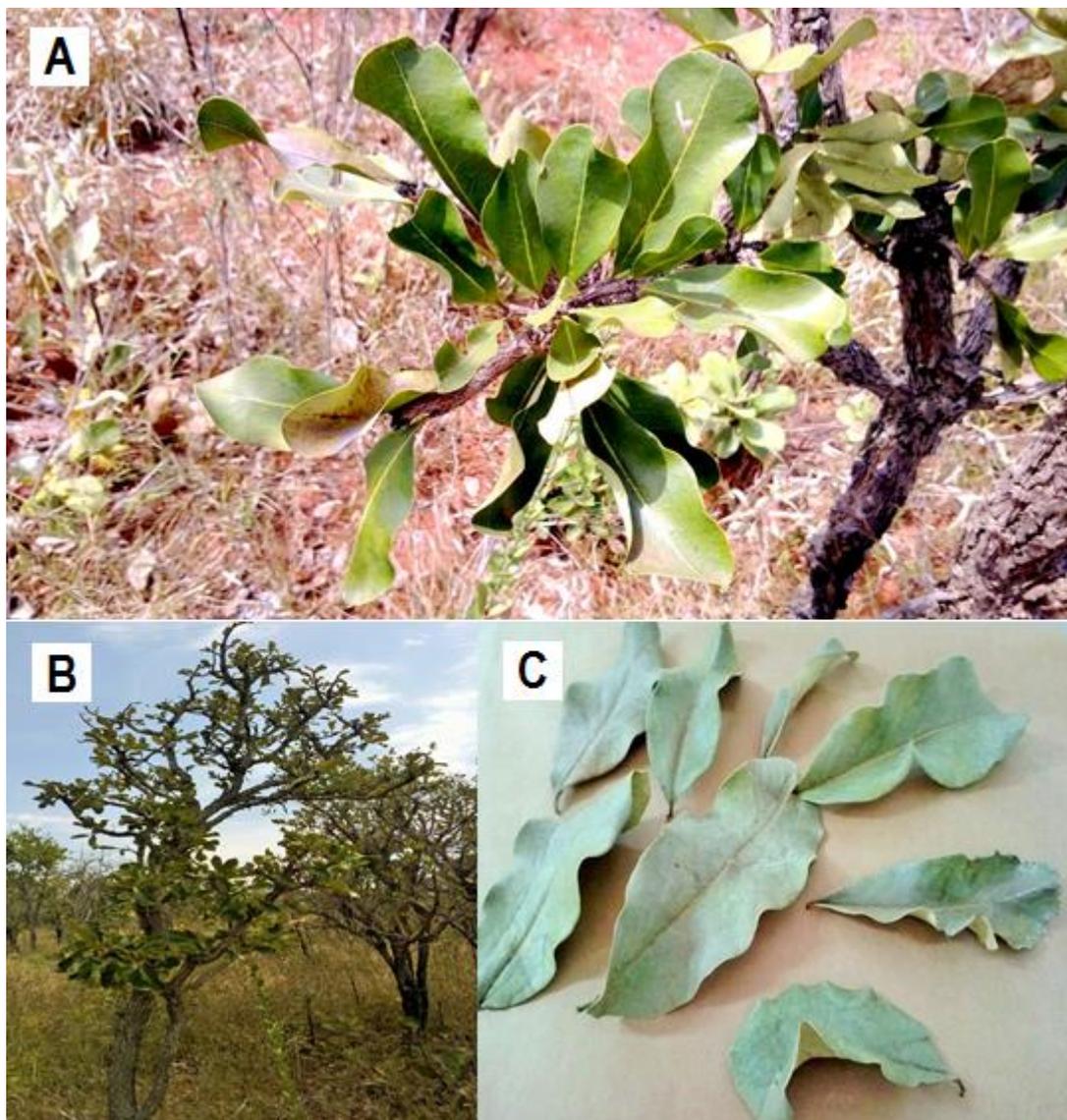


Figura 1: *Erythroxylum suberosum* A.St.-Hil. A) galhos; B) árvore; C) folhas.

1.3. Antioxidantes e estresse oxidativo

Os radicais livres podem ser conceituados como espécies químicas instáveis que são produzidas em pequenas quantidades no período de metabolização celular, como na síntese de energia, controle do crescimento celular, fagocitose e produção de compostos biológicos. Os radicais livres, em sua maioria, são gerados a partir do oxigênio molecular diatômico (O_2) e são conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ERO), como exemplo, o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), os radicais hidroxila (HO^{\bullet}) e peroxila (RO_2^{\bullet}), e o óxido nítrico (NO) (LIMA et al., 2001; SOUSA et al., 2007; OLIVEIRA et al.; 2008). Contudo, outros oxidantes que não sejam radicais livres, podem sofrer reações e formar radicais (LIMA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2008).

No interior das células, na cadeia respiratória mitocondrial pode se originar a maioria dos radicais livres, devido à ineficiência da transferência de elétrons ao oxigênio, na fosforilação oxidativa e na produção de adenosina trifosfato (ATP), resultando assim, na superprodução localizada (mitocôndria) de radicais superóxidos (ZOCCARATO et al., 2007).

Os radicais livres podem apresentar efeitos benéficos ou patológicos. O estresse oxidativo é um desequilíbrio que ocorre na produção entre ERO e/ou ERN e uma falha no sistema defesa antioxidante contra estes radicais. Assim, quando a síntese de radicais livres sobrepõe a ação das moléculas antioxidantes de origem endógena, pode acarretar danos a proteínas, lipídios e ácidos nucléicos presentes nas células e em sua superfície (AITKEN et al., 2012; KADIRVE et al., 2014).

Grandes concentrações de espécies reativas podem ser associadas a doenças degenerativas, como o câncer, doenças cardiovasculares, disfunção cerebral, cataratas e decaimento do sistema imunológico (AMES et al., 1993). Além disso, o estresse oxidativo se relaciona frequentemente com as fases da carcinogênese (iniciação, promoção e progressão): 1) quando há excesso de radicais livres resultando em um processo celular danoso; 2) influenciando na síntese de compostos tóxicos; 3) induzindo danos aos tecidos (FUCHS-TARLOVSKY, 2013).

Os agentes antioxidantes, por sua vez, são definidos como qualquer substância que apresenta prevenção ou inibição de um substrato oxidável, podendo agir tanto em altas concentrações como em baixas concentrações mantendo assim sua atividade efetiva (MAHOMOODALLY et al., 2012).

Dentre as enzimas responsáveis pela defesa antioxidante do organismo destacam-se a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx), que fazem parte da primeira linha de defesa endógena de neutralização das ERO. Por meio delas, as células tentam manter baixas quantidades de radical superóxido e de peróxido de hidrogênio, evitando assim, uma maior formação do radical hidroxila. Existem outras substâncias antioxidantes não enzimáticas, como a glutathione (GSH), a vitamina A, vitamina C, vitamina E, zinco e selênio (PAPAS, 1999; BERNAUD & FUNCHAL, 2011).

Os ativos com propriedades antioxidantes agem em três distintas linhas de defesa orgânica contra ERO. A primeira é a de prevenção, caracterizando-se pela proteção no surgimento de substâncias agressoras. A segunda é a interceptação, os antioxidantes impedem os radicais livres de iniciar suas atividades destrutivas. E a última é o reparo, que ocorre quando as duas primeiras linhas de frente não obtêm efetivo sucesso e os produtos pró-oxidantes provenientes dos ERO, estão sendo continuamente formados e podem se acumular no organismo (SANTOS, 2012; BIANCHI & ANTUNES, 1999).

1.4. Plantas Medicinais e doenças relacionadas ao estresse oxidativo

A utilização da natureza na cura e alimentos ocorre desde os primórdios da humanidade e plantas, animais e fungos foram utilizados empiricamente pelo homem para o tratamento de doenças. Desde então, remédios à base de plantas têm sido utilizados oralmente, por via tópica e outras aplicações curativas utilizadas na medicina tradicional (VIEIRA et al., 2010; WAGNER & WISENAUER, 2006).

As plantas e os derivados obtidos destas, são considerados como um recurso de grande importância no combate e a prevenção de patologias de grande gravidade. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) aproximadamente 80% da população do mundo se encontram dependentes das práticas tradicionais para o tratamento de doenças que se apresentam de ocorrência comum (GENEVA, 2011; VALLEY et al., 2015).

Para a maioria dos pesquisadores que estudam plantas medicinais, aproximadamente 70% das plantas do mundo apresentam uma finalidade de uso medicinal. Algumas destas podem apresentar compostos antioxidantes, podendo ser utilizadas também na indústria de alimentos processados, prolongando a vida útil

destes, especialmente em alimentos ricos em gorduras poliinsaturadas (SANNIGRAHI et al., 2010; KRISHNAIAH et al., 2011).

Com perspectiva na área da saúde, as propriedades antioxidantes de plantas específicas podem apresentar uma grande versatilidade na aplicação. como exemplo, a prevenção de doenças cardiovasculares e tumores malignos, que pode estar associada à ingestão de chá com quantidades significativas de antioxidantes naturais (JOYEUX et al., 1995; SILVA et al., 2005).

Alguns medicamentos originam-se de compostos encontrados em diversas plantas em todo o mundo e estão sempre fornecendo novas possibilidades para produção de medicamentos para humanidade (KRISHNAIAH et al., 2011).

O progresso da área científica permitiu o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos confiáveis e eficazes, ou seja, medicamentos que possuem como princípio ativo o extrato de alguma droga vegetal. Entretanto, ainda há carência de estudos nesta área que comprovem a utilização segura e eficaz para uma diversidade de plantas medicinais (RIBEIRO et al., 2005).

Ainda com relação aos fitoterápicos, em um estudo com extratos da espécie *Semecarpus anacardium*, os autores mostraram um significativo potencial antioxidante, sendo o extrato etanólico, aquele com maior potencial (BARMAN et al., 2013). Essa espécie contém compostos fenólicos, bem como outras substâncias, que proporcionam ação antimicrobiana, que podem combater artrites e que apresentam propriedades mutagênicas (BARMAN et al., 2013)-

Outros exemplos são as plantas medicinais indianas, que apresentam grande potencial antioxidante, devido a compostos fenólicos (flavonoides, ácidos fenólicos e taninos) e promovem diversos efeitos, como por exemplo: anti-inflamatório, anticancerígeno e anti-aterosclerótico (WONGA et al., 1998; MAIGA et al., 2006). Dentre as espécies analisadas, *Diospyros abyssinica* como uma das que exibiram maior atividade na estabilização de radicais livres. Os extratos metanol e etanol 80% dessa espécie foram considerados uma rica fonte de compostos. Esta espécie é utilizada tradicionalmente pelos chineses e indianos (MAIGA et al., 2006).

Foi realizado um levantamento de plantas de diversas localidades do mundo que apresentavam atividade antioxidante por Krishnaiah e colaboradores (2011). A *Pistacia lentiscus*, muito utilizada na Argélia, mostrou atividade sequestradora de radicais livres em duas metodologias: 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH*) e H₂O₂. Porém, para a inibição da peroxidação lipídica, sua resposta foi relativamente baixa,

em comparação as demais. Os extratos que apresentaram resultados significativos foram etanólico e aquoso.

Salvia officinalis L. é uma planta de origem mediterrânea muito utilizada por apresentar, em sua composição, grande quantidade de compostos fenólicos com propriedades antioxidantes. O extrato metanólico apresentou o melhor resultado antioxidante, pelo método onde se verificou uma maior concentração de ácido rosmarínico, em relação ao extrato aquoso. Porém, utilizando métodos diferentes para avaliação da estabilização de radicais, o extrato aquoso se apresentou mais eficiente (LIMA et al., 2007).

Para as espécies listadas na Tabela 1, foram encontrados valores de CI_{50} , que indicaram o potencial sequestrador de radicais livres. Entre as famílias presentes na pesquisa, a Palmae e Fabaceae apresentaram maior capacidade antioxidante pela metodologia com radical DPPH*. Um dos extratos da família Palmae apresentou valores para CI_{50} semelhantes a rutina purificada (SILVA et al., 2005).

Tabela 1: Capacidade sequestradora de radicais DPPH* por espécies brasileiras (SILVA et al., 2005).

Concentração Inibitória (CI_{50})			
Família	Espécie	Partes da planta	CI_{50} µg/mL
Palmae	<i>Copernicia cerifera</i>	Epicarpo dos frutos	41,9 µg/mL
		Folhas	23,5 µg/mL
		Mesocarpo dos frutos	5,3 µg/mL
	<i>Mauritia vinifera</i>	Epicarpo dos frutos	71,0 µg/mL
	<i>Syagrus oleracea</i>	Epicarpo e mesocarpo de frutos	27,0 µg/mL
Fabaceae	<i>Bauhinia variegata</i>	Partes aéreas	37,0 µg/mL
	<i>Bauhinia candida</i>	Partes aéreas	45,4 µg/mL
Lamiaceae	<i>Hyptis fasciculata</i>	Partes aéreas	57,9 µg/mL

CI_{50} = Concentração inibitória de 50% dos extratos de diferentes partes de plantas utilizando método de redução do radical DPPH* para análise de efetividade.

O interesse nos compostos antioxidantes tem aumentado devido a sua utilização ser direcionada também para o tratamento da artrite reumatoide (AR) (TRICHOPOULOU et al., 2003; KHANNA et al., 2007; MARINO et al., 2015).

Em doenças como a artrite reumatoide, os danos resultantes podem ocorrer devido à peroxidação de lipídios localizados na membrana celular. Assim, a aceleração da desordem ocorre em termos de estrutura e função das membranas que sofrem peroxidação. Um simples comprometimento com a defesa antioxidante, como a sua baixa eficácia ou inativação desta, pode conduzir a um aumento na peroxidação de lipídios em linfócitos, baço e timo, em condições causadas pela doença. As condições apresentadas do baço e timo (órgão linfoide) na artrite reumatoide, pode ser relacionada à fagocitose (BARBAR & HARRIS, 1994; ISLAMOV et al., 2000; RAMPRASATH et al., 2005).

Um dos fatores observados na doença é a produção de ERO que ocorre simultaneamente com o processo inflamatório, levando assim, à oxidação de proteínas e de lipídios, sustentando a inflamação.

O estresse oxidativo desempenha um importante papel na patogênese AR, quando, por exemplo, os níveis de ERO produzidos podem exceder a capacidade antioxidante das enzimas produzidas pelo organismo, perturbando assim, o equilíbrio redox (produção e eliminação de ERO), o que aumenta as respostas inflamatórias da via NF-KB (HITCHON & EL-GABALAWY, 2004; KONDO et al., 2009).

O malondialdeído (MDA) e a peroxidação lipídica em pacientes com artrite reumatoide (AR) apresentam-se níveis elevados, de acordo com alguns ensaios clínicos. Contudo, para antioxidantes enzimáticos ou não, baixos valores são encontrados, especificamente para glutathione peroxidase (GSH-peroxidase) e superóxido dismutase (SOD), o que sugere um aumento do estresse oxidativo e uma capacidade antioxidante significativamente baixa, que comumente, ocorrem em pacientes com AR (XIAO et al., 2011).

As macromoléculas do tecido conjuntivo como colágeno, ácido hialurônico e proteoglicanos (proteínas intracelulares), podem sofrer os efeitos dos radicais livres, como as imunoglobulinas (Ig ou anticorpos) e outros tecidos, que apresenta alta relevância para a patogênese da AR. Gerados por células polimorfonucleares (PMN), os radicais livres, alteram o IgG (anticorpo da classe antitoxinas), que por sua vez, pode ativar PMN, gerando radicais adicionais, como por exemplo, superóxidos. Podem também ativar as células PMN diretamente, sem necessitar de moléculas

interceptoras, propagar o processo inflamatório, facilitando a síntese de quimiotáticos no local onde ocorre a inflamação (KHANNA et al., 2007; TOWNSEND et al., 2010; VENKATESHA et al., 2011).

O tratamento para artrite reumatoide é destinado à neutralização das ERO. O líquido sinovial e o sangue periférico de indivíduos com a doença apresentam altos níveis de ERN e ERO, e estas podem ser: superóxido, radicais hidroxila, peróxido (HADJIGOGOS, 2003; FILIPPIN et al., 2008).

O acúmulo de ERO pode induzir a erosão da cartilagem e articulações. Fármacos que ofereçam proteção dos componentes presentes nesta região, podem representar potencial alvo terapêutico na AR. Em outro caso, os ERO podem interagir diretamente no ácido desoxirribonucleico (DNA), oxidando suas bases nitrogenadas (guanina), como também induzir mutações somáticas (modificações nos genes), alterar a função de uma proteína e/ou capacidade de induzir e reagir a uma resposta imunológica (imunogenicidade) (RALL et al., 2000; ISHIBASHI, 2013).

Extratos vegetais podem proteger a cartilagem da destruição ocasionada pelas doenças artríticas. Os antioxidantes presentes em certos extratos de plantas podem aumentar a atividade da superóxido dismutase (SOD), um antioxidante endógeno. Em continuação ao tratamento da AR, na medicina ayurvédica, um dos mais antigos sistemas medicinais da humanidade, a *Trewia polycarpa*, revelou propriedades antioxidantes em sua composição, podendo induzir a um aumento na atividade de superóxido dismutase/glutathione peroxidase e assim, uma redução da peroxidação lipídica (KHANNA et al., 2007; TOWNSEND et al., 2010; VENKATESHA et al., 2011).

Os compostos extraídos das plantas, como os polifenóis, podem regular a expressão de sinais pró-inflamatórios, assim, apresentam uma significativa ação no combate e prevenção da doença (TRICHOPOULOU et al., 2003; KHANNA et al., 2007; MARINO et al., 2015;).

Alstonia scholaris é uma planta comumente utilizada na medicina popular para o tratamento de várias doenças, incluindo a artrite. A ação da *Alstonia scholaris* deve ser considerada, para o alívio de dores reumáticas, devido à presença de flavonoides e triterpenoides, identificados nos extratos etanólicos provenientes de folhas dessa espécie, que possivelmente diminuem a resposta inflamatória na AR (ARULMOZHI et al., 2011; MARINO et al., 2015).

De acordo com INCA (Instituto Nacional de Câncer) em 2014, a estimativa mundial era que o terceiro tipo mais comum de câncer nos homens e o segundo em

mulheres, na relação de prevalência entre outros seria o câncer de colón. Pode-se propor que, uma inflamação no cólon deriva da elevação na síntese de espécies reativas oxigênio e nitrogênio que logo adiante, poderá resultar em danos sobre, DNA, RNA, proteínas e lipídeos, acarretando assim, um dos neoplasmas mais ocorrentes na população brasileira (JAIN et al., 2011).

Assim, substâncias com atividade antioxidante possuem destaque no tratamento de doenças. Na renovação celular e no tratamento de doenças ligadas ao estresse oxidativo, tais como diabetes, hiperlipidêmicas, e entre outras. Alguns antioxidantes naturais, eficazes a AR, podem ser citados, tais como o resveratrol, a epigallocatequina galato, oleuropeína, quercetina e as fração flavonoide do suco de bergamota (*Citrus bergamia*) (MARINO et al., 2015).

Atualmente há um interesse crescente tanto da indústria farmacêutica quanto da indústria de cosméticos pelos tratamentos alternativos que atendam os desejos dos consumidores. É cada vez maior a demanda por recursos terapêuticos específicos para o cuidado estético da pele. A busca pela juventude prolongada que fascina os indivíduos para a manutenção da saúde da pele (VERAS, 2009).

O envelhecimento da pele é uma das manifestações mais visíveis no corpo humano devido aos diversos fatores que se desencadeiam com o passar dos anos. Existem grandes evidências científicas que apontam os radicais livres como um dos principais modificadores da pele, tornando-a assim com maior predisposição para o aparecimento repentino de rugas, falta de pigmentação, ressecamento e flacidez da pele (IVIÉ, 2008).

1.5 Polifenóis presentes na dieta

Ao logo do tempo, os investigadores científicos têm relacionado o consumo de frutos e vegetais à saúde e tentando esclarecer e identificar a forma em que os compostos presentes em certas plantas, transmitem benefícios ao organismo humano. Frutas e vegetais são fontes ricas em compostos bioativos de grande potencial, que atuam como antioxidante e na prevenção de doenças degenerativas (DENNY & BUTTRISS, 2005).

A mudança de hábitos alimentares, com uma menor ingestão de produtos processados pelas indústrias alimentícias, pode prevenir complicações de certas doenças tais como doenças vasculares e alguns tipos de câncer (JAKOBEK, 2015).

De acordo com Wink (2013) em um levantamento sobre o número de fitoquímicos conhecidos, mostrou que alcaloides e polifenóis são as classes com mais número de compostos.

Tabela 2: Distribuição de origem vegetal de compostos naturais conhecidos por classes [Wink (2013)].

Metabólitos secundários	Compostos
Alcaloides	21.000
Aminoácidos	700
Carboidratos	200
Glicosídeos cianogênicos	200
Poliacetilenos e ácidos graxos	1.500
Policetídeos	750
Polifenóis	20.000

Dados encontrados por Yuan e colaboradores (2005), podem correlacionar a ação dos polifenóis presentes em alimentos comestíveis, com o efeito inibitório sobre o desenvolvimento de tumores por meio de diversos mecanismos (YUAN et al., 2005), como por exemplo, adesão celular e diminuição dos níveis plasmáticos de IL-6, pela ingestão de vinho branco e tinto. Também com o aumento na vasodilatação, indicando melhoras na função endotelial em homens com doença arterial coronariana, têm sido evidenciado (WILLIAMS et al., 2004).

A absorção dos polifenóis pelo organismo humano, varia de acordo com as estruturas química e com o tipo. Os compostos melhores absorvidos pelo organismo são isoflavonas, ácido gálico, catequinas, flavanonas e glicosídeos de quercetina, que apresentaram cinéticas distintas, para o ensaio de biodisponibilidade. (MANACH et al., 2004; WILLIAMSON & MANACH, 2005).

Têm sido relatados aproximadamente 8.000 diferentes estruturas fenólicas distribuídas em plantas e alimentos (CROZIER et al., 2009). Variando o número de anéis fenólicos e a quantidade e tipos de grupos funcionais ligados a estes compostos fenólicos estão possivelmente envolvidos na defesa contra a agressão dos raios ultravioleta ou de seres patogênicos (MANACH et al., 2004).

Para os polifenóis, existem cada vez mais informações sobre uma variedade de atividades no organismo humano, que são fundamentais para real compreensão do papel desses metabólitos nos efeitos sobre a regulação enzimática e sua ação antioxidante. Estas atividades dos polifenóis podem ser atribuídas aos grupos hidroxila presente na molécula, podendo apresentar função protetora em doenças cardiovasculares, de acordo com alguns autores (FRANKEL et al., 1993; RICE-EVANS et al., 1997; CROZIER et al., 2009).

Os polifenóis podem atuar sobre doenças que apresentam uma provável origem a partir do desequilíbrio no organismo na produção e eliminação de radicais livres (estresse oxidativo). Por exemplo, aterosclerose é uma doença multifatorial, sendo a hipercolesterolemia um fator de risco para esta doença (MEISINGER et al., 2005; KOSTYUK et al., 2011). De acordo com Kostyuk e colaboradores (2011), os polifenóis podem executar, por meio de suas propriedades moduladoras, o controle da inflamação vascular, como também desempenhar papel antioxidante. Desta forma, a quercetina e resveratrol impediram o desequilíbrio redox, quando adicionado em células endoteliais tratadas com LDL oxidado (KOSTYUK et al., 2011)

As raízes de *Geranium sanguineum L.* são utilizadas tradicionalmente para o tratamento de infecções intestinais e processos inflamatórios. Também é utilizada para o tratamento de doenças dermatológicas, na forma de banho e cataplasmas na região afetada. O ácido gálico, de comprovada ação antioxidante, é encontrado em quantidades significativas nesta espécie (IVANCHEVA et al., 1992).

Silva e colaboradores (2005) descreveram as espécies da família Palmae como versáteis, apresentando boa aplicação para diversos fins. Por exemplo, o buriti (*Mauritia vinifera*), um fruto rico em carotenoides, é muito utilizado, devido a sua ação antitumoral (RODRIGUEZ, 1999; SILVA et al., 2005). Espécies da família Polygalaceae são citadas para analgesia (PEPATO et al., 2002) e espécies das famílias Fabaceae e Lamiaceae podem apresentar atividade no combate a diabetes e anti-inflamatória (SILVA et al., 2005).

1.6 Estudo de Sazonalidade

Para as plantas, existem dois metabolismos que podem acontecer em nível primário ou secundário. Em nível primário, sua função reúne processos necessários para o crescimento e desenvolvimento do vegetal (BUER & MUDAY, 2004; TAYLOR

& GROTEWOLD, 2005). Os componentes dos metabólitos secundários podem constantemente sofrer alterações e exigências para sua adaptação frente a mudanças, de acordo com as variações na seleção ambiental. Diante deste conhecimento, o aumento sobre informações dos mecanismos envolvendo genes atribuídos para diversificação evolutiva, pode ser determinante para elucidar a função ecológica dos metabólitos secundários (TAYLOR & GROTEWOLD, 2005; BRUNETTI et al., 2013).

Os metabólitos secundários são um produto diferenciado não essenciais ao longo da vida de um organismo. A sua produção pode advir de uma diversidade de metabólitos primários e por uma variada sinalização (Verpoorte; Alfermann, 2000). Devido as plantas serem sésseis e não podendo escapar dos seus predadores, elas sintetizam e armazenam uma diversidade de metabólitos secundários contra herbívoros, com uma variedade de parâmetros farmacológicos e propriedades toxicológicas, pois não apresentam semelhança aos animais, onde o sistema imunológico age no combate aos agentes externos (WINK, 2010; 2013).

Ainda de acordo com Verpoorte e Alfermann (2000), o metabolismo secundário pode apresentar uma diversidade química, e todo organismo tem integrado um de conjunto metabólitos secundários que podem compartilhar características com outros organismos, quer estejam relacionados ou não. Sendo assim, estes compostos podem ser sintetizados em um grupo taxonômico restrito, e desempenhar um papel importante na interação dos organismos que estão envolvidos, assegurando a sobrevivência destes em seu ecossistema.

Na década dos anos oitenta, ocorreu o maior nível de desenvolvimento ou conhecimento sobre a bioquímica do metabolismo secundário. O metabolismo secundário ocorre de maneira coordenada em relação ao período e espaço da ontogênese da planta (WIERMANN, 1980; HARTMANN, 2007).

As plantas não somente produzem metabólitos para fugirem dos herbívoros, podendo também se comunicar, por meio de uma sinalização química e atrair insetos polinizadores, animais dispersadores de sementes ou bactérias fixadoras de nitrogênio em processo de simbiose (rizóbios). Ainda, alguns destes metabólitos podem armazenar nitrogênio, apresentar proteção UV e ação antioxidante (HARTMANN, 2007; WINK, 2008). Os metabólitos secundários e sua classe de flavonoides podem fornecer pigmentação em partes da planta, proteção no combate

aos raios ultravioleta e também podem sinalizar a interação planta-herbívoro (IBRAHIM, 2005).

Sazonalidade vem da palavra sazonal e significa um período que varia em certas épocas do ano. A quantidade e o tipo de metabolitos secundários não são constantes durante o decorrer do ano e idade da planta, e assim, o período em que a planta é coletada é um fator de extrema importância para garantir que contenha os teores adequados um composto específico. Além disso, alteração no seu ambiente proveniente do ritmo circadiano, radiação, índice pluviométrico, temperatura, altitude e etc., pode interferir na produção de compostos do metabolismo secundário (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

A variação sazonal na característica química de folhas tem sido documentada. Os compostos químicos presentes na superfície das folhas, desempenham um rico papel e de grande importância, para as interações entre plantas e herbívoros (insetos). A aproximação, no período da quimiorrecepção da oviposição, de variados insetos, pode estar limitada à superfície das folhas (BART & WILLIAMS, 1993; BROOKS & FEENY, 2004).

Alguns trabalhos têm sido realizados para compreender como os mecanismos químicos de períodos sazonais podem interagir afetando outras espécies ou aumentando o nível taxonômico. Estes relatam que a resistência é a descrição do comportamento dos genes de uma planta que pode impedir ou prevenir a multiplicação de um parasita no tecido foliar de uma planta. A tolerância, por sua vez, seria a capacidade da planta de promover reestruturação após agressões ocasionadas por um certo parasita. Assim, quando o estudo se iniciou sobre estas estratégias de defesa, era relatado como repetitivas na interação planta-herbívoro. Atualmente, esta teoria pode ser sustentada como um efeito complementar, onde estas estratégias se expressam simultaneamente sem estímulos externos, em uma produção própria (MAURICIO, 2000; FORNONI et al., 2004; CARMONA & FORNONI, 2013).

Hipóteses foram propostas para o valor do tecido foliar das plantas e têm sido utilizadas, com grande amplitude, para o entendimento e explicação para alocação de diferentes metabolitos secundários nas folhas. A primeira hipótese está na própria produção de metabolitos secundários que ocasiona desvio de energia e nitrogênio que, assim, se torna indisponível para utilização no crescimento e reprodução da planta. Quanto à defesa, essa atribuirá para a planta (ao seu tecido foliar), um valor

de acordo com os seus níveis de defesa, dependente dos estímulos externos. Em último, a alocação, nas fases fenológicas, pode aumentar a produção de compostos de defesa, necessitando de muitos locais para armazenamento destes metabólitos secundários, utilizando também o tecido foliar destas plantas (MCKEY, 1979; BROOKS & FEENY, 2004).

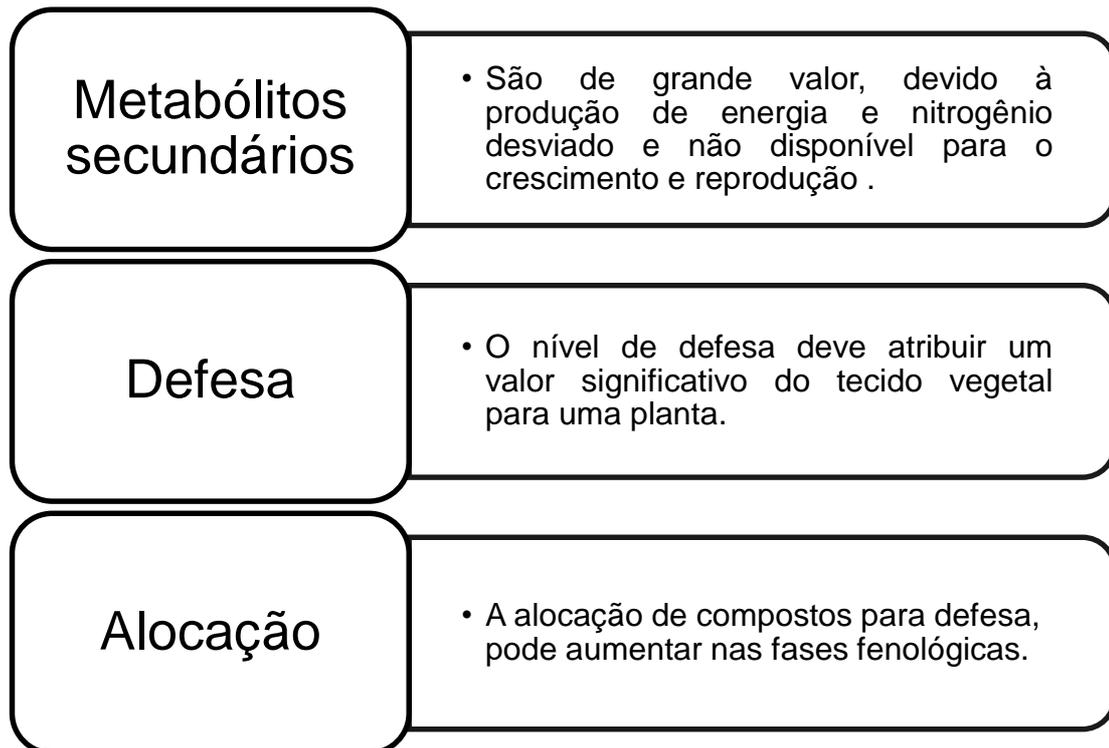


Figura 2: Esquema de hipóteses para o valor significativo dos tecidos para as plantas [(MCKEY, 1979; BROOKS & FEENY, 2004)].

Kessler (2015) explicou em sua publicação, as hipóteses da evolução de produção dos metabólitos secundários induzidos por herbívoros. Assim, a evolução pode ser constituída de três hipóteses: A defesa ótima, que pode ser denominada quando há uma diminuição da expressão da resistência com a ausência, e aumento desta, com a presença de herbívoros. Outra hipótese é a de alvo em movimento, onde existe a possibilidade de produção induzida, pelos herbívoros, dos metabólitos secundários, com modificação fenotípica. Terceira e última hipótese, transferência de informação. Pode ser pela facilidade de troca de informações da planta com o ambiente, interagindo assim, com os membros da comunidade, limitando o ataque de herbívoros (Figura 3).

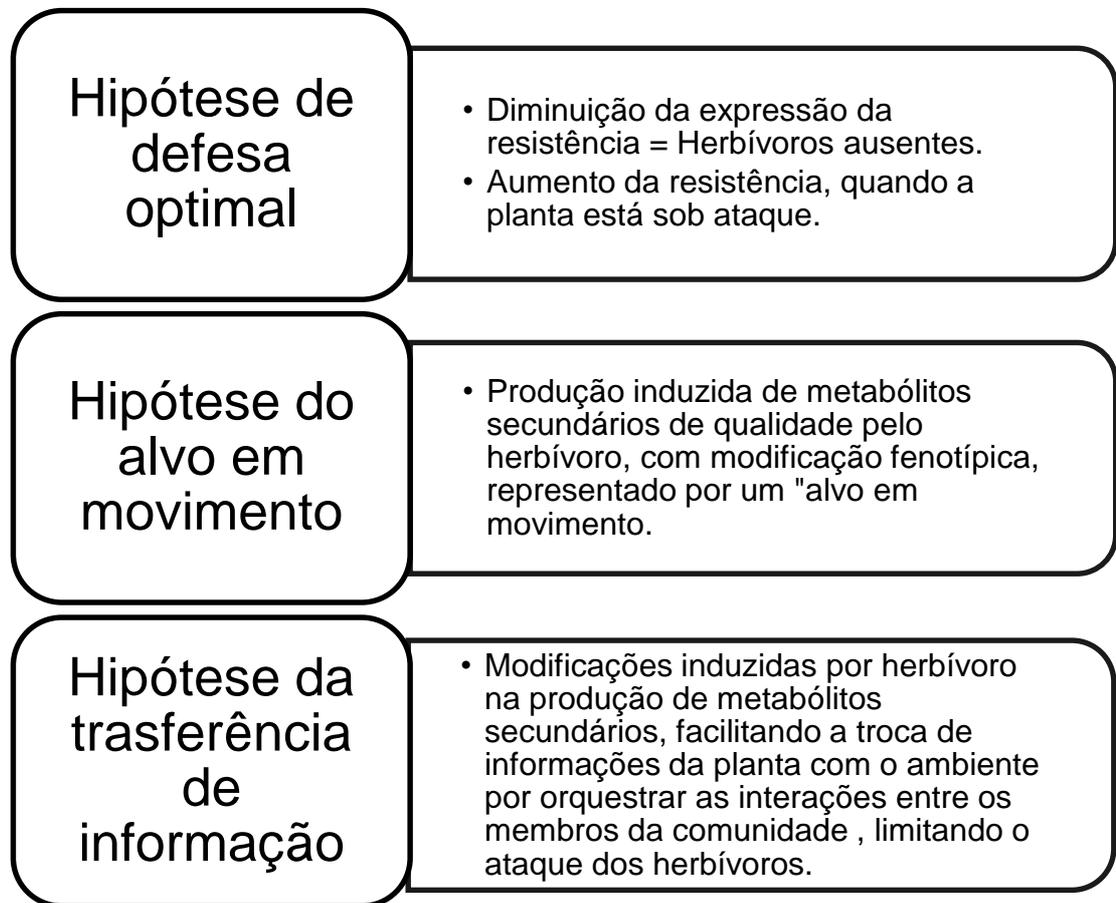


Figura 3: Esquema de três hipóteses para evolução dos metabólitos secundários causados pela herbivoria.

Os metabólitos secundários podem apresentar um grande benefício da planta, devido à mediação de interações com a comunidade presente, como por exemplo, uma grande gama de organismos que mantém uma variabilidade natural nas estratégias de defesa da planta. Portanto, os associados à comunidade biológica podem variar nas estratégias de defesa de uma planta, que participa de uma positiva interação com os ambientes bióticos e abióticos, nas condições necessárias para que estas interações ocorram (Kessler, 2015).

Iniciado pelos agrônomos, a pesquisa sobre a tolerância na herbivoria tem sido realizada devido à compreensão da necessidade de sustentar grandes rendimentos da planta, mesmo com a presença de certos danos. Assim, a tolerância a herbívoros (insetos) sugere uma relação da expressão fenotípica de traços antes e logo após os danos com recursos de alocação, estrutura e atividade fotossintética da planta. Para

uma planta que tolera os danos, ele estará neutralizando efeitos negativos, compensando a perda de seus tecidos, podendo apresentar também resistência pela via química e meios físicos (FORNONI et al., 2003; FORNONI, 2011).

Citado por Fornoni (2011), a tolerância é um mecanismo que sinaliza uma resposta generalizada à perda de tecidos pela planta, podendo existir outra resposta em mesmo nível, para compensar os danos causados pelas diferentes espécies de herbívoros. Dentro do que se é evidenciado, as descobertas na pesquisa consideram a resposta gerada pela tolerância como específica para as modificações (danos) que incidem nos tecidos imposta na herbivoria. Os estudos para elucidar o mecanismo de tolerância nas plantas, têm sido considerado na pesquisa um assunto que não pode ser integrado a teoria da evolução entre planta-herbívoro.

Para compreensão dos efeitos ambientais nos papéis dos traços constitutivos (pré-dano) *versus* os induzidos (pós -dano) à tolerância, existe uma grande barreira na identificação das vias de mecanismos (STEVENS et al., 2008). Mas para o entendimento delineado, o uso de ferramentas genômicas pode contribuir para a identificação destas vias.

Os efeitos da herbivoria estão associados à disponibilidade limitada ou não dos recursos ambientais, que poderá determinar o aumento ou diminuição da expressão gênica. Não ocorrendo alteração destes genes, não há presença de associação com as modificações dos recursos presentes no ambiente (FORNONI et al., 2003; STEVENS et al., 2008; SCHMIDT & BALDWIN, 2009; KARBAN, 2011).

Os mecanismos (resistência e tolerância) podem se correlacionar afetando geneticamente o nível da resistência, quando se apresenta alterado o nível de tolerância. Porém, quando não existe a capacidade de se correlacionarem, o mecanismo de tolerância da planta, pode impor seleção sobre os herbívoros, alterando seu crescimento e desempenho (STINCHCOMBE, 2003).

Em pastoreio de mamíferos, foi observado que a utilização de plantas ao longo dos anos para alimentação destes, induzia modificações na composição da comunidade destas plantas e assim, a dominação surgiria, para as normalmente tolerantes. Algumas destas espécies podem se tornar escassas, pela ocorrência da herbivoria de outras espécies (DEL-VAL & CRAWLEY, 2005).

Entretanto, uma resposta causada pela herbivoria, em alguns momentos, se torna menos prejudicial para o desenvolvimento e reprodução das plantas, que algum outro tipo de dano de origem artificial (SCHAT & BLOSSEY, 2005).

Na oviposição de insetos, a seleção das plantas pode apresentar-se de extrema importância, pois as substâncias químicas (metabólitos) produzidas na superfície do tecido foliar, podem repelir estes insetos em seu período de oviposição. Para repelir estes insetos, como meio de defesa, as plantas aumentam a concentração destas substâncias e iniciam um funcionamento como barreiras para a atuação das fêmeas, podendo sugerir que os efeitos destes produtos são diferenciados daqueles que são ofertados pela planta na fase posterior, a de desenvolvimento larval (JOGESH et al., 2014).

Considerando ainda a produção dos metabólitos, existe a possibilidade de duas hipóteses relacionadas a ausência de danos sobre as plantas, onde, os benefícios adquiridos da alocação para defesa, podem ser perdidos. Espécies exóticas e nativas podem apresentar semelhantes níveis de herbivoria (CHUN et al., 2010). Para indução de plantas vizinhas, elas representam uma susceptível associação com danos a outras plantas e têm sido observados com grande frequência pelos pesquisadores (FORNONI, 2011).

Porém, ainda não se considera uma relação ao aumento dos danos vizinhos com a tolerância. As plantas podem apresentar interações diretas e indiretas em relação a outras plantas que têm crescimento adjacente a elas, que sofrerá e/ou não influência, aumentando (suscetibilidade associativa) ou diminuindo (resistência associativa) uma possível detecção ou vulnerabilidade por herbívoros. As interações planta-planta podem ser analisadas por meio dos resultados, tipicamente medidos como, modificações graduadas de herbivoria ou quantidade de herbívoros, sendo também encontradas as duas relações somadas (BARBOSA et al., 2009).

As plantas que nascem nas proximidades, podem alterar qualidade e quantidade dos nutrientes do solo, que podem ser necessários para o desenvolvimento e defesa das plantas focais. Estes podem determinar fatores essenciais na herbivoria. A desfolha de pastagem leguminosa pode aumentar a transferência de nitrogênio para plantas adjacentes (vizinhas), causando assim, interferência no fluxo de nitrogênio no solo. As transferências de nitrogênio de leguminosas para espécies sem fixação e limitação de nitrogênio podem alterar interações de competição para a estrutura de uma comunidade vegetal (AYRES et al., 2007; BARBOSA et al., 2009).

A luz solar pode apresentar utilidade no controle do sinal sensorial, como a capacidade de movimento das plantas por meio do fototropismo, na reprodução e

crescimento das plantas. Um fator ambiental que pode influenciar no comportamento das plantas e fisiologia de alguns organismos vivos é a luz solar e por meio da fotossíntese, converte a energia obtida pela luz, em uma energia química, sendo armazenada como hidratos de carbono. As adaptações em um ambiente iluminado são essenciais para a sobrevivência da planta e em condições limitadas de luz, haverá um movimento foliar e dos cloroplastos direcionado para captação destas. Plantas que apresentam alta intensidade ao impedir fotodanos por luz UV-B, respondem por meio do deslocamento dos cloroplastos (organelas presentes em seres fotossintetizadores), sintetizando assim, pigmentos fotoprotetores (KAMI et al., 2010; HIGA et al., 2014)

Os fotorreceptores que se apresentam nos animais, estão em órgãos totalmente específicos enquanto que, nas plantas, se localizam por toda a sua estrutura e podem estar presentes em suas raízes. Independentemente da luminosidade (alta ou baixa). Existe uma variedade de plantas que apresentam famílias fotorreceptoras que contribuem para captar a quantidade de luz fornecida pelo ambiente. Vários fotorreceptores podem detectar com precisão e responder a alterações dinâmicas da composição espectral, a modificações no direcionamento da luz e duração (fotoperíodo). Em certos momentos, o local de fotopercepção da luz, poderá coincidir com uma região da planta que comumente já responde aos estímulos. Porém, em outros momentos, o local para esta resposta, será considerado distante da fotorrecepção. Assim, as plantas podem captar a luz, que dispara sinais de longa distância, somente para mediar uma resposta (CHITOSE et al., 2010; CHAVES et al., 2011; JOGESH et al., 2014).

O estudo de sazonalidade poderá contribuir para avaliação da variação do teor de ativos da planta e sua influência na atividade biológica frente a diferentes variações ambientais durante o ano, sendo possível estabelecer o melhor período de coleta do material botânico para uso terapêutico.

Este projeto contribui com o desenvolvimento de pesquisas e inovação em plantas medicinais e fitoterápicas, com a valoração de plantas nativas do Bioma Cerrado.

2.0 OBJETIVO GERAL

Avaliar a possível variação sazonal da composição química da espécie *Erythroxylum suberosum* A.St.-Hil., relacionando à atividade antioxidante com o teor de hiperosídeo e isoquercitrina.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter amostras de folhas de *E. suberosum* A.St.-Hil. e extratos brutos aquosos, etanólicos e hexânicos obtidos a partir destas;
- Determinar o possível potencial antioxidante de extratos obtidos pelos métodos de atividade doadora de H• ao radical DPPH• e pelo método de redução do complexo fosfomolibdênio;
- Avaliar a composição química dos extratos por CCD e CLAE;
- Correlacionar a atividade antioxidante com os teores de hiperosídeo e isoquercitrina dos extratos obtidos;
- Avaliar a sazonalidade das folhas da espécie *E. suberosum* A.St.-Hil. correlacionando as variáveis ambientais (temperatura, índice pluviométrico e radiação global) com o teor de hiperosídeo e isoquercitrina, e com a atividade antioxidante dos extratos provenientes das folhas de *E. suberosum* A.St.-Hil.

3.0 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 EQUIPAMENTOS E REAGENTES

✓ EQUIPAMENTOS

- Analisador de Umidade Infra-Vermelho (GEHAKA® IV 200);
- Bomba de vácuo (EXIPUMP – AAKE®);
- Câmara de UV - 365nm (Prodicil®);
- Capela de exaustão (Permutation®);
- Espectrofotômetro UV-1800 (Shimadzu®) com software UVProve 2.33.;

- Evaporador Rotativo (Heildolph®), contando com bomba de vácuo (Heildolph® Instruments D-91126) e refrigerador (Heildolph® MX07R-20-HD2E);
- Lavadora Ultrasônica (UNIQUE Ultrasonic Cleaner®);
- Liofilizador Advantage Plus XL-70 (SP Scientific®), contando com bomba de vácuo 2005SD (SP Scientific®) e compressor de ar (AIR COMPRESSOR 1NNE5 SP Scientific®);
- Equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência CLAE/DAD LaChrom Elite® (Hitachi, Tokyo, Japan) com bomba L2130; injetor L2200; forno para coluna L2300; detector L2455 DAD (Hitachi, Tokyo, Japan); Coluna PurospherStar® RP C18e (Merck, Germany);
- Moinho Tipo Croton MA-580 (Marconi®);
- Banho Ultratermoestato (Nova Ética®).

✓ **REAGENTES**

- 2,2-difenil-1-picril-hidrazina – DPPH (Sigma-Aldrich®);
- Ácido ascórbico (Fisher®);
- Álcool etílico (J.T.Baker®);
- Hexano (Vetec®);
- Hidroxitolueno de butila – BHT (Sigma®);
- Rutina (Sigma®);
- Sílica gel 60G (Analítica®);
- Hiperosídeo (Chromadex®);
- Quercitrina (Sigma®);
- Isoquercitrina (Sigma®);
- Isovetexina (Sigma®);
- Kaempferol (Sigma®);
- Ácido sulfúrico (Quimex/Merck®);
- Fosfato de sódio (Vetec®);
- Molibdato de amônio (Honeywell Riedel-de haen®);
- Acetato de etila (Vetec®);
- Ácido acético (Synth®);
- Ácido fórmico (Isofar®).

3.2 MATERIAL BOTÂNICO

As folhas de *Erythroxylum suberosum* A.St.-Hil. foram coletadas no cerrado stricto no campus Darcy Ribeiro da Fundação Universidade de Brasília (UnB), Brasília - Distrito Federal, entre o período de agosto/2013 (1a coleta) à maio/2014 (4a coleta), nos horários de 11h à 12h e nas datas entre 18 e 20 entre intervalos de três meses. A coleta ocorreu manualmente e obedecendo a critérios como: maior proximidade entre as árvores e a não seleção das folhas previamente.

As folhas foram identificadas e uma exsicata depositada no herbário da Universidade de Brasília (UB) pelo botânico Prof. Dr. Christopher Willian Fagg (Voucher Fagg CW2192).

Foram coletados aproximadamente 3,0 Kg de folhas em cada período sazonal para extração com diferentes solventes. Todas as folhas passaram por secagem natural em ambiente arejado ao abrigo de luz, sem utilização do método de lavagem em água corrente previamente, devido a sua consistência coriácea, sendo verificado o teor de umidade por meio de analisador de Umidade Infravermelho (GEHAKA® IV 200). Foram consideradas folhas secas aquelas que apresentaram umidade abaixo 8,5%. Após secagem, as folhas foram pulverizadas em moinho tipo Croton MA-580 (Marconi®) A partir das folhas secas, foram preparados extratos aquosos, etanólicos e hexânicos.

3.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Foram preparados extratos aquoso (EA), hexânico (EH) e etanólico (EE) com folhas coletadas nos diferentes períodos (agosto/2013 à maio/2014), obtendo três extratos diferentes para cada período de coleta, totalizando 12 extratos, que foram submetidos a diferentes ensaios.

O extrato aquoso (EA) foi preparado por método de infusão, no qual a água foi fervida, arrefecida a 70°C, e em seguida vertida sobre as folhas secas rasuradas, na proporção de 100 g/L (folhas; água). Após resfriamento a 50°C, o extrato obtido foi filtrado, congelado a -20 °C e liofilizado no Liofilizador Advantage Plus XL-70 (SP Scientific®), com bomba de vácuo 2005SD (SP Scientific®) e compressor de ar (AIR COMPRESSOR 1NNE5 SP Scientific®). Após processo de liofilização, o extrato aquoso seco foi armazenado a -20 °C para posterior análise.

Os extratos hexânicos (EH) e etanólicos (EE) foram preparados por processo de maceração, onde as folhas foram maceradas por 7 dias na proporção 1:10 primeiramente com o solvente hexano. O rasurado que havia sido submetido ao hexano, passou pelos mesmos processos, sendo desta vez macerado com etanol. Os extratos obtidos foram submetidos ao processo de concentração em evaporador rotativo, seguido de secagem em banho-maria a 60 °C para evaporação do solvente residual. Após secagem os extratos foram pesados e em seguida acondicionados em freezer a -20 °C.

O rendimento dos extratos obtidos foi determinado relacionando o peso das folhas secas inicial e o peso do extrato seco obtido.

3.4 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE

Para determinação do potencial antioxidante dos diferentes extratos EA, EE e EH dos diferentes períodos de coleta (agosto/2013 a maio/2014) foram preparadas soluções mães dos extratos na concentração de 1 mg/mL nos seus respectivos solventes de origem, tais como água, etanol e hexano. Em seguida, foram preparadas diluições seriadas das soluções mães para determinação do CI_{50} (concentração inibitória de 50%) nos diferentes ensaios. A figura 4 mostra a estrutura do DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl).

3.4.1 ATIVIDADE REDUTORA DO RADICAL DPPH*

Em tubo de ensaio foram adicionados 1 mL de tampão acetato de sódio (100 mM) pH 5,5, 1 mL de álcool etílico (95 %), 100 µL de amostra e 500 µL solução alcoólica de DPPH* (250 mM). Após 10 minutos foi realizada leitura em 517 nm, em espectrofotômetro UV-1800 (Shimadzu®) com software UVProve 2.33 (BLOIS, 1958). A atividade dos extratos foi expressa em porcentagem de inibição, calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Porcentagem de inibição (\%)} = \frac{\text{Absorbância das amostras} \times 100}{\text{Absorbância do controle}}$$

A análise de regressão linear da porcentagem de inibição *versus* a concentração de extrato no meio de reação foi estabelecida e a equação da reta determinada. O CI_{50} foi determinado por meio da equação da reta ($y = ax \pm b$) obtida para cada uma das amostras.

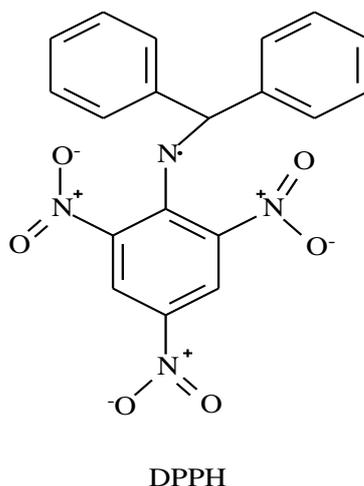


Figura 4: Estrutura do DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl).

3.4.2 REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO

Em microtubo, uma alíquota de 0,1 mL de amostra teste foi adicionada a 1 mL de solução reagente (ácido sulfúrico 0,6 M, fosfato de sódio 28 mM e molibdato de amônio 4 mM). Em seguida, os microtubos foram mantidos em banho-maria a 95°C por 90 min. Após resfriamento das amostras a temperatura ambiente, a absorbância das soluções foi avaliada em 695 nm espectrofotômetro UV-1800 (Shimadzu®) com software UVProve 2.33 contra um branco (1 mL de solução reagente e 1 mL de diluente da amostra, preparado nas mesmas condições que as amostras testes) (PRIETO, et al., 1999).

A capacidade antioxidante das amostras (solução mãe de 1mg/ mL) foi expressa em relação ao AA, considerando sua absorbância correspondente a 100% de atividade antioxidante. A Análise de regressão linear da resposta obtida pelo AA *versus* a concentração de AA no meio de reação foi estabelecida a equação da reta ($y = ax \pm b$) e determinada. Através desta equação foi possível determinar o equivalente de AA para os extratos.

3.5 AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA

3.5.1 PERFIL CROMATOGRÁFICO POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

Os extratos brutos foram monitorados por cromatografia em camada delgada (CCD) em placas de vidro (0,25 mm de espessura) contendo cobertura de sílica gel (60 g), preparadas com água destilada, na razão (1:2). As placas foram ativadas à 100 °C em estufa.

A separação dos compostos de polaridade alta, foi conduzida com utilização de fase móvel com acetato de etila, ácido acético e ácido fórmico na relação (100:10:10).

Foram utilizadas também, cromatofolhas, placas analíticas de sílica gel 60 de 0,2 mm (Kieselgel 60 Alugram Sil 6-Macherey-Nagel) fixadas em suporte de alumínio. Solução de 1% difenilboriloxietilamina + 5% solução etanólica polietilenoglicol- 4000 (NP-PEG) foi utilizada como revelador, sendo as placas analisadas sob luz ultravioleta 365 nm, para revelação de compostos flavonoides (WAGNER & BLADT, 2001).

A Figura 5 mostra a estrutura dos padrões utilizados para identificação, (flavonoides e ácidos fenólicos): hiperosídeo (Chromadex®), quercetrina, isoquercetrina (Sigma®), isovitexina e kaempferol (Sigma®) e rutina (Chromadex®).

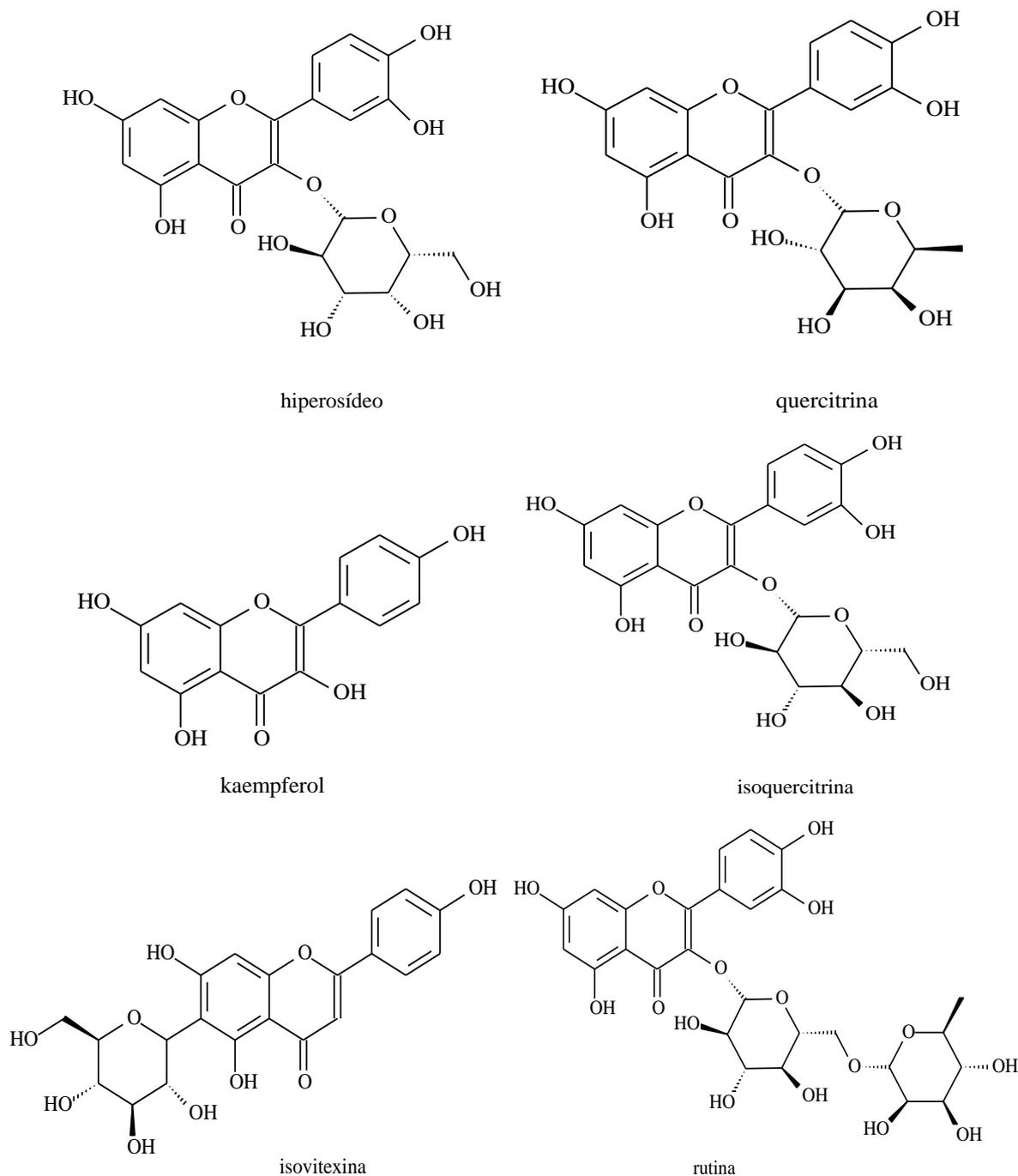


Figura 5: Estruturas dos padrões de flavonoides e ácidos fenólicos utilizados nesse trabalho.

3.5.2 PERFIL CROMATOGRÁFICO POR CLAE E DETERMINAÇÃO DO TEOR DE HIPEROSÍDEO E ISOQUERCITRINA

Os extratos foram avaliados quanto ao perfil cromatográfico por CLAE. Foi utilizado cromatógrafo líquido de alta eficiência LaChrom Elite® (Hitachi, Tokyo,

Japan), contando com bomba L2130, injetor L2200, forno para coluna L2300, mantido a 25 °C e detector L2455 DAD (Hitachi, Tokyo, Japan). O detector foi ajustado para coletar dados na faixa de 220 nm e 400 nm, sendo extraído um cromatograma em 354 nm. A fase móvel foi constituída de solução de ácido fosfórico 1% (Bomba A) e acetonitrila (Bomba B). O fluxo de fase móvel foi de 0,6 mL/min. A coluna utilizada foi PurospherStar® RP C18e (150 x 4.6 mm, 5 mm, Merck, Germany) (Part. n°945681), acoplada a pré-coluna de mesmas características (4 x 4; 5mm particle size, Merck, Germany). Os dados foram adquiridos utilizando o software Agilent EZChrom Elite® (version 3.3.2 SP1 Scientific Software. Inc.) (LEITE et al., 2014).

Após identificação da presença de hiperosídeo e isoquercitrina nos extratos, estes foram adotados como marcadores. O teor de hiperosídeo e isoquercitrina foram determinados nos diferentes extratos e períodos de coleta. Para isto, o mesmo método descrito na avaliação do perfil cromatográfico por CLAE foi utilizado. O teor de hiperosídeo e isoquercitrina nos extratos foram calculados a partir da equação da reta obtida pela análise regressão linear dos dados obtidos com padrões autênticos de hiperosídeo e isoquercitrina.

3.5.3 CORRELAÇÃO DO TEOR DE MARCADORES E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Foi estabelecida uma correlação linear de Pearson (CALLEGARI-JACQUES, 2003) entre o teor de hiperosídeo e isoquercitrina com atividade antioxidante de cada extrato etanólico (EE) ou aquoso (EA) pelas metodologias: redução do radical DPPH• como também, pela redução do complexo fosfomolibdico.

O coeficiente de correlação linear de Pearson (r) é uma estatística utilizada para medir a força, a intensidade ou o grau de relação linear entre duas variáveis aleatórias. A escala a seguir foi utilizada para a classificação:

- Correlação fraca = $|r| < 0,3$;
- Correlação moderada = $0,3 \leq |r| < 0,6$;
- Correlação forte = $|r| \geq 0,6$.

3.5.4. CORRELAÇÃO ENTRE VARIÁVEIS AMBIENTAIS E MARCADORES

Uma correlação entre as variáveis ambientais (temperatura, índice pluviométrico e radiação global) com o teor de hiperosídeo e isoquercitrina nos extratos provenientes das folhas de *E. suberosum* A.St.-Hil. foi estabelecida por meio da utilização correlação linear de Pearson.

Os dados referentes à radiação global, temperatura máxima/mínima e pluviometria (Tabela 3), foram cedidos pelo Laboratório de Agroclimatologia (FAL/UnB) e são dados meteorológicos relativos ao período de coleta realizados nos distintos meses (Agosto/2013 a Maio/2014).

Tabela 3: Dados climáticos correspondentes aos períodos das coletas da espécie *E. suberosum* A.St.-Hil.

Coletas/data	Radiação Global	Índice pluviométrico média mensal/dia	Temperatura Max.	Temperatura Min.
Ago/2013	18,66 MJm ^{-2d-1}	0,0 mm	28,63 °C	9,40 °C
Nov/2013	16,83 MJm ^{-2d-1}	6,9 mm	27,93 °C	27,18 °C
Fev/2014	17,01 MJm ^{-2d-1}	4,7 mm	28,16 °C	27,62 °C
Mai/2014	15,84 MJm ^{-2d-1}	0,4 mm	27,18 °C	11,60 °C

Coletas/data= períodos de coleta do material vegetal (folhas); Radiação global= Incidência de luz solar que penetra a superfície terrestre; índice Pluviométrico/média por dia = quantidade de chuva média diária no mês. Temperatura Max. e Min.= Diferença de amplitude térmica.

3.5.5. CORRELAÇÃO VARIÁVEIS AMBIENTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Uma correlação entre as variáveis ambientais (temperatura, índice pluviométrico e radiação global) com o potencial antioxidante dos extratos provenientes das folhas de *E. suberosum* A.St.-Hil. foi estabelecida por meio da utilização correlação linear de Pearson.

3.5.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatísticas foram utilizados os softwares *Microsoft Office Excel*[®] 2013 e *GraphPad Prism*[®] Version 5.01. Os resultados foram expressos pela média \pm erro padrão, comparando os diferentes grupos de acordo com o método de análise de variância ANOVA associado ao teste de Tukey. Foram consideradas diferenças significativas os valores de $p < 0,05$. A correlação linear de Pearson (r) foi utilizada para estabelecer o nível de correlação entre as variáveis ambientais e atividade antioxidante e teor de hiperosídeo e isoquercitrina de cada extrato obtido.

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, foi determinada a variação sazonal da atividade antioxidante e dos teores de hiperosídeo e isoquercitrina presentes nas folhas de *E. suberosum*. Além disso, a correlação entre o teor de marcadores flavonoides e a atividade antioxidante foi estabelecida.

4.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Não foram observadas mudanças significativas nas características organolépticas dos extratos obtidos, como coloração, odor ou pigmentação. Os valores de umidade encontrados para as distintas coletas foram: 8,2%, 8,4% para 2^o e 3^o coletas, respectivamente. Para a 1^o coleta, o valor de umidade não pode ser determinado. Acredita-se que isto possa ter ocorrido, devido as características coriáceas da folha e baixa umidade relativa do ar no período. O teor de umidade, em todos os casos, encontrou-se dentro do limite especificado de até 12%, preconizado pela (BRASIL, 2010) ainda de acordo com esse código, os extratos são preparações que podem ser obtidas em consistências diferenciadas, por meio de matéria-prima animal ou vegetal, com a presença ou não de um tratamento preliminar.

O processo de extração de vegetais tem como objetivo a retirada de uma grande diversidade de substâncias extremamente complexas. Os extratos são obtidos a partir do emprego de vegetais secos ou frescos. Para seleção destas substâncias (compostos), deve-se fundamentar em dois principais fatores: o processo extrativo e as características do solvente (DÄR, 1981; ANSEL et al., 2000; TREVISAN, 2013).

Para preparados a partir da maceração ou percolação, a utilização do solvente adequado é imprescindível para o método de extração, que deve ser validado (RATES, 2001).

A média de rendimento entre os extratos aquosos foi de $7,23\% \pm 1,14$, sendo similar ao rendimento dos extratos hexânicos ($6,2\% \pm 6,5$). O extrato etanólico apresentou maior valor médio de rendimento de $11,24\% \pm 6,04$, com exceção da coleta quatro, que apresentou rendimento reduzido (Tabela 4).

Tabela 4: Rendimento dos extratos aquosos, etanólicos e hexânicos.

Extratos Aquosos			
Coleta	Folha Seca (g)	Extrato seco (g)	Rendimento Final (%)
EA1	312	25,48	8,16
EA2	191,18	10,68	5,58
EA3	358,2	26,41	7,37
EA4	457,78	35,78	7,81
Extratos Etanólicos			
EE1	536,5	81,17	15,12
EE2	382,32	56,03	14,65
EE3	708	91,45	12,91
Extratos Hexânicos			
EH1	536,5	9,86	1,83
EH2	382,32	13,03	3,4
EH3	708	26,75	3,77

EA = extrato aquoso EE = extrato etanólico. EH = extrato hexânico. Os n° de 1 a 3 referem-se as coletas de agosto/2013, novembro/2013, fevereiro/2014 e maio/2014, respectivamente. Folha seca/g = Quantidade de material vegetal utilizado para obtenção do extrato.

Os valores de rendimento dos diferentes extratos se apresentaram com grande distanciamento entre eles, devido à dificuldade em se determinar a secagem na apresentação final dos extratos.

Em Martins (2015), o material vegetal rasurado das folhas de *E. daphnites* Mart., mostrou, após o processo extrativo, rendimento superior nas cinco coletas realizadas em relação ao rendimento das folhas de *E. suberosum* A.St.-Hil. Os extratos aquosos

de *E. suberosum* A.St.-Hil. apresentaram aproximação nos valores encontrados nos estudos relacionados com as folhas *E. daphnites* Mart.

Os valores do rendimento dos extratos aquoso bruto (EAB) das folhas de *E. daphnites* no estudo de Martins (2015), variaram de 8,00% a 14,07%; referentes as cinco coletas, dentro de um período sazonal, estabelecido em seu trabalho. Para extratos etanólicos brutos (EEB), foram obtidos valores entre 4,00% e 12,75% e os extratos hexânicos (EHB), apresentaram rendimento entre 0,48% e 5,82%.

Comparando com os valores citados para os extratos de *E. daphnites*, pode ser observado que os valores encontrados para os extratos de *E. suberosum* EA, EA2 e EA3 foram: 8,16%; 5,58% e 7,37%; respectivamente. Para os extratos EE1 a EE3 os valores foram: 15,12%; 14,65% e 12,91%, sendo maiores que os encontrados em EEB das folhas de *E. daphnites* Mart. Os extratos EH1, EH2 e EH3 (1,83% ;3,4% e 3,77%, respectivamente), apresentaram um rendimento em média, maior do que os em média relatados em Martins (2015), para espécie *E. daphnites*.

4.2 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE

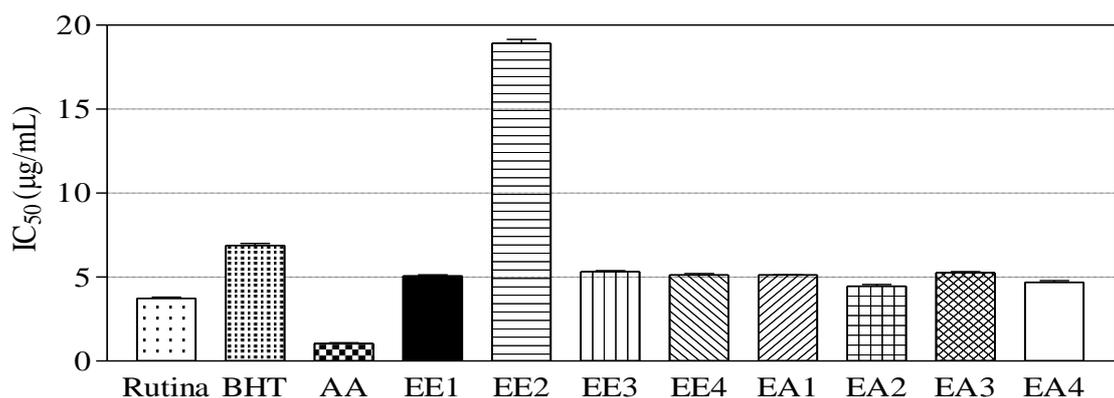
4.2.1 ATIVIDADE REDUTORA DO RADICAL DPPH*

O método colorimétrico para determinar a atividade redutora do radical DPPH* consiste na avaliação da capacidade do composto teste em reduzir o radical DPPH*. Este radical se apresenta com uma coloração violeta e quando é reduzido por substâncias antioxidantes adquire uma coloração amarelada (MOLYNEUX, 2004). Assim, o percentual encontrado para a ação antioxidante, dependerá da quantidade correspondente de DPPH* reduzida pelo antioxidante, sendo que a concentração necessária para reduzir o valor inicial de DPPH* pelo antioxidante em 50% é denominada concentração efetiva (CE₅₀) ou concentração inibitória (CI₅₀) (MOLYNEUX, 2004). Portanto, quanto maior a atividade redutora ou ação antioxidante de um extrato bruto ou frações, proveniente de uma espécie de planta, maior será a redução do DPPH* e menor será o valor do IC₅₀.

Foram utilizados como padrões de referência: rutina, BHT e ácido ascórbico, substâncias com comprovada atividade antioxidante (DUARTE et al., 2014).

As diferentes amostras foram lidas em espectrofotômetro a 517 nm. A partir dos valores encontrados para amostras teste e controle foi estabelecida a

porcentagem de redução do radical DPPH^{*}, conforme a fórmula descrita em materiais e métodos (item 3.4.1). Os valores de porcentagem de redução foram plotados graficamente e a análise de regressão linear da porcentagem de redução versus a concentração de extrato no meio de reação foi estabelecida. O IC₅₀ foi determinado por meio da equação da reta ($y = ax \pm b$) obtida para cada uma das amostras.



	Rutina	BHT	AA	EE1	EE2	EE3	EE4	EA1	EA2	EA3	EA4
Rutina		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
BHT			X	X	X	X	X	X	X	X	X
AA				X	X	X	X	X	X	X	X
EE1					X				X		
EE2						X	X	X	X	X	X
EE3									X		X
EE4									X		
EA1									X		
EA2										X	
EA3											X
EA4											

Figura 6: Comparação dos valores de IC₅₀ referentes à atividade redutora do radical DPPH^{*} dos diferentes extratos e padrões em cada período de coleta do estudo de sazonalidade. X = $p < 0,05$ por ANOVA seguido de Tukey ($n=3$), em relação ao grupo presente na coluna perpendicular.

Neste ensaio, o extrato mais ativo foi EA2 (IC₅₀= 4,45 µg/mL) em comparação aos demais extratos de *E. suberosum*, sendo mais ativo que o padrão BHT (Figura 6 e Tabela 5). Entre os EE, o mais ativo foi EE1 (IC₅₀= 5,08 µg/mL), também mais ativo que padrão BHT. O padrão de referência mais ativo foi o ácido ascórbico com IC₅₀ igual a 1,06 µg/mL, seguido pela rutina com IC₅₀ igual a 3,74 µg/mL (Figura 6 e Tabela 5).

Entre os extratos aquosos (EA) não foram observadas grandes alterações na atividade redutora de radical DPPH• entre as diferentes coletas. No entanto, para os extratos etanólicos (EE), o extrato da coleta 2 (EE2) apresentou redução significativa de atividade (aproximadamente 3,5 vezes) em comparação aos demais extratos etanólicos e aquosos (Figura 6 e Tabela 5).

Tabela 5: Valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) referentes à atividade redutora do radical DPPH• dos diferentes extratos e padrões em cada período de coleta do estudo de sazonalidade.

	Rutina	BHT	AA	EE1	EE2	EE3	EE4	EA1	EA2	EA3	EA4
Média	3,74	6,9	1,06	5,08	18,93	5,32	5,13	5,12	4,45	5,28	4,69
SD	0,13	0,18	0,05	0,12	0,4	0,12	0,15	0,02	0,17	0,07	0,17

EA = extrato aquoso e EE = extrato etanólico. Os n° de 1 a 4 referem-se as coletas de agosto/2013, novembro/2013, fevereiro/2014 e maio/2014, respectivamente. Os resultados representam a média de três determinações.

Veber (2015) descreveu a atividade redutora de DPPH• para espécie *Syzygium cumini*, conhecida como Jambolão, comumente utilizada no tratamento de febre, estomalgia, gastropatia e diabetes mellitus tipo 2. O menor CI_{50} encontrado foi para os extratos de frutos verdes, sendo de 2,27 mg/mL. Para os extratos hidroetanólicos, preparados a partir de folhas da espécie, o valor encontrado foi de 23,07 mg/mL.

A *Morinda citrifolia* L. devido a relatos de propriedade anticâncer, antioxidante, dentre outras, teve um crescimento do seu consumo na forma de suco da fruta no Brasil. Os resultados de CI_{50} encontrados em extratos metanol:acetona foram 25,18 mg/mL e 25,96 mg/mL em metanol (PALIOTO et al., 2015).

Em outro estudo, os extratos provenientes da extração por etanol e acetato de etila da espécie *E. suberosum*. apresentaram CI_{50} de 0,18 mg/mL e 0,74 mg/mL respectivamente, frente ao ensaio com DPPH•. Os autores relataram que, a atividade encontrada para o extrato etanólico, apresentou uma relação com os valores altos encontrados de fenóis totais (OLIVEIRA et al., 2015).

O material vegetal obtido de *E. suberosum* no trabalho de Oliveira e colaboradores (2015) foi coletado nos vales do Jequitinhonha e Mucuri em Diamantina, Minas Gerais, Brasil e os extratos das folhas preparados por maceração

(OLIVEIRA et al., 2015). Em comparação aos valores encontrados para *E. suberosum*, da região de Brasília, Distrito Federal, relatados no presente estudo, pode ser observado que o potencial antioxidante da espécie coletado no Distrito Federal parece ser maior frente ao radical DPPH*. Contudo, diferenças no processo extrativo tais como proporções planta, solvente e tempo de extração podem ter influenciado na diferença de atividade, assim como uma resposta da espécie aos nutrientes do solo e ao clima.

Palhares e colaboradores (2010) relataram que a complexidade da relação entre o clima e as condições do solo da região do Cerrado, pode diversificar as respostas fotossintéticas e hídricas nas espécies vegetais, provenientes deste ambiente. As plantas adultas do Cerrado estão expostas a altos níveis de irradiação solar porém, possuem um sistema radicular (órgãos especializados em fixação, absorção, reserva e condução) muito extenso, que alcança as camadas mais profundas do solo. Esse consegue manter uma fonte de água estável para as plantas, diminuindo assim, os efeitos de déficit hídrico sazonal.

Palhares e colaboradores (2010), relataram também que a *E. suberosum* A.St.-Hil. é uma espécie isoídrica, ou seja, são plantas capazes de uma redução na condutância ou condução estomática, impedindo desta forma, a completa dessecação foliar e mantendo a assimilação de carbono, em períodos de redução na oferta hídrica do solo. Assim, a espécie em questão, pode ter mantido boas condições hídricas, podendo obter poucas variações significativas de seus metabolitos secundários, mantendo o seu potencial antioxidante durante todo o período sazonal, com uma pequena variação para o extrato EE2, do período de coleta chuvoso. Neste período, as folhas da planta podem ter perdido compostos importantes para sua atividade, por um processo de lixiviação (PALHARES et al., 2010).

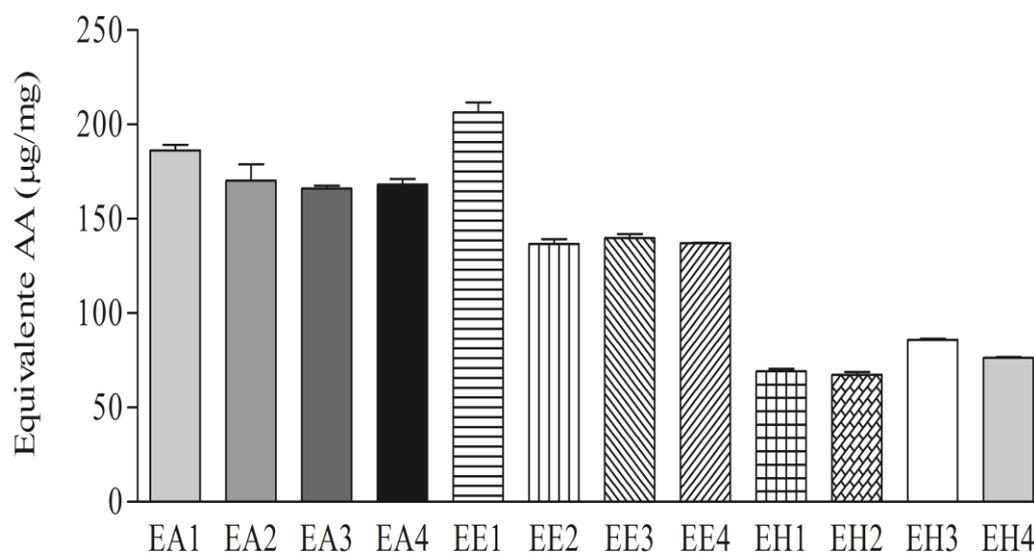
4.2.2 REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO

Um método muito utilizado para avaliação da atividade antioxidante é a de redução do complexo fosfomolibdênio. Este método se baseia na redução do molibdênio (VI) para (V) pela amostra com capacidade antioxidante e subsequente formação de um complexo de molibdênio (V) e fosfato, adquirindo coloração verde que é avaliada por espectrômetro (PRIETO, 1999).

A atividade antioxidante foi expressa em equivalentes de ácido ascórbico (AA). A análise de regressão linear da absorbância obtida pelo AA *versus* a concentração de AA no meio de reação foi estabelecida. Por meio desta equação da reta foi possível determinar o equivalente de AA para os extratos

Neste ensaio o extrato mais ativo foi EE1 (206,39 µg/mL equivalente AA) em comparação aos demais extratos de *E. suberosum* A.St.-Hil. Dentre os EA, o mais ativo foi EA1 (186,28 µg/mL equivalente AA) (Figura 7 e Tabela 6). E entre os EH, o mais ativo foi EH3 (86,00 µg/mL equivalente AA). Entre os extratos aquosos (EA) não foram observadas grandes alterações na atividade redutora do complexo fosfomolibdênio entre as diferentes coletas. No entanto, para os extratos etanólicos (EE), o extrato da coleta 1 (EE1) apresentou atividade significativamente maior em comparação aos demais extratos etanólicos, aquosos e hexânicos. Em relação aos extratos hexânicos (EH), os extratos da coleta 3 e 4 (EH3 e EH4) apresentaram atividade significativamente maior que os extratos da coleta 1 e 2 (EH1 e EH2) (Figura 7 e Tabela 6).

Para os extratos aquosos e etanólicos, o melhor período de coleta onde foram obtidos extratos com maiores valores de atividade antioxidante, considerando o método com fosfomolibdênio, foi referente ao mês de agosto de 2013 (coleta 1). Entretanto, para os extratos hexânicos, o melhor período de coleta foi a referente ao mês de fevereiro de 2014 (coleta 3) (Tabela 6 e Figura 7). Esta diferença entre as atividades, períodos de coleta e extratos pode ser devido à existência de diferentes compostos com atividade antioxidante.



	EE1	EE2	EE3	EE4	EA1	EA2	EA3	EA4	EH1	EH2	EH3	EH4
EE1		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
EE2					X	X	X	X	X	X	X	X
EE3					X	X	X	X	X	X	X	X
EE4					X	X	X	X	X	X	X	X
EA1							X		X	X	X	X
EA2									X	X	X	X
EA3									X	X	X	X
EA4									X	X	X	X
EH1											X	X
EH2											X	X
EH3												X
EH4												

Figura 7: Comparação dos valores de equivalente AA ($\mu\text{g}/\text{mL}$) referentes à atividade antioxidante pelo método fosfomolibdênio dos diferentes extratos em cada período de coleta do estudo de sazonalidade. X = $p < 0,05$ por ANOVA seguido de Tukey, em relação ao grupo presente na coluna perpendicular.

Para a espécie *Dorstenia multiformis* Miquel, conhecida como carapiá, a maior presença de compostos antioxidantes, foi encontrada na fração clorofórmio, apresentando equivalentes de ácido ascórbico de $200 \mu\text{g}/\text{mL}$ (BALESTRIN et al., 2008).

Tabela 6: Valores de equivalente AA ($\mu\text{g/mL}$) referentes à atividade antioxidante pelo método fosfomolibdênio dos diferentes extratos em cada período de coleta do estudo de sazonalidade.

	EA1	EA2	EA3	EA4	EE1	EE2	EE3	EE4	EH1	EH2	EH3	EH4
Média	186,3	170,3	166,08	168,3	206,39	136,77	139,87	137,23	69,21	67,3	86,00	76,30
SD	5,22	14,84	2,54	5,16	9,25	4,39	3,73	0,42	1,73	2,13	0,77	0,58

EA = extrato aquoso e EE = extrato etanólico. EH = extrato hexânico. Os n° de 1 a 4 referem-se as coletas de agosto/2013, novembro/2013, fevereiro/2014 e maio/2014, respectivamente. Os resultados representam a média de três determinações.

No trabalho de (OLIVEIRA, 2015) os valores encontrados para extrato bruto das folhas da espécie *Psychotria fractistipula*, foram de 39,75% e 63,04% de equivalentes de ácido ascórbico e rutina, entretanto que para fração de acetato de etila foram observados equivalentes de 90,17% e 142,98%, para ácido ascórbico e rutina, respectivamente.

4.3 AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA

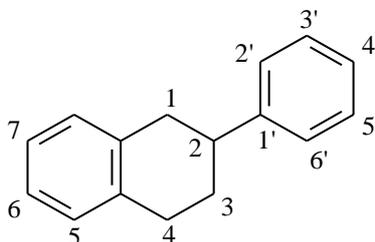
4.3.1 PERFIL CROMATOGRÁFICO POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

O método de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) é utilizado para separação, identificação e quantificação de compostos em um extrato de origem semipuro ou bruto, permitindo a identificação bioguiada do composto ativo (CECHINEL-FILHO, 2000).

Na análise realizada neste trabalho foram obtidos resultados por meio de tentativas, à procura de um eluente que separasse os compostos da classe dos flavonoides presentes nos extratos brutos de *E. suberosum*. Assim, foi definido o eluente referente a mistura (100:5:5:0) acetato de etila, ácido acético e ácido fórmico, não apresentou boa separação das bandas, sendo melhor a mistura de (100:10:10:0) dos mesmos solventes. O revelador utilizado foi NP-PEG (difetilboriloxietilamina) analisada sob luz ultravioleta 365 nm.

A fluorescência, após a aplicação do revelador pode determinar a posição e número dos substituintes dos flavonoides. Por exemplo, a coloração verde, que indica a presença de um grupo OH na posição 4'; a cor amarela indica a presença do grupo

OH nas posições 3' e 4'; a presença de três grupos OH nas posições 3', 4' e 5' produz uma fluorescência de cor alaranjada (PEREIRA, 2002).



A Figura 8 apresenta o perfil cromatográfico por CCD dos padrões hiperosídeo e quercitrina e pontos mistos com extratos de *E. suberosum*. Foram utilizadas substâncias padrões da classe dos flavonoides, pois a atividade antioxidante pode estar relacionada a esta classe. Foi observada a presença de hiperosídeo e quercitrina tanto nos extratos aquosos quanto nos extratos etanólicos de *E. suberosum*, sendo confirmada a presença destas substâncias pela técnica do ponto misto. O fator de retenção (R_f) encontrado para hiperosídeo e quercitrina foram de 0,48 e 0,73, respectivamente, com manchas de coloração amarela. O R_f das manchas de mesma altura presentes no extrato aquoso foram os mesmos encontrados para os padrões de hiperosídeo e quercitrina, respectivamente. O R_f das manchas de mesma altura do extrato etanólico também foram os mesmos dos padrões em questão.

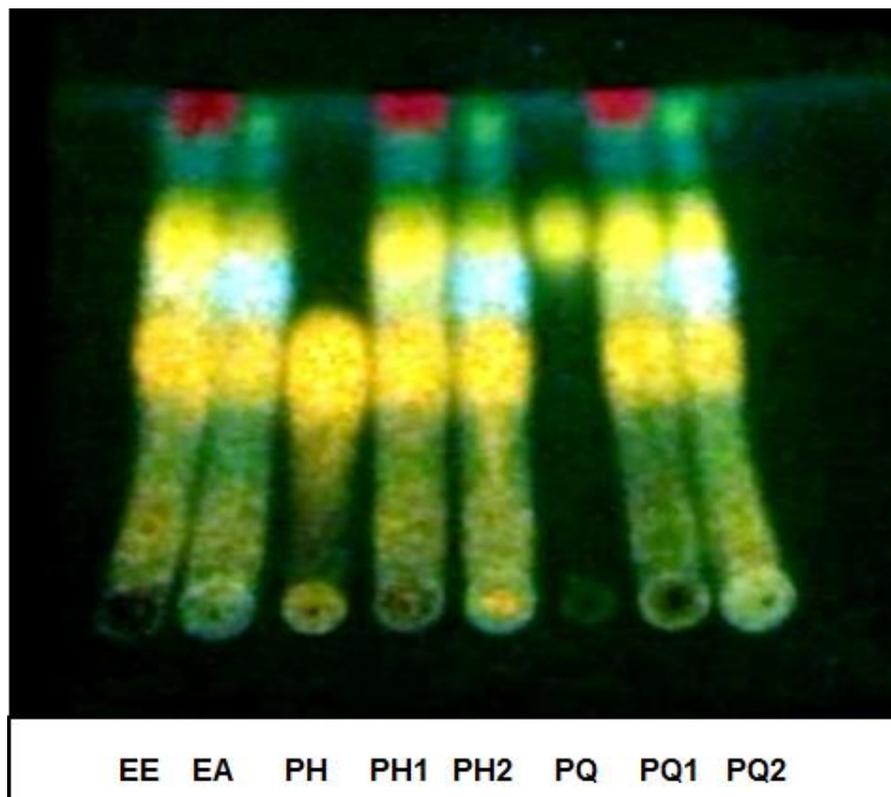


Figura 8: Perfil cromatográfico por CCD dos padrões hiperosídeo e quercitrina e pontos mistos com extratos de *E. suberosum* A.St.-Hil. EA = extrato aquoso; EE = extrato etanólico; PH = Padrão de hiperosídeo; PH1 = Ponto misto de hiperosídeo + EE; PH2 = Ponto misto de hiperosídeo + EA; PQ = Padrão de quercitrina; PQ1 = Ponto misto de quercitrina + EE; PQ2 = Ponto misto de quercitrina + EA; Eluente = acetato de etila, ácido acético e ácido fórmico (100:10:10); Revelador = NP-PEG.

A Figura 9 apresenta o perfil cromatográfico por CCD dos padrões isoquercitrina e isovitexina e pontos mistos com extratos de *E. suberosum* A.St.-Hil. Não foram confirmadas a presença de isoquercitrina (nesta primeira análise por CCD) e isovitexina tanto nos extratos aquosos quanto nos extratos etanólicos de *E. suberosum* A.St.-Hil. O fator de retenção (R_f) encontrado para isoquercitrina e isovitexina foram de 0,46 e 0,54, respectivamente e as manchas demonstraram coloração alaranjada e amarela esverdeada, respectivamente. As manchas de mesma altura presentes no extrato aquoso e etanólico apresentam coloração diferente das apresentadas pelos padrões de isoquercitrina e isovitexina.

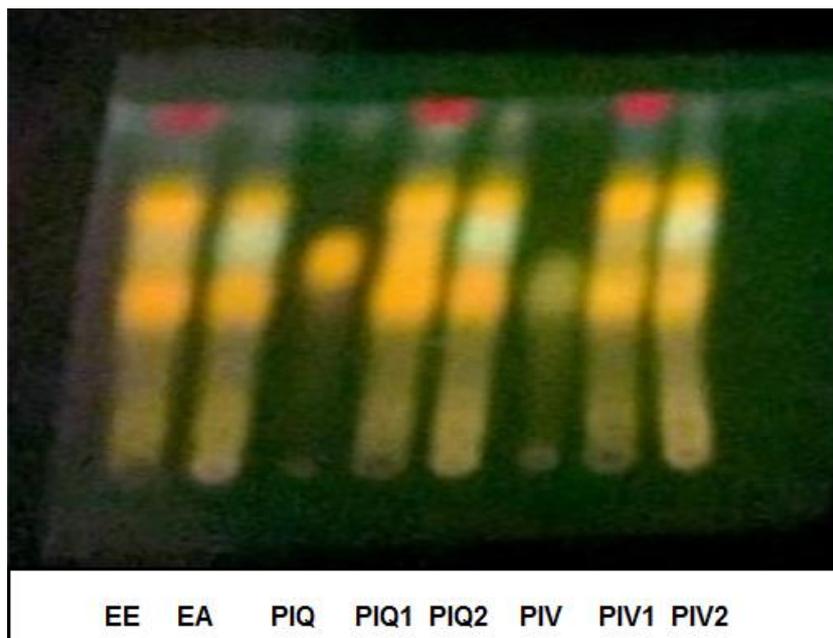


Figura 9: Perfil cromatográfico por CCD dos padrões isoquercitrina e isovitexina e pontos mistos com extratos de *E. suberosum* A.St.-Hil. EA = extrato aquoso; EE = extrato etanólico; PIQ = Padrão de Isoquercitrina; PIQ1= Ponto misto de Isoquercitrina + EE; PIQ2 = Ponto misto de Isoquercitrina + EA; PIV = Padrão de Isovitecina; PIV1 = Ponto misto de Isovitecina + EE; PIV2 = Ponto misto de Isovitecina + EA; Eluente = acetato de etila, ácido acético e ácido fórmico (100:10:10); Revelador = NP-PEG.

A Figura 10, apresenta o perfil cromatográfico por CCD do padrão kaempferol e pontos mistos com extratos de *E. suberosum* A.St.-Hil.

Tanto no extrato aquoso quanto no extrato etanólico de *E. suberosum* A.St.-Hil. não foi possível identificar com certeza a presença de Kaempferol, pois o fator de retenção ($R_f = 0,95$) encontrado para Kaempferol foi muito, o que dificultou a separação de outros compostos presentes nos extratos. Contudo, para o extrato aquoso a mancha demonstrou coloração semelhante ao padrão, porém com menor intensidade e o R_f também se aproxima.

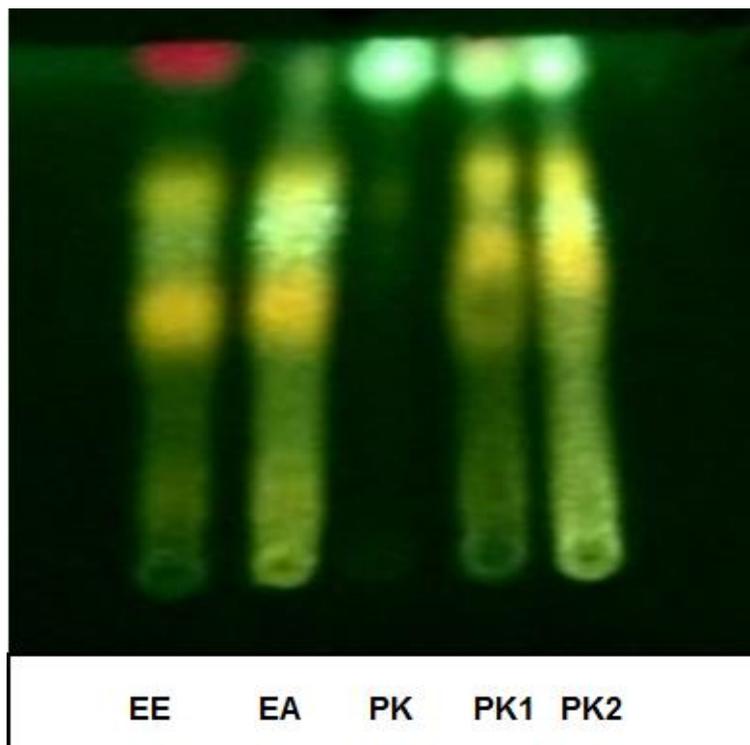


Figura 10: Perfil cromatográfico por CCD do padrão kaempferol e pontos mistos com extratos de *E. suberosum* A.St.-Hil. EA = extrato aquoso; EE = extrato etanólico; PK = Padrão de Kaempferol; PK1= Ponto misto de Kaempferol + EE; PK2 = Ponto misto de Kaempferol + EA; Eluente = acetato de etila, ácido acético e ácido fórmico (100:10:10); Revelador = NP-PEG.

A Figura 11 apresenta o perfil cromatográfico por CCD dos extratos aquoso EA e etanólico EE de *E. suberosum* A.St.-Hil. nos diferentes períodos de coleta do estudo de sazonalidade. Pode ser observado que o perfil de ambos os extratos não se altera qualitativamente nos diferentes períodos.

A Figura 12 apresenta um perfil cromatográfico por CCD para os padrões de rutina, isoquercitrina e hiperosídeo, extrato aquoso das folhas de *E. suberosum* A.St.-Hil. e extrato aquoso com o hiperosídeo, um ponto misto entre extrato mais padrão. Nesta figura pode ser observado a identificação da presença de hiperosídeo e isoquercitrina, porém, a isoquercitrina pode estar coeluída com outro composto, de acordo com os resultados encontrados por CLAE, houve a confirmação da presença de isoquercitrina, nos extratos de *E. suberosum* A.St.-Hil. A molécula coeluída com a isoquercitrina, não pode ser identificada neste trabalho. Assim, se duas moléculas ou compostos possuírem semelhante tempo de retenção, então os picos podem se apresentarem sobrepostos.

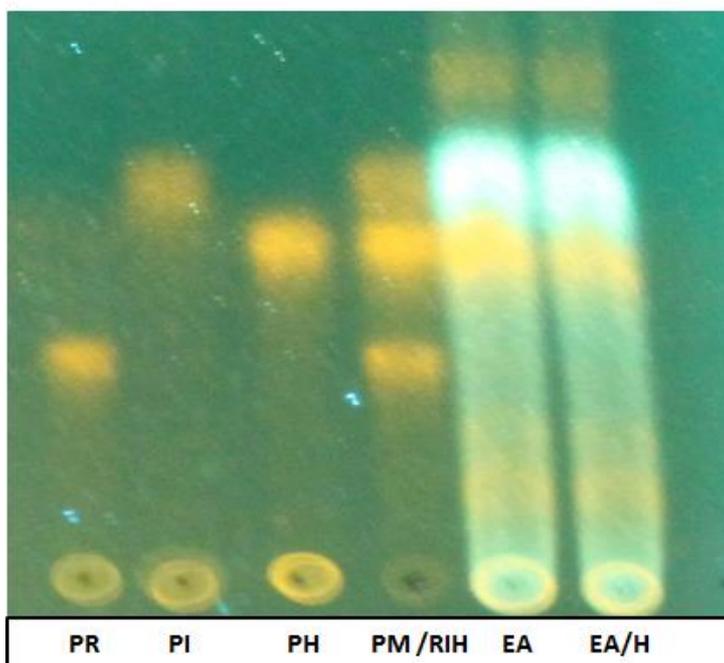


Figura 11: Perfil cromatográfico por CCD dos extratos aquoso EA e EE das folhas de *E. suberosum* A.St.-Hil. EA = extrato aquoso e EE = extrato etanólico. Os n° de 1 a 4 referem-se as coletas de agosto/2013, novembro/2013, fevereiro/2014 e maio/2014, respectivamente; Eluente = acetato de etila, ácido acético e ácido fórmico (100:10:10); Revelador = NP-PEG.

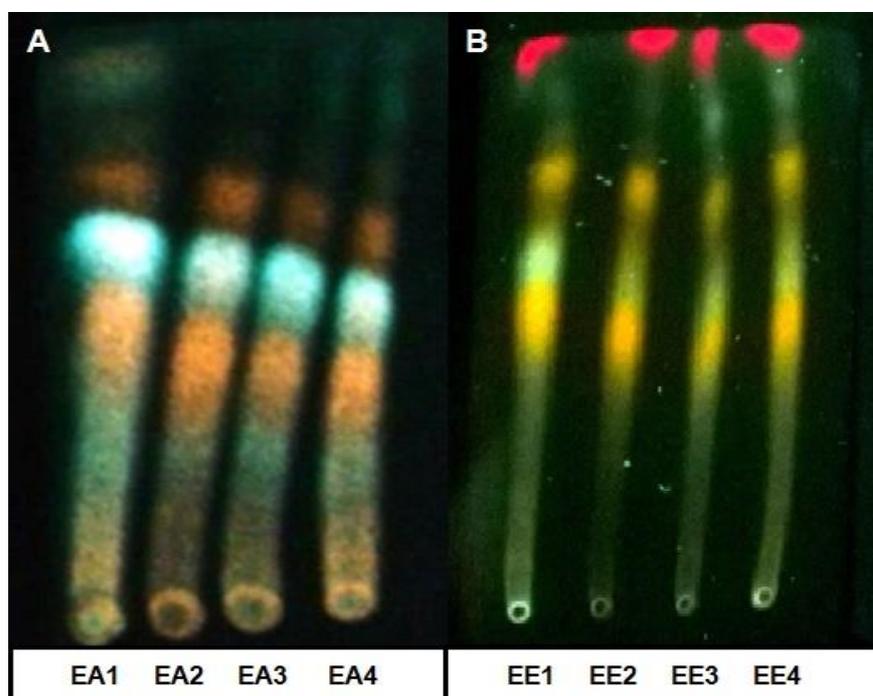


Figura 12: Padrões de rutina, isoquercitrina e hiperosídeo e pontos mistos com extratos de *E. suberosum* A.St.-Hil. PR= rutina; PI= isoquercitrina; PH= hiperosídeo; PM/RIH= ponto misto com os três padrões citados (R, I e H); EA = extrato aquoso; EA/H = extrato aquoso + H; Eluente = acetato de etila, ácido acético e ácido fórmico (100:10:10); Revelador = NP-PEG.

O gênero da *Erythroxylum* é conhecido pela ocorrência de alcaloides, flavonoides e terpenos em sua composição (OLIVEIRA et al., 2015). Em relação aos compostos ativos de espécies, provenientes do cerrado, foi verificado, nos extratos de galhos e folhas da espécie *E. suberosum* A.St.-Hil., cinco diterpenos e dois flavonoides, respectivamente a cada extrato citado, sendo que, a rutina, um dos flavonoides identificados neste trabalho, foi obtido de extrato etanólico de folhas, considerado pelo autor não tóxico, devido aos resultados encontrados em análise do extrato etanólico com *Artemia salina*. (NASCIMENTO et al., 2012)

De acordo com os resultados de uma triagem fitoquímica realizada no trabalho de OLIVEIRA e colaboradores (2015) a presença de duas classes de metabólitos secundários, as dos flavonoides e triterpenos/esteroides, foi detectada no extrato acetato de etila; e flavonoides, antocianidinas, cumarinas e taninos condensados, no extrato etanólico. Porém os autores não determinaram, quais flavonoides poderiam estar relacionados com o potencial antioxidante do extrato da espécie.

Dessa forma, identificação de três compostos, quercetrina e hiperosídeo e isoquercitrina, reforça a utilidade dos flavonoides como marcadores quimiotaxonômicos para o gênero *Erythroxylum*.

4.3.2 PERFIL CROMATOGRÁFICO POR CLAE E DETERMINAÇÃO DO TEOR DE HIPEROSÍDEO E ISOQUERCITRINA

Os extratos aquosos e etanólicos das folhas secas de *E. suberosum* (EA e EE) foram analisados por CLAE/DAD. Foi observado, frente ao método descrito, que EA apresentou quatro principais picos de substâncias, sendo possível identificar duas delas, hiperosídeo e isoquercitrina (Picos 2 e 3), conforme mostrado na Figura 13. Além disso, foi possível inferir que o pico 1 é um derivado do ácido clorogênico e o pico 4, um flavonoide, com base na semelhança espectral com padrões de ácido clorogênico e quercetina, respectivamente.

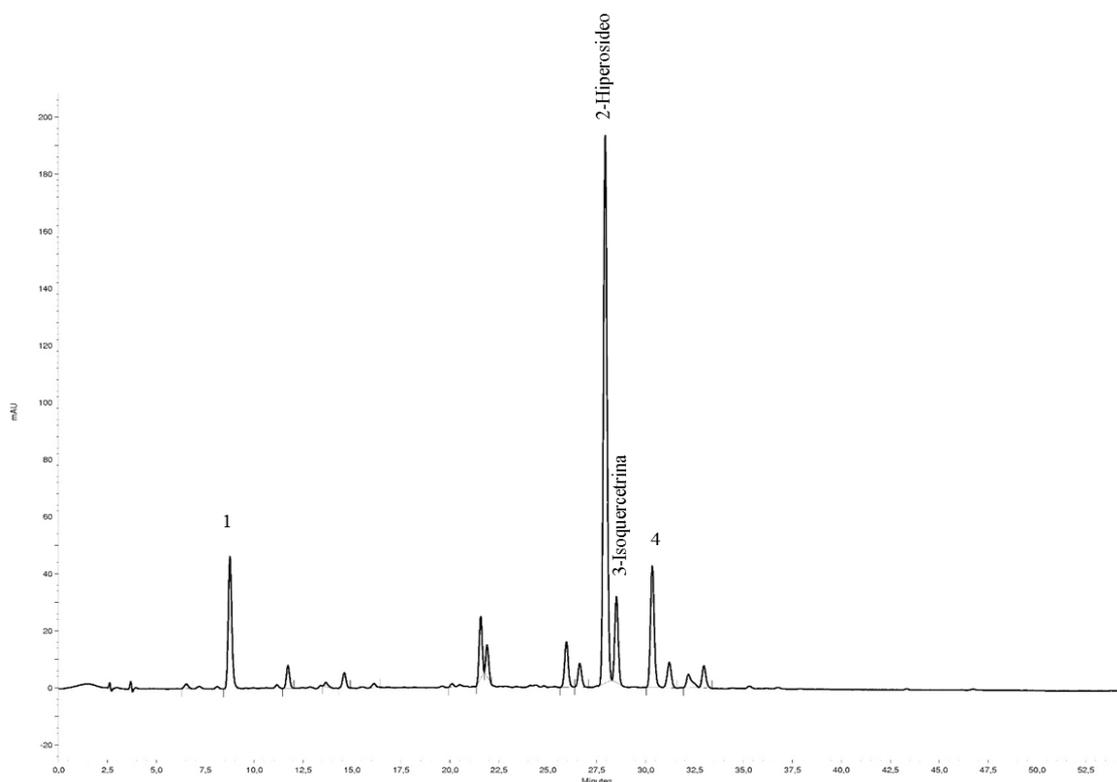


Figura 13: Perfil cromatográfico por CLAE/DAD do extrato aquoso das folhas secas de *E. suberosum* A.St.-Hil. Cromatograma registrado 353nm (hiperosídeo) e 354nm (isoquercetrina) com detector ajustado para coletar dados na faixa de 220 nm e 400 nm. Fase móvel constituída de solução ácido fosfórico 1% (Bomba A) e acetonitrila (Bomba B). Fluxo de fase móvel de 0,6 mL/min.

Em relação ao extrato etanólico (EE), também foi observada, frente ao método descrito, a presença de quatro principais picos de substâncias, sendo possível identificar duas delas: hiperosídeo e isoquercitrina (Picos 2 e 3), conforme mostrado na Figura 14. De forma semelhante ao EA, o pico 1, é um derivado do ácido clorogênico e o pico 4, de um flavonoide. Na Figura 15 podem ser observados os espectros das substâncias identificadas, hiperosídeo e isoquercitrina respectivamente.

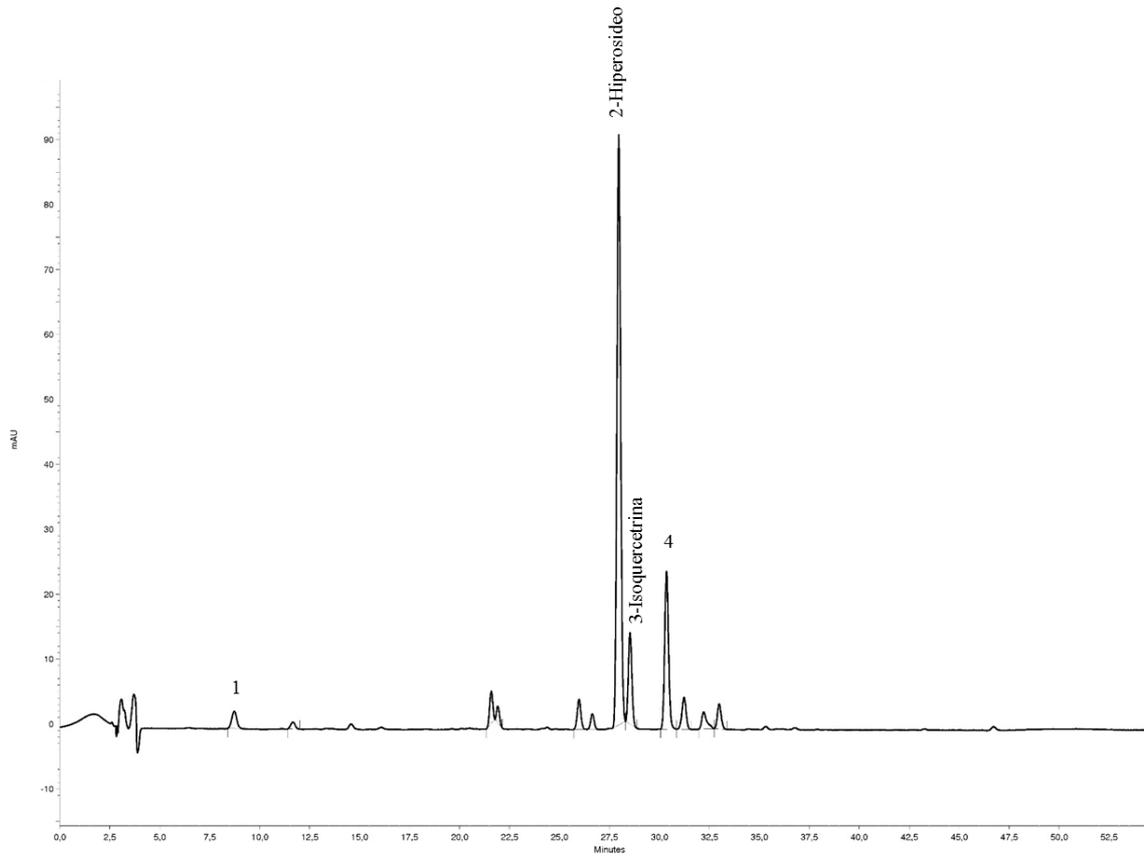


Figura 14: Perfil cromatográfico por CLAE do extrato etanólico das folhas secas de *E. suberosum* A.St.-Hil. Cromatograma registrado a 353nm (hiperosídeo) e 354nm (isoquercetrina) com detector ajustado para coletar dados na faixa de 220 nm e 400 nm. Fase móvel constituída de solução ácido fosfórico 1% (Bomba A) e acetonitrila (Bomba B). Fluxo de fase móvel de 0,6 mL/min.

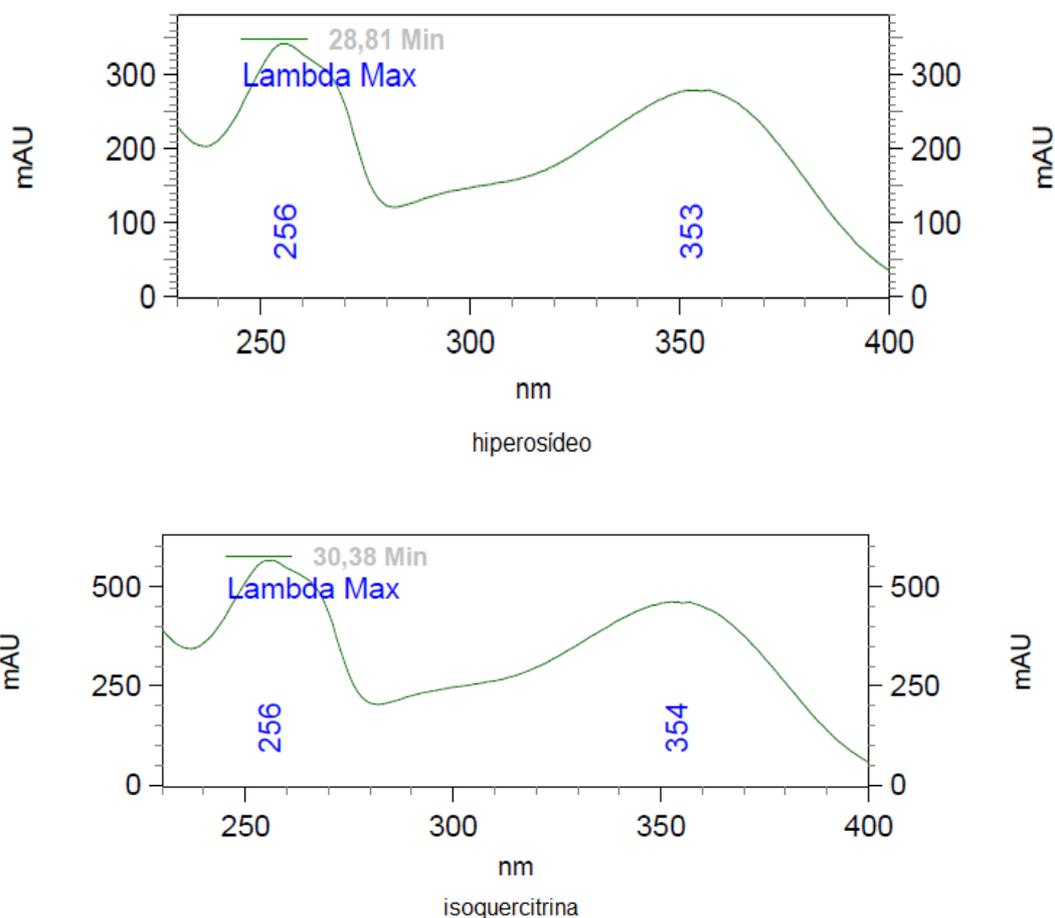


Figura 15: Espectro para hiperosídeo (Tempo de retenção: 28,813 Min e Lambda max: 256, 353) e isoquercitrina (Tempo de retenção: 30,380 Min e Lambda max: 256, 354) respectivamente. Detector ajustado para coletar dados na faixa de 220 nm e 400 nm. Fase móvel constituída de solução ácido fosfórico 1% (Bomba A) e acetonitrila (Bomba B). Fluxo de fase móvel de 0,6 mL/min.

Quanto à análise de EA e EE em vários períodos de coleta, no estudo de sazonalidade, foi observado que o perfil cromatográfico não foi alterado nos diferentes períodos. O perfil cromatográfico se manteve semelhante para ambos extratos e durante todo o período de estudo.

Foi possível verificar o teor das duas substâncias identificadas, hiperosídeo e isoquercitrina. Para isto, uma curva analítica para cada substância foi preparada. A partir das absorvâncias médias obtidas das substâncias padrões na faixa de concentração estudada (6,25-100,00 $\mu\text{g/mL}$) a equação da reta foi calculada e o coeficiente de correlação (r) foi determinado utilizando o programa *GraphPadPrism*[®]. Com a equação da reta encontrada para hiperosídeo ($y=238000x-6677$; $r=0,9998$) e para a isoquercitrina ($y=114300-554200$; $r=0,9986$) foi possível calcular o quanto de

hiperosídeo e isoquercitrina havia em cada extrato preparado, substituindo a absorbância pela variável y na equação da reta.

Os extratos aquosos, EA1, EA2, EA3 e EA4 apresentam 41,8 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 23,4 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 23,3 $\mu\text{g}/\text{mg}$ e 26,6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de hiperosídeo. Enquanto que os extratos etanólicos, EE1, EE2, EE3 e EE4 apresentam 19,9 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 25,5 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 19,0 $\mu\text{g}/\text{mg}$ e 20,6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de hiperosídeo (Figura 16).

O extrato que apresentou maior teor de hiperosídeo foi o extrato aquoso referente à coleta de agosto/2013 (EA1), seguido pelo extrato aquoso da coleta de maio 2014 (EA4) e extrato etanólico da coleta de novembro de 2013 (EE2). O extrato EA1 apresentou 36,4% e 39,0% mais hiperosídeo que EA4 e EE2, respectivamente. O extrato com menor teor de hiperosídeo foi o extrato etanólico da coleta referente a fevereiro/2014 (EE3), sendo este 54,6% menor que EA1 (Figura 16).

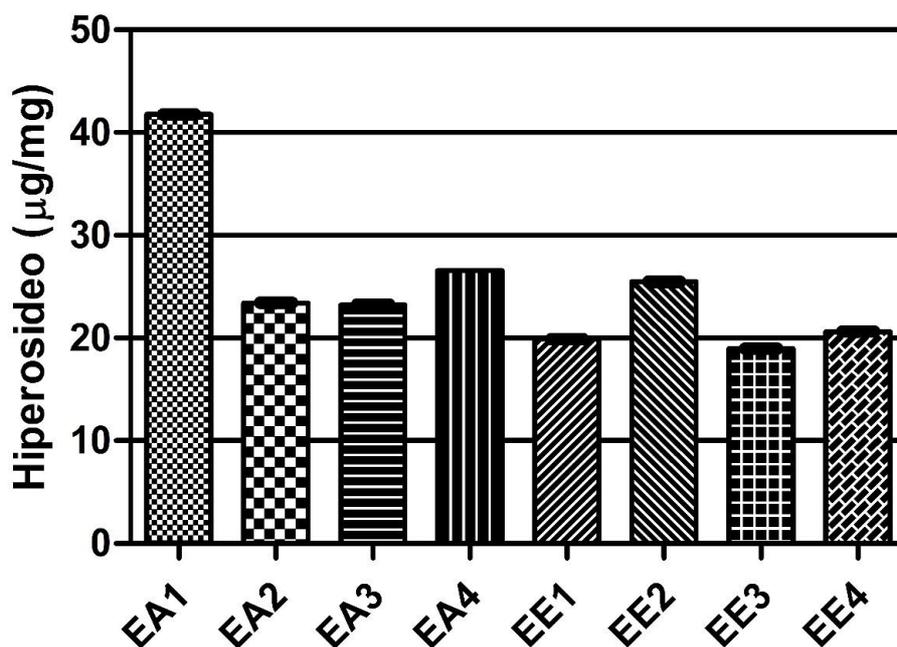


Figura 16: Teor de hiperosídeo nos diferentes extratos das folhas secas de *E. suberosum* A.St.-Hil. em cada período de coleta do estudo de sazonalidade. EA = extrato aquoso e EE = extrato etanólico. Os nº de 1 a 4 referem-se as coletas de agosto/2013, novembro/2013, fevereiro/2014 e maio/2014, respectivamente. Os dados representam a média \pm erro padrão ($n=3$).

Os extratos aquosos, EA1, EA2, EA3 e EA4 apresentaram 18,0 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 13,6 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 12,9 $\mu\text{g}/\text{mg}$ e 14,6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de isoquercitrina (Figura 17), enquanto que os extratos etanólicos, EE1, EE2, EE3 e EE4 apresentaram 10,9 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 14,4 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 11,9 $\mu\text{g}/\text{mg}$ e 13,7 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de isoquercitrina (Figura 17).

O extrato que apresentou maior teor de isoquercitrina foi o extrato aquoso referente a coleta de agosto/2013 (EA1), seguido pelo extrato aquoso da coleta de maio 2014 (EA4) e extrato etanólico da coleta de novembro de 2013 (EE2). EA1 apresentou 18,8% e 19,9% mais isoquercitrina que EA4 e EE2, respectivamente. O extrato com menor teor de isoquercitrina foi o extrato etanólico da coleta referente a agosto/2013 (EE1), sendo este 39,1% menor que EA1.

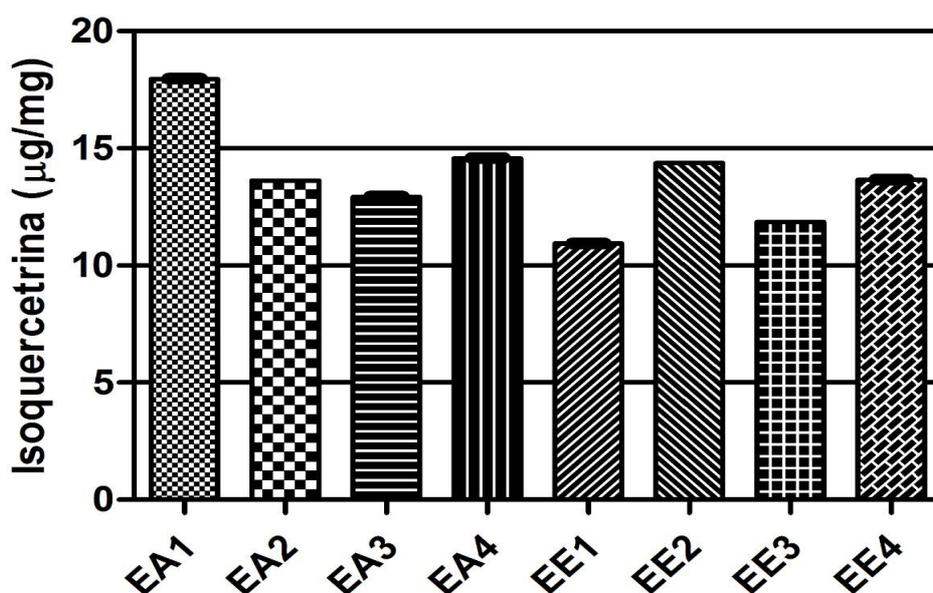


Figura 17: Teor de isoquercitrina nos diferentes extratos das folhas secas de *E. suberosum* A.St.-Hil. em cada período de coleta do estudo de sazonalidade. EA = extrato aquoso e EE = extrato etanólico. Os n° de 1 a 4 referem-se as coletas de agosto/2013, novembro/2013, fevereiro/2014 e maio/2014, respectivamente. Os dados representam a média \pm erro padrão (n=3).

Proveniente da maioria das plantas advindas do continente asiático, já relatado em alguns trabalhos, o hiperosídeo pode estar na presença ou não da isoquercitrina. Por exemplo, para espécie *Apocynum venetum* L., que apresenta atividade anti-hipertensiva e antidepressiva, devido à presença de flavonoides, o hiperosídeo é um

dos principais componentes químicos ativos que contribuem para eficácia farmacológica desta planta (SONG & ZHOU, 2015).

O hiperosídeo é um dos principais glicosídeos de flavonoides bioativos na *E. lindleyanum* e está presente também em uma variedade de plantas como, *Hypericum perforatum* e *Artemisia capillaris*. Esse flavonoide apresenta notória relevância, devido a suas propriedades antioxidante, anti-inflamatória, antifúngica e antidepressiva (ZHANG et al., 2015).

WANG e colaboradores (2011) relataram valores de hiperosídeo em extrato de folhas de *Crataegus pinnatifida* Bge. var *major* N. E. Br e *Crataegus pinnatifida* Bge, da família Rosaceae, sendo os valores de 0,80 mg/g e 1,61mg/g, respectivamente. Estes valores são maiores do que os detectados para os extrato aquosos e etanólicos da espécie *E. suberosum* A.St.-Hil., pertencente à família Erythroxylaceae.

PIAO e colaboradores (2011) relataram para espécie *L. fischeri* (Ledebour) Turcz. o valor de 0,387 mg/g de hiperosídeo no extrato de folhas, o que se aproxima mais aos valores encontrados em extratos das folhas de *E. suberosum* A.St.-Hil. neste estudo, tanto para aquoso, como também etanólico.

TAN e colaboradores (2014), detectaram 0,553 mg/g de hiperosídeo para *Rheum palmatum* L. o que apresenta maior proximidade ao valor de EA1 (41,8 µg/mg) neste estudo com folhas de *E. suberosum*. Contudo, os valores descritos são referentes a outras partes utilizadas da planta, diferentemente das folhas, como raízes e rizomas (TAN et al., 2014).

Dos glicosídeos de quercetina já identificados, a isoquercitrina pode ser um dos principais encontrados. De acordo com um estudo realizado, foi verificado que a isoquercitrina, em relação à atividade biológica, demonstrou ser um menor alvo para as pesquisas, não estendendo os estudos desta, para não mais do que 49 registros nesta área (VALENTOVA et al., 2014)

Em relação à quantificação de isoquercitrina a partir de extratos de plantas ou isolados, há poucos resultados utilizando o método de quantificação por CLAE. *Dimorphandra gardneriana* Tul tem apresentado 2,2 µg/mL de isoquercitrina, aproximadamente 11, 10% dos compostos contido nesta espécie (LANDIM et al., 2013).

Em outra espécie, a *Tropaeolum majus*, da família Tropaeolaceae, foi encontrado nos extratos hidroetanólico de folhas e na fração semi-purificada, 38,64 mg/g e 93,45 mg/g de isoquercitrina, respectivamente (GASPAROTTO-JUNIOR et al.,

2012). Em folhas de *Ziziphus joazeiro*, o teor de isoquercitrina foi de 15,24 mg/g (BRITO et al., 2014).

Na publicação de Tan e colaboradores (2008), o teor de isoquercitrina na espécie *Artemisia capillaris* Thunb foi definido de acordo com o período sazonal das diferentes regiões. Em abril, os valores do teor do composto variaram entre 0,876 mg/g - 0,444 mg/g. Em maio e junho, a variação foi de 0,368 mg/g e 0,121mg/g - 2,082 mg/g, respectivamente. (TAN et al., 2008)

De acordo com dados da literatura, citados neste trabalho, os valores do teor de isoquercitrina para os extratos aquosos e etanólicos de agosto/2013 até a última coleta de maio/2014, podem ser considerados similares aos encontrados em *Ziziphus joazeiro*, em folhas foram coletadas na chapada do Araripe/CE, território brasileiro (BRITO et al., 2014). Para a espécie *Artemisia capillaris* Thunb, contudo, (TAN et al., 2008), os teores relatados dos períodos sazonais analisados, estão abaixo dos valores encontrados nos extratos de folha da *E. suberosum* A.St.-Hil.

4.4 SAZONALIDADE DA ESPÉCIE *E. SUBEROSUM* A.ST.-HIL.

4.4.1 CORRELAÇÃO DO TEOR DE MARCADORES E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O nível de correlação entre os dados de atividade antioxidante de cada extrato, obtido no estudo de sazonalidade, e dados relativos ao teor de marcadores fitoquímicos determinados por CLAE foram estabelecidos utilizando a correlação linear de Pearson.

Para o teor de hiperosídeo, foram observadas correlações fortes positivas significativas entre a atividade antioxidante pelo ensaio com fosfomolibdênio e o teor de hiperosídeo de EA ($r= 0,9700$, $p= 0,0150$) (Figura 18) e entre a atividade redutora de DPPH• e o teor de hiperosídeo de EE ($r=0,9692$, $p=0,0154$) (Figura 19 e Tabela 7).

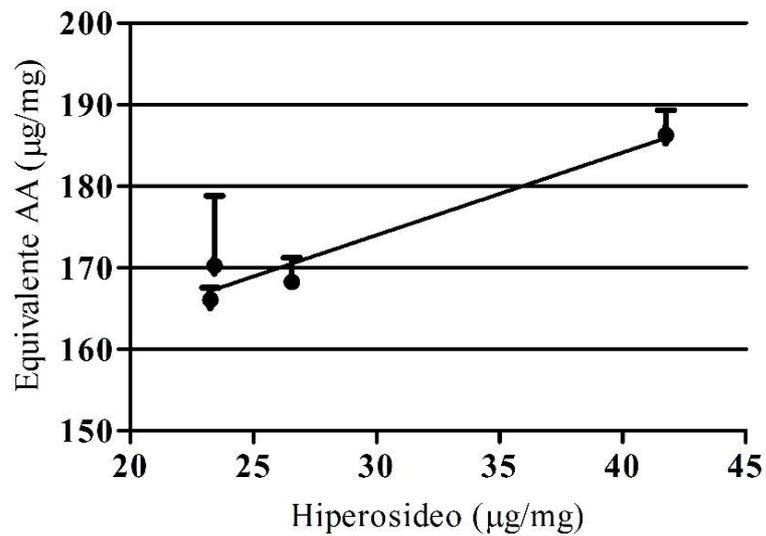


Figura 18: Correlação linear de Pearson entre atividade antioxidante pelo método com fosfomolibdênio e teor de hiperosídeo de EA. Dados representam a média \pm erro padrão (n=3) ($r= 0,9700$, $p= 0,0150$).

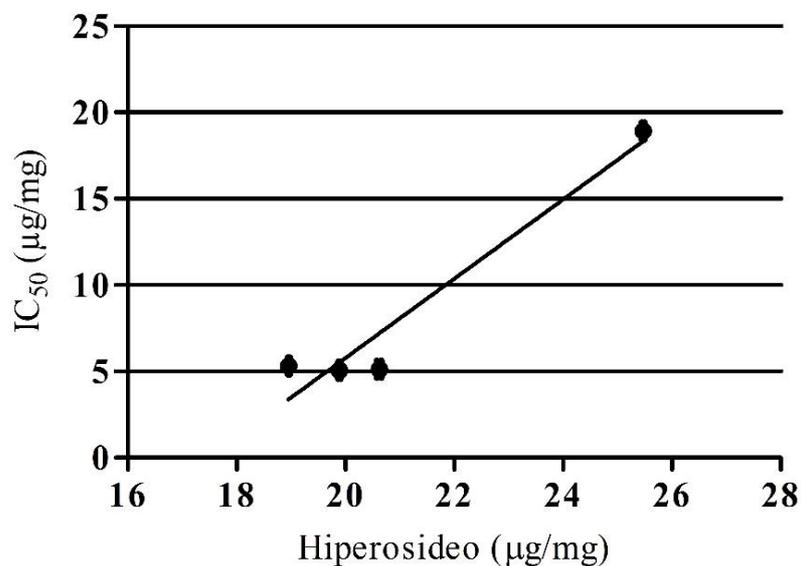


Figura 19: Correlação linear de Pearson entre atividade redutora de DPPH* e teor de hiperosídeo de EE. Dados representam a média \pm erro padrão (n=3) ($r= 0,9692$, $p= 0,0154$).

Tabela 7: Correlação linear de Pearson entre atividade antioxidante e teor de hiperosídeo de EA e EE.

	DPPH•		Fosfomolibdênio	
	<i>r</i>	p-valor	<i>r</i>	p-valor
EA	0,3608	0,3196	0,97	0,015
EE	0,9692	0,0154	-0,3389	0,3305

EA= extrato aquoso e EE= extrato etanólico *r* = coeficiente de correlação.

Em relação ao teor de isoquercitrina, foi observada correlação forte significativa entre a atividade antioxidante pelo ensaio com fosfomolibdênio e o teor de isoquercitrina de EA ($r= 0,9613$, $p= 0,0194$) (Figura 20). Foi observada também correlação forte não significativa entre atividade redutora de DPPH• e o teor de isoquercitrina de EE ($r= 0,7017$, $p= 0,1491$) (Figura 21). Além disso, uma correlação forte negativa não significativa foi observada entre atividade antioxidante pelo ensaio com fosfomolibdênio e o teor de isoquercitrina de EE ($r= -0,770$, $p= 0,1147$) (Tabela 8).

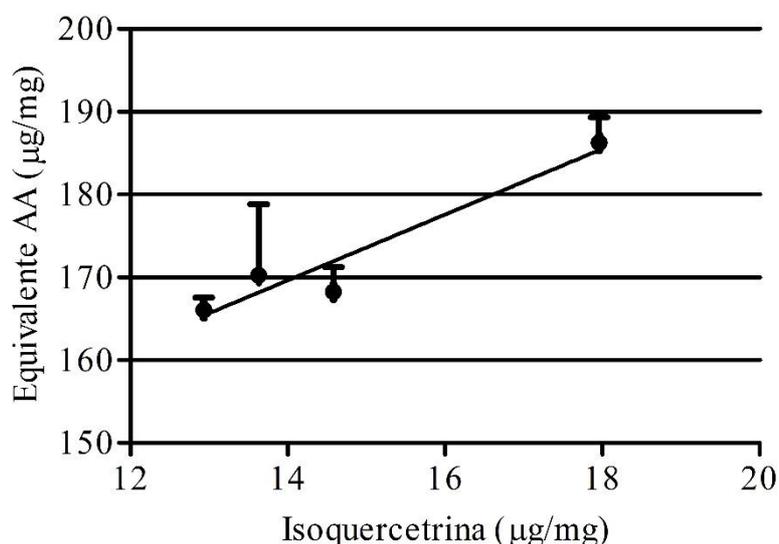


Figura 20: Correlação linear de Pearson entre atividade antioxidante pelo método com fosfomolibdênio e teor de isoquercitrina de EA. Dados representam a média \pm erro padrão ($n=3$) ($r= 0,9613$, $p= 0,0194$).

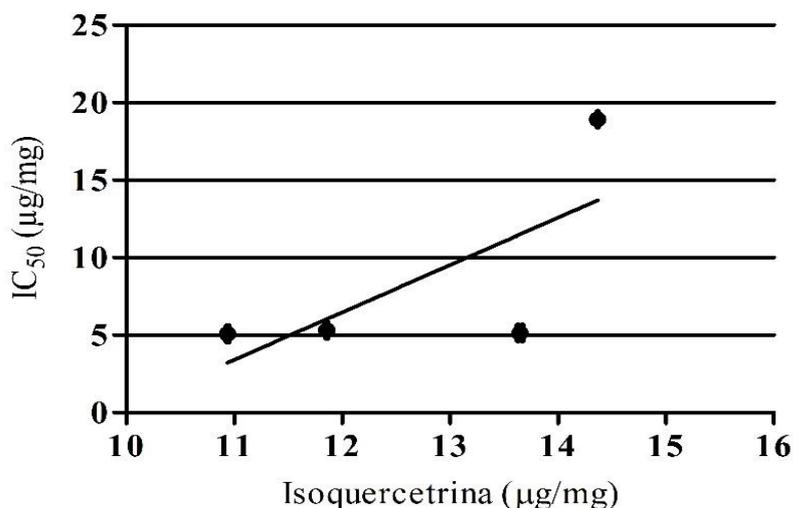


Figura 21: Correlação linear de Pearson entre atividade redutora de DPPH• e teor de isoquercitrina de EE. Dados representam a média \pm erro padrão (n=3) ($r=-0,770$, $p=0,1147$).

Tabela 8: Correlação linear de Pearson entre atividade antioxidante e teor de isoquercitrina de EA e EE.

	DPPH•		Fosfomolibdênio	
	<i>r</i>	p-valor	<i>r</i>	p-valor
EA	0,2197	0,3901	0,9613	0,0194
EE	0,7017	0,1491	-0,7706	0,1147

EA= extrato aquoso e EE= extrato etanólico r = coeficiente de correlação.

As correlações relativas ao EA indicaram que à medida que os teores de isoquercitrina e hiperosídeo aumentam, o poder antioxidante dos extratos pelo ensaio usando fosfomolibdênio também aumenta. Desta forma, a atividade antioxidante de EA foi atribuída em grande parte a estes flavonoides.

As correlações relativas ao EE indicaram que à medida que os teores de isoquercitrina e hiperosídeo aumentam, o poder antioxidante dos extratos pelo ensaio de atividade redutora de DPPH• diminui. Desta forma, a atividade redutora de DPPH• de EE não pode ser atribuída principalmente a estes flavonoides.

Vale a pena destacar que o EE apresentou uma forte correlação negativa entre a atividade antioxidante pelo ensaio com fosfomolibdênio e o teor de isoquercitrina. O

que indica que a medida que o teor de isoquercitrina aumenta, a atividade antioxidante também reduz.

Os flavonoides podem atuar como pró-oxidantes em altas concentrações. A atividade pró-oxidante pode ser considerada proporcional ao número total de grupos hidroxila, especialmente, aqueles presentes no anel B, devido à possibilidade de formação de radicais aroxila (BEHLING et al., 2004). Isso pode justificar o fato de maiores concentrações de extrato apresentarem menor atividade antioxidante.

4.4.2 CORRELAÇÃO VARIÁVEIS AMBIENTAIS E MARCADORES

O nível de correlação entre o teor de marcadores fitoquímicos e dados relativos às variáveis climáticas foi estabelecido utilizando a correlação linear de Pearson.

A Tabela 9 apresenta os coeficientes de correlação encontrados entre o teor de hiperosídeo e variáveis climáticas, tais como nível de precipitação, temperatura máxima, temperatura mínima e radiação global.

Foram observadas correlações fortes não significativas negativas entre o nível de precipitação e o teor de hiperosídeo de EA ($r = -0,7156$, $p = 0,1422$) e entre a temperatura mínima e o teor de hiperosídeo de EA ($r = -0,8750$, $p = 0,0625$). Foram observadas também correlações fortes não significativas positivas entre o nível de precipitação e o teor de hiperosídeo de EE ($r = 0,6260$, $p = 0,1870$) e entre a radiação global e o teor de hiperosídeo de EA ($r = 0,8069$, $p = 0,0966$); além de correlações moderadas não significativas entre temperatura máxima e o teor de hiperosídeo de EA ($r = 0,5925$, $p = 0,2038$) e temperatura mínima e o teor de hiperosídeo de EE ($r = 0,4936$, $p = 0,2531$) (Tabela 9).

Estas correlações mostram que à medida que a quantidade de chuva aumenta, o teor de hiperosídeo tende a diminuir nos extratos aquosos. Isto pode ser devido ao processo de lixiviação sofrido pelas folhas durante as chuvas (NOBREGA et al., 2009). Outra observação em relação ao teor de hiperosídeo em EA é que à medida que a temperatura reduz, o teor de hiperosídeo tende a aumentar. Além disso, à medida que a radiação global aumenta, o teor de hiperosídeo também tende a aumentar. Isto pode ser devido ao processo de defesa contra a radiação solar; hiperosídeo é um flavonoide, classe substâncias conhecida como protetores contra a radiação nas plantas (TREUTTER, 2005).

Tabela 9: Correlação linear de Pearson entre teor de hiperosídeo dos extratos de *E. suberosum* A.St.-Hil.e variáveis climáticas.

	Precipitação (mm)		Temp. max. (°C)		Temp. min. (°C)		Radiação global	
	<i>r</i>	p-valor		p-valor	<i>r</i>	p-valor	<i>r</i>	p-valor
EA	-0,716	0,1422	0,5925	0,2038	-0,875	0,0625	0,8069	0,0966
EE	0,626	0,187	-0,192	0,4039	0,4936	0,2531	-0,221	0,3894

EA= extrato aquoso e EE= extrato etanólico; Radiação global= Incidência de luz solar que penetra a superfície terrestre; Índice Pluviométrico = quantidade de chuva em determinado local e certo período; Temperatura Max. e Min.= Diferença de amplitude térmica.

A Tabela 10 apresenta os coeficientes de correlação encontrados entre o teor de isoquercitrina e as variáveis climáticas.

Para o extrato aquoso foi observada correlação forte não significativa negativa entre nível de precipitação e teor de isoquercitrina ($r = -0,7416$, $p = 0,1292$). Outra correlação forte não significativa, porém positiva, foi encontrada entre radiação global e teor de isoquercitrina ($r = 0,7261$, $p = 0,1370$). Foi encontrado também uma correlação forte significativa negativa entre temperatura mínima e teor de isoquercitrina para EA ($r = -0,9008$, $p = 0,0496$) (Figura 22).

Estas correlações mostram que à medida que o nível de precipitação aumenta, o teor de isoquercitrina reduz, semelhante ao observado no teor de hiperosídeo para o mesmo extrato. E ainda, mostram que à medida que a radiação global aumenta, o teor de isoquercitrina também aumenta, similar ao observado com o teor de hiperosídeo. Além disso, a medida que a temperatura reduz foi observado um aumento no teor de isoquercitrina.

Para o extrato etanólico foi observado correlações fortes não significativas negativas entre temperatura mínima e o teor de isoquercitrina ($r = -0,7469$, $p = 0,1265$); e entre radiação global e o teor de isoquercitrina ($r = -0,7786$, $p = 0,1107$).

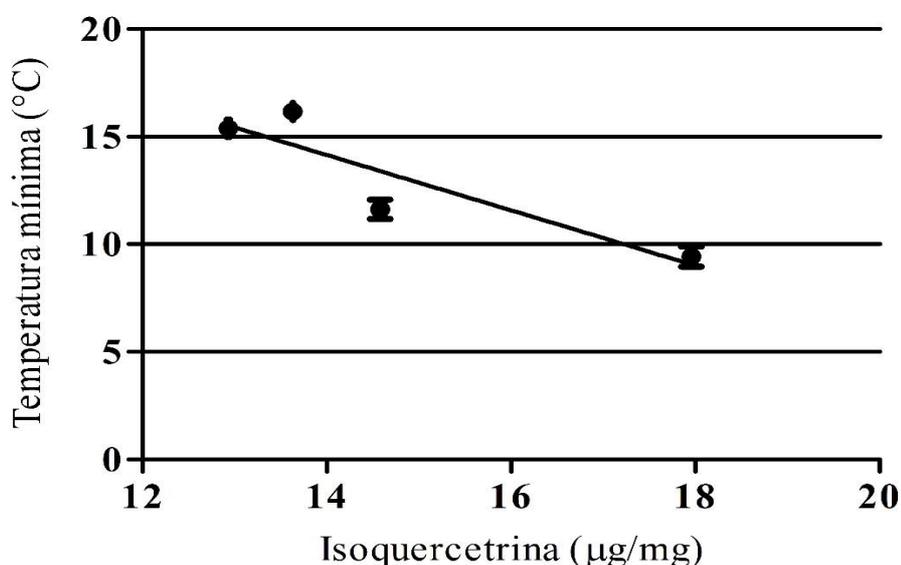


Figura 22: Correlação linear de Pearson entre temperatura mínima e teor de isoquercitrina de EA. Dados representam a média \pm erro padrão ($n=3$) ($r=-0,9008$, $p=0,0496$).

As correlações encontradas para EE mostram que à medida que a temperatura reduz e a radiação global aumenta, o teor de isoquercitrina aumenta. Isto pode ser devido ao processo de defesa contra a radiação solar, semelhante ao observado para hiperosídeo, pois isoquercitrina também é um flavonoide, classe substâncias conhecida como protetores contra a radiação nas plantas (TREUTTER, 2005).

Tabela 10: Correlação linear de Pearson entre teor de isoquercitrina dos extratos de *E. suberosum* A.St.-Hil. e variáveis climáticas.

	Precipitação (mm)		Temp. max. (°C)		Temp. min. (°C)		Radiação global	
	<i>r</i>	p-valor		p-valor	<i>r</i>	p-valor	<i>r</i>	p-valor
EA	-0,742	0,1292	0,4819	0,259	-0,901	0,0496	0,7261	0,137
EE	0,4967	0,2516	-0,747	0,1265	0,5487	0,2257	-0,779	0,1107

EA= extrato aquoso e EE= extrato etanólico; Radiação global= Incidência de luz solar que penetra a superfície terrestre; índice Pluviométrico = quantidade de chuva em determinado local e certo período; Temperatura Max. e Min.= Diferença de amplitude térmica.

Baccharis dracunculifolia, apresenta alterações em sua composição química pelo período sazonal, ocorrendo assim, uma modificação na sua ampla ação

biológica, dentre elas a atividade antioxidante FIGUEIREDO (2010). Deste modo, existe uma grande dificuldade da padronização dos efeitos da planta, devido ao período sazonal interferir no rendimento e na quantidade de compostos químicos (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

Outro trabalho corrobora com o fato de a variação de temperatura, exposição solar, quantidade de água, nutrientes, secagem armazenamento, poderem afetar de maneira significativa a matéria-prima e conseqüentemente, o valor terapêutico das plantas medicinais; se faz necessário a constância dos princípios ativos de uma planta, para que possa participar de um arsenal terapêutico reconhecido (SOUSA et al., 2007).

O nível de correlação entre os dados de atividade antioxidante de cada extrato, obtido no estudo de sazonalidade, e dados relativos às variáveis ambientais foram estabelecidos utilizando a correlação linear de Pearson. As variáveis ambientais foram agrupadas pela média dos valores dentro do mês de referência. As variáveis foram: nível de precipitação (mm), temperatura máxima (°C), temperatura mínima (°C) e radiação global ($MJm^{-2d^{-1}}$).

Para o ensaio de atividade antioxidante pelo ensaio com fosfomolibdênio, foram observada correlações fortes não significativas negativas entre a temperatura mínima e atividade antioxidante de EA ($r=-0,7513$, $p=0,1243$) e EE ($r=-0,7747$, $p=0,1126$). Foram observadas também correlações fortes não significativas positivas entre temperatura máxima e atividade antioxidante de EA ($r=0,6766$, $p=0,1617$) e EE ($r=0,7368$, $p=0,1316$). Ainda, há correlação forte significativa entre radiação global e EE ($r=0,9050$, $p=0,0475$). E correlação forte não significativa entre radiação global e EA ($r=0,8675$, $p=0,0662$), além de correlações moderadas negativas não significativas entre precipitação e atividade antioxidante de EA ($r=-0,5388$, $p=0,2306$) e EE ($r=-0,5937$, $p=0,2031$). Para o EH não foram observadas correlações moderadas ou fortes em comparação as variáveis testadas (Tabela 11).

Tabela 11: Correlação linear de Pearson entre a atividade redutora de fosfomolibdênio dos extratos de *E. suberosum* A.St.-Hil. e variáveis climáticas.

	Precipitação (mm)		Temp. max. (°C)		Temp. min. (°C)		Radiação global	
	<i>r</i>	p-valor	<i>r</i>	p-valor	<i>r</i>	p-valor	<i>r</i>	p-valor
EA	-0,539	0,2306	0,6766	0,1617	-0,751	0,1243	0,8675	0,0662
EE	-0,594	0,2031	0,7368	0,1316	-0,775	0,1126	0,905	0,0475
EH	0,0296	0,4852	-0,158	0,4211	0,2581	0,371	-0,323	0,3384

EA= extrato aquoso e EE= extrato etanólico; EH= extrato hexânico; Radiação global= Incidência de luz solar que penetra a superfície terrestre; índice Pluviométrico = quantidade de chuva em determinado local e certo período; Temperatura Max. e Min.= Diferença de amplitude térmica.

Para o ensaio de atividade antioxidante pelo ensaio com radical DPPH• foram observada correlações fortes não significativas positivas entre a precipitação e atividade redutora do radical DPPH• de EE ($r=0,7845$, $p=0,1078$) e entre temperatura mínima e atividade redutora do radical DPPH• de EE ($r=0,6452$, $p=0,1773$). Além de correlações moderadas positivas não significativas entre temperatura máxima e atividade redutora do radical DPPH• de EA ($r=0,5806$, $p=0,2097$); e entre radiação global e atividade redutora do radical DPPH• de EA ($r=-0,5182$, $p=0,2409$) (Tabela 12).

Tabela 12: Correlação linear de Pearson entre a atividade redutora de DPPH• dos

	Precipitação (mm)		Temp. max. (°C)		Temp. min. (°C)		Radiação global	
	<i>r</i>	p-valor	<i>r</i>	p-valor	<i>r</i>	p-valor	<i>r</i>	p-valor
EE	0,7845	0,1078	-0,05	0,4748	0,6452	0,1773	-0,148	0,4261
EA	-0,32	0,3399	0,5806	0,2097	-0,278	0,3609	0,5182	0,2409

extratos de *E. suberosum* A.St.-Hil.e variáveis climáticas.

EA= extrato aquoso e EE= extrato etanólico; Radiação global= Incidência de luz solar que penetra a superfície terrestre; índice Pluviométrico = quantidade de chuva em determinado local e certo período; Temperatura Max. e Min.= Diferença de amplitude térmica.

5.0 CONCLUSÃO

Como não há outros estudos que relatam resultados sobre o rendimento das folhas da *E. suberosum* A.St.-Hil., este é um ponto de partida para a validação de processos extrativos e uma avaliação destes, para melhor aplicação no material vegetal desta espécie promissora.

A avaliação do perfil cromatográfico da *E. suberosum* A.St.-Hil. permitiu a identificação dos compostos ativos: a isoquercitrina e hiperosídeo. O teor de hiperosídeo e isoquercitrina foram maiores nas coletas 1 ao 4, para os extratos EA. Os maiores teores destes flavonoides foram encontrados para EA1, que se refere a coleta de Agosto/2013, período de escassez hídrica no cerrado, sugerindo um aumento dos compostos flavonoides nesta época do ano, devido à sua ação fotoprotetora, impedindo uma grande exposição do tecido foliar da planta à radiação.

Em relação à atividade antioxidante, todos extratos apresentaram atividade em maior ou menor grau. Para o ensaio com radical DPPH•, foi verificada maior atividade antioxidante para o extrato EA2, com a atividade semelhante ao padrão BHT. Com exceção do extrato o EE2, todos os demais extratos apresentaram atividade antioxidante por redução do radical DPPH• de forma semelhante. Contudo, não foi possível determinar a atividade redutora de radical DPPH• para os extratos hexânicos devido a interferências metodológicas. Para o método de redução do complexo fosfomolibdênio, os extratos EA1 e EE1 apresentaram-se ligeiramente mais ativos que os demais extratos.

Foi possível estabelecer o nível de correlação entre a atividade antioxidante os teores de hiperosídeo e isoquercitrina dos extratos obtidos. As correlações relativas ao EA indicam que à medida que os teores de isoquercitrina e hiperosídeo aumentam, o poder antioxidante dos extratos pelo ensaio usando fosfomolibdênio também aumenta. Foram encontradas correlações fortes positivas significativas. Desta forma, a atividade antioxidante de EA pode ser atribuída em grande parte a estes flavonoides.

As correlações relativas ao EE indicam que à medida que os teores de isoquercitrina e hiperosídeo aumentam, o poder antioxidante dos extratos EE pelo ensaio de atividade redutora de DPPH• reduz. Desta forma, a atividade redutora de DPPH• de EE pode não ser atribuída principalmente a estes flavonoides.

Em relação à avaliação da sazonalidade das folhas da espécie *E. suberosum* A.St.-Hil. correlacionando as variáveis ambientais (temperatura, índice pluviométrico e radiação global) com o teor de hiperosídeo e isoquercitrina, foi observado que à medida a quantidade chuva aumenta, o teor de hiperosídeo e isoquercitrina tende a diminuir. E à medida que a temperatura reduz e que a radiação global aumenta, o teor de hiperosídeo e isoquercitrina tende a aumentar também.

Na avaliação da sazonalidade das folhas da espécie *E. suberosum* A.St.-Hil. correlacionando as variáveis ambientais (temperatura, índice pluviométrico e radiação global) e a atividade antioxidante, foi observado que à medida a quantidade chuva aumenta, a atividade redutora de DPPH* e fosfomolibdênio tendem a diminuir. E à medida que a temperatura e a radiação global aumentam, a atividade redutora de fosfomolibdênio tende a aumentar também. Isto corrobora com o aumento do teor de flavonoides nestas condições.

Para a atividade redutora de DPPH*, à medida que a radiação aumenta, a atividade tende a diminuir, apesar do aumento do teor dos flavonoides, isoquercitrina e hiperosídeo. Esta não correlação entre a radiação e atividade por DPPH* confirma a correlação negativa entre a atividade por DPPH* e o teor dos flavonoides.

Os resultados obtidos revelaram que para obter um extrato a partir das folhas de *E. suberosum* A.St.-Hil com maiores teores de isoquercitrina e hiperosídeo e maior atividade antioxidante, o melhor período de coleta é o mês de agosto. O melhor solvente extrativo para se obter melhores rendimentos destes flavonoides foi a água, utilizando processo de infusão.

Este projeto contribui com o desenvolvimento de pesquisas e inovação em plantas medicinais e fitoterápicos e com a valoração de plantas nativas do Bioma Cerrado.

6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITKEN, R. J.; JONES, K. T.; ROBERTSON, S. A. Reactive Oxygen Species and Sperm Function - In Sickness and In Health. **Journal of Andrology**, v. 33, n. 6, p. 1096–1106, 2012.

ALAGILLE, D; BALDWIN, R. M.; ROTH, B. L. et al. Functionalization at position 3 of the phenyl ring of the potent mGluR5 noncompetitive antagonists MPEP. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, n. 4, p. 945–949, 2005.

AMARAL, A.; LEONI, L. S. O gênero *Erythroxylum* P. Browne. (Erythroxylaceae) no município de Carangola, Minas Gerais. **Pabstia**, v. 3, p. 1–5, 1992.

AMES, B. N.; SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 17, p. 7915–7922, 1993.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN JR., L. V. Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos. In:_____. **Farmacotécnica**: 6. Ed, Premier São Paulo, 2000. p. 516–518.

ARULMOZHI, S.; MAZUMDER, P.; SATHIYANARAYANAM, L. et al. Anti-arthritic and antioxidant activity of leaves of *Alstonia scholaris* Linn. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 3, n. 2, p. 83–90, 2011.

AYRES, E.; DROMPH, K. M.; COOK, R. et al. The influence of below-ground herbivory and defoliation of a legume on nitrogen transfer to neighbouring plants. **Functional Ecology**, v. 21, n. 2, p. 256–263, 2007.

BALESTRIN, L.; DIAS, J. F. G.; MIGUEL, O. G. et al. Contribuição ao estudo fitoquímico de *Dorstenia multiformis* Miquel (Moraceae) com abordagem em atividade antioxidante. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 230–235, 2008.

BARBAR, D.; HARRIS, S. Oxygen free radicals and antioxidants: a review. *Journal of American Pharmacists Association*, v. 34, n. 9, p. 26–35, 1994.

BARBOSA, P.; HINES, J.; KAPLAN, I. et al. Associational Resistance and Associational Susceptibility: Having Right or Wrong Neighbors. **Evolutionary Ecology**, n. 40, p. 1–20, 2009.

BARMAN, N.; SHARMA, A.; KUMAR, A. Radical Scavenging and Antioxidant Potential of Nuts and Leaves Extracts of *Semecarpus anacardium* (L.). **American Journal of Plant Sciences**, v. 2013, n. August, p. 1679–1683, 2013.

BART, K.; WILLIAMS, E. Use of dental wax for the study of insect behavior by scanning electron microscopy. **Microscopy Research and Technique**, v. 26, n. 2, p. 180–181, 1993.

BEHLING, E.B.; SENDAO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C. B. et al. Flavonóide Quercetina : Aspectos Gerais. **Brazilian Journal of Food and Nutrition**, v. 15, n. 3, p. 285–292, 2004.

BERNAUD, F. S. R.; FUNCHAL, C. D. S. Atividade antioxidante do açaí. **Nutrição Brasil**, v. 10, n. 5, p. 310–316, 2011.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123–130, 1999.

BIERI, S.; BRACHET A.; JEAN-LUC, V. et al. Cocaine distribution in wild *Erythroxylum* species. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 103, n. 3, p. 439–447, 2006.

BLOIS, M. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. **Nature**, n. 181, p. 1199 – 1200, 1958.

BOHM, B. A.; GANDERS, F. R; PLOWMAN, T. Biosystematics and evolution of cultivated coca (*Erythroxylaceae*). **Systematic Botany**, n. 7, 121–133, 1982.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira**: Brasília, 2010. p.126.

BRITO, S. M. O.; COUTINHO, H. D. M.; TALVANI, A. et al. Analysis of bioactivities and chemical composition of *Ziziphus joazeiro* Mart. using HPLC–DAD. **Food Chemistry**, v. 186, n. 2015, p. 185–191, 2014.

BROOKS, J. S.; FEENY, P. Seasonal variation in *Daucus carota* leaf-surface and leaf-tissue chemical profiles. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, n. 9, p. 769–782, 2004.

BRUNETTI, C.; DI FERDINANDO, M.; POLLASTRI, S. et al. Flavonoids as antioxidants and developmental regulators: Relative significance in plants and humans. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 2, p. 3540–3555, 2013.

BUER, C. S.; MUDAY, G. K. The transparent testa4 mutation prevents flavonoid synthesis and alters auxin transport and the response of *Arabidopsis* roots to gravity and light. **The Plant cell**, v. 16, n. 5, p. 1191–1205, 2004.

CALLEGARI-JAQUES, S. M. **Bioestatística: Princípios e Aplicações**. Editora Artmed S.A.: São Paulo, 2003.

CARMONA, D.; FORNONI, J. Herbivores can select for mixed defensive strategies in plants. **New Phytologist**, v. 197, n. 2, p. 576–585, 2013.

CECHINEL-FILHO, V. Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: Estudos desenvolvidos no NIQFAR/UNIVALI. **Química Nova**, v. 680, n. 1, p. 1–5, 2000.

CHAVES, I.; Pokorny, R.; Byrdin, M. et al. The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals. **Annual review of plant biology**, v. 62, n. 3, p. 335–364, 2011.

CHITOSE, K.; LORRAIN, S.; HORNITSCHKEK, P. Chapter Two – Light-Regulated Plant Growth and Development. In:_____. Plant Development: Current Topics in Developmental Biology. **Elsevier**, 2010. v. 91.p. 29-66.

CHOI, Y.; JOSEPH R. ARRON; TOWNSEND, M. J. Promising bone-related targets for rheumatoid arthritis therapy. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 5, n. July 2009, p. 543–548, 2010.

CHUN, Y.; KLEUNEN, M.; DAWSON, W. The role of enemy release, tolerance and resistance in plant invasions: linking damage to performance. **Ecology Letters**, v. 13, n. 8, p. 937–946, 2010.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics:chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural product reports**, v. 26, n. 8, p. 1001–1043, 2009.

CRUZ, M. J. B.; DOURADO, E. F. N.; BODEVAN, E. C. et al. Uso de Plantas Medicinais por Famílias do Vale do Jequitinhonha. **Infarma**, v. 7, p. 38–48, 2015.

DALY, D.; SMITH, S. A.; MORI, A. Flowering plants of the neotropics. In:_____. The New York botanical garden. **Princeton University Press**, 2004. p. 143–145.

DÄR, A. Tecnologia farmacêutica. In:_____. **Zaragoza: Acribia**, 1981. v. 366.p.141 152.

DEL-VAL, E.; CRAWLEY, M. J. Are grazing increaser species better tolerators than decreasers? An experimental assessment of defoliation tolerance in eight British grassland species. **Journal of Ecology**, v. 93, n. 5, p. 1005–1016, 2005.

DENNY, A.; BUTTRISS, J. Plant foods and health: focus on plant bioactives. In:_____. Project Management Office/British Nutrition Foundation 2007: **EuroFIR**, 2007. n.4, p. 3–5.

DUARTE, A. F. S. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana do extrato etanólico bruto e frações orgânicas obtidas a partir da casca do caule da espécie Guettarda. **Revista de ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 4, p. 607–614, 2014.

FERREIRA, P. E. M.; MARTINI, R. K. Cocaína: lendas, história e abuso. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 23, n. 2, p. 96–99, 2001.

FIGUEIREDO, A. S. G. **Efeito da sazonalidade no perfil químico e na atividade antioxidante de Baccharis dracunculifolia (Asteraceae) e ação modulatória desta planta sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos**. 2010. 96f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

FILIPPIN, L. I.; VERCELINO, R.; MARRONI, N. P. et al. Redox signalling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 152, n. 3, p. 415–422, 2008.

FORNONI, J. Ecological and evolutionary implications of plant tolerance to herbivory. **Functional Ecology**, v. 25, n. 2, p. 399–407, 2011.

FORNONI, J.; VALVERDE, P. L.; NUNEZ-FARFAN, J. Quantitative genetics of plant tolerance and resistance against natural enemies of two natural populations of *Datura stramonium*. **Evolutionary Ecology Research**, n. 5, p. 1049–1065, 2003.

FORNONI, J.; VALVERDE, P.; NUNEZ-FARFAN, J. Population variation in the cost and benefit of tolerance and resistance against herbivory in *Datura stramonium*. **International Journal of Organic Evolution**, v. 58, n. 8, p. 1696–1704, 2004.

FRANKEL, E. N.; KANNER, J.; GERMAN, J. B. et al. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. **Lancet**, v. 341, n. 8843, p. 454–457, 1993.

FUCHS-TARLOVSKY, V. Role of antioxidants in cancer therapy. *Nutrition*, v. 29, n. 1, p. 15–21, 2013.

GASPAROTTO-JUNIOR, A.; PRADO, T. B. L.; LEME, T. S. U. et al. Mechanisms underlying the diuretic effects of *Tropaeolum majus* L. extracts and its main component isoquercitrin. ***Journal of Ethnopharmacology***, v. 141, n. 1, p. 501–509, 2012.

GENEVA. World Health Organization (WHO). The world medicines situation 2011. **Traditional Medicines: global situation, issues and challenges**, 2011. p.12.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas Mediciniais: Fatores de Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários. ***Química Nova***, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.

GRIFFIN, W.J; LIN, G.D. Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. ***Phytochemistry***, v. 53, p. 623-637, 2000.

HADJIGOGOS, K. The role of free radicals in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. ***Panminerva Medica***, v. 45, n. 1, p. 7–13, 2003.

HARTMANN, T. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. ***Phytochemistry***, v. 68, n. 22-24, p. 2831–2846, 2007.

HIGA, T.; Suetsugu, N.; Kong, S. et al. Actin-dependent plastid movement is required for motive force generation in directional nuclear movement in plants. ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America***, v. 111, n. 11, p. 4327–31, 2014.

HITCHON, C. A; EL-GABALAWY, H. S. Oxidation in rheumatoid arthritis. ***Arthritis research & therapy***, v. 6, n. 6, p. 265–278, 2004.

IBRAHIM, R. A forty-year journey in plant research: original contributions to flavonoid biochemistry. ***Canadian Journal of Botany***, v. 83, n. 5, p. 433–450, 2005.

IRACEMA, M.; LOIOLA, M.; AGRA, M. et al. Flora da Paraíba, Brasil: Erythroxyloaceae Kunth. **Acta Botânica Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 473–487, 2007.

ISHIBASHI, T. Molecular Hydrogen: New Antioxidant and Anti-inflammatory Therapy for Rheumatoid Arthritis and Related Diseases. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 35, p. 6375–6381, 2013.

ISLAMOVIĆ, B. I.; BALABANOVA, R. M.; FUNTIKOV, V. A. et al. Effect of bioresonance therapy on antioxidant system in lymphocytes in patients with rheumatoid arthritis. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 134, n. 3, p. 248–250, 2000.

IVANCHEVA, S.; MANOLOVA, N.; SERKEDJIEVA, S. et al. Polyphenols from Bulgarian medicinal plants. **Basic Life Sciences**, v. 59, p. 717–728, 1992.

IVIĆ, N. P. Skin aging. **Acta Dermato-venereologica**, v. 17, p. 47–54, 2008.

JAIN, S. S.; ASHOKKUMAR, M.; BIRD, R. P. Differential expression of TNF-signaling molecules and ERK1 in distal and proximal colonic tumors associated with obesity. **Tumor Biology**, v. 32, n. 5, p. 1005–1012, 2011.

JAKOBEK, L. Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. **Food Chemistry**, n. 175, p. 556–567, 2015.

JOGESH, T.; WONG, J. C. H.; STANLEY, M. C. et al. Impact of reassociation with a coevolved herbivore on oviposition deterrence in a hostplant. **Oecologia**, n. 176, p. 117–127, 2014.

JOYEUX, M.; MOITIER, F.; FLEURENTIN, J. Screening of antiradical, antilipoperoxidant and hepatoprotective effects of nine plant extracts used in caribbean folk medicine. **Phytotherapy Research**, n. 9, p. 228–230, 1995.

KADIRVE, G.; KUMAR, S.; GHOSH, S. K. et al. Activity of antioxidative enzymes in fresh and frozen thawed buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa in relation

to lipid peroxidation and semen quality. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v. 3, n. 3, p. 210–217, 2014.

KARBAN, R. The ecology and evolution of induced resistance against herbivores. **Functional Ecology**, v. 25, n. 2, p. 339–347, 2011.

KESSLER, A. The information landscape of plant constitutive and induced secondary metabolite production. **Current Opinion in Insect Science**, v. 47-53, p. 1–7, 2015.

KHANNA, D.; SHETI, G.; AHN, K. S. et al. Natural products as a gold mine for arthritis treatment. *Current Opinion in Pharmacology*, v. 7, n. 3, p. 344–351, 2007.

KONDO, T.; HIROSE, M.; KAGEYAMA, K. Roles of oxidative stress and redox regulation in atherosclerosis. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 16, n. 5, p. 532–538, 2009.

KOSTYUK, V. A.; POTAPOVICH, A. I.; SUHAN, T. O. et al. Antioxidant and signal modulation properties of plant polyphenols in controlling vascular inflammation. **European Journal of Pharmacology**, v. 658, n. 2-3, p. 248–256, 2011.

KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, n. 3, p. 217–233, 2011.

LANDIM, L. P.; FEITOZA, G. S.; DA COSTA, J. G. M. Development and validation of a HPLC method for the quantification of three flavonoids in a crude extract of *Dimorphandra gardneriana*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 1, p. 58–64, 2013.

LEITE, C. F. M.; LEITE, B. H. M.; GOMES, S. M. et al. Determination of rutin in *Erythroxyllum suberosum* extract by liquid chromatography: applicability in

standardization of herbs and stability studies. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 13, n. 2, p. 135–143, 2014.

LIMA, C. F.; VALENTAO, P. C. R.; ANDRADE, P. B. et al. Water and methanolic extracts of *Salvia officinalis* protect HepG2 cells from t-BHP induced oxidative damage. **Chemico-Biological Interactions**, v. 167, n. 2, p. 107–115, 2007.

LIMA, E. S.; SAES, D.; ABDALLA, P. Peroxidação lipídica : mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, p. 293–303, 2001.

LUCAS-FILHO, M. D. **Estudo Fitoquímico de Espécies do Gênero Erythroxylum com Potencial Atividade Vasodilatadora e Inibidora da Enzima Conversora de Angiotensina**. 118f. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas) – Escola de Farmácia, Ouro Preto, Minas Gerais, 2009.

MAHOMOODALLY, M. F.; SUBRATTY, A. H.; GURIB-FAKEN, A. et al. Traditional Medicinal Herbs and Food Plants Have the Potential to Inhibit Key Carbohydrate Hydrolyzing Enzymes In Vitro and Reduce Postprandial Blood Glucose Peaks In Vivo. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1–9, 2012.

MAIGA, A.; MALTERUD, K. E.; DIALLO, D. et al. Antioxidant and 15-lipoxygenase inhibitory activities of the Malian medicinal plants *Diospyros abyssinica* (Hiern) F. White (Ebenaceae), *Lannea velutina* A. Rich (Anacardiaceae) and *Crossopteryx febrifuga* (Afzel) Benth. (Rubiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, n. 1-2, p. 132–137, 2006.

MANACH, C. ; SCALBERT, A.; MORAND, C. et al. Polyphenols: Food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727–747, 2004.

MARIA, I.; VIOLANTE, P.; HAMERSKI, L. et al. Antimicrobial Activity of Some Medicinal Plants From the Cerrado of the Central- Western Region of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1302–1308, 2012.

MARINO, A.; PATERNITI, I.; CODARO, M. et al. Role of natural antioxidants and potential use of bergamot in treating rheumatoid arthritis. **PharmaNutrition**, v. 3, n. 2, p. 53–59, 2015.

MARTINS, D. H. N. **Avaliação da sazonalidade de compostos fenólicos e atividade antioxidante de folhas de Erythroxyllum daphnites Mart.** 2015. 102 f., il. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

MAURICIO, R. Natural selection and the joint evolution of tolerance and resistance as plant defenses. **Evolutionary Ecology**, v. 14, n. 4-6, p. 491–507, 2000.

MCKEY, D; ROSENTHAL, G. A.; JANZEN, D.H. The Distribution of Secondary Compounds within Plants. In:_____. **Herbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites**: Academic Press, 1979. p. 56-133.

MEISINGER, C.; BAUMERT, J.; KHUSEYINOVA, N.et al. Plasma Oxidized Low-Density Lipoprotein, a Strong Predictor for Acute Coronary Heart Disease Events in Apparently Healthy, Middle-Aged Men From the General Population. **American Heart Association**, n. 112, p. 651-657, 2005.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicryl- hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarín Journal of Science and Technology**, v. 26, n. December 2003, p. 211–219, 2004.

NASCIMENTO, C. J. D.; VIOLANTE, I. M. P.; GARCEZ, W.S. et al. Biologically active abietane and ent-kaurane diterpenoids and other constituents from *Erythroxyllum suberosum*. **Phytochemistry Letters**, v. 5, n. 2, p. 401–406, 2012.

NOBREGA, L. H. P.; LIMA, G. P.; MARTINS, G. I. et al. Germinação de sementes e crescimento de plantulas de soja (*Glycine max* L. Merrill) sob cobertura vegetal. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v.31, n. 3, p. 467–472, 2009.

OLIVEIRA, C. F. **Morfoanatomia, caracterização fitoquímica e avaliação das atividades biológicas de *Psychotria fractistipula* L.B. Sm., Klein & Delprete (RUBIACEAE)**. 2015. 101 f., il. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

OLIVEIRA, F. F.; AGUIAR, P. N. C.; RIBEIRO, G. J. G.; et al. Antioxidant Activity and Phytochemical Screening of Extracts of *Erythroxylum suberosum* A.St.-Hil (Erythroxylaceae). **Research Journal of Phytochemistry**, v. 9, n. 2, p. 68–78, 2015.

OLIVEIRA, M. F.; FONSECA, Y. M.; FONSECA, M. J. V. Desenvolvimento de formulações tópicas antioxidantes. **Cosmetics & Toiletries**, v. 2, p. 64–68, 2008.

PALHARES, D.; FRANCO, A. C.; ZAIDAN, L. P. Respostas fotossintéticas de plantas do cerrado nas estações seca e chuvosa. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, p. 213–220, 2010.

PALIOTO, G. F.; SILVA, C. F. G.; MENDES, M. P. Composição centesimal, compostos bioativos e atividade antioxidante de frutos de *Morinda citrifolia* Linn cultivados no Paraná. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, v. 17, n. 1, p. 59–66, 2015.

PAPAS, A. Diet and Antioxidant Status. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 9-10, p. 999–1007, 1999.

PEPATO, M. T.; KELLER, E. H.; BA, A. M. et al. Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats. **Ethnopharmacology**, v. 81, p. 191–197, 2002.

PEREIRA, C. A. M. **Estudo cromatográfico (HPLC, HPTLC, LCMS) e análise microscópica das folhas de espécies de Passiflora L.** 2002. 273f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

PIAO, X. L.; MI, X. Y.; JANG, Y. P. et al. Determination of hyperoside and 2"-acetylhyperoside from *Ligularia fischeri* by high performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 129, n. 1, p. 213–216, 2011.

PLOWMAN, T. C. New Species of *Erythroxyllum* from Brazil and Venezuela. In:_____. **Botanical Museum Leaflets - Harvard University**, v. 29, n. 4, p. 273–290, 1983.

PLOWMAN, T. C. Ten new species of *Erythroxyllum* (Erythroxyllaceae) from Bahia: Brazil. *Fieldiana: Botany*, v. 19, p. 1–41, 1987.

PLOWMAN, T. C.; STEVENS, W. D.; ULLOA, C. et al. **Erythroxyllaceae Kunth**. In:_____. *Monographs Systematic Botany Missouri Botanical Garden: Flora de Nicaragua*, 2001.v. 85. p. 834–838.

PLOWMAN, T. Four New Species of *Erythroxyllum* (Erythroxyllaceae) from Northeastern Brazil. **Brittonia - The New York Botanical Garden**, v. 38, n. 3, p. 189–200, 1986.

PLOWMAN, T.; HENSOLD, N. Names, types, and distribution of neotropical species of *Erythroxyllum* (Erythroxyllaceae). **Brittonia**, v. 56, n. 1, p. 1–53, 2004.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, n. 269, p. 337–341, 1999.

RALL, L. C.; ROUBENOFF, R.; MEYDANI, S. N. et al. Urinary 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) as a marker of oxidative stress in rheumatoid arthritis and aging: Effect of progressive resistance training. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 11, n. 11-12, p. 581–584, 2000.

RAMPRASATH, V. R.; SHANTHI, P.; SACHDANANDAM, P. Evaluation of antioxidant effect of *Semecarpus anacardium* Linn. nut extract on the components of immune system in adjuvant arthritis. **Vascular Pharmacology**, v. 42, n. 4, p. 179–186, 2005.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603–613, 2001.

RIBEIRO, A. Q.; LEITE, J. P. V.; DANTAS-BARROS, A. M. Artigo Perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob a influência da legislação nacional. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 1, p. 65–70, 2005.

RIBEIRO, E.; LIMA, M. O ; LIMA L. S; et al. A new tropane alkaloid and other constituents of *Erythroxylum rimosum* (Erythroxylaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 6, n. 2, p. 232–235, 2013.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 4, p. 152–159, 1997.

RODRIGUEZ, D. Latin American food sources of carotenoids. **Archivos Latino Americanos de Nutrición**, v. 49, p. 74S–84S., 1999.

SANTOS, M. P. papel das Vitaminas Antioxidantes na Prevenção do Envelhecimento Cutâneo. **Acadêmica do Curso de Nutrição da Universidade do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul**, p. 1–16, 2012.

SANNIGRAHI, S.; MAZUDER, U. K.; PAL, D. K. et al. 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.

SCHAT, M.; BLOSSEY, B. Influence of natural and simulated leaf beetle herbivory on biomass allocation and plant architecture of purple loosestrife (*Lythrum salicaria* L.). **Bio One**, v. 34, n. 4, p. 906–914, 2005.

SCHMIDT, S.; BALDWIN, I. T. Down-regulation of systemin after herbivory is associated with increased root allocation and competitive ability in *Solanum nigrum*. **Oecologia**, v. 159, n. 3, p. 473–482, 2009.

SILVA, C. G.; HERDEIRO, R. S.; MATHIAS, C. J. et al. Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. **Pharmacological Research**, v. 52, n. 3, p. 229–233, 2005.

SONG, R. J.; ZHOU, J. Microemulsion liquid chromatographic method for simultaneous separation and determination of six flavonoids of *Apocynum venetum* leaf extract. **Journal of Chromatography B**, v. 995, p. 8–14, 2015.

SOUSA, C. D. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, p. 351–355, 2007.

STEVENS, M. T.; KRUGER, E. L.; LINDROTH, R. L. Variation in tolerance to herbivory is mediated by differences in biomass allocation in aspen. **Functional Ecology**, v. 22, n. 1, p. 40–47, 2008.

STINCHCOMBE, J. R. Can tolerance traits impose selection on herbivores?. **Evolutionary Ecology**, n. Janzen 1980, p. 595–602, 2003. Universidade do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, p. 1–16, 2012.

TAN, L.; JI, T. JIANG, G. et al. Simultaneous identification and quantification of five flavonoids in the seeds of *Rheum palmatum* L. by using accelerated solvent extraction and HPLC–PDA–ESI/MSn. **Arabian Journal of Chemistry**, 2014.

TAN, X.J.; LI, Q.; CHEN, X. H. et al. Simultaneous determination of 13 bioactive compounds in *Herba Artemisiae Scopariae* (Yin Chen) from different harvest seasons by HPLC-DAD. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 47, n. 4-5, p. 847–53, 5 ago. 2008.

TAYLOR, L. P.; GROTEWOLD, E. Flavonoids as developmental regulators. **Elsevier**, n. 8, p. 317–323, 2005.

TREUTTER, D. Significance of Flavonoids in Plant Resistance and Enhancement of Their Biosynthesis. **Plant Biology Journal**, v. 7, p. 581–591, 2005.

TREVISAN, D. P. V. **Determinação do Pontencial Antimicrobiano de Extratos de Folhas de *Byrsonima pachyphylla* griseb.** 2013.46f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia e Bioquímica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2013.

TRICHOPOULOU, A.; COSTACOU, T.; BAMEA, C. et al. Adherence to a Mediterranean Diet and Survival in a Greek Population. **British Medical Journal**, v. 348, n. 26, p. 2599–2608, 2003.

VALENTOVA, K.; JIRI, V.; BANCIROVA, M. et al. Isoquercitrin: Pharmacology, toxicology, and metabolism. **Food and Chemical Toxicology**, v. 68, p. 267–282, 2014.

VEBER, J. Determinação dos compostos fenólicos e da capacidade antioxidante de extratos aquosos e etanólicos de Jambolão (*Syzygium cumini* L.). **Revista Brasileira de plantas medicinais**, v. 17, n. 2, p. 267–273, 2015.

VENKATESHA, S. H.; BERMAN, B. M.; MOUDGIL, K. D. Herbal medicinal products target defined biochemical and molecular mediators of inflammatory autoimmune arthritis. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 21–29, 2011.

VERAS, R. Envelhecimento populacional contemporâneo: demandas, desafios e inovações. **Revista de Saúde Pública**, v. 43, n. 3, p. 548–554, 2009.

VERPOORTE, R.; ALFERMANN, A. W. Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism. In:_____. **Plant Cell: Tissue and Organ Culture**. Kluwer Academic Publishers: Netherlands, 2000.v. 68, p. 211–212.

VIEIRA, S. H.; SÓLON, S.; VIEIRA, M.C. et al. Artigo Levantamento de fitoterápicos manipulados em farmácias magistrais de Dourados-MS. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. November 2008, p. 28–34, 2010.

WAGNER, H.; WISENAUER, M. Farmacologia e Aplicações Clínicas Fitoterapia. In:_____. **Fitofármacos: Pharmabooks**. 2ª edição. São Paulo, 2006.

WAGNER, H.; BLADT, S. Flavonoid Drug Including Ginko biloba and Equinaceae. In:_____. **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography**. Atlas.2ª Edition. New York: Springer Verlag, 2001. p. 210-211.

WANG, C. H.; WANG, Y. X.; LIU, H. J. Validation and application by HPLC for simultaneous determination of vitexin-2''-O-glucoside, vitexin-2''-O-rhamnoside, rutin, vitexin, and hyperoside. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 1, n. 4, p. 291–296, 2011.

WIERMANN, R. Secondary plant products and cell and tissue differentiation.**The Biochemistry of Plants**, v. Academic P, n. Conn, E.E., p. 85–137, 1980.

WILLIAMS, M. J. A.; SUTHERLAND, W. H. F.; WHELAN, A. P. et al. Acute Effect of Drinking Red and White Wines on Circulating Levels of Inflammation-Sensitive Molecules in Men With Coronary Artery Disease. **Metabolism**, v. 53, n. 3, p. 318–323, 2004.

WILLIAMSON, G.; MANACH, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans.II.Review of 93 intervention studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, p. 243S–255S, 2005.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae). **South African Journal of Botany**, v. 89, p. 164–175, 2013.

WINK, M. Evolutionary advantage and molecular modes of action of multi-component mixtures used in phytomedicine. **Current drug metabolism**, v. 9, n. 10, p. 996–1009, 2008.

WINK, M. Functions and biotechnology of plant secondary metabolites. Annual Plant Reviews. **Wiley-Blackwell**, v. 39, 2010.

WONGA, C.; CHENG, Y. W.; LIND, Y. Tannins and Human Health: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, n. 6, p. 421–464, 1998.

XIAO, C.; LI, J.; DONG, X. et al. Anti-oxidative and TNF- α suppressive activities of puerarin derivative (4AC) in RAW264.7 cells and collagen-induced arthritic rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 666, n. 1-3, p. 242–250, 2011.

YUAN, H.; GONG, A.; YOUNG, C. Y. F. Involvement of transcription factor Sp1 in quercetin-mediated inhibitory effect on the androgen receptor in human prostate cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 4, p. 793–801, 2005.

ZHANG, J.; ZHAO, F. XIAOLING, Y. et al. Pharmacokinetics of eupalinolide A, eupalinolide B and hyperoside from *Eupatorium lindleyanum* in rats by LC/MS/MS. **Journal of chromatography.B**, v. 995-996C, p. 1–7, 2015.

ZOCCARATO, F.; CAVALLINI, L.; BORTOLAMI, S. et al. Succinate modulation of H₂O₂ release at NADH: ubiquinone oxidoreductase (Complex I) in brain mitochondria. **The Biochemical journal**, v. 406, n. 1, p. 125–129, 2007.

ZUANAZZI, J. A S; TREMEA, V; LIMBERGER, R. P. et al. Alkaloids of Erythroxyllum (Erythroxyllaceae) species from Southern Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, n. 8, p. 819–825, 2001.