



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
CURSO DE QUÍMICA INDUSTRIAL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE DOURADOS



DIEGO CEGÓBIA FERREIRA

**PERFIL FITOQUÍMICO E POTENCIAL ANTIOXIDANTE,
ANTIPROLIFERATIVO E ANTICOLINESTERÁSICO DE**

Psychotria capillacea Müll. Arg. (Rubiaceae)

DOURADOS

2016

DIEGO CEGÓBIA FERREIRA

**PERFIL FITOQUÍMICO E POTENCIAL ANTIOXIDANTE,
ANTIPROLIFERATIVO E ANTICOLINESTERÁSICO DE
Psychotria capillacea Müll. Arg. (Rubiaceae)**

*Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de
Química Industrial da Universidade Estadual de Mato Grosso
do Sul, como requisito para a obtenção do título de graduado
em Química Industrial, sob orientação da Professora Dra.
Anelise Samara Nazari Formagio*

DOURADOS

2016

F44f Ferreira, Diego Cegóbia

Perfil fitoquímico e potencial antioxidante, antiproliferativo e anticolinesterásico de *Psychotria capillacea* Müll. Arg. (Rubiaceae)/ Diego Cegóbia. Dourados, MS: UEMS, 2016.

54p.; 30cm.

Monografia (Graduação) – Química Industrial – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2016.

Orientadora: Profa. Dra. Anelise Samara Nazari Formagio.

1. Alzheimer 2. Estresse Oxidativo 3. Câncer I. Título

CDD 23.ed. 615.375

BANCA EXAMINADORA

Orientadora Profa. Dra. Anelise Samara Nazari Formagio
Biologia Geral – Bioprospecção – UFGD

MSc. Carla Roberta Ferreira Volobuff
Doutoranda – Ciências da Saúde – UFGD

Prof. Dr. Jonas da Silva Mota
Química Licenciatura – UEMS

Dourados, __ de _____ de 2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter sido fonte de minhas energias para que eu pudesse concluir esse trabalho.

Agradeço de forma incansável minha orientadora Prof^a Dr^a Anelise Samara Nazari Formagio, pelos ensinamentos e orientação, também agradeço pelos puxões de orelha quando necessários, pois tudo isso me fez crescer como químico e como pessoa.

Aos meus pais e familiares, que me incentivaram todos os anos que estive na faculdade.

Aos meus irmãos, que mesmo distantes de minha realidade acadêmica, indiretamente contribuíram para que esse trabalho se realizasse.

Agradeço a minha namorada Carla Fernanda Batista e aos meus amigos Jéssica e Lucas, que sempre estiveram presentes nos momentos de alegrias e tristezas durante o curso. Afinal foram muitas noites de conversas, discussões e risadas. Agradeço também ao meu amigo Pedro Cruz de Oliveira Junior, que me ajudou muito nessa reata final do curso.

Aos meus colegas de laboratório: Carla, Yara, Marciane, Raquel, Thiago, Karolyni, Isabela, Hariane, Kamilla, Lucas, Jacenir, Camila, Matheus e demais colegas, que batalharam ao meu lado na pesquisa, e festejaram comigo nosso sucesso nos inúmeros congressos que participamos.

Agradeço de coração à Técnica Suzana pela amizade, boas conversas, e pelos conselhos sempre valiosos. Como todos do laboratório dizem “Nossa Mãezona”.

Enfim, agradeço ao CNPq pela concessão da bolsa de iniciação científica durante dois anos, aos meus professores e demais pessoas que fizeram parte dessa etapa decisiva de minha vida.

Obrigado.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%AA	–	porcentagem de atividade antioxidante
%I	–	porcentagem de inibição
786-0	–	linhagem celular cancerígena renal
a. C	–	antes de cristo
AE	–	atividade enzimática
ABS	–	Absorbância
Ach	–	neurotransmissor acetilcolina
AChE	–	enzima acetilcolinesterase
BG-250	–	comassiê brilliant blue
BHA	–	butil-hidróxi-anisol
BHT	–	butil-hidróxi-tolueno
CE	–	equivalentes de catequina
CEUA	–	Comissão de Ética no Uso de Animais
ChAT	–	enzima Acetiltransferase
cm	–	Centímetro
DA	–	doença de Alzheimer
DMSO	–	dimetilsufóxido de sódio
DNA	–	ácido desoxirribonucleico
DPPH	–	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
DTNB	–	5,5-ditiobis-2-nitrobenzoato
EMPC	–	extrato metanólico de <i>P. capillacea</i>

ERNs	– espécies reativas de nitrogênio
EROs	– espécies reativas de oxigênio
ERs	– espécies reativas
FCC	– fator de correção da concentração de proteína
AGE	– equivalentes de ácido gálico
HaCat	– linhagem celular não-cancerígena de queratinócitos
CLAE	– Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HT-29	– linhagem celular cancerígena de cólon
IC ₅₀	– concentração necessária para inibir 50% a oxidação
K-562	– linhagem celular cancerígena de leucemia
Km	– Quilômetro
LC ₅₀	– concentração que mata 50% da população celular
MCF7	– linhagem celular cancerígena de mama
MDA-TBARS	– malondialdeído – ácido tiobarbitúrico
NCI	– National Câncer Institute
NCI/ADR-RES	– linhagem celular cancerígena de ovário resistente
NCI-460	– linhagem celular cancerígena de fígado
OVCAR-3	– linhagem celular cancerígena de ovário
PCO-3	– linhagem celular cancerígena de próstata
PEVRI	– Parque Estadual do Rio Ivinhema
pH	– potencial hidrogeniônico
PN	– produtos naturais

QE	–	equivalentes de quercetina
RL	–	radicais livres
RPMI 1640	–	meio de cultura Roswell Park Memorial Institute 1640
SFB	–	soro fetal bovino
SNC	–	sistema nervoso central
SRB	–	suforrodamina-B
TCA	–	ácido tricloroacético
TGI	–	concentração que inibe em 100% o crescimento celular
U251	–	linhagem celular cancerígena de glioma

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Zonas climáticas continentais	17
Figura 2	- Biossíntese de alcaloides polindólicos a partir do L-triptofano	18
Figura 3	- Rota Biossintética de alcaloides indol-monoterpênicos	18
Figura 4	- Metabólitos secundários com atividades biológicas comprovadas, isolados de <i>P. oleoides</i>	19
Figura 5	- Fotografia com exemplar da espécie <i>P. capillacea</i> seguida de sua classificação	20
Figura 6	- Estruturas dos principais fármacos derivados de plantas medicinais empregados no tratamento do câncer	23
Figura 7	- Ilustração exemplificando o funcionamento de um neurônio durante um estímulo nervoso	25
Figura 8	- Fármacos empregados no tratamento de DA	26
Figura 9	- Reação fotocolorimétrica do DPPH em meio antioxidante	37
Figura 10	- Reação fotocolorimétrica entre o ácido 2-tiobarbitúrico e o malondialdeído, formando o composto colorido (rosa)	39
Figura 11	- Reação fotocolorimétrica do neurotransmissor ACh com o reagente de Ellman	43

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	-	Concentração de fenóis totais, flavonoides, taninos condensados e flavonol presentes no EMPC	36
Gráfico 2	-	Curva analítica expressando a regressão linear para atividade antioxidante de EMPC pelo método de DPPH	39
Gráfico 3	-	Curva analítica da inibição da peroxidação lipídica empregando o EMPC	40
Gráfico 4	-	Atividade antiproliferativa do extrato metanólico frente a 10 linhagens de células tumorais	41
Gráfico 5	-	Potencial anticolinesterásico do EMPC expressa em atividade enzimática de AChE	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Valor de concentração a ser corrigida	34
Tabela 2	- Avaliação da atividade antioxidante do extrato metanólico de quatro espécies de <i>Psychotria</i> pelos métodos DPPH, β -caroteno/ ácido linoleico e MDA-TBARS	40
Tabela 3	- IC ₅₀ e TGI do extrato metanólico de <i>Psychotria capillacea</i> e padrão Doxorrubicina ($\mu\text{g/mL}$) em várias linhagens de células tumorais	41
Tabela 4	- Atividade enzimática do EMPC acompanhada pelos respectivos desvios-padrões	44
Tabela 5	- Atividade enzimática do Controle acompanhada pelos respectivos desvios-padrões	44

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1	<i>O gênero Psychotria</i>	17
2.2	<i>Psychotria capillacea Müll. Arg.</i>	20
2.3	<i>Estresse oxidativo</i>	21
2.4	<i>Câncer</i>	22
2.5	<i>Doença de Alzheimer</i>	24
3.	OBJETIVOS	27
3.1	<i>Objetivo geral</i>	27
3.2	<i>Objetivos específicos</i>	27
4.	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1	<i>Preparação do extrato metanólico</i>	28
4.2	<i>Teor de constituintes</i>	28
4.2.1	<i>Concentração de fenóis totais</i>	28
4.2.2	<i>Concentração de flavonóides totais</i>	28
4.2.3	<i>Concentração de taninos condensados</i>	29
4.2.4	<i>Concentração de flavonol</i>	29
4.3	<i>Avaliação da atividade antioxidante</i>	29
4.3.1	<i>Método de sequestro de radicais livre DPPH</i>	29
4.3.2	<i>Método de cooxidação do β-caroteno/ácido linoleico.....</i>	30
4.3.3	<i>Modelo de experimentação animal</i>	30
4.3.4	<i>Avaliação da atividade antioxidante empregando MDA como biomarcador</i>	31
4.4	<i>Atividade antiproliferativa do EMPC</i>	32
4.5	<i>Avaliação do potencial anticolinesterásico do EMPC</i>	33
4.5.1	<i>Quantificação de proteínas</i>	34
4.5.2	<i>Avaliação do Potencial anticolinesterásico In vitro</i>	34
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1	<i>Teor de constituintes</i>	36
5.2	<i>Avaliação da atividade antioxidante</i>	37
5.2.1	<i>Método de sequestro de radicais livre DPPH</i>	37
5.2.2	<i>Método de cooxidação do β-caroteno/ ácido linoleico</i>	38
5.2.3	<i>Avaliação da atividade antioxidante empregando MDA como biomarcador</i>	39

5.3	<i>Atividade antiproliferativa do EMPC</i>	40
5.4	<i>Avaliação do potencial anticolinesterásico do EMPC</i>	42
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
8.	ANEXOS	54

RESUMO

O estresse oxidativo é um dos principais desencadeadores de doenças degenerativas, como câncer e Alzheimer, danificando principalmente a membrana celular, o que prejudica a permeabilidade da célula, também podendo acarretar mutações genéticas. Em contrapartida a essas doenças diversos fármacos foram desenvolvidos corroborados pelo uso de produtos naturais. O gênero *Psychotria* é o maior da família Rubiaceae e possui cerca de 1400 a 2000 espécies com vasta distribuição na zona tropical. Os extratos de algumas espécies desse gênero possuem um amplo espectro de atividades relatadas na literatura, sendo estas empregadas na medicina popular como infusão para tratar doenças brônquicas, distúrbios reprodutivos, doenças gastrointestinais e dores de cabeça. Neste contexto o presente estudo relata a quantificação dos constituintes do extrato metanólico de *P. capillacea* (EMPC), assim como avaliação de seu potencial antioxidante, antiproliferativo e anticolinesterásico. O EMPC foi preparado a partir das folhas e galhos de *Psychotria capillacea* coletados na região de Dourados-MS, com posterior análise de teor de constituintes (fenóis, flavonoides, flavonol e taninos condensados) e avaliação dos potenciais antioxidante (DPPH, cooxidação do β -caroteno/ácido linoleico e MDA-TBARS), antiproliferativo e anticolinesterásicos. O EMPC apresentou elevada concentração de taninos condensados (439,21 mg (CE) / g extrato) e flavonol (541,29 mg QE / g de extrato) comparado a valores relatados anteriormente na literatura. O EMPC também demonstrou elevada atividade antioxidante no método de DPPH ($IC_{50} = 16,60 \mu\text{g/mL}$), e moderada atividade antioxidante nos métodos de cooxidação do β -caroteno/ác. Linoleico (%AA = 46,48) e MDA-TBARS ($IC_{50} = 82,09 \mu\text{g/mL}$), quando comparados ao controle BHT (16,72 $\mu\text{g/mL}$, 91.20 % de AA e 75,69 $\mu\text{g/mL}$). O EMPC apresentou atividade e seletividade frente a linhagem celular de ovário (OVCAR-3) com GI_{50} de 2,23 $\mu\text{g/mL}$. O EMPC demonstrou atividade anticolinesterásica no modelo *In vitro* utilizando enzimas extraídas de cérebro de ratos, apresentando os melhores resultados nas concentrações 2,5 mg/mL ($4,03 \pm 0,16 \mu\text{mol}$ de ACh hidrolisada x hora⁻¹/mg de proteína) da estrutura cerebral hipocampo onde apresentou menor taxa de hidrólise quando comparado ao controle ($12,37 \pm 5,81 \mu\text{mol}$ de ACh hidrolisada x hora⁻¹/mg de proteína). No entanto ensaios *in vivo* de modelos antioxidantes e anticolinesterásicos são cruciais para caracterizar o EMPC como antioxidante biológicos e inibidor colinesterásico.

Palavras-chaves: Alzheimer; estresse oxidativo; câncer; cafezinho

1. INTRODUÇÃO

O emprego de plantas medicinais para tratamento de doenças segue as civilizações desde os primórdios de sua existência. De acordo com Rezende e Cocco (2002) os primeiros achados de uso de plantas para tratamento de doenças datam de mais de sessenta mil anos, sendo as descobertas realizadas em ruínas no Irã.

Os primeiros registros escritos de fitoterápicos foram datados a 3000 a. C, localizados na China. Onde o imperador da época se encarregou de catalogar 365 ervas medicinais e venenos que eram empregados pela comunidade, elaborando assim o primeiro herbário que se tem notícia até hoje. Esse meio de tratamento utilizando o conhecimento popular seguiu crescendo até o final da segunda Revolução Industrial (FRANÇA, 2008).

Até final do século XIX a fitoterapia era a principal forma de tratamento, no entanto com o avanço tecnológico proporcionado pelo advento da síntese de fármacos em larga escala acabou desestimulando, no decorrer do tempo, o uso de plantas medicinais para tratar enfermidades. Entretanto este cenário vem mudando gradualmente, inclusive no Brasil (Decreto nº 5.813/2006).

O uso de plantas medicinais no Brasil tem suas origens enraizadas na cultura indígena, sendo também influenciada pela cultura africana e portuguesa, dando origem a uma ampla medicina popular. Atualmente com a implantação de programas e políticas nacionais, houve incentivo para o uso de novas alternativas medicamentosas frente aos fármacos sintéticos. Pode-se destacar a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, inserida no ano de 2006, que tem por finalidade garantir acesso consciente e seguro de plantas e fitoterápicos, estimulando o uso sustentável da biodiversidade seguido do crescimento da cadeia produtiva e da indústria nacional, e por sua vez favorecendo a pesquisa científica das plantas medicinais (ALVES e SILVA, 2003).

Além do incentivo dado pelo governo, outro fator que favorece o uso popular de fitoterápicos, são os estudos científicos sobre as espécies utilizadas. Neste quesito o Brasil está se aperfeiçoando, já que o mesmo possui a maior biodiversidade do planeta, contando com cerca de 20% de todas as espécies da Terra (BRASIL, 2016 (a)).

Toda biodiversidade do país está disposta em 8,5 milhões de Km² ocupando quase metade de toda América do Sul. Por possuir uma extensão continental o Brasil guarda diversos biomas com zonas climáticas distintas, tais como, Floresta Amazônica, maior floresta tropical

úmida do planeta; Pantanal, maior planície inundável; Cerrado de savanas e bosques, Pampas gaúchos e Mata Atlântica (BRASIL, 2016 (a)).

Todos esses biomas contam com cerca de 56.000 espécies de plantas catalogadas dispostas em suas extensões territoriais. O progresso da conservação e restauração de tal biodiversidade depende, inicialmente, da sensibilização e do conhecimento das espécies em relação à sua importância para o meio ambiente e para o homem (BRASIL, 2016 (b)).

Grande parte dos recursos terapêuticos modernos, constituídos por medicamentos que atuam especificamente sobre receptores, canais aniônicos e sítios enzimáticos de clivagem, não teriam sido descobertos sem a contribuição dos produtos naturais, principalmente das plantas superiores. No mercado mundial 59% dos fármacos são produzidos sinteticamente, os outros 41% são provenientes de fontes de produtos naturais (PN). Destes, 25% de plantas, 13% dos microrganismos e 3% de animais. No caso de drogas para tratamento de câncer, esse percentual aumenta para 70% no uso de PN oriundo de plantas medicinais (CALIXTO 2003).

De acordo com Simões (2001), a produção dos compostos responsáveis pela atividade biológica e farmacológica das plantas ocorre na via metabólica da mesma, e os produtos são divididos em metabólitos primários (lipídios, carboidratos, proteínas, dentre outros) e os secundários (alcaloides, flavonoides, terpenos e outros). Os metabólitos primários têm como função suprir as necessidades estruturais e metabólicas da planta como um todo. Já os metabólitos secundários possuem aplicabilidade para defesa e reprodução, encontrados em maior quantidade no período de inflorescência ou quando a planta é submetida a uma condição adversa. Sendo os metabólitos secundários os principais responsáveis pelas atividades biológicas e farmacológicas das plantas, por sua vez, um alvo altamente desejado das pesquisas científicas. Os metabólitos secundários também são empregados como marcadores quimiotaxonômicos para distinguir Famílias, Gêneros e Espécies de plantas (SIMÕES, 2001).

Muitos fármacos foram descobertos por meio da etnobotânica (ciência que estuda o conhecimento popular), onde alguns desses fármacos permanecem sem alteração desde sua descoberta, apesar de todo avanço da química sintética. Ainda hoje, diversas classes de metabólitos secundários servem como protótipos de origem natural para síntese de fármacos, evidenciando a importância e o potencial das plantas para indústria farmacêutica. (MACIEL et al., 2002; COSTA-LOTUFO et al., 2010; GILANI e RAHMAN, 2005; CORDELL et al., 2001). Por isso, é de suma importância a multidisciplinaridade no estudo de plantas medicinais, englobando profissionais das áreas de etnobotânica, química e a farmacologia para viabilizar

um amplo espectro de conhecimento do uso terapêutico de plantas medicinais de maneira sustentável. Neste contexto, se torna necessário a pesquisa, visando elucidar o perfil químico e avaliação da atividade biológica da *Psychotria capillacea*, devido à escassez de dados na literatura para a mesma

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O gênero *psychotria*

O gênero *Psychotria* é o maior da família Rubiaceae e possui cerca de 1400 a 2000 espécies com ampla distribuição na zona tropical (Figura 1). A maioria das espécies do gênero apresenta hábito arbustivo, no entanto, árvores, ervas, lianas e epífitas também são comumente encontradas no gênero (FARIA et al.; 2008; LIBOT et al., 1987; NEPOKROEFF et al., 1999).

Figura 1 - Zonas climáticas continentais.



Fonte: IBGE, 2003.

Devido à complexidade do gênero *Psychotria* estudiosos propuseram a sua divisão em três subgêneros distintos, sendo eles o *Psychotria*, *Tetramerae* e *Heteropsychotria*. Para tal feito, tomou-se como base a distribuição geográfica e características morfológicas, onde o subgênero *Psychotria* engloba espécies pantropicais¹, enquanto o *Heteropsychotria* possui espécies neotropicais², e o *Tetramerae* detém apenas espécies da África e Ilha de Madagascar (TAYLOR et al., 1996).

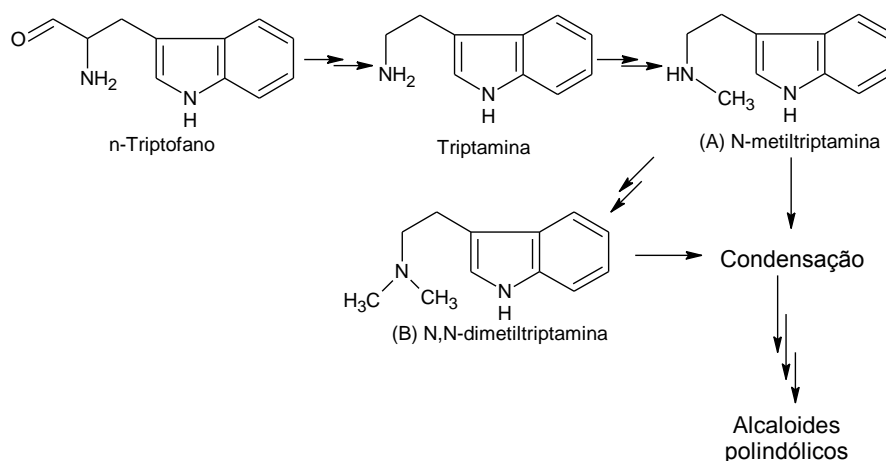
Os alcaloides são empregados como marcadores quimiotaxonômicos para o gênero *Psychotria*, distinguindo assim os subgêneros entre si, a partir de suas principais classe de

¹ Espécies pantropicais: possuem ocorrência entre os trópicos, em específico os trópicos de Capricórnio e Câncer.

² Espécies neotropicais: tem ampla ocorrência nos continentes Americanos.

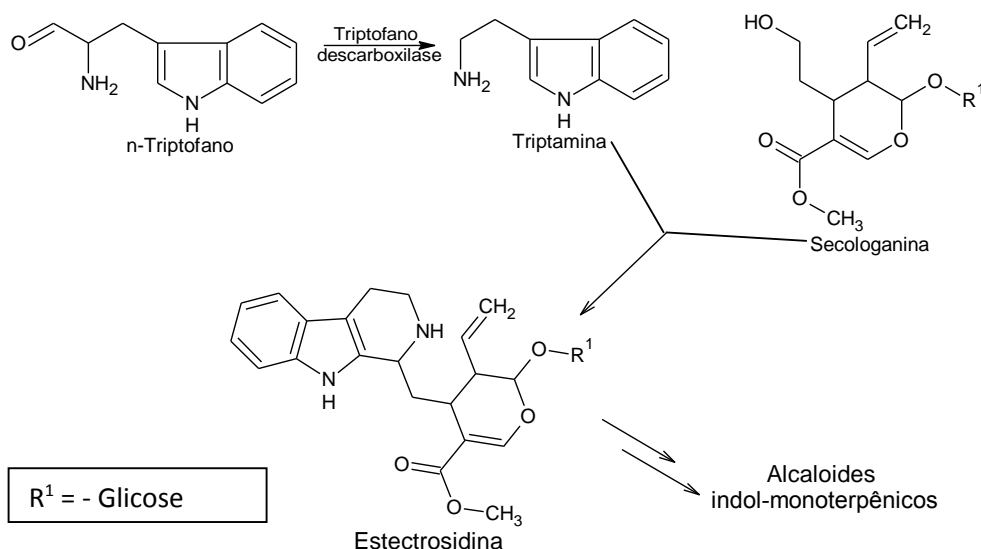
compostos químicos. O subgênero *Psychotria* se diferencia dos demais pela presença de alcaloides polindólicos, originados como consequência da condensação de alcaloides triptamínicos (N-metiltriptamina (2A), ou N,N-dimetiltriptamina (2B)) ou de duas ou mais ligações de N-b-metiltriptamina. Enquanto as espécies do subgênero *Heteropsychotria* são distinguidas pela presença de alcaloides indol-monoterpênicos (Figura 3) (LOPES et. al.; 2004).

Figura 2 - Biossíntese de alcaloides polindólicos a partir do L-triptofano.



Fonte: LOPES et al., 2004, adaptado.

Figura 3 - Rota Biossintética de alcaloides indol-monoterpênicos.



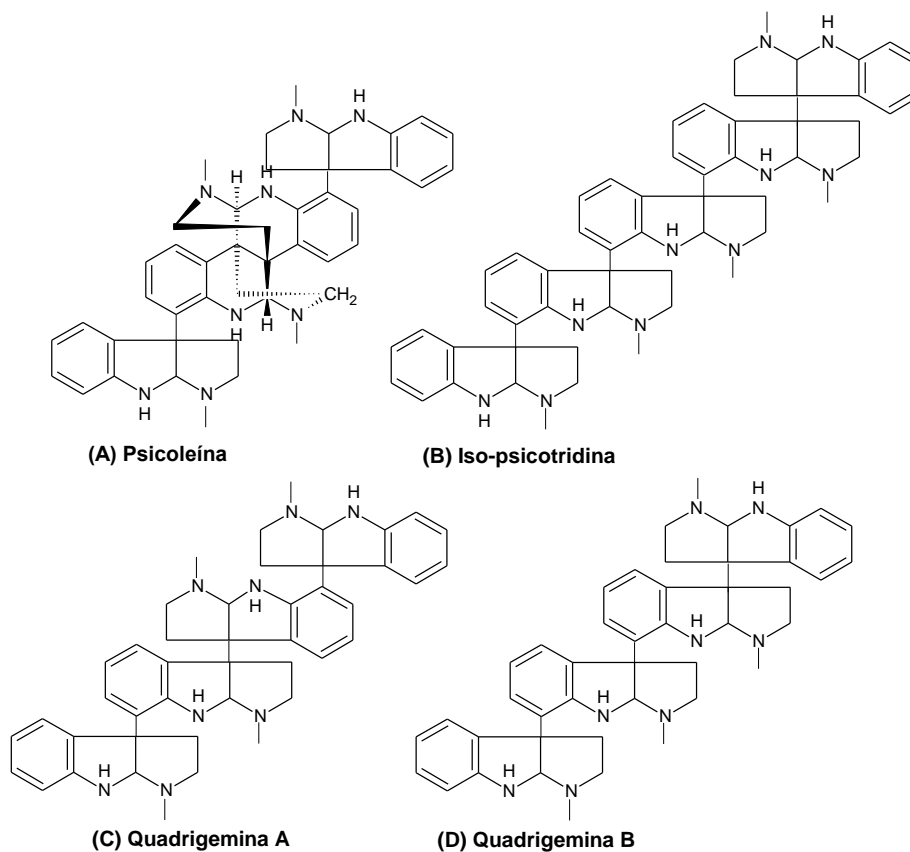
Fonte: DEWICK, 1997.

Os extratos de algumas espécies desse gênero possuem um amplo espectro de atividades relacionadas na literatura, sendo estas empregadas na medicina popular como infusão para tratar

doenças brônquicas, distúrbios reprodutivos, doenças gastrointestinais e dores de cabeça. E também são utilizadas como aplicativo externo para tratar doenças de pele, problemas oculares e de ouvido (PERRY e METZGER, 1980; LAJIS et al.,1993).

Podem-se citar como exemplo o extrato alcalóidico de folha de *P. fosteriana* que demonstrou potente atividade citotóxica na linhagem de células leucêmicas humanas. O extrato de *P. oleoides* (Psicoleína (4A) exibiu uma influência significativa frente a hormônios hipofisiários. Psicotridina A, iso-psicotridina (4B), quadrigemina A (4C) e quadrigemina B (4D) demonstraram atividade antibiótica contra cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (Figura 4) (ADJIBADÉ, 1990; MAHMUD et al., 1993).

Figura 4 - Metabólitos secundários com atividades biológicas comprovadas, isolados de *P. oleoides*.



Fonte: FARIAS, 2006, adaptado.

Partindo dessa premissa de empregar plantas medicinais para combater enfermidades, faz-se necessário o estudo aprofundado da *P. capilacea*, uma vez que a mesma não apresenta relatos bibliográficos até o momento (2016), sobre sua composição química ou atividades

biológicas. Espécies do gênero justificam tal pesquisa, por apresentarem extratos bioativos com diversas atividades já relatadas.

2.2 *Psychotria capillacea* Müll. Arg.

Segundo Pereira (2007) a *P. capillacea* é um arbusto de pequeno porte com ampla ocorrência por todo o Brasil, também ocorrendo na Argentina, Paraguai e Uruguai. Suas folhas são afiladas e pecioladas, os pecíolos são cruzados antepostos. A inflorescência ocorre de setembro a dezembro, suas flores são pequenas e amarelas. A frutificação ocorre de outubro a julho, sendo seus frutos pequenos (2-3cm), globulosos e avermelhados (Figura 5).

Figura 5 - Fotografia com exemplar da espécie *P. capillacea* seguida de sua classificação.



- Reino Plantae
- Superdivisão: Spermatóphyta
- Divisão: Magnoliopsida
- Classe: Magnoliopsida
- Subclasse: Asteriade
- Ordem: Rubiales
- Família: Rubiaceae
- Gênero: *Psychotria*
- Subgênero: *Heteropsychotria*
- Espécie: *P. Capillacea*
- Sinônímias: *Mapouria capillacea* Müll.Arg.; *Psychotria chiococcoides* Standl.; *Psychotria paraguariensis* Chodat e Hassl.; *Uragoga capillacea* (Müll.Arg.) Kuntze (Flora do Brasil, 2016).

Fonte: Próprio autor.

P. capillacea é conhecida popularmente como erva-de-rato-branca e café selvagem. A espécie não apresenta relatos de estudo fitoquímico e atividades biológicas na literatura pesquisada. Segundo Pereira (2007) a espécie se distribui por todo Mato Grosso do Sul, com

maior ocorrência no Parque Estadual das Várzeas do Rio Ivinhema (PEVRI) (Coordenadas: 22° 57' 33.2" S 53° 40' 06.5" W).

2.3 *Estresse oxidativo*

Espécies reativas (ERs) de oxigênio (EROs), nitrogênio (ERNs) e radicais livres (RL), que são produzidas pelo metabolismo normal dos organismos aeróbicos, quando não controlados, podem desencadear diversas doenças crônicas e degenerativas. Os organismos aeróbicos podem apresentar uma desordem entre o sistema de antioxidantes e as espécies reativas, ocasionando o que chamamos de estresse oxidativo (MONTEIRO, 2007).

A membrana celular é a principal estrutura danificada pelas ERs por meio do processo oxidativo em cadeia, uma vez que a mesma é constituída por ácidos graxos insaturados. A peroxidação origina diversos compostos derivados do metabolismo secundário da lipoperoxidação, esses compostos na grande maioria possuem características eletrofílicas, destacando os aldeídos, que ao permearem a célula podem interagir com o DNA (ácido desoxirribonucleico) e proteínas resultando em produtos tóxicos e mutagênicos, deste modo o processo oxidativo desordenado pode levar a falência do metabolismo celular, justificando o aparecimento de tais doenças. (MONTEIRO, 2007; FENG et al., 2006; FERGUSON, 2010; LIMA e ABDALLA, 2001; MARNETT, 1999).

Estudos com animais comprovam que o estresse oxidativo é um dos responsáveis pelo envelhecimento, mutações e morte celular, assim como o aparecimento de várias doenças, dentre elas o diabetes, mal de Parkinson, Alzheimer, aterosclerose, inflamações, além de diversos tipos de câncer (FENG et al., 2006; GRIGNON e CHIANNETTA, 2007; KARATAS, KARATEPE, BAYSAR, 2002; VASCONCELOS et al., 2007).

A vitamina E (alfa-tocoferol) inibe a peroxidação lipídica e quelação de metais, sendo o principal agente inativador de ERs, sua produção ocorre no sistema endógeno de proteção cerebral. No entanto, o uso de agentes antioxidantes que se acumulam no tecido cerebral são os principais candidatos para prevenção ou tratamento de desordens oxidativas (FARIAS, 2006).

As substâncias antioxidantes podem ser naturais ou artificiais. Os naturais podem ser encontrados principalmente em plantas, na forma de compostos fenólicos (flavonóides, fenóis, alcoóis, tocoferóis, tocotrienóis), ácido ascórbico e carotenóides. Para os antioxidantes artificiais podem ser citados butil-hidroxi-tolueno (BHT), butil-hidroxi-anisol (BHA) e o ácido cítrico, que retardam as reações de degradação oxidativa, ou seja, reduzem a velocidade da

oxidação por um ou mais mecanismos, como inibição de radicais livres e complexação de metais (MATTOS et al, 2009).

Inúmeras técnicas têm sido empregadas para determinar as atividades antioxidantes *in vitro*, de maneira a permitir uma rápida triagem de substâncias e/ou misturas que potencialmente possam ser empregadas na prevenção de doenças crônico-degenerativas (ALVES et al., 2010). Dentre estes métodos destaca-se o sistema de cooxidação do β -caroteno/ácido linoléico, o método de sequestro de radicais livres (DPPH) e o método de inibição da lipoperoxidação empregando como biomarcador o malondialdeído MDA.

2.4 Câncer

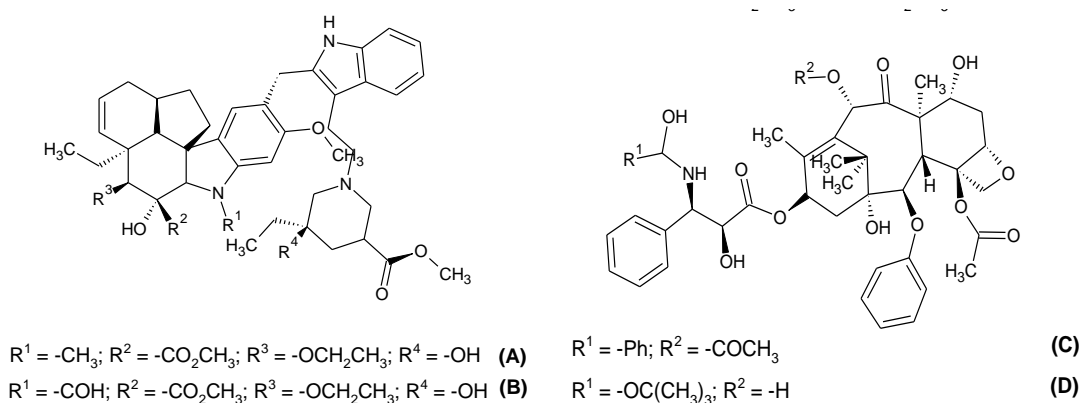
O câncer, neoplasia maligna ou tumor maligno, é uma doença que apresenta como principal característica, a multiplicação e propagação celular desequilibrada no corpo de forma anormal das próprias células corporais. Esta proliferação não é controlada pelos processos que comumente regulam a divisão celular e o crescimento de tecidos (GOMES, 2008).

O DNA é detentor de todas as informações genéticas em um organismo complexo, alguns dos seus genes são responsáveis pelo controle de crescimento e divisão celular, denominados oncogêneses. Outros genes de extrema importância para o bom funcionamento de um organismo complexo são os genes supressores de tumor, que tem por finalidade retardar o processo de divisão celular, e levar à célula a morte no momento certo. A disfunção nos oncogêneses e desativação dos genes supressores de tumor acarretam no aparecimento do câncer. As mutações genéticas no DNA podem ser endógenas (hereditária) ou exógenas (alterações relativas aos hábitos praticados). Na maioria dos casos de aparecimento de tumores, podem-se relacionar as mutações exógenas, sendo influenciados por hábitos não saudáveis, tais como exposição prolongada às fontes de radiação, tabagismo, alcoolismo, má alimentação, dentre outros (Instituto Oncoguia, 2015).

Nas últimas décadas, o câncer se apresentou como um problema de saúde pública mundial, estimulando o interesse urgente na pesquisa para a obtenção de novos fármacos com atividade antitumoral. A descoberta de medicamentos para o câncer está relacionada a pesquisas de produtos naturais, sendo que entorno de 60% dos medicamentos empregados no tratamento da doença possuem sua origem relacionada à uma fonte natural. Dada a biodiversidade do país, as fontes naturais ainda estão disponíveis em abundância e oferecem as melhores possibilidades de encontrar substâncias de interesse terapêutico (COSTALOTUFO et al., 2010).

O século XX apresentou um avanço considerável na pesquisa de produtos naturais, principalmente no campo da oncologia, o que possibilitou o desenvolvimento de inúmeros fármacos, podem ser citados como exemplo a Vimblastina (6A), Vincristina (6B) (*Catharanthus roseus*), Paclitaxel (6C) e Docetaxel (6D) (*Taxus brevifolia*) (Figura 6) (COSTA-LOTUFO et al., 2010; KATO et al., 2011).

Figura 6 - Estruturas dos principais fármacos derivados de plantas medicinais empregados no tratamento do câncer.



Fonte: COSTA-LOTUFO et al., 2010) adaptado.

Muitas substâncias já foram isoladas de produtos naturais apresentando atividades antiproliferativa, demonstrando ser fonte promissora de drogas antitumorais. É possível aumentar a atividade apresentada realizando modificações simples na estrutura química dessas substâncias (BOGO, 2012).

Uma das principais ferramentas para obtenção de novos fármacos é a modificação estrutural de substâncias ativas. Compostos com atividade biológica podem apresentar propriedades indesejáveis, como toxicidade e baixa solubilidade. A estrutura dessas substâncias pode ser modificada, a fim de atenuar ou eliminar tais características, e aumentar atividade desejada (BOGO, 2012).

Grande parte dos medicamentos antineoplásicos utilizados na terapêutica foram selecionados a partir da sua capacidade de controlar ou inibir a proliferação celular. Uma técnica preliminar que tem sido utilizada é a determinação da atividade antiproliferativa *in vitro* de diversas linhagens de células tumorais, possibilitando realizar de maneira simultânea a análise de um grande número de amostras; esta metodologia é mais simples comparada a ensaios *in vivo* (GOMES, 2008; BOGO, 2012).

2.5 Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) é uma neuropatologia degenerativa progressiva que acomete principalmente idosos com faixa etária acima de 65 anos. O principal aspecto clínico da doença é a perda de memória recente. Com o avanço da doença as lembranças primordiais também são afetadas, bem como as funções cognitivas e capacidade de realizar atividades cotidianas. Acompanham estes sintomas distúrbios comportamentais, como irritabilidade, alucinações, agressividade, e em estágio mais avançado da DA o paciente pode ter depressão (SERENIKI e VITAL, 2008).

Ainda de acordo com Sereniki e Vital (2008), a DA é caracterizada pela perda sináptica considerável, bem como a deterioração de áreas cerebrais encarregadas pelas funções de memória recente e cognição, como córtex, hipocampo, e o estriado ventral.

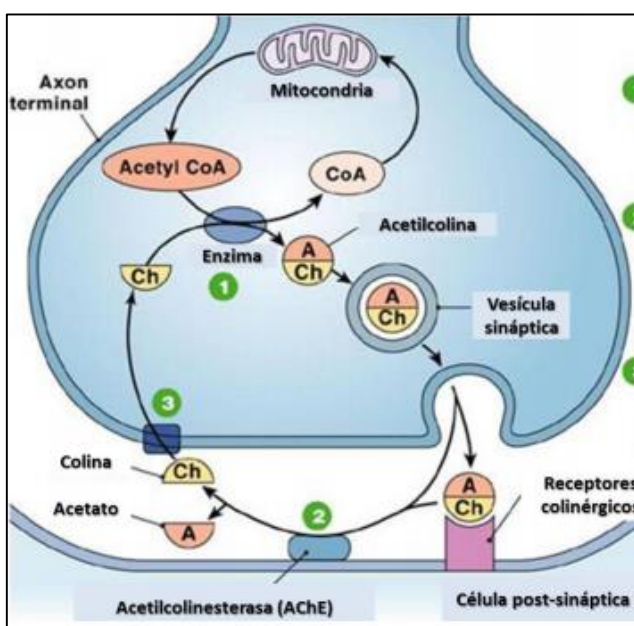
O fator genético hereditário é o principal agente desencadeador da DA, no entanto, fatores externos também influenciam no aparecimento da neuropatologia. Dentre elas, ingestão de alumínio, estresse oxidativo, aminoácidos neurotóxicos e o comprometimento em microtubos e proteínas associadas. É de extrema importância ressaltar que esses fatores podem ocasionar dano direto, ou mutação genética somática nos tecidos desencadeando futuramente a patologia (LUCATELLI et al., 2009).

As características histopatológicas para DA incluem depósitos de placas senis no espaço extra celular, emaranhados neurofibrilares intraneuronais (hipótese da cascata amiloidal) e déficit do neurotransmissor acetilcolina (ACh) (hipótese colinérgica) (SERINKI e VITAL, 2008).

Ainda segundo Serinki e Vital (2008), as placas senis são formadas a partir da clivagem da proteína APP (proteína precursora amiloide) pelas enzimas β e γ secretases gerando peptídeos insolúveis e tóxicos com elevado potencial de agregação. A hipótese amiloidal é baseada na nesta sequência de reações, e sugere que o excesso de produção, agregação e deposição da proteína β -amilóide leva à uma disfunção, seguida de morte neuronal. Já os emaranhados neurofibrilares são oriundos da hiperfosforilação da proteína tau. Esta proteína em condições normais liga-se aos microtúbulos estabilizando a estrutura de suporte interno dos neurônios promovendo a condução de nutrientes e outras moléculas ao longo do axônio. Uma vez que a proteína tau é alterada quimicamente, os microtúbulos se desintegram e os novos que se formam provocam avarias na comunicação neuronal e mais tarde a morte das células.

A hipótese mais aceitável para ocorrer a DA é o déficit do ACh (Figura 7). A ACh fica armazenada nas vesículas celulares pré-sinápticas, até o impulso nervoso estimular sua liberação. Despolarizando a membrana celular, logo os canais de cálcio dependentes de voltagem se abrem, favorecendo a entrada dos íons cálcio. A liberação da ACh está relacionada com a concentração de cálcio na célula. O neurotransmissor quando liberado na fenda sináptica, se liga aos receptores colinérgicos da célula pós-sináptica, acarretando na abertura dos canais de sódio dessa célula. O sódio é responsável por despolarizar a célula pós-sináptica, permitindo a ocorrência do impulso nervoso. Após o impulso nervoso a acetilcolinesterase (AChE) se encarrega de degradar a ACh em colina e acetato, evitando assim a abertura prolongada dos receptores colinérgicos para a repolarização da célula pré-sináptica. No entanto, quando há um excesso de enzima AChE ou déficit na produção de neurotransmissor ACh a partir da Acetiltransferase (ChAT), ocorre então o comprometimento da memória recente, iniciando assim a DA (FARIAS, 2006).

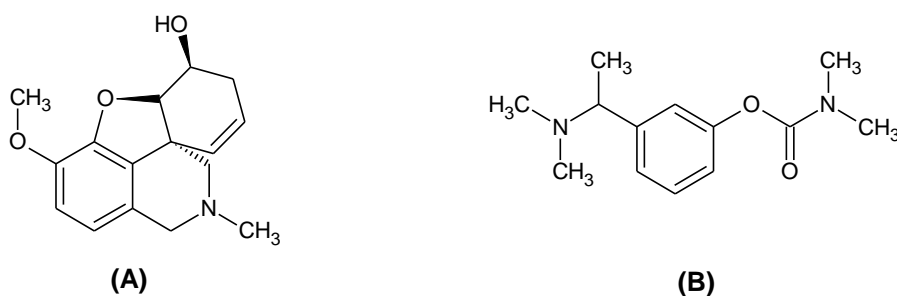
Figura 7 - Ilustração exemplificando o funcionamento de um neurônio durante um estímulo nervoso.



Fonte: TAMBELI, 2010, adaptado.

Os produtos naturais são uma fonte promissora para descoberta de novos inibidores de AChE, já que os principais fármacos para o tratamentos da doença são oriundos de plantas medicinais, como podem-se se citar a galantamina (8A), fármaco mais efetivo frente a doença, isolado do *Galanthus sp* e a rivastigmina (8B) (*Physostigma venenosum*) (DIAS et al., 2015).

Figura 8 - Fármacos empregados no tratamento de DA.



Fonte: (DIAS et al., 2015) adaptado.

A Cochrane Collaboration afirma que os inibidores de AChE são mais eficazes sobre as funções cerebrais (cognição e memória) nas doses mais elevadas em relação as mais baixas, quando comparados ao placebo. No entanto o tratamento é paliativo, as doses mais elevadas ocasionam efeitos adversos, como náuseas, hepatotoxicidade, vômitos, cefaleias e problemas gastrointestinais, mas de forma geral são bem tolerados (MOREIRA e STEFANI, 2014).

São incentivadas pesquisas científicas empregando plantas medicinais, na pretensão de encontrar potenciais protótipos a fármaco, com baixos efeitos colaterais e elevada inibição enzimática, o que melhoraria significativamente a qualidade de vida do paciente e de seus cuidadores (MOREIRA e STEFANI, 2014).

3. OBJETIVOS

3.1 *Objetivo Geral*

Quantificar o perfil fitoquímico e avaliar o potencial antioxidante, antiproliferativo e anticolinesterásico do extrato metanólico de *Psychotria capillacea* Müll Arg. (Rubiaceae).

3.2 *Objetivos Específicos*

- Coleta, identificação e preparação do extrato metanólico das folhas de *P. capillacea*;
- Quantificação do teor de fenóis, flavonoides, taninos condensados e flavonol presentes no extrato metanólico;
- Avaliação da atividade antioxidante pelos métodos de DPPH, cooxidação do β -caroteno/ácido linoléico e MDA-TBARS;
- Avaliação *in vitro* do potencial antiproliferativo do extrato metanólico empregando linhagens celulares cancerosas e não-cancerosas.
- Avaliação *in vitro* do potencial anticolinesterásico do extrato metanólico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 *Preparação do Extrato Metanólico*

A espécie *P. capillacea* foi coletada na fazenda Coqueiro no mês de agosto de 2014, localizada na cidade de Dourados, Mato Grosso do Sul e identificadas pela Dra. Zefa Valdevina Pereira. Posteriormente, uma exsicata (DDMS-5008) foi depositada no Herbário da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Dourados, MS. A secagem das partes aéreas (folhas e galhos) foi realizada em estufa de circulação de ar a 45 ± 5 °C por 48 horas e, em seguida, triturado em moinho de facas. A amostra foi submetida à maceração exaustiva com metanol, posteriormente filtrada e concentrada em evaporador rotativo sob pressão reduzida, para a obtenção do extrato metanólico codificado como EMPC (13,7798 g).

4.2 *Teor de Constituintes*

4.2.1 *Concentração de Fenóis Totais*

A concentração de fenóis totais da amostra foi determinada utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu (MAXSON e ROONEY, 1972). Resumidamente, 100 µl do extrato em metanol (1 g/L) foi misturado com 1,0 mL de água destilada e 0,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (1:10 v / v). Após a mistura, foi adicionado 1,5 ml de 2% de bicarbonato de sódio aquoso, e a mistura foi deixada em repouso durante 30 min com agitação intermitente. A absorbância foi medida a 765 nm utilizando um espectrofotômetro. Concentração de fenólicos totais foi expresso em equivalente de ácido gálico em mg por grama de extrato (mg GAE/ g de extrato), a partir da equação da reta obtida por regressão linear (OriginPro 9.1®). A solução de metanol foi utilizada como branco. Todo o ensaio foi realizado em triplicata.

4.2.2 *Concentração de Flavonóides Totais*

A quantificação de flavonoides totais no extrato foi realizada espectrofotometricamente, descrito por Lin e Tang (2007). 0,05 mL do extrato foi misturado com 1,50 mL de etanol a 95%, 0,10 mL de cloreto de alumínio a 10% ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 0,10 mL de acetato de sódio ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (1 mol/L) e 2,80 mL de água destilada. Após incubação durante 40 min, a absorbância foi medida a 415 nm utilizando um espectrofotômetro. Para calcular a concentração de flavonóides, preparamos uma curva de calibração (OriginPro 9.1®) usando quercetina como

padrão. A concentração de flavonóides foi expressa como equivalentes de quercetina em mg por grama de extrato (mg QE/ g de extrato). Todo o ensaio foi realizado em triplicata.

4.2.3 Concentração de Taninos Condensados

O extrato foi misturado com 5 ml de vanilina-HCl (solução aquosa de HCl 8% e uma solução de vanilina em metanol de 4%) e absorvância a 500 nm foi lida após 20 min em triplicata de 5 em 5 minutos (MAXSON e ROONEY, 1972; LIN e TANG, 2007). A catequina foi usada como o padrão para obtenção da curva-padrão (OriginPro 9.1). A concentração de tanino condensado é expressa como equivalentes de catequina em mg por grama de extrato (mg CE/ g de extrato).

4.2.4 Concentração de Flavonol

A concentração de flavonol no extrato foi estimada utilizando o método descrito por (MAXSON e ROONEY, 1972, BRAND-WILLIAMS, CUVELIER e BENSET, 1995). Adicionou-se 2 ml de amostra, 2 mL solução etanólica de cloreto de alumínio (2%) e 3 mL acetato de sódio (50 g/L). A mistura foi agitada e incubada durante 2,5 h a 20 °C. A absorvância foi lida a 440 nm em triplicata de 5 em 5 minutos. Utilizando a curva de calibração (OriginPro 9.1®) com a quercetina como padrão obteve-se o teor total de flavonol, que foi expresso em mg de equivalentes de quercetina por grama de extrato (mg QE/ g de extrato).

4.3 Avaliação da Atividade Antioxidante

4.3.1 Método de Sequestro De Radicais Livres DPPH

A solução DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) (0,062 mg/ml) foi preparada sem luminosidade, utilizando metanol CLAE como solvente. Para preparar a amostra, foi utilizada a concentração de 1 mg/mL de extrato em metanol CLAE. Foram aplicados diferentes volumes de amostra (5, 10,15, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 270, 350, 500 µL) juntamente com 2 mL de solução DPPH, posteriormente as amostras foram incubadas na temperatura ambiente por 30 minutos. A leitura da absorvância de cada amostra foi realizada no espectrofotômetro a 515 nm (HARBORNE e WILLIAMS, 2000). Toda a análises foram realizadas em triplicata. A porcentagem de inibição (% I) foi calculada pela fórmula: $\% I = (A_0 - A)/A_0 \times 100$. Onde A_0 é a absorvância do DPPH (controle) e A é a absorvância da solução de DPPH na presença da amostra. Foi empregado como controle positivo o BHT.

Os valores de porcentagem de inibição foram plotados em função da concentração utilizando o programa de estatística OriginLab 9.1 ®, empregando a análise de regressão linear para encontrar o IC₅₀, que é a concentração necessária para inibir 50% da oxidação.

4.3.2 Método do Cooxidação do β -Caroteno/ Ácido Linoleico

1 mL de solução de β -caroteno (2 mg/mL em clorofórmio), reagiu com 20 mL de ácido linoleico e 200 μ L de Tween 40, e posteriormente concentrada em evaporador rotativo sob pressão reduzida a uma temperatura de 45°C por aproximadamente 5 minutos. Foi adicionado ao concentrado 50 mL de água destilada, agitando para formar emulsão.

A amostra foi preparada na concentração de 1 mg/mL em metanol CLAE. Os tubos foram preparados em triplicata, adicionando 5 ml de emulsão junto com 200 μ L de amostra. Para o controle o tubo foi preparado com 5 ml de emulsão juntamente com 200 μ L de metanol. Os tubos foram incubados a uma temperatura de 50°C, fazendo leitura periódica a 470 nm em espectrofotômetro de 15 em 15 minutos, até o branqueamento do controle (KAUR e KAPOOR, 2002; RUFINO et al., 2007).

A atividade antioxidante foi calculada de acordo com a fórmula % AA= $[1 - (A_i - A_t)/(A'_i - A'_t)] * 100$, onde o A_i é absorvância da amostra no tempo zero, A_t absorvância da amostra no tempo final, A'_i absorvância do controle no tempo zero, A'_t absorvância do controle no tempo final.

4.3.3 Modelo de Experimentação Animal

Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFGD (CEUA-Protocolo Nbr. 14/2015). Foram utilizados 3 ratos machos da linhagem *Wistar Hannover* (*Rattus norvegicus*, variedade Albino Rodentia), com 8 semanas de idade pesando 200-300 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD. Durante todo o período os animais permaneceram acondicionados em gaiolas individuais de aço inoxidável, em ambiente com temperatura controlada (20-25°C), umidade relativa de 55± 10% e iluminação apropriada com ciclo claro/escuro de 12 h tendo livre acesso ao consumo de ração e água, e jejum antes dos experimentos.

4.3.4 Avaliação da Atividade Antioxidante Empregando MDA Como Biomarcador

A atividade antioxidante do EMPC foi avaliada *in vitro* de acordo com método descrito por Stocks et al. (1974). Este método é baseado na inibição da lipoperoxidação espontânea de homogeneizado de cérebro de ratos, quando incubado em condições controladas de temperatura e oxigenação. Malondialdeído (MDA) foi empregado como parâmetro para avaliação da lipoperoxidação.

Três ratos *Wistar* machos com peso entre 200-300 g foram anestesiados e mortos. A cabeça foi removida por guilhotinamento, o cérebro foi removido e lavado com solução de cloreto de sódio NaCl 0,15 mol/L, e pesado. A seguir o cérebro foi triturado juntamente com tampão fosfato de potássio salino [(K₂HPO₄/KH₂PO₄)/NaCl 0,14 mol/L] pH 7,4 com volume quatro vezes maior que peso do cérebro. O cérebro triturado foi submetido à centrifugação sob 1800 RPM por 20 minutos. Em seguida o homogeneizado foi separado e diluído em três vezes seu volume final.

O EMPC foi testado nas concentrações de 0,20; 0,50; 0,75 e 1 mg/mL em metanol CLAE, onde foi adicionado 50 µL de amostra junto com 3 mL de homogeneizado, usando como controle 50µL de tampão fosfato de potássio salino juntamente com 3 mL homogeneizado, a leitura da absorbância a 532 nm no tempo zero foi realizada em espectrofotômetro e incubado por 1 hora em banho-maria 37°C. Após 1 hora foi adicionado 1,2 mL de ácido tricloroacético 280 mg/mL para precipitação de proteínas. As amostras foram centrifugadas e ao sobrenadante foi adicionado 1 mL de ácido tiobarbitúrico 10 mg/mL e incubado a 100°C por 15 min, posteriormente foi realizado a leitura no tempo final a 532 nm. A análise foi realizada em triplicada empregando como controle positivo o BHT.

O cálculo foi realizado de acordo com a seguinte formula abaixo (eq.1):

$$\%I = 1 - \frac{ABS A_{final} - ABS A_{inicial}}{ABS C_{final} - ABS C_{inicial}} \times 100 \quad \text{eq.1}$$

Onde a (% I) é igual à porcentagem de inibição, (ABS A_{final}) média das absorbâncias da amostra mensurada no tempo final, (ABS A_{inicial}) média das absorbâncias da amostra mensuradas no tempo inicial (ABS C_{final}) média das absorbâncias do controle mensurada no tempo final e (ABS C_{inicial}) média das absorbâncias do controle mensurada no tempo inicial.

Os valores de porcentagem de inibição foram plotados em função da concentração utilizando o programa de estatística OriginLab 9.1 ®, empregando a análise de regressão linear para encontrar o IC₅₀, que é a concentração necessária para inibir 50% da oxidação.

4.4 Atividade Antiproliferativa do EMPC

O experimento foi realizado em parceria com a Professora Doutora Mary Ann Foglio. Todos os teste foram desenvolvidos no laboratório de CPQBA-UNICAMP, Campinas-SP.

As linhagens de células foram doadas pelo National Câncer Institute (NCI). Foram plaqueados 100 µL de cada célula [U251 (glioma, SNC)¹, MCF7 (mama)¹, NCI/ADR-RES (Ovário resistente)¹, 786-0 (renal)¹, NCI-460 (fígado)¹, PCO-3 (próstata)¹, OVCAR-3 (ovário)¹, HT-29 (côlon)¹, K-562 (leucemia)¹ e HaCat (queratinócitos)²], em meio RPMI-1640/SFB/gentamicina, nas suas respectivas densidades de inoculação em placas de 96 compartimentos. Estas foram incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% e CO₂ e 100% de umidade. Para cada linhagem foi utilizado um número estipulado de placas, além da placa T0 (placa controle), dependendo da quantidade de células obtidas.

O EMPC foi obtido na concentração 1 g/mL em dimetilsufóxido de sódio (DMSO) resultando em soluções estoques. Estas soluções foram diluídas 40 vezes em RPMI/SFB/gentamicina. Foram adicionados 100 µL do extrato a ser testado nas placas de 96 compartimentos, exceto na T0, nas doses de 0,25; 2,5; 25; 250 mg/ mL, sendo realizada no mesmo momento, a fixação e leitura da placa T0, onde foi possível determinar a quantidade de células presentes no momento em que os compostos foram colocados. As demais placas foram encubadas por 48 horas. Após este período foram realizadas as leituras pelo ensaio do suforrodamina-B (SRB).

As placas de 96 compartimentos forma centrifugadas por 3 minutos a 2000 rpm, e foram fixadas com 50 µL de ácido tricloroacético 50% (TCA) para as células aderidas e 80 % para as células em suspensão. Para completar a fixação celular, as placas forma incubadas por 1 horas a 4 °C. Após esse tempo, foram submetidas a quatro lavagens consecutivas com água destilada para remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários. Essas placas foram mantidas a temperatura ambiente até a secagem completa.

¹ Linhagem celular cancerígena.

² Linhagem celular não-cancerígena.

Em seguida as células foram coradas pela adição de 50 µL de SRB a 0,4% (p/v) dissolvidas em ácido acético a 1%. Estas foram incubadas a 4°C, durante 30 minutos. Após esse período, as placas foram lavadas por 4 vezes seguidas com uma solução de ácido acético 1%. O resíduo da solução de lavagem foi removido e as placas foram novamente secas a temperatura ambiente.

O corante aderido as proteínas celulares foi solubilizado com uma solução de base Trizma na concentração de 10 µL e pH 10,5 por 5 minutos em ultrassom. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em 560 nm em um leitor de microplacas.

A análise dos resultados foi realizado calculando as médias das absorbâncias descontadas dos respectivos brancos e através da equação abaixo (eq. 2).

$$GI = 100 * \left[\frac{t-t_0}{c-t_0} \right] \quad \text{eq. 2}$$

Onde foi determinada a inibição de crescimento (IG) de cada amostra testada. Sendo que T é a média da absorbância da célula tratada; C é o controle de célula; T0 é o controle de células no dia da adição do extrato. O resultado obtido foi subtraído de 100% obtendo-se então a porcentagem de inibição de crescimento (%GI). As amostras foram consideradas ativas quando apresentaram inibição de crescimento maior que 50% e ainda de forma dose-dependente (MONKS et al. 1991).

4.5 Avaliação do Potencial Anticolinesterásico do EMPC

Seguiu-se o mesmo modelo de experimentação animal descrito para o método de avaliação antioxidante empregando MDA como biomarcador (CEUA-Protocolo Nbr. 14/2015). Foram anestesiados via inalatória (halotano) e mortos, 3 ratos Wistar machos, posteriormente os cérebros foram removidos, e suas estruturas (córtex, hipocampo e estriado) separadas¹. Após a remoção, as estruturas foram trituradas na presença de 2 mL de solução tampão Tris-HCl 10 mmol, pH 7,5 com sacarose 160 mmol (1:10, p/v). Posteriormente as estruturas foram submetidas a centrifugação a 1800 rpm por 20 minutos, separando o sobrenadante. O sobrenadante foi então submetido à quantificação de proteínas.

4.5.1 Quantificação de Proteínas

¹ Todas as etapas de remoção e preparo do homogeneizado foram realizadas a uma temperatura média de 0-2°C, com a finalidade de evitar a desnaturação da enzima AChE.

O método empregado foi descrito por Bradford (1976), sendo uma técnica para a determinação de proteínas totais que utiliza o corante de “Coomassie Brilliant Blue” BG-250. Este método se baseia na interação do corante BG-250 com macromoléculas de proteínas que possuem aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 ocasiona um deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm. Foi utilizada como curva padrão a albumina sérica bovina, para correção da concentração de proteína foi empregado um fator de correção (FCC) referente à média das absorbâncias da curva padrão (eq. 3).

$$[proteína] = \frac{absorbância\ da\ amostra \times FCC}{Volume\ de\ amostra} \quad eq. 3$$

Após a quantificação de proteínas nos tecidos animais foram realizados a diluição para atingir as concentrações ideais do teste (Tabela 1).

Tabela 1: valor de concentração a ser corrigida

Estruturas Cerebrais			
Concentração de proteína ideal para realização do teste	Cortex	Hipocampo	Estriado
	0,6 mg/mL	0,8 mg/mL	0,4 mg/mL

4.5.2 *Potencial anticolinesterásico In vitro*

Após a correção e o cálculo da concentração, foi realizada a avaliação do potencial anticolinesterásico do EMPC, a partir da atividade enzimática da AChE presente no homogeneizado, sendo determinada pelo método de Ellman et al. (1961), empregando como controle, o solvente metanol CLAE, e branco água ultrapura. A reação da atividade enzimática de AChE foi realizada em microplaca de 96 poços. Foi empregado meio de ensaio contendo 97,5 µL de água, 150 µL (5,5-ditiobis-2-nitrobenzoato) DTNB 1.04 mmol, diluído em tampão fosfato de potássio 24 mmol pH 7,5 e 0,03 g de bicarbonato de sódio, posteriormente incubado por 2 minutos a 30°C com 7,5 µL da amostra (EMPC), iniciando a reação com adição de 15 µL iodeto de acetiltiocolina 0,83mmol L⁻¹. O produto da reação foi determinado em 412 nm durante 13 s por 5 vezes, Possíveis aumentos na absorbância foram corrigidos devido à hidrólise espontânea, por meio da subtração da velocidade da reação antes da adição da enzima, com a

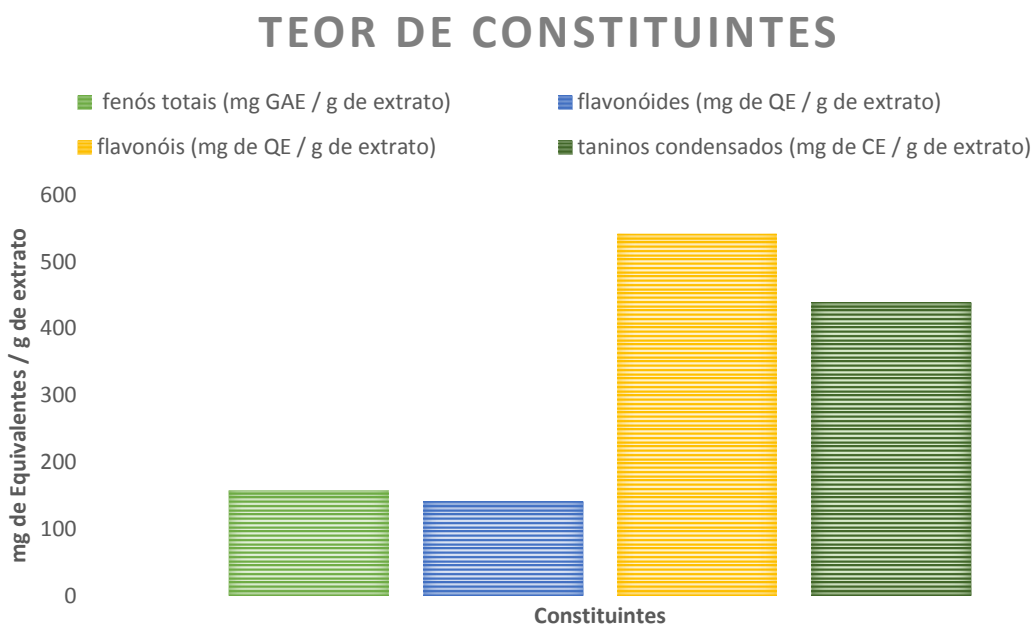
velocidade da reação depois de se adicionar a enzima. E sua atividade enzimática expressa em $\mu\text{mol de ACh Hidrolisada} \times \text{Hora}^{-1}/\text{mg de proteína}$. A atividade enzimática normal do cérebro foi empregada como meio comparativo para expressar o potencial inibidor do EMPC frente a AChE.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Teor de Constituintes

As concentrações de compostos fenólicos totais presentes nos extratos são mostradas na (Gráfico 1). O EMPC apresentou um teor de fenóis totais de 156,63 mg GAE /g extrato, flavonóides 140,92 mg QE / g extrato, taninos condensados 439,21 mg (CE) / g extrato e flavonol 541,29 mg QE / g de extrato.

Gráfico 1: Concentração de fenóis totais, flavonoides, taninos condensados e flavonol presentes no EMPC.



Comparando os valores do presente estudo com os valores da literatura, pode-se afirmar que os resultados para taninos condensados e flavonóis demonstrando valores superiores aos descritos anteriormente para mesma espécie. Segundo Formagio e colaboradores (2014), o estudo do perfil fitoquímico de *Psychotria capillacea* apresentou as seguintes concentração de fenóis ($148,42 \pm 4,69$ mg AGE/ g de extrato), flavonoides ($91,58 \pm 3,74$ mg de QE / g de extrato), flavonóis ($185,54 \pm 5,33$ mg QE / g de extrato) e taninos condensados ($571,95 \pm 7,22$ mg de CE / mg de extrato) respectivamente, tal diferença pode ser justificada pelos períodos distintos de coleta, uma vez que a espécie estudada em ambos estudos foram coletadas na mesma região.

Os compostos fenólicos (fenóis, flavonoides, flavonol e taninos condensados) são conhecidos como antioxidantes de alto nível, devido à sua capacidade para sequestrar radicais livres e espécies de oxigénio ativas, tais como oxigénio singlete, radicais livres superóxido e radicais hidroxila (TORRES e ROSAZZA, 2001). A atividade de sequestro de radical livre é atribuída à substituição dos grupos hidroxila nos sistemas de anel aromático dos compostos fenólicos como um resultado da sua capacidade de doar hidrogénio (NACZK e SHAHIDI, 2004). No entanto, outras substâncias não-fenólicas também podem atuar sequestrando radicais ou inibindo a peroxidação lipídica, pode-se citar como exemplo o ácido ascórbico.

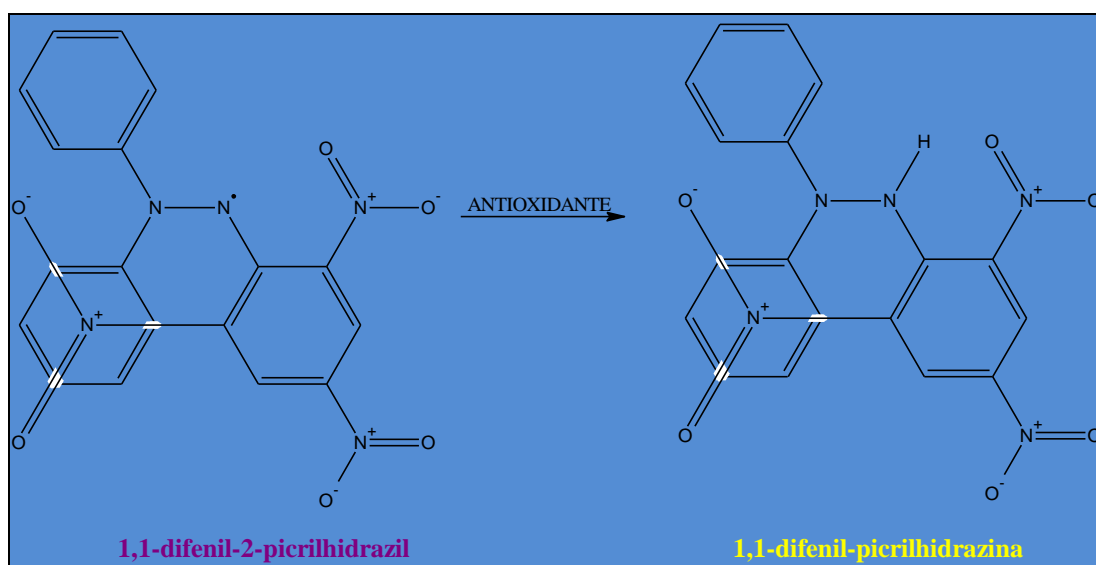
5.2 Avaliação da Atividade Antioxidante

Devido à complexidade de alguns extratos de plantas é recomendada a utilização de vários métodos diferentes para a avaliação da atividade antioxidante (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER e BENSET, 1995).

5.2.1 Método de Sequestro de Radicais Livres DPPH

Dos métodos atualmente utilizados, pode-se incluir o DPPH (BLOIS, 1958), que mede a capacidade de uma substância para eliminar o radical DPPH, reduzindo-o a hidrazina com uma mudança de cor de violeta para amarelo pálido (Figura 9).

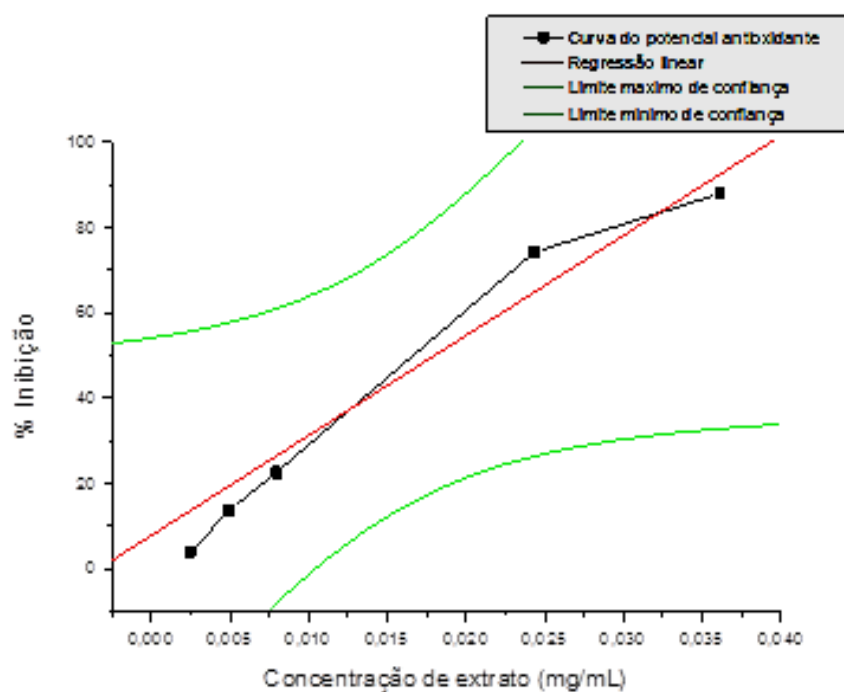
Figura 9 - Reação fotocolorimétrica do DPPH em meio antioxidante.



Fonte: BLOIS, 1958, adaptado.

Foram utilizados os seguintes parâmetros para determinar a atividade antioxidante do EMPC através do método DPPH, partindo de sua regressão linear (Gráfico 2). Potente atividade para $IC_{50} \leq 20 \mu\text{g/mL}$, moderada $21 \mu\text{g/mL} \geq IC_{50} \leq 70 \mu\text{g/mL}$ e baixa $IC_{50} \geq 71 \mu\text{g/mL}$. Os resultados da avaliação da atividade antioxidante do EMPC apresentou potente atividade antioxidante $16,60 \mu\text{g/mL}$, quando comparado com o padrão BHT ($16,70 \mu\text{g/mL}$) (Tabela 2). Formagio e colaboradores (2014) encontrou uma atividade antioxidante moderada para *P. capillacea* com $IC_{50} = 30,05 \pm 6,22 \mu\text{g/mL}$, quando comparado ao padrão BHT ($16,72 \pm 1,34 \mu\text{g/mL}$).

Gráfico 2: Curva analítica expressando a regressão linear para atividade antioxidante de EMPC pelo método de DPPH.



5.2.2 Método do Cooxidação do β -Caroteno/ Ácido Linoleico

O método branqueamento do β -caroteno avalia a capacidade de uma substância para impedir a oxidação de β -caroteno, protegendo-o dos radicais livres gerados durante a peroxidação de ácido linoleico.

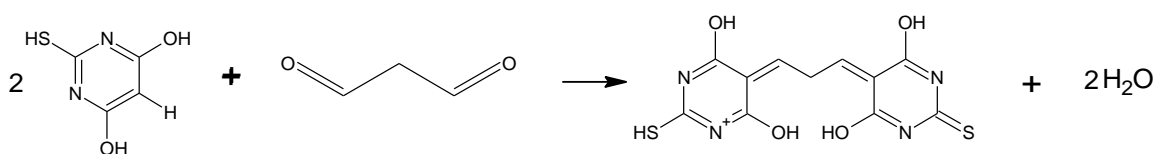
Foram utilizados os seguintes parâmetros para determinar a atividade antioxidante do EMPC através do método do branqueamento do β -caroteno, Potente atividade $IC_{50} \leq 20 \mu\text{g/mL}$, moderada $21 \mu\text{g/mL} \geq IC_{50} \leq 70 \mu\text{g/mL}$ e baixa $IC_{50} \geq 71 \mu\text{g/mL}$. Os resultados da avaliação da atividade antioxidante do EMPC apresentou moderada atividade antioxidante (%AA =

46,48), quando comparado com o padrão BHT (%AA = 91,20) (Tabela 2). Segundo Formagio e colaboradores (2014) obteve resultados moderados para a atividade antioxidante para *P. capillacea* (%AA = 33,40 ± 15,22) quando comparado ao padrão BHT (%AA = 91,20 ± 4,54).

5.2.3 Avaliação da Atividade Antioxidante Empregando MDA Como Biomarcador

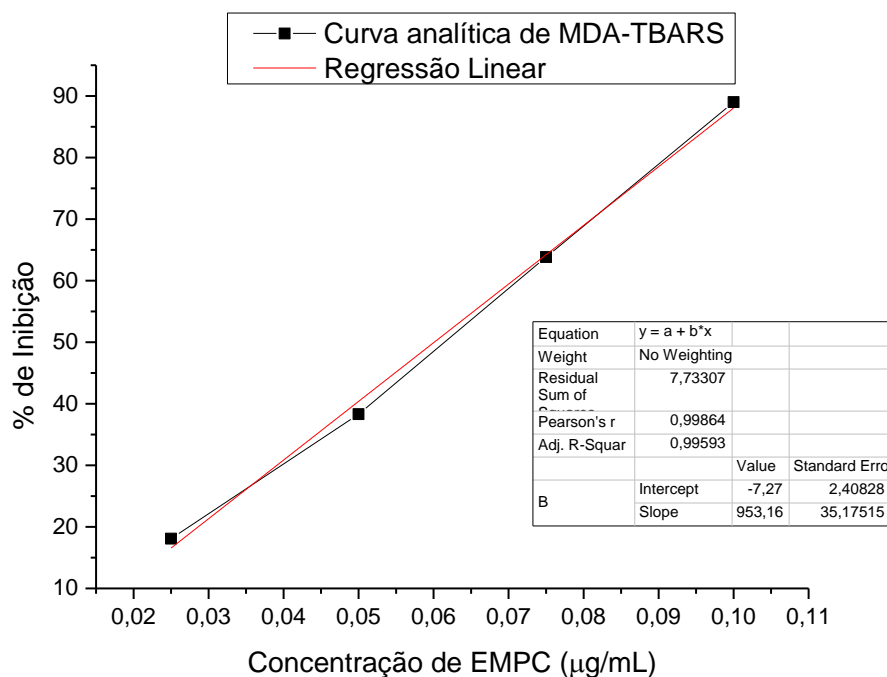
O teste se baseia na inibição da lipoperoxidação empregando o malondialdeído (MDA) como biomarcador. O MDA é um dos produtos de oxidação de ácidos graxos poliinsaturados, que reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA), formando um complexo de coloração rosa, e tem um máximo de absorção no comprimento de onda 532 nm, podendo assim mensurar a atividade antioxidante ou a concentração de MDA de acordo com a absorbância (Figura 10).

Figura 10 - Reação fotocolorimétrica entre o ácido 2-tiobarbitúrico e o malondialdeído, formando o composto colorido (rosa).



Fonte: Stocks et al., 1974, adaptado.

Foram utilizados os seguintes parâmetros para determinar a atividade antioxidante do EMPC através do método MDA-TBARS, Potente atividade $IC_{50} \leq 20 \mu\text{g/mL}$, moderada $21 \mu\text{g/mL} \geq IC_{50} \leq 70 \mu\text{g/mL}$ e baixa $IC_{50} \geq 71 \mu\text{g/mL}$. No método MDA-TBARS o EMPC apresentou IC_{50} de $61,59 \mu\text{g/mL}$ capacidade antioxidante superior ao padrão BHT $75,69 \mu\text{g/mL}$, no entanto essa atividade se enquadra como moderada quando comparada ao BHT (Gráfico 3) (Tabela 2).

Gráfico 3: Curva analítica da inibição da peroxidação lipídica empregando o EMPC.**Tabela 2 -** Avaliação da atividade antioxidante do EMPC pelos métodos DPPH, β -caroteno/ácido linoleico e MDA-TBARS.

Amostras	Métodos avaliados		
	DPPH	β -caroteno/ác. Linoleico	MDA-TBARS
	IC ₅₀ (µg/mL)	%AA	IC ₅₀ (µg/mL)
	EMPC	16,60	46,48
BHT	16,72	91,20	75,69

5.3 Atividade Antiproliferativa do EMPC

Dois parâmetros de resposta foram calculados a partir do Gráfico 4, (GI₅₀ e TGI) para o extrato em cada linhagem celular cancerígenas ou não-cancerígenas, os resultados estão expressos na Tabela 3.

Gráfico 4 – Atividade antiproliferativa do (A) EMPC e (B) padrão doxorrubicina frente as 9 linhagens celulares cancerígenas e 1 não-cancerígena.

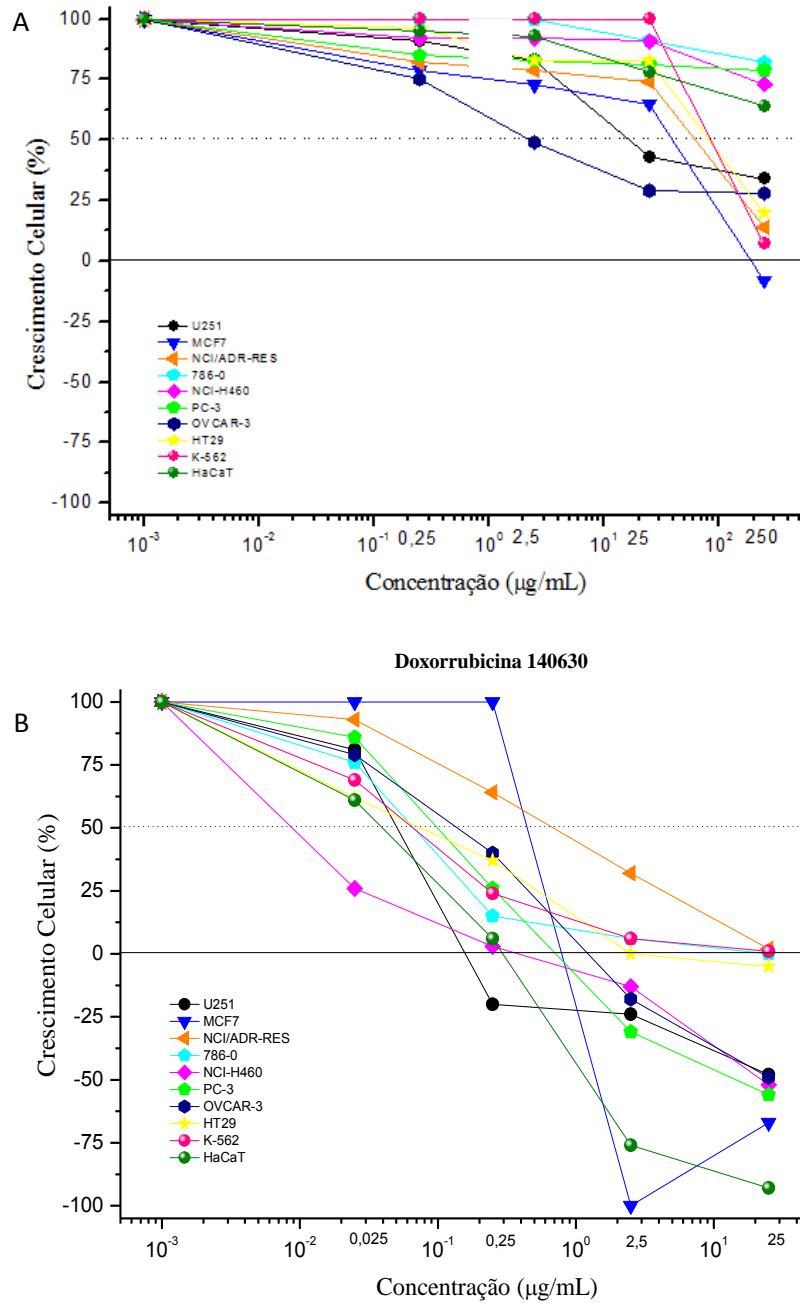


Tabela 3 - GI₅₀ e TGI extrato metanólico de *Psychotria capillacea* e padrão Doxorrubicina (µg/mL) em várias linhagens de células tumorais.

Linhagens de células tumorais	Amostra		Padrão	
	EMPC		Doxorrubicina	
	GI ₅₀ (µg/mL)	TGI (µg/mL)	GI ₅₀ (µg/mL)	TGI (µg/mL)
HaCat	(-)	(-)	0,01	0,77
HT-29	83,19	(-)	0,09	26,03
K-562	85,21	(-)	0,03	2,60
MCF-7	39,64	194,42	0,01	2,52
NCIH-460	(-)	(-)	0,01	3,73
NCI/ADR-RES	62,44	(-)	0,20	22,42
OVCAR-3	2,23	(-)	0,02	1,47
PC-3	(-)	(-)	0,18	1,03
U-251	16,76	(-)	0,02	2,68
786-0	(-)	(-)	0,04	0,51

Os valores de GI₅₀ (atividade citotóxica) referem-se à concentração de extrato que reduz 50% do crescimento celular em relação às células de controle (sem adição de extrato). O TGI (atividade citostática) refere-se à concentração do extrato necessário para inibição total do crescimento celular. Neste enfoque, a atividade foi classificada para os seguintes valores: GI₅₀ e TGI > 100 µg/mL, inativo; 10 µg/mL > GI₅₀ e TGI < 100 µg/mL, moderada e GI₅₀ e TGI < 10 µg/mL ativa, quando comparados ao padrão Doxorrubicina.

O extrato apresenta um potencial ativo sobre a célula OVCAR-3 com GI₅₀ de 2,23 µg/mL. Nas linhagens de células cancerosas U-251 (GI₅₀ = 16,76 µg/mL), NCI/ADR-RES (GI₅₀ = 62,44 µg/mL), MCF-7 (GI₅₀ = 39,64 µg/mL; TGI = 194,42 µg/mL), K-562 (GI₅₀ = 85,21 µg/mL) e HT-29 (GI₅₀ = 83,19 µg/mL), EMPC apresentou um potencial moderado.

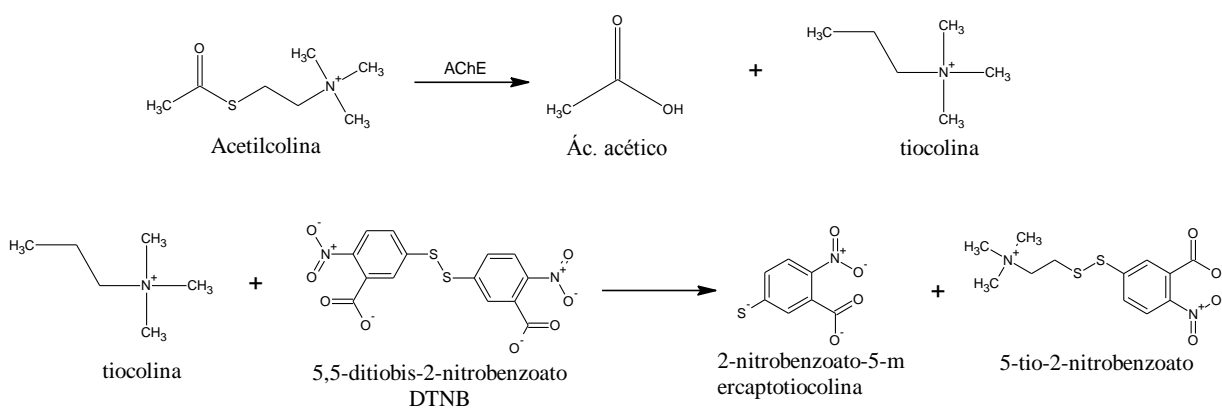
Estudos mostram que algumas espécies do gênero apresentaram atividade antiproliferativa, sendo elas *P. prunifolia* e *P. umbellata* que apresentam atividade antiproliferativa frente a linhagem celular leucêmica (ROTH et al., 1990; KATO et al., 2011; GERLACH et al., 2010).

O Instituto Nacional de Câncer Americano considera um extrato bruto promissor quando o mesmo demonstra um GI₅₀ inferior a 30 µg/mL (SUFFNESS e PEZZUTO, 1990), sendo assim os resultados obtidos pelo EMPC, pode ser uma alternativa viável para o tratamento dos cânceres de ovário e glioma, considerando também a necessidade de estudos mais aprofundados para descobrir os compostos responsáveis e o mecanismo de ação.

5.4 Avaliação do Potencial Anticolinesterásico do EMPC

No meio reacional na placa de 96 poços, a enzima AChE hidrolisa o substrato acetilcolina, gerando como produto a tiocolina, que reage com o reagente de Ellman, produzindo 2-nitrobenzoato-5-mercaptotiocolina e 5-tio-2-nitrobenzoato, que possibilita a determinação a 405 nm (Figura 11) (ELLMAN, 1961).

Figura 11 - Reação fotocolorimétrica do neurotransmissor ACh com o reagente de Ellman.



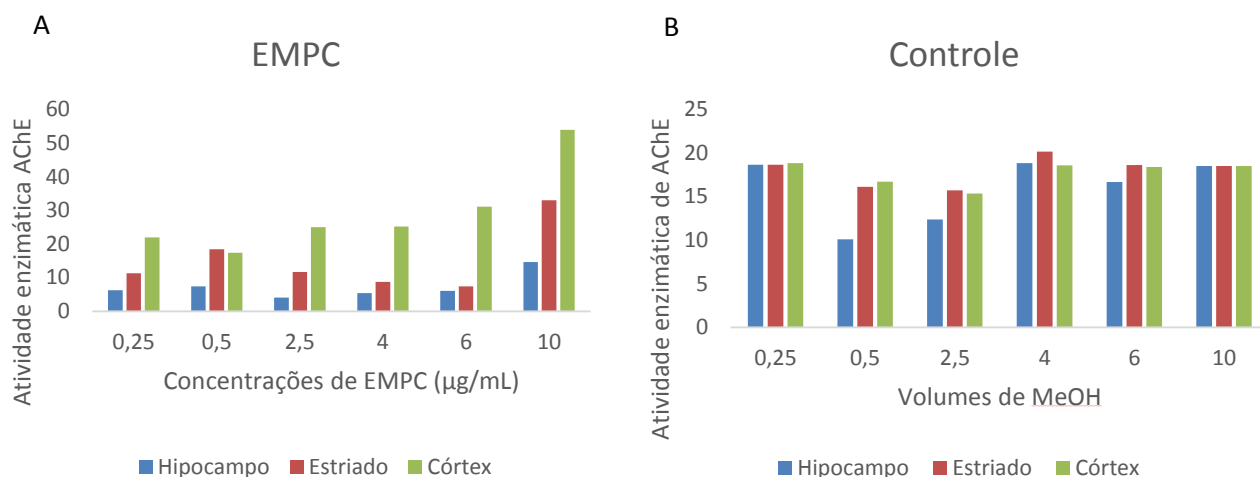
Fonte: próprio autor

A atividade enzimática para o EMPC foi expressa em potente quando o extrato apresentou baixa taxa de hidrólise de ACh, quando comparado ao controle, pois essa atividade está diretamente relacionada com a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina. Quanto mais elevada a taxa de atividade enzimática menos efetivo o extrato frente à enzima AChE.

Os valores obtidos na determinação do potencial anticolinesterásico foram expressos no Gráfico 5. Para determinar o potencial neuroprotetor do EMPC utilizou-se a atividade

enzimática (μmol de ACh hidrolisada \times Hora⁻¹/mg de proteína) do cérebro na presença do solvente metanol como controle para comparar uma possível redução ou elevação da atividade enzimática após adição das diferentes concentrações do EMPC (0,25; 0,5; 2,5; 4; 6 e 10 mg/mL).

Gráfico 5 - Potencial anticolinesterásico do EMPC e Controle expresso em atividade enzimática de AChE (μmol de ACh hidrolisada \times Hora⁻¹/mg de proteína).



Pode-se observar no gráfico que o EMPC se mostrou ativo quando comparado ao controle na estrutura hipocampo, apresentando atividades enzimáticas inferiores ao controle nas diferentes concentrações testadas. O mesmo se pode observar para a amostra de estriado com exceção da concentração 10 mg/mL. A amostra de córtex na presença do extrato não apresentou resultados promissores, apresentando elevada taxa enzimática quando comparada ao controle (Tabela 4 e 5).

Tabela 4 - Atividade enzimática do EMPC acompanhada pelos respectivos desvios-padrões.

Concentração mg/mL	Atividade enzimática da AChE (μmol de ACh hidrolisada \times hora ⁻¹ /mg de proteína)		
	Hipocampo	Estriado	Córtex
0,25	6,24 \pm 0,14	11,29 \pm 0,21	21,98 \pm 1,34
0,5	7,36 \pm 0,42	18,42 \pm 0,84	17,34 \pm 2,40
2,5	4,03 \pm 0,16	11,67 \pm 0,56	25,02 \pm 0,99
4	5,37 \pm 0,32	8,69 \pm 0,58	25,18 \pm 0,67
6	6,08 \pm 0,10	7,39 \pm 1,11	31,11 \pm 0,86
10	14,65 \pm 0,98	33,02 \pm 3,89	53,93 \pm 1,66

Tabela 5 – Atividade enzimática do controle acompanhada pelos respectivos desvios-padrões.

Volume de MeOH (mL)	Atividade enzimática da AChE ($\mu\text{mol de ACh hidrolisada} \times \text{hora}^{-1}/\text{mg de proteína}$)		
	Hipocampo	Estriado	Córtex
0,25	18,65 \pm 0,21	18,65 \pm 0,21	18,85 \pm 1,31
0,5	10,11 \pm 2,56	16,11 \pm 2,88	16,7 \pm 2,33
2,5	12,37 \pm 5,81	15,77 \pm 0,06	15,34 \pm 0,67
4	18,83 \pm 0,94	20,16 \pm 3,13	18,59 \pm 1,53
6	16,68 \pm 2,85	18,62 \pm 0,75	18,41 \pm 3,54
10	18,50 \pm 2,95	18,52 \pm 2,99	18,50 \pm 2,95

Outras espécies de *Psychotria* também apresentaram atividade frente à enzima, são elas: *P. principensis* que inibiu a atividade enzimática em 50% com uma concentração de 2,4 ng/mL devido a presença do alcaloide vocamine. As frações de *P. viridis*, clorofórmio (91,76% \pm 2,25%), hexano (80,34% \pm 1,33%), metanol (85,28% \pm 2,99%) e acetato (91,21% \pm 3,95%), apresentaram elevada atividade anticolinesterásica expressa em porcentagem de inibição, quando comparadas ao controle positivo Galantamina® (90,31% \pm 0,24%) (SOARES, 2015; CURRAIS et al., 2014). Analisando este contexto é possível afirmar que a espécie *Psychotria capillacea* possui atividade frente a enzima AChE, no entanto estudos Ex vivo, In vivo e In sílico, são primordiais para caracteriza-lo como potencial protótipo a fármaco, elucidando seus mecanismos de ação, bem como suas características farmacodinâmicas e farmacocinéticas,

6. COSIDERAÇÕES FINAIS

O EMPC apresentou maior concentração de flavonóis e taninos condensados comparado a estudos fitoquímicos anteriormente relatados na literatura.

O EMPC exibiu elevado potencial antioxidante perante o método de sequestro de radicais livres DPPH, e moderada atividade antioxidante frente aos modelos de peroxidação lipídica (cooxidação do betacaroteno/ác linoleico e MDA-TBARS).

A espécie também apresentou elado potencial antiproliferativo para as linhagens celular de ovário ($GI_{50} = 2,223 \mu\text{g/mL}$).

O EMPC apresentou atividade anticolinesterásica, sendo observado em diferentes estruturas cerebrais, com exceção do córtex, onde o EMPC não se mostrou promissor, devido a sua elevada taxa de hidrólise de ACh.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADJIBADÉ, Y. Pharmacognose Du Psychotria forsteriana A. Gray (RUBIACEAE). **Aspects Botanique, Chimique et Essais Pharmacologiques Preliminaires**. Paris, Universite Louis Pasteur de Strasbourg. 1989.

ALVES A. R.; SILVA, M. J. P. O uso da fitoterapia no cuidado de crianças com até cinco anos em área central e periférica da cidade de São Paulo. **Revista Escola de Enfermagem, USP**. v. 37, n. 4, p. 85-91, 2003.

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

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

BOGO, D. **Avaliação da atividade antitumoral in vitro e in vivo de compostos de líquens**. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste, Campo Grande-MS, p. 18-38, 2012.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BENSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm. Wiss. Technol.**, v.28, p.25–30, 1995.

BRASIL, 2016 (a). **Ministério do Meio Ambiente - Árvores Brasileiras**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>>. Acessado em: 24/09/2016.

BRASIL, 2016 (b). **Ministério do Meio Ambiente - Biodiversidade Brasileira**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>>. Acessado em: 21/09/2016.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade Como Fonte De Medicamentos. **Cienc. Cult.** vol.55 no.3 São Paulo July/Sept. 2003

COORDEL, G. A.; QUINN-BEATTIE, M. L.; FARSWORTH, N. R. The potencial of alkaloids in drugs discovery. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 183-205, 2001.

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N., MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Rev. Virtual Quim.**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

CURRAIS, A.; CHIRUTA, C.; GOUJON-SVRZIC, M.; COSTA, G.; SANTOS, T.; BATISTA, M. T.; PAIVA, J.; do CÉU MADUREIRA, M.; MAUHER, P. Screening and identification of neuroprotective compounds relevant to Alzheimer's disease from medicinal plants of S. Tomé e Príncipe. **J Ethnopharmacol.** v. 155, n. 1, p. 830-840. 2014.

DECRETO nº 5.813 de 22 de junho de 2006. Dispõe sobre a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Diário Oficial da União** (Brasília). 2006.

DEWICK, P. M. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. **Chichester**, Ed. John Wiley e Sons, V.2, p.351-359, 1997.

DIAS, K. S. T.; DE PAULA, C. T.; RIQUEL, M. M.; LAGO, S. T.; COSTA, K. C. M.; VAZ, S. M.; MACHADO, R. P.; LIMA, L. M. S.; VIEGAS JUNIOR, C. Aplicações Recentes da Abordagem de Fármacos Multialvo para o Tratamento da Doença de Alzheimer **Rev. Virtual Quim.**, v. 7, n. 2, p. 609-648, 2015.

ELLMAN, G. L. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**. v. 7, p. 88-95, 1961.

FARIA, E. O.; CARVALHO, B. G.; MELO, M. P. de; OLIVEIRA, P. L. de; KATO, L.; OLIVEIRA, C. M.; SILVA, C. C. da; TANAKA, C. A. Fitoquímica e avaliação antibacteriana de *Psychotria prunifolia* (Kunth) Steyerem (Rubiaceae). **Soc. Brasileira de Química**, 2008.

FARIAS, F. M. *Psychotria myriantha* Müll. Arg. (Rubiaceae): caracterização dos alcaloides e avaliação das atividades antiquimiotóxica e sobre o sistema nervoso central. Porto Alegre, RS. UFRGS, Tese (doutorado), Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, xv, 191 p. 2006.

FENG, Z.; HU, W.; MARNETT, L. J.; TANG, M. Malondialdehyde, a major endogenous lipid peroxidation product, sensitizes human cells to UV- and BPDE-induced killing and

mutagenesis through inhibition of nucleotide excision repair. **Mutat. Res.**, v. 601, p. 125-136, 2006.

FERGUSON, L.R. Chronic inflammation and mutagenesis. **Mutat. Res.** v. 690, p. 3-11, 2010.

Flora do Brasil, 2016. **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB14166>>. Acesso em: 04/12/2016.

FORMAGIO, A. S. N.; VOLOBUFF, C. R. F.; SANTIAGO, M.; CARDOSO, C. A. L.; VIEIRA, M. C.; PEREIRA, Z. V. Evaluation of Antioxidant Activity, Total Flavonoids, Tannins and Phenolic Compounds in Psychotria Leaf Extracts. **Antioxidants**. v. 3, p. 745-757, 2014.

FRANÇA I. S. X. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista Brasileira de Enfermagem**, Brasília. v. 61, n. 2, p. 201-8, 2008.

GERLACH, S. L.; RATHINAKUMAR, R.; CHAKRAVARTY G.; GÖRANSSON U.; WIMLEY W. C.; DARWIN S. P.; MONDAL D. Anticancer and Chemosensitizing Abilities of Cycloviolacin O₂ from *Viola odorata* and Psyle Cyclotides from *Psychotria leptothyrsa*. **Biopolymers Peptide Science**. v. 94 n. 5, 2010.

GILIANI, A.H.; RAHMAN, A. U. Trends in ethnopharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 43-49, 2005.

GOMES, J. P. M. **Pesquisa De Atividade Antitumoral E Mutagênica In Vitro De Produtos Naturais**. Universidade Estadual Paulista Julho de Mesquita Filho. PósGraduação em Ciências Farmacêuticas. Araraquara-SP. 2008

GRIGNON, S.; CHIANETTA, J. M. Assessment of malondialdehyde levels inschizophrenia: A meta-analysis and some methodological considerations. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**. v. 31, p. 365-369, 2007.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**. v.55, p. 481–504, 2000.

IBGE. **Atlas geográfico escolar**. 3 ed. Rio de Janeiro, RJ, p.58, 2007.

Instituto Oncoguia, 2015. **O que é câncer?**. Disponível em: <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/cancer/12/1/>>. Acessado em: 08/11/2016.

KARATAS, F.; KARATEPE, M.; BAYSAR, A. Determination of free malondialdehyde in human serum by high-performance liquid chromatography. **Analytical Biochemistry**. v. 311, p.76-79, 2002.

KATO, L.; VILANOVA-COSTA, C. A. S.T.; SILVEIRA-LACERDA, E. de P.; PIRES, W. C.; MELLO, F. M. dos S.; BATISTA, M. P.; LIMA, A.P. Estudo Da Atividade Citotóxica Do Extrato Bruto Etanólico De *Psychotria prunifolia* (Rubiaceae) Em Células Tumorais E Normais In Vitro. **Rev. Biol. Meotrop**. v. 8, p. 15-23, 2011.

KATO, L.; VILANOVA-COSTA, C. A. S.T.; SILVEIRA-LACERDA, E. de P.; PIRES, W. C.; MELLO, F. M. dos S.; BATISTA, M. P.; LIMA, A.P. Estudo Da Atividade Citotóxica Do Extrato Bruto Etanólico De *Psychotria prunifolia* (Rubiaceae) Em Células Tumorais E Normais In Vitro. **Rev. Biol. Meotrop**. v. 8 p. 15-23, 2011.

KAUR, C.; KAPOOR, H.C. Antioxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. **Int. J. Food Sci. Technol.**, v. 37, p. 153–161, 2002.

LAJIS, N.H.; MAHMUD, Z.; TOIA, R.F. The alkaloids of *Psychotria rostrata*, **Planta Med.** v. 59, p.383–384, 1993.

LIBOT, F.; MIET, C.; KUNESH, N.; POISSON, J. E.; PUSSET, J.; SEVENET, T. Rubiacées d'océanie: alcaloides de *Psychotria oleoides* de Nouvelle-Calédonie et de *Calycodendron milnei* du Vanuatu (Nouvelle-Hébrides), **J. Nat. Prod.** v. 50, p. 468-473, 1987.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. Braz. J. Pharm. Sci**, v. 37, p. 293-303, 2001.

LIN, J.Y.; TANG, C.Y. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. **Food Chem**. v.101, p.140–147, 2007.

LOPES, S.; POSER, G. L. V.; KERBER, V. A.; FARIAS, F. M.; KONRATH, E. L.; MORENO, P.; SOBRAL, M. E.; ZUANAZZI, J. A. S.; HENRIQUES, A. T. Taxonomic

significance of alkaloids and iridoid glucosides in the tribe Psychotrieae (Rubiaceae), **Biochemical Systematics and Ecology**, v.32, p. 1187-1195, 2004.

LUCATELLI, J. F.; BARROS, A. C.; MALUF, S. W.; ANDRADE, F. M. Influência genética sobre a doença de Alzheimer de início precoce. **Rev. Psiq. Clín.** v. 36, n. 1, p. 25-30, 2009.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA-JR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVERRIA, A. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MAHMUD, Z.; MUSA, M.; ISMAIL, N. H. Citotoxicity and Bactericidal Activity of *Psychotria rostrata*, **International Journal of Pharmacology**, v. 31, n. 2, p. 142-146, 1993.

MARNETT, L. J. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. **Mutat. Res.**, v. 424, p. 83-95, 1999.

MATTOS, L.M.; MORETTI, C.L.; MUNIZ L.B.; SILVA, E.Y.Y. da. Protocolo de análise para determinação da atividade antioxidante total em hortaliças no sistema Beta-caroteno/ácido linoléico. **Embrapa -Comunicado Técnico**, p.1-2, 2009.

MAXSON, E.D.; ROONEY, L.W. Evaluation of methods for tannin analysis in sorghum grain. **Cereal Chem.** v.49, p.719–729,1972.

MONKS, A. D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPELL,H.; MAYO, J.; BOYD, M. J. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **Journal of Nacional Cancer institute**, v.83, p.757-766, 1991.

MONTEIRO, V. C. B. **Avaliação do estresse oxidativo em humanos e animais suplementados com ácidos graxos polinsaturados Omega-3**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MOREIRA, P. A.; STEFANI, F. Y. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. **Rev. Oswaldo Cruz**. v. 1, n. 2, p. 1-12, 2014.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **J. Chromatogr.** 1054, 95–111, 2004.

NEPOKROEFF, M.; BREMER, B.; SYTSMA, K. J. Reorganization of the genus *Psychotria* and tribe Psychotriaceae (Rubiaceae) inferred from ITS AND rbcL sequence data, **System. Bot.**, v. 24, n. 1, p. 5-27, 1999.

PEREIRA, Z. V. **Rubiaceae Juss. do Parque Estadual das Várzeas do rio Ivinhema, Mato Grosso do Sul: florística, sistema reprodutivo, distribuição espacial e relações alométricas de espécies distílicas**. UNICAMP – Instituto de Biologia (Tese de Doutorado), Campinas, SP, 2007.

PERRY, L.M.; METZGER, J. Medicinal Plants of East and Southeast; **MIT Press**, Cambridge, UK, 1980.

REZENDE, H. A.; COCCO, M. I. M. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. **Revista Escola de Enfermagem, USP.**, v. 36, n. 3, p. 282-288, 2002.

ROTH, A.; KUBALLA, B.; BOUNTHANH, C.; CABALION, P.; SÉVENET, T., BECK, J. P.; R. ANTON. Cytotoxic Activity of Polyindoline Alkaloids of *Psychotria forsteriana* (Rubiaceae). **Planta médica 1986**, v. 6, p. 450-453. 1990.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.D. Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. **Embrapa Agroindústria Tropical/Comunicado Técnico**. v.128, p.1-4, 2007.

SERENIKI, A.; VITAL, M. A. B. F. A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. **Rev Psiquiatr RS**. p. 1-17, 2008.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3º ed. UFRGS, Rio Grande do Sul. 834p. 2001.

SOARES, D. B. S. **Estudo fitoquímico das folhas de *Psychotria viridis* (Rubiaceae) e avaliação da atividade biológica de extratos e constituintes**. UFMG, Belo Horizonte, 172p. 2015.

STOCKS J.; GUTTERIDGE J. M. C.; SHARP, R. J.; DORMANDY, T. L. Assay using brain homogenate for measuring the antioxidant activity of biological fluids. **Clin Sci Mol Med.**, v. 47, p. 215-222, 1974.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. *Assays related to cancer drug discovery*. In: Hostettmann, K. (Ed.), **Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity**, Academic Press, London, p. 71–133, 1990.

TAMBELLI, C. H., 2010. Sinapse. Disponível em: <http://w2.fop.unicamp.br/dcf/fisiologia/downloads/sinapse_2010.pdf>. Acessado em: 14/11/2016.

TAYLOR, C. M. Overview of Psychotriace (Rubiaceae) in the Neotropics, **Opera Botanical**, Belgica, v. 7, p. 261-270, 1996.

TORRES, J.L.; ROSAZZA, J.P.N. Microbial transformations of *p*-coumaric acid by *Bacillus megaterium* and *Curvularia lunata*. **J. Nat. Prod.** v.64, p.1408–1414, 2001.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; BENFATO, M. S.; MANFREDINI, V.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quím. Nova**, v. 30, p. 1323-1338, 2007.

8. ANEXOS



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Dourados-MS, 22 de fevereiro de 2016.

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Avaliação da atividade antitumoral, anticolinesterásica, anti-inflamatória e toxicidade de espécies de Psychotria (Rubiaceae)**", protocolo nº 14/2015, sob responsabilidade de Anelise Samara Nazari Formagio – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, *subfilo Vertebrata* (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFGD) da Universidade Federal da Grande Dourados, em reunião de 11 de dezembro de 2015.

<i>Vigência do Projeto</i>	07/03/2016 – 15/04/2016
<i>Espécie/linhagem</i>	<i>Rattus norvegicus</i> /Wistar e <i>Mus musculus</i> /Swiss
<i>Nº de animais</i>	195
<i>Peso/idade</i>	200-300 g/ 2-3 meses 25-30 g/ 45 dias
<i>Sexo</i>	87 Machos e 24 Fêmeas / 84 Machos
<i>Origem</i>	Biotério da Faculdade de Ciências da Saúde- FCS/UFGD

Melissa Negrão Sepulveda

Melissa Negrão Sepulveda
Coordenadora CEUA

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFGD – Rua João Rosa Góes, 1761 – Vila Progresso.
Dourados/MS. E-mail: ceua@ufgd.edu.br