

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PRISCILLA ANDRADE DE MOURA

***SCREENING DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E  
ANTICOAGULANTE DE PLANTAS DO BIOMA CAATINGA***

RECIFE, 2015

PRISCILLA ANDRADE DE MOURA

***SCREENING DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E  
ANTICOAGULANTE DE PLANTAS DO BIOMA CAATINGA***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito final exigido para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Maria Tereza dos Santos  
Correia

Co-Orientador: Dr. Marlon Vilela de Brito

RECIFE, 2015

Catálogo na Fonte:  
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Moura, Priscilla Andrade de  
Screening das atividades antioxidantes e anticoagulantes de plantas do bioma  
Caatinga / Priscilla Andrade de Moura. – Recife: O Autor, 2015.

82 f.: il.

Orientadores: Maria Tereza dos Santos Correia, Marlon Vilela de Brito  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro  
de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2015.  
Inclui referências e anexos

1. Caatinga 2. Plantas da Caatinga 3. Plantas medicinais I. Correia,  
Maria Tereza dos Santos (orient.) II. Brito, Marlon Vilela de (coorient.)  
III. Título.

634.90981

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-250

# **"Screening das atividades antioxidante e anticoagulante de plantas do bioma Caatinga"**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito final exigido para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Biotecnologia.

Data de Aprovação: 09/02/2015

COMISSÃO EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia - (Orientador/UFPE)

---

Profa. Dra. Márcia Vanusa da Silva - (UFPE)

---

Prof. Dr. Luís Cláudio Nascimento da Silva – (University of Copenhagen)

“Dedico este trabalho a minha mãe, Geni, e as minhas orientadoras, Profas. Tereza Correia e Márcia Vanusa, que foram de grande importância durante a realização do mesmo”.  
Vocês são exemplo e inspiração para mim, cada uma ao seu modo.

Obrigada por tudo!”

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por todas as oportunidades que tem me dado e pelas pessoas maravilhosas que tem colocado em meu caminho.

A minha mãe, Geni, por ter sido sempre uma guerreira, lutando e abdicando de tantas coisas por mim. Por todo o incentivo que sempre me deu e por ter me ensinado a sempre correr atrás dos meus objetivos, por mais distantes ou impossíveis que eles parecessem. Cheguei até aqui graças aos seus ensinamentos!!!

Ao meu namorado, Elizardo, meu melhor amigo e companheiro de aventuras! Obrigada pelas críticas, pela compreensão, paciência e companheirismo, que tornaram essa jornada bem mais fácil de suportar.

A minha família, fonte de muito carinho e afeto. Em especial ao meu pai, Josenildo, a minha vozinha, D. Maria José, às minhas irmãs, Patrícia e Laura e aos meus primos e primas, que estão sempre na torcida por mim...vocês são incríveis!! Também agradeço à Mayara Nunes, irmã que a vida acadêmica me deu...obrigada pela amizade e apoio de sempre!!

A minha orientadora, Profa. Maria Tereza dos Santos Correia, pela oportunidade de ser sua aluna, e por ser sempre tão solícita e amável com seus alunos, sendo um exemplo de orientadora, de professora e, mais ainda, de pessoa!!

A minha co-orientadora, Profa. Márcia Vanusa da Silva, por ter me recebido de braços abertos e confiado na minha capacidade, num momento tão difícil pra mim. Por ser também um exemplo de humildade, respeito e perseverança para os seus alunos. Páginas e páginas de agradecimento a ela jamais seriam suficientes!!! OBRIGADA.

Ao meu co-orientador, Marlon Brito, que mesmo distante foi muito solícito e sempre me ajudou no que precisei. Também agradeço ao meu co-orientador extra-oficial Clóvis Macêdo, pela gentileza, generosidade e paciência, além de todas contribuições neste trabalho.

Agradeço a Alexandre Gomes, pela grande contribuição ao nosso trabalho, através da coleta das espécies vegetais.

Ao professor Rafael Ximenes, pela contribuição ao nosso trabalho através da análise fitoquímica.

Aos colegas do Departamento de Antibióticos, minha primeira “casa” durante o mestrado: Iasmim, Wanda, Wellma, Camila, Evelyn, Glêzia, Emerson, Raphael, Jéssica, Nataliane. Obrigada por todo apoio e ensinamentos, e também pelos momentos divertidos e boas risadas. Agradeço principalmente às professoras Janete Magali e Gláucia Lima, e às técnicas Fátima (Fafá) e Marcela...muito obrigada por toda ajuda!!

Agradeço muito às minhas eternas IC's Amanda e Elys. Obrigada pela companhia até altas horas no laboratório, pelos baldes e baldes de vidrarias sujas compartilhados...e pelos momentos divertidos que tivemos ao longo desta caminhada. Desejo muito sucesso e crescimento às duas.

A todos que fazer o Departamento de Bioquímica, principalmente aos colegas dos Laboratórios de Produtos Naturais e de Biologia Molecular. Agradeço principalmente a Seu João, que me ajudou e me ensinou muito, sempre me socorrendo quando eu estava “perdida” no laboratório!!!

Aos meus colegas da turma PGCB 2013.1, obrigada por dividirem comigo os momentos bons e também os tensos no decorrer do mestrado!

Um agradecimento especial aos meus amigos e companheiros de laboratório: Hortência, Bruno, Lívia, Bárbara, Tayane, Sivoneide, Túlio, Amanda Uchôa...obrigada por toda ajuda científica, e também por tornar esses momentos mais divertidos!!!

Aos amigos Graciely, Rafaela, Milca, Marcinha, Mariana, Raquel, Lívia, Bruno, Ednaldo e Temístocles, que tive a sorte de encontrar. Obrigada pela amizade e palavras de incentivo, que fizeram toda a diferença nos momentos mais difíceis.

A Universidade Federal de Pernambuco e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

Por fim, agradeço a todos que, ao seu modo, contribuíram para que esta etapa fosse concluída!

**MUITO OBRIGADA!!!**

“A fé na vitória tem que ser inabalável.”

- O Rappa

## RESUMO

A Caatinga tem uma grande variedade de espécies vegetais, sendo muitas delas endêmicas e adaptadas às condições de estresse ambiental deste ambiente. Estudos recentes indicam algumas plantas da Caatinga como fontes promissoras de biomoléculas de interesse, incluindo compostos com atividade antimicrobiana, antioxidante, anticoagulante, entre outras. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade antioxidante e anticoagulante de plantas da Caatinga, frente a métodos de análise *in vitro*. As espécies *Anadenanthera colubrina* (Ac), *Bowdichia virgilioides* (Bv), *Libidibia ferrea* (Lf), *Myroxylon peruiferum* (Mp), *Pityrocarpa moniliformis* (Pm) (Fabaceae); e *Buchenavia tetraphylla* (Bt) (Combretaceae) foram coletadas no Parque Nacional do Catimbau (Pernambuco-Brasil) e suas folhas utilizadas para preparação de extratos orgânicos, utilizando-se os solventes diclorometano (DIC), tetrahydrofurano (THF) e acetona (ACE). Para avaliação do potencial antioxidante, os extratos foram submetidos aos seguintes ensaios *in vitro*: capacidade antioxidante total, sequestro dos radicais DPPH e ABTS<sup>+</sup> e o ensaio de proteção de DNA, utilizando-se o reagente de Fenton. Para se avaliar o potencial anticoagulante, foram realizados os ensaios de e Tempo de Prototrombina (TP) Tempo de Ativação Parcial de Tromboplastina (TTPA). Além disso, foram determinados o perfil fitoquímico e o teor de compostos fenólicos totais dos extratos vegetais. Nos ensaios de capacidade antioxidante total, o melhor resultados foram obtidos nos extratos LfTHF (79,300 ± 3,19). Nos ensaios de captura dos radicais DPPH e ABTS<sup>+</sup>, as melhores porcentagens de inibição foram observadas em AcTHF, BtTHF, BtACE, LfTHF, LfACE, e PmTHF, que também apresentaram os melhores resultados nos ensaios de proteção de DNA. Os maiores teores de compostos fenólicos totais foram encontrados nos extratos obtidos a partir do THF para todas as plantas. Nos ensaios de atividade anticoagulante, os extratos PmTHF e PmACE alteraram o tempo de coagulação em ambos os ensaios realizados. O perfil fitoquímico evidenciou, principalmente, a presença flavonoides, derivados cinâmicos, terpenos e protoantocianidinas, principalmente nos extratos THF e acetônicos. Os resultados obtidos mostram que os solventes tetrahydrofurano e acetona são capazes de extrair das plantas compostos com importantes atividades biológicas, como antioxidante e anticoagulante. As folhas de *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* e *Pityrocarpa moniliformis* apresentam alto potencial antioxidante em ensaios *in vitro*, enquanto as folhas de *Pityrocarpa moniliformis* apresentam potencial para o fornecimento de compostos com atividade anticoagulantes.

Palavras-chave: plantas da Caatinga; atividade antioxidante; atividade anticoagulante; extratos orgânicos.

## ABSTRACT

The Caatinga has a wide variety of plant species, many of which are endemic and adapted to the conditions of environmental stress in this environment. Recent studies indicate some plants from Caatinga as promising sources of biomolecules of interest, including compounds with antimicrobial, antioxidant, and anticoagulant activity, among others. Thus, the aim of this study was to evaluate the antioxidant and anticoagulant capacity of Caatinga plants, compared to *in vitro* analytical methods. The species *Anadenanthera colubrina* (Ac), *Bowdichia virgilioides* (Bv), *Libidibia ferrea* (Lf), *Myroxylon peruiferum* (Mp), *Pityrocarpa moniliformis* (Pm) (Fabaceae); and *Buchenavia tetraphylla* (Bt) (Combretaceae) were collected in “Parque Nacional do Catimbau” (Pernambuco-Brazil) and its leaves used for preparation of organic extracts, using the solvents dichloromethane (DIC), tetrahydrofuran (THF) and acetone (ACE). To evaluate the antioxidant potential, the extracts were subjected to the following *in vitro* assays: Total antioxidant capacity, kidnapping of DPPH radical and ABTS + and DNA protection assay. To evaluate the anticoagulant potential, were performed the tests Prototrombina Time (PT) Activated Partial Thromboplastin Time (APTT). In addition, they determined the phytochemical profile and the content of phenolic compounds from plant extracts. In total antioxidant capacity assays, the best results were obtained in LfTHF extracts ( $79.300 \pm 3.19$ ). The capture assays of DPPH and ABTS radicals, the best inhibition percentages were observed in AcTHF, BtTHF, BtACE, LfTHF, LfACE and PmTHF, which also showed the best results in DNA protection assays. The highest content of total phenolic compounds were found in the extracts obtained from the THF for all plants. In anticoagulant activity assays, and PmTHF PmACE extracts alter the clotting time in both tests. The phytochemical profile evidenced mainly the presence of flavonoids, cinnamic derivatives, terpenes and proanthocyanidins, especially in THF and acetic extracts. The results show that acetone and tetrahydrofuran solvents are capable to extract compounds of plants with important biological activities, such as antioxidant and anticoagulant. The leaves *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia férrea*, *Pityrocarpa moniliformis* have a high antioxidant potential *in vitro* assays, while the leaves of *Pityrocarpa moniliformis* have the potential to provide compounds having anticoagulant activity.

Keywords: Caatinga plants, antioxidant activity, anticoagulant activity, organic extract.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Vegetação da Caatinga	22
<b>Figura 2:</b> Parque Nacional da Serra do Catimbau – PARNA Catimbau	24
<b>Figura 3:</b> Espécie <i>Anadenanthera colubrina</i>	26
<b>Figura 4:</b> Espécie <i>Bowdichia virgilioides</i>	27
<b>Figura 5:</b> Espécie <i>Buchenavia tetraphylla</i>	28
<b>Figura 6:</b> Espécie <i>Libidibia ferrea</i>	29
<b>Figura 7:</b> Espécie <i>Myroxylon peruiferum</i>	31
<b>Figura 8:</b> Espécie <i>Pityrocarpa moniliformis</i>	31
<b>Figura 9:</b> Principais vias do metabolismo secundário	33
<b>Figura 10:</b> Exemplos de compostos fenólicos. A presença de pelo menos uma anel aromático caracteriza o grupo.	34
<b>Figura 11:</b> Alguns exemplos de terpenos. O isopreno é a cadeia chave, originando os demais terpenos por fusão de moléculas.	35
<b>Figura 12.</b> Alguns tipos de alcaloides.	36
<b>Figura 13.</b> Representação esquemática da ativação das vias intrínseca, extrínseca e comum da coagulação sanguínea.	45

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Caracterização das principais espécies reativas de oxigênio, formadas *in vivo*

38

## LISTA DE ABREVIACES

ABTS•+: *2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)*

Arixtra®: pentassacardeo sinttico fondaparinux

AUC: rea da curva

AVK: cumarina

BHA: butilhidroxianisol

BHT: butilhidroxitolueno

C: carbono

C<sub>6</sub>: benzoquinonas

C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>: cidos fenólicos

C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>: cido fenilactico

C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>: cido hidroxicinamico, cumarina, fenilpropano, cromonas

C<sub>6</sub>-C<sub>4</sub>: nafitoquinonas

C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>: xantonas

(C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)<sub>2,3</sub>: bi e triflavonoides

(C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>)<sub>2</sub>: lignanas e neolignanas

(C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>)<sub>n</sub>: ligninas

C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>: protoantocianidina

DNA: cido desoxirribonuclico

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

ERNs: espécies reativas de nitrogênio

EROs: espécies reativas de oxigênio

FRAP: poder redutor do ferro

Fe<sup>3+</sup>; Fe<sup>2+</sup>: on férrico

GSH: glutationa

HBPM: heparina de baixo peso molecular

HNF: heparina não fracionada

HNO<sub>2</sub>: cido nitroso

HO•: radical hidroxila

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio

IPP: ou isopentenilpirofosfato

LSD: dietilamida do ácido lisérgico  
MMA: Ministério do Meio Ambiente  
NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato  
NO: óxido nítrico  
N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: óxido nitroso  
NO<sub>2</sub><sup>-</sup>: nitrito  
NO<sub>3</sub><sup>-</sup>: nitratos  
OMS: Organização Mundial de Saúde  
O<sub>2</sub>•: radical superóxido  
O<sub>2</sub>: oxigênio molecular  
ONOO<sup>-</sup>: peroxinitritos  
ORAC: capacidade de absorbância do radical oxigênio  
PARs: receptores ativados de protease  
PG: propilgalato  
PGI<sub>2</sub>: prostaciclina  
RNA: ácido ribonucleico  
RO•: alcóxila  
ROO•: peróxil  
PARNA Catimbau: Parque Nacional da Serra do Catimbau  
TAC: capacidade antioxidante total  
TBHQ: terciobutilhidroxinona  
TEAC: capacidade antioxidante equivalente ao trolox  
TOSC: capacidade total do sequestro de oxirradicais  
TRAP: parâmetro oxidante radical total  
UV: ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
2.1 Objetivo Geral.....	21
2.2 Objetivos Específicos .....	21
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>22</b>
3.1 Caatinga .....	22
3.2 Plantas da Caatinga .....	25
3.2.1 <i>Anadenanthera colubrina</i> .....	25
3.2.2 <i>Bowdichia virgilioides</i> .....	27
3.2.3 <i>Buchenavia tetraphylla</i> .....	28
3.2.4 <i>Libidibia ferrea</i> .....	29
3.2.5 <i>Myroxylon peruiferum</i> .....	30
3.2.6 <i>Pityrocarpa moniliformis</i> .....	31
3.3 Produtos naturais: metabólitos secundários de plantas .....	32
3.3.1 Compostos fenólicos.....	33
3.3.2 Terpenos.....	35
3.3.3 Alcaloides .....	36
3.4 Antioxidantes.....	37
3.4.1 Radicais livres e estresse oxidativo .....	37
3.4.2 Atividade antioxidante.....	39
3.5 Anticoagulantes .....	43
3.5.1 Hemostasia e processos de coagulação sanguínea.....	43
3.5.2 Doenças trombóticas e anticoagulantes.....	44
3.5.3 Anticoagulantes e produtos naturais.....	47
<b>4. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>49</b>
<b>ARTIGO</b> .....	<b>58</b>
<b>1. INTRODUCTION</b> .....	<b>58</b>
<b>2. MATERIAL AND METHODS</b> .....	<b>59</b>
2.1. Plant material .....	59
2.2. Preparation of leaf extracts .....	60
2.3. Phytochemical profile .....	60
2.4. Total phenolic compounds.....	60
2.5. Antioxidant activity.....	60
2.5.1. Total antioxidant activity .....	60

<b>2.5.2. DPPH scavenging assay .....</b>	<b>60</b>
<b>2.5.3. ABTS scavenging assay .....</b>	<b>61</b>
<b>2.5.4. DNA protection assay .....</b>	<b>61</b>
<b>2.5. Anticoagulant Activity .....</b>	<b>61</b>
<b>2.5.1. Human plasma.....</b>	<b>61</b>
<b>2.5.3. Determination of prothrombin time (PT).....</b>	<b>61</b>
<b>2.5.4. Determination of activated partial thromboplastin time (aPTT).....</b>	<b>62</b>
<b>3. RESULTS e DISCUSSION .....</b>	<b>62</b>
<b>3.1. Phytochemical profile .....</b>	<b>62</b>
<b>3.2. Total phenolic compounds.....</b>	<b>64</b>
<b>3.3. Antioxidant activity.....</b>	<b>64</b>
<b>3.3.1. Total antioxidant activity .....</b>	<b>64</b>
<b>3.3.2. DPPH scavenging assay .....</b>	<b>65</b>
<b>3.3.3. ABTS scavenging assay .....</b>	<b>67</b>
<b>3.3.4. DNA nicking assay .....</b>	<b>67</b>
<b>3.4. Anticoagulant activity.....</b>	<b>68</b>
<b>3.4.1. Determination of Prothrombin Time (PT) and Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) .....</b>	<b>68</b>
<b>4. CONCLUSION.....</b>	<b>71</b>
<b>ACKNOWLEDGEMENT .....</b>	<b>71</b>
<b>REFERENCES .....</b>	<b>72</b>
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>77</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>78</b>
<b>Normas da Revista: Biomed Research International .....</b>	<b>78</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais vêm recuperando espaço e importância na indústria farmacêutica, tanto na sua utilização direta quanto para uso como fonte inspiradora de novos padrões moleculares (VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006). Por isso, diversos estudos têm investigado a presença de compostos químicos com potencial biológico em extratos vegetais, principalmente em plantas utilizadas pelas comunidades no combate a várias doenças (GUIMARÃES; SERAFINI; QUINTANS-JÚNIOR, 2014).

O bioma Caatinga possui grande variedade de espécies vegetais, sendo muitas delas endêmicas e adaptadas às condições de estresse ambiental característicos das regiões semiáridas, como baixa pluviosidade, temperaturas elevadas e altas taxas de evapotranspiração. Assim, estudos recentes apontam espécies vegetais da Caatinga como fontes promissoras de biomoléculas de que apresentam atividades biológicas importantes, e as atividades anticoagulante e antioxidante poderiam ser destacadas entre elas (TROVÃO et al., 2007; ARCOVERDE et al., 2014; FÉLIX-SILVA et al., 2014)

Os mecanismos de oxidação e redução são fundamentais para a sobrevivência das células, principalmente no que diz respeito à produção de energia e síntese de moléculas biológicas importantes. Porém, esses mecanismos geram radicais livres que, quando em excesso, podem acarretar sérios danos às células e o surgimento de diversas doenças, como câncer, envelhecimento precoce, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, disfunções cognitivas, dentre outras. Diversos estudos têm investigado a presença de compostos químicos com potencial biológico em extratos vegetais, que podem ser responsáveis pelos efeitos preventivos apresentados pelas plantas contra várias doenças. Desse modo, os estudos envolvendo a propriedade antioxidante de compostos vegetais apresentam diversas perspectivas (SEIFRIED et al., 2007; TRENTIN et al., 2011; CAROCHO; FERREIRA, 2013).

Adicionalmente, as doenças que acometem o sistema circulatório são as principais causas de mortalidade e morbidade no mundo e geram grandes despesas aos países, principalmente pela grande quantidade de medicamentos com atividades antitrombótica, anticoagulante e anti-plaquetária que é utilizada (PAWLACZYK et al., 2011; SHI et al., 2012; SALU et al., 2014), onde muitos pacientes precisam fazer uso contínuo dessa medicação. Porém, os tratamentos com drogas anticoagulantes podem trazer efeitos deletérios aos pacientes, como hemorragias e imunossupressão. Esta e outras desvantagens nos tratamentos com drogas anticoagulantes acabam incentivando a busca por novas opções terapêuticas (ALVARENGA; YOSHIDA; ROLLO, 2011; OSTROWSKI; VALENTINI;

PAVANELLI, 2014) e plantas medicinais têm sido, historicamente, a primeira fonte de moléculas anticoagulantes e antitrombóticas (FÉLIX-SILVA et al., 2014).

Considerando estes aspectos, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antioxidante e anticoagulante dos extratos orgânicos de seis plantas da Caatinga, obtidos a partir de solventes já relatados na literatura por terem potencial de extrair compostos vegetais que apresentam atividade biológica.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Selecionar plantas da Caatinga em função do potencial antioxidante e anticoagulante frente a ensaios *in vitro*, a partir de seus extratos orgânicos;

### **2.2 Objetivos Específicos**

- ✓ Obter os extratos vegetais de plantas da Caatinga;
- ✓ Determinar o perfil fitoquímico dessas plantas;
- ✓ Avaliar o teor de fenóis totais dos extratos vegetais;
- ✓ Avaliar a atividade antioxidante de espécies vegetais da Caatinga, através de diferentes ensaios *in vitro*;
- ✓ Selecionar as plantas da Caatinga com atividade anticoagulante, através de ensaios *in vitro*;

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Caatinga

A região Nordeste, sob influência do clima semiárido, é caracterizada por condições singulares de clima e solo e apresenta, por essa razão, ampla variação fisionômica e florística. O clima do Nordeste é um dos mais complexos do país, devido à grande área que ocupa, com diferentes fisionomias de relevo, e especialmente a associação de dois sistemas climáticos formados pelos ventos alísios do Nordeste e Sudeste, que proporciona chuvas em diversos períodos do ano e em diferentes quantidades, criando assim uma diversidade e instabilidade nos padrões de precipitação anual, o que contribui para a formação de uma grande variedade vegetal (GIULIETT; QUEIROZ, 2006)

A expressão “Bioma Caatinga” é um termo abrangente, usado para caracterizar as diversas fisionomias da região semiárida do nordeste brasileiro, englobando fauna, flora e geomorfologia. É o único bioma exclusivamente brasileiro, que abriga fauna e flora com muitas espécies endêmicas, podendo ser considerado um patrimônio biológico de imensurável valor (Figura 1) (DRUMOND, 2013).

**Figura 1.** Vegetação da Caatinga



Fonte: Diego Assunção, (2011).

A Caatinga (do tupi, mata branca) ocupa uma área de 844.453 km<sup>2</sup>, que equivalem a 10 % de todo o território nacional. Engloba os estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Piauí, Sergipe e o Norte de Minas Gerais (MMA, 2015). Rico em biodiversidade, abriga cerca de 178 espécies de mamíferos, 591 de aves, 177 de répteis, 79 de anfíbios, 241 de peixes e 932 espécies de plantas (MMA, 2015). A temperatura média da região é de 27,5 °C, apresentando baixos níveis de umidade; a precipitação média anual nessa região varia entre 240 e 1500 mm, porém metade da sua área não recebe mais que 500 mm e a maioria das chuvas que ocorrem (50-70%) são concentradas em três meses consecutivos. O número de meses secos aumenta

da periferia para o centro da região e algumas localidades possuem períodos de 7 a 11 meses de baixa disponibilidade de água (MMA, 2015; LEAL et al., 2005; MEDEIROS; LADIO; ALBUQUERQUE, 2013).

Em relação à vegetação, a Caatinga é constituída, predominantemente, por uma floresta espinhosa (6-10 m de altura) e arbustos de pequeno porte e de folhas miúdas, geralmente dotadas de espinhos, como cactáceas, euforbiáceas e bromeliáceas (GIULIETT; QUEIROZ, 2006; DRUMOND, 2013). São caducifólias em sua maioria (perdem suas folhas nos períodos de seca) e capazes de sobreviver em condições ambientais extremas, como restrições hídricas, grandes oscilações diárias de temperatura, alta insolação, ventos fortes e solos rasos e/ou arenosos, além de apresentarem grande tolerância à dessecação (GIULIETT; QUEIROZ, 2006; TROVÃO et al., 2007; ARCOVERDE et al., 2014). As folhas e flores são produzidas em um curto período de chuvas, e a Caatinga permanece “dormente” durante a maior parte do ano. A vegetação herbácea também cresce somente durante o período de chuvas, curtas e esparsas. Por isso, o termo Caatinga foi dado a essa região se refere ao aspecto da vegetação durante a estação seca, quando a maioria das árvores perde as folhas e os troncos esbranquiçados e brilhantes dominam a paisagem (LEAL et al., 2005). Sobre sua diversidade vegetal, cerca de 1010 espécies de Angiospermas foram referenciadas, das quais 318 tem sido consideradas endêmicas (GIULIETT; QUEIROZ, 2006). As famílias mais frequentes são: Caesalpinaceae, Mimosaceae, Euphorbiaceae, Cactaceae e Fabaceae, sendo a última a mais diversa, com 293 espécies em 77 gêneros, dos quais 144 são endêmicas (LEAL et al., 2005; DRUMOND, 2013).

Sendo um dos principais biomas brasileiros, a Caatinga apresenta inúmeras espécies, que são amplamente utilizadas pela população do semiárido nas mais diversas atividades, sendo esta uma realidade que perdura ao longo de décadas nesta região. Esse quadro tem se tornado preocupante, pois além da insuficiente realização de trabalhos relacionados à catalogação da flora nativa, este bioma encontra-se entre os mais alterados e ameaçados pela ação antrópica e, por conta disto, tem sido apontado como o bioma brasileiro mais crítico no que se refere à conservação (SOUZA, 2013). O estudo e a conservação da biodiversidade da Caatinga se constituem em um dos maiores desafios do conhecimento científico brasileiro, pelo fato da mesma ser restrita ao território nacional e também por ser, proporcionalmente, a região menos estudada e menos protegida, onde apenas 1 % do seu território encontra-se em unidades de conservação (MMA, 2015; ARCOVERDE et al., 2014; TROVÃO et al., 2007). Desse modo, ela tem sido vítima de um extenso processo de alteração e deterioração ambiental, provocada pelo uso insustentável de seus recursos (TROVÃO et al., 2007).

Dentre as Unidades de Conservação implementadas na Caatinga, há o Parque Nacional da Serra do Catimbau (PARNA Catimbau), localizado no Sertão Pernambucano, distribuído entre os municípios de Buíque, Ibimirim e Tupanatinga, com área de 607 km<sup>2</sup>. Criado em 13 de dezembro de

2002, o PARNA Catimbau está inserido em uma região definida como área prioritária para pesquisa científica (MMA, 2015) (Figura 2).

**Figura 2.** Parque Nacional do Vale do Catimbau, Pernambuco/Brasil.



Fonte: Diego Assunção, (2011).

Entre as finalidades de maior exploração extrativista da Caatinga, destaca-se o uso medicinal de suas plantas, uma vez que o potencial terapêutico das mesmas é conhecido há décadas (AGRA et al., 2007; SOUZA, 2013). Suas espécies apresentam características fisiológicas que refletem adaptações complexas e peculiares às condições únicas do ambiente onde vivem, o que tem despertado o interesse da comunidade científica (TROVÃO et al., 2007). Estudos etnobotânicos realizados na região apontam que as espécies vegetais são utilizadas pela comunidade para tratar doenças variadas, incluindo doenças de pele, respiratórias, gastrintestinais e infecções variadas. (TROVÃO et al., 2007; AGRA et al., 2007; CARTAXO et al., 2010; ALBUQUERQUE et al., 2007). Além disso, avaliações qualitativas realizadas nas regiões tropicais demonstraram que as populações humanas locais têm um amplo conhecimento das espécies de plantas úteis. Além disso, a realização de estudos de plantas medicinais do semi-árido região brasileiro tem crescido progressivamente, sendo a maioria destes estudos descritivo, se concentrando em listar plantas junto com suas indicações terapêuticas, modo de utilização e qual o órgão utilizado (AGRA et al., 2007; CARTAXO et al, 2010; ALBUQUERQUE et al., 2007)

Albuquerque e Oliveira (2007) avaliaram as implicações do uso de plantas medicinais por comunidades rurais e observaram que apesar de as espécies exóticas serem uma fração significativa da flora medicinal local, as espécies nativas apresentam um maior percentual de uso e indicações,

destacando-se as espécies *Amburana cearensis*, *Myracrodruon urundeuva*, *Anadenanthera colubrina*, *Obtusifolium sideroxylon*, e *Ziziphus joazeiro*.

No trabalho de Frasso et al. (2012), foi feito o primeiro relato de atividade contra *Tricomonas vaginalis* dos extratos de *Polygala decumbens* (planta da Caatinga), sendo este estudo baseado no uso e conhecimento popular da planta pelas comunidades. Nos estudos de Araújo et al. (2014), os extratos de *Parapiptadenia rígida*, coletada nos estados de Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte, apresentaram promissora atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus epidermidis* e *Shigella flexneri*, além de significativa atividade anti-inflamatória (ALBUQUERQUE et al., 2007; ARAÚJO et al., 2014). Trentin et al. (2011) realizaram a primeira triagem antibacteriana e antibiofilme de plantas da Caatinga contra *Staphylococcus epidermidis*, o que, segundo os autores, confirma que os relatos etnofarmacológicos podem ser indicadores de novos produtos antibacterianos e antibiofilmes.

Embora venha crescendo o número de estudos em relação ao potencial biológico de plantas da Caatinga, muitas plantas que são utilizadas pelas comunidades para fins medicinais ainda não foram submetidas a estudos científicos para confirmar sua eficácia no tratamento de algumas doenças (SILVA, et al., 2015) Por isso, a expansão de ações voltadas para a bioprospecção bioquímica de plantas da Caatinga é de extrema importância, uma vez que suas espécies vegetais podem ser fonte de biomoléculas que podem se tornar novas alternativas para a indústria: analgésicos, tranquilizantes, diuréticos, laxantes e antibióticos, entre outros (ARCOVERDE et al., 2014). Informações fitoquímicas e farmacológicas precisam ser verificadas para estas espécies, justificando assim o uso medicinal das mesmas (CARTAXO et al, 2010).

## 3.2 Plantas da Caatinga

### 3.2.1 *Anadenanthera colubrina*

Conhecida popularmente como angico ou angico preto, *Anadenanthera* (Vell.) Brenan *colubrina* (Figura 3) é uma planta nativa da Caatinga e pertencente à família Leguminosae ou Fabaceae, que abrange no Brasil cerca de 200 gêneros e 1.500 espécies presentes nos mais variados ecossistemas, sendo apontada como uma das maiores famílias do grupo das angiospermas (ALVES et al., 2014), além de ser também a mais representativa da Caatinga (GIULIETT; QUEIROZ, 2006).

*Anadenanthera colubrina* é facilmente reconhecida por seu folículo plano, possuindo margens irregularmente contraídas entre as sementes. É encontrada na América do Sul, no Nordeste da Argentina, na Bolívia até o sul do Equador e no Brasil, de Minas Gerais ao Maranhão, ocorrendo principalmente em áreas de florestas estacionais (LIMA; MANSANO, 2011).

Além de serem conhecidas e utilizadas pelas comunidades locais, muitas espécies vegetais da Caatinga são vendidas como produtos medicinais à base de plantas e dentre elas, está a *A. colubrina*.

**Figura 3.** Espécie *Anadenanthera colubrina*



Fonte: João Medeiros, 2010.

Ela aparece bastante nos estudos em relação à utilização de plantas medicinais pelas comunidades e é usada como bebida e como antisséptico para lavar o local afetado, tendo o seu uso indicado contra gripe, congestão nasal, inflamação torácica, alergia, contra câncer, coceira, dor, diarreia, estomatite, dor nas costas, expectorante, feridas, inflamações, inflamação na garganta, problemas renais e pulmonares, problemas uterinos, tuberculose, como expectorante, broncodilatador e em infecções em geral (CARTAXO et al, 2010; MEDEIROS, et al., 2013). Algumas comunidades também descrevem a utilização da casca do caule macerada com vinho ou cachaça para aplicação contra tosses, coqueluche e bronquites (AGRA et al., 2007; TRENTIN et al., 2011).

Estudos fitoquímicos indicaram que *A. colubrina* tem alta concentração de fenóis totais e taninos na casca do caule, o que permite fazer uma relação entre essa composição e a atividade anti-inflamatória, antioxidante e antinociceptiva já relatadas desta espécie (DAMASCENA et al., 2014; MELO et al., 2010). Um flavonoide que inibe lipoxigenases foi isolado de *A. colubrina* e chamado de anadaflavonoide (CARTAXO et al, 2010). O trabalho de Silva et al. (2011) evidenciou atividade antioxidante para esta espécie. Além disso, sua resina contém um ácido heteropolisacarídeo, composto principalmente por galactose e arabiose, que apresentou efeitos imunomodulatório e antitumoral em ratos com sarcoma. Em Trentin et al. (2011), o extrato da casca de *A. colubrina* apresentou potencial na redução da formação de biofilme *Staphylococcus spidermidis*, além de atividade microbiana contra *S. aureus*, quando foi testado o seu potencial de sinergismos com o antibiótico eritromicina, sendo esta atividade atribuída à alta concentração de compostos fenólicos em seus extratos, principalmente rutina e quercitina (SILVA et al., 2013).

### 3.2.2 *Bowdichia virgilioides*

*Bowdichia virgilioides* Kunth é pertencente à família Fabaceae (Leguminosae) e conhecida popularmente como sucupira e sucupira preta (RIBEIRO et al., 2014). É uma grande árvore que é bastante encontrada nas regiões montanhosas e nas florestas do Norte, Nordeste e na região central do Brasil (BARROS et al., 2010).

A casca e as sementes da sucupira são extensivamente utilizadas na medicina popular, sob a forma chá ou macerado para uso tópico, para o tratamento de diarreia, gota, diabetes, bronquite, hipertermia, inflamações uterinas, reumatismo, acne, artrite, artrose, esporão, cefaleia, feridas, gripe, hemorragias, problemas de coluna, fraqueza (como um tônico para corpo) e a má-digestão (ARRIAGA et al., 2000; SILVA et al., 2010; THOMAZZI et al., 2010).

**Figura 4.** Espécie *Bowdichia virgilioides*.



Fonte: A.P. Fortuna-Perez, 2012.

Análises fitoquímicas realizadas com *B. virgilioides* detectaram a presença de flavonoides, benzofuranoides, terpenoides e alcaloides (ARRIAGA et al., 2000; SILVA et al., 2010). Juck et al. (2013) isolaram dois novos isoflavonoides, denominados 7,8,4'-trimetoxiisoflavona e 7,8,4'-trimetoxiisoflavonona.

Diversos trabalhos evidenciaram o potencial anti-inflamatório, antinociceptivo, antiplasmodial, além de efeito imunomodulatório de extratos feitos com a casca de *B. virgilioides*

(BARROS et al., 2010; SILVA et al., 2010; THOMAZZI et al., 2010). No trabalho de Almeida et al. (2006), o óleo essencial de *Bowdichia virgilioides* apresentou atividade antimicrobiana contra *Candida albicans*, *Candida guilliermondii*, *Candida stellatoidea*, *Micrococcus luteus* e *Trichophyton rubrum*. Adicionalmente, um novo alcaloide foi isolado a partir da casca do caule de *B. virgilioides* e demoninado bowdichina (BARBOSA-FILHO et al., 2004).

### 3.2.3 *Buchenavia tetraphylla*

*Buchenavia* é um gênero pertencente à família Combretaceae, que compreende cerca de 30 espécies, distribuídas entre América Central, Venezuela, Colômbia, Guiana, Brasil, Peru e Bolívia. *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) RA Howard (Figura 5) é uma espécie neotropical de distribuição desde Cuba (América Central) até o estado do Rio de Janeiro, chegando também até o sul do Brasil (BARROS et al., 2010).

**Figura 5.** Espécie *Buchenavia tetraphylla*.



Fonte: Tarcilia Rego, (2014).

Conhecida popularmente como caicaró e tanimbuca, ela é relatada como uma planta medicinal por comunidades que vivem na região Nordeste, incluindo grupos indígenas (é utilizada por eles como bebida). Uma infusão de cascas do tronco ou folhas é usada como um digestivo após as refeições (AGRA et al., 2007; TRENTIN et al., 2011).

Vários estudos têm apontado aplicações medicinais de *Buchenavia tetraphylla*, em concordância com o uso popular. Oliveira et al. (2012), avaliaram importante atividade antimicrobiana desta planta, onde seus extratos e frações inibiram o crescimento de *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium smegmatis*, *Proteus vulgaris* e *Staphylococcus*

*aureus*. Nesses extratos foi detectada a presença de flavonoides (luteolina), proantocianidinas, leucoantocianidinas, triterpenos, carboidratos e taninos, sugerindo a relação destes compostos com as atividades biológicas encontradas (OLIVEIRA et al., 2012).

### 3.2.4 *Libidibia ferrea*

*Libidibia ferrea* (Mart.) L. P. Queiroz (Figura 6), anteriormente denominada *Caesalpinia ferrea* (WYREPKOWSKI et al., 2014) e pertencente a família Fabaceae (Leguminosae), é conhecida popularmente como pau-ferro ou jucá (ALBUQUERQUE et al., 2007; ARAÚJO et al., 2014). É uma árvore que ocorre em todo o Brasil, principalmente nas regiões Norte e Nordeste (FREITAS et al., 2012).

**Figura 6.** Espécie *Libidibia ferrea*.



Fonte: Maurício Mercadante, (2011).

Seu uso medicinal é bastante popular, onde preparações aquosas e alcoólicas são utilizadas pelas comunidades para tratar uma série de doenças, tais como: anemia, diabetes, reumatismo, câncer, além de ser indicada para o uso como antiviral, anti-inflamatório e antidiarreico (ALBUQUERQUE; OLIVEIRA, 2007; ARAÚJO et al., 2014; FREITAS et al., 2012; WYREPKOWSKI et al., 2014).

Nos estudos de Trentin et al. (2011), o extrato feito com a casca da *Libidia ferrea* ocasionou redução na formação de biofilme de *S. epidermidis* em 30%, enquanto o extrato obtido à partir dos frutos reduziu a formação de biofilme de *S. epidermidis* em 70%. (SILVA et al., 2013). Além disso, esta planta apresentou atividade microbiana contra *S. aureus*, quando foi testado o seu potencial de sinergismos com o antibiótico eritromicina, sendo a atividade atribuída à alta concentração de compostos fenólicos em seus extratos, principalmente do ácido gálico (SILVA et al., 2013). Freitas et al. (2012) e Sawada et al. (2014) demonstraram que os extratos de *L. ferrea* apresentam uma importante atividade anti-inflamatória e antinociceptiva. Martins et al. (2014) avaliaram a atividade antifúngica e antimicotoxigênica de *L. ferrea* contra *Aspergillus parasiticus*, onde houve significativa redução no crescimento fúngico e na produção de aflatoxinas na presença do extrato vegetal.

Adicionalmente, considerando o extensivo uso medicinal de *L. ferrea*, Wyrepkowski et al., (2014) apontaram a importância de um estudo sobre efeitos mutagênicos desta planta, porém seus extratos metanólicos da casca do tronco não apresentaram mutagenicidade nos ensaios empregados. Além disso, realizou estudos fitoquímicos nos mesmos extratos, registrando a predominância de taninos, principalmente do ácido gálico. O uso popular da casca do caule de *L. ferrea* no combate à diabetes também foi comprovado por estudos, onde o extrato metanólico reduziu os níveis de glicose e melhorou o estado metabólico de ratos diabéticos (VASCONCELOS et al., 2011).

### 3.2.5 *Myroxylon peruiferum*

*Myroxylon peruiferum* L. f. é facilmente reconhecida pela combinação de pontos e listras translúcidas nos folíolos e pel fruto do tipo sâmara. É uma árvore que cresce até 15-25 metros de altura, de copa arredondada e pouco densa, tronco cilíndrico de 60 a 80 cm de diâmetro (Figura 6). É encontrada no México, Honduras, Colômbia, Peru, Bolívia, Argentina, Brasil e Equador, em áreas de savana estépica, savana, floresta ombrófila densa, amazônica e atlântica (LIMA; MANSANO, 2011).

Conhecida como bálsamo, cabreúva, bálsamo-do-peru e óleo-cabreúva, *M. peruiferum* é uma planta nativa da Caatinga, que também possui aplicações medicinais para as comunidades do semiárido. A casca do caule é utilizada para lavar o local afetado, como um antisséptico (CARTAXO et al., 2010). Além disso, esta espécie produz um bálsamo (substância aromática, que contém óleos essenciais e resinas em sua composição) chamado bálsamo cabreúva ou óleo vermelho, que tem sido usado há séculos pelos povos indígenas da América Central e do México para tratar a asma, reumatismo, feridas externas, e também pelos índios da Amazônia, para tratar a asma, reumatismo, bronquite, resfriado, tuberculose, dores de cabeça e abscesso (CUSTÓDIO; VEIGA-JUNIOR, 2012).

Ohsaki et al. (1999) avaliaram o potencial antimicrobiano de *M. peruiferum* frente à *Helicobacter pylori*, no qual foram obtidos resultados promissores e esta atividade foi atribuída à presença de uma nova isoflavona isolada, denominada cabreuvina.

**Figura 7.** Espécie *Myroxylon peruiferum*.



Fonte: Rubens Queiroz, (2012).

### 3.2.6 *Pityrocarpa moniliformis*

Conhecida popularmente como catanduba, quipembé, angico de bezerros e muquém, *Pityrocarpa moniliformis* (Benth.) Luckow & R.W. pertence a família Fabaceae – Leguminosae e está distribuída a partir dos estados do Maranhão e Piauí até o estado da Bahia, mais especificamente na Caatinga, Carrasco, Seridó, Cerrado e Agreste (FERREIRA et al., 2014).

**Figura 8:** Espécie *Pityrocarpa moniliformis*



Fonte: Rubens Queiroz, 2012.

Alves et al. (2014) relataram em seus estudos o potencial antioxidante desta planta, correlacionando-o à presença de flavonoides nos extratos testados. Além disso, vários trabalhos têm evidência do potencial antimicrobiano de *P. moniliformis*. No estudo de Trentin et al. (2014), ela apresentou alta eficiência na inibição do crescimento de *P. aeruginosa*, além de evitar 68% da formação de biofilme pela bactéria. No trabalho de Silva et al., (2013) esta planta apresentou atividade

microbiana com *S. aureus* quando foi testado o seu potencial de sinergismos com o antibiótico eritromicina, sendo a atividade positiva atribuída à alta concentração de compostos fenólicos em seus extratos (quercitina, rutina).

### 3.3 Produtos naturais: metabólitos secundários de plantas

A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais. Por isso, muitas espécies e preparados vegetais medicinais vêm sendo estudados na busca pelo entendimento de seus mecanismos de ação e no isolamento dos princípios ativos (GUIMARÃES; SERAFINI; QUINTANS-JÚNIOR, 2014; VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Nos últimos anos, a fitoterapia tem sido largamente difundida e a venda de plantas com propriedades fitoterápicas cresce significativamente em todo o mundo. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de 80% da população de países em desenvolvimento utiliza ervas para o tratamento de doenças, que são consideradas até mais seguras e mais efetivas que drogas sintéticas (GURIB-FAKIM, 2006; PANG et al., 2014). Desse modo, os produtos naturais vêm recuperando espaço e importância na indústria farmacêutica, tanto para a sua utilização direta quanto para uso como fonte inspiradora de novos padrões de moléculas bioativas (VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

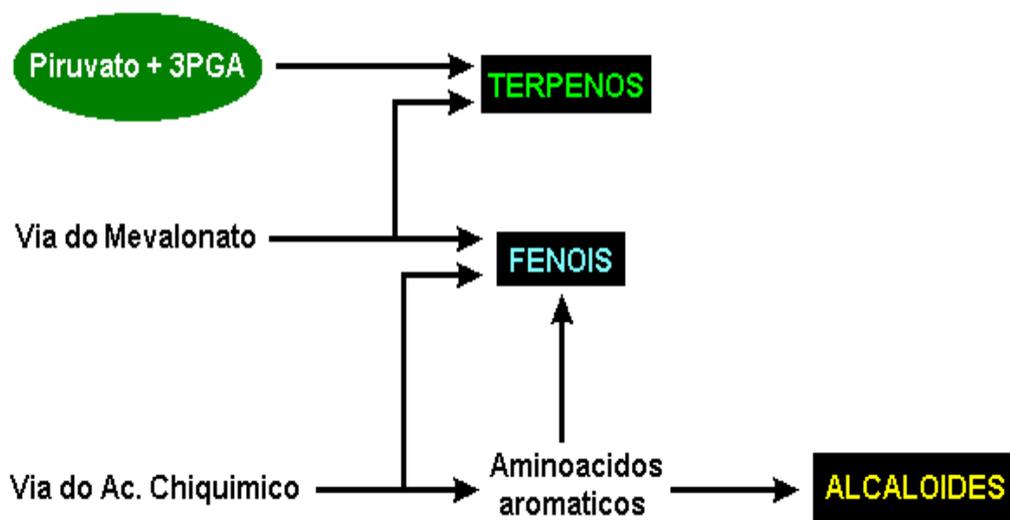
Os estudos em fitoquímica têm como objetivos esclarecer e registrar os constituintes resultantes do metabolismo vegetal, através do isolamento e elucidação de suas estruturas moleculares. Esses estudos estão sendo realizados graças ao crescente desenvolvimento de novas técnicas analíticas e o constante aperfeiçoamento dos instrumentos de análise espectrométrica (RODRIGUES et al, 2009). A seleção de plantas para estudo tem se baseado no conhecimento popular, em relatos da literatura e na prospecção química sobre ações antioxidante, anti-inflamatória e inseticida das mesmas (GUIMARÃES et al., 2014; RODRIGUES et al., 2009; VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Os processos metabólicos das plantas podem ser distinguidos em metabolismo primário e secundário. O metabolismo primário está relacionado a um conjunto de processos que desempenham funções essenciais na planta, tais como fotossíntese, respiração e transporte de solutos. Os compostos envolvidos nesse tipo de metabolismo possuem uma distribuição universal entre as espécies vegetais, sendo eles: aminoácidos, nucleotídeos, lipídios, carboidratos e a própria clorofila (GURIB-FAKIM, 2006; PERES, 2009) e os metabólitos primários são produzidos e convertidos em entidades moleculares necessárias para construir e manter as estruturas e os processos vitais da célula vegetal. Já o metabolismo secundário origina compostos que não possuem uma distribuição universal entre as

plantas, por não serem necessários para todas elas (PERES, 2009). Por isso, representam recursos que podem ser utilizados em estudos de diferenciação e diversidade ecológica, taxonômica e bioquímica (GURIB-FAKIM, 2006). Embora não sejam essenciais para a vida das plantas, eles desempenham uma função importante na interação delas com o meio ambiente, possuindo um papel fundamental nos seus sistemas de defesa: contra herbivoria, ataque de patógenos, na competição entre plantas, na atração de organismos benéficos (micro-organismos simbiotes, polinizadores, dispersores de sementes) e na adaptação às condições ambientais extremas (alterações bruscas de temperatura, níveis de água e de luz, exposição à UV, deficiências de nutrientes minerais) (GURIB-FAKIM, 2006; PERES, 2009).

Os metabólitos secundários vegetais podem ser divididos em três grandes grupos: compostos fenólicos, terpenos e alcaloides (Figura 7) (PERES, 2009).

**Figura 9.** Principais vias do metabolismo secundário



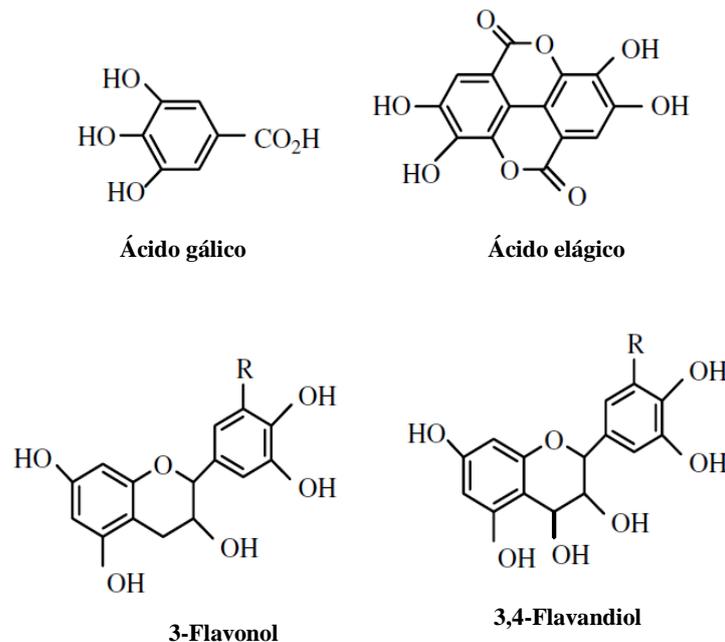
Fonte: Peres, (2004).

### 3.3.1 Compostos fenólicos

São substâncias que possuem pelo menos um anel aromático, no qual ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila (Figura 9) (GURIB-FAKIM, 2006). Também conhecidos como polifenóis, são sintetizados a partir da via metabólica do ácido chiquímico e a do ácido mevalônico, (PERES, 2009). A esses compostos são atribuídos o sabor, o odor e a coloração de diversos vegetais, estando relacionados também à atração de polinizadores e dispersantes de sementes, à inibição do crescimento de plantas competidoras, à proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias, além de possuírem um papel fundamental como compostos de defesa aos estresses ambientais, tais como a alta incidência de luz, baixas temperaturas e deficiência de nutrientes.

A exposição das plantas aos estresses ambientais pode levar ao aumento da produção de radicais livres e outras espécies oxidativas, e acredita-se que elas respondem a esses fatores de estresse biótico e abiótico aumentando a sua capacidade para eliminar espécies reativas de oxigênio, através da produção de compostos fenólicos (GURIB-FAKIM, 2006; PERES, 2009).

**Figura 10:** Exemplos de compostos fenólicos. A presença de pelo menos uma anel aromático caracteriza o grupo.



Fonte: Gurib-Fakim, (2006).

Os polifenóis são os compostos secundários vegetais mais amplamente distribuídos, englobando um grupo altamente diverso, sendo classificados de acordo com a sua estrutura molecular básica: fenóis simples ou benzoquinonas ( $C_6$ ); ácidos fenólicos ( $C_6-C_1$ ); acetofenona, ácido fenilacético ( $C_6-C_2$ ); ácido hidroxicinâmico, cumarina, fenilpropano, cromonas ( $C_6-C_3$ ); nafitoquinonas ( $C_6-C_4$ ); xantonas ( $C_6-C_1-C_6$ ); estilbenos, antraquinonas ( $C_6-C_2-C_6$ ); flavonoides, isoflavonóides, neoflavonóides ( $C_6-C_3-C_6$ ); bi e triflavonóides ( $C_6-C_3-C_6$ )<sub>2,3</sub>; lignanas e neolignanas ( $C_6-C_3$ )<sub>2</sub>; ligninas ( $C_6-C_3$ )<sub>n</sub>; e tatinos condensados, conhecidos também como protoantocianidinas ( $C_6-C_3-C_6$ ) (PERES, 2009).

Em relação às propriedades farmacológicas dos compostos fenólicos, destacam-se os flavonoides, que possuem grande potencial antioxidante graças à sua capacidade de sequestrar radicais livres e quelar íons metálicos. Flavonoides, como quercetina, isoramnetina, campferol e seus derivados detectados em *Annona crassiflora*, demonstraram atividade antioxidante significativa frente ao radical DPPH e ao  $\beta$ -caroteno. Adicionalmente, pesquisas sugerem que alguns flavonóides

são responsáveis por uma ação antitumoral considerável, podendo ainda agir como antivirais, antioxidantes, anti-hemorrágicos, hormonais, anti-inflamatórios e antimicrobianos (ROMAGNOLO; SELMIN, 2012).

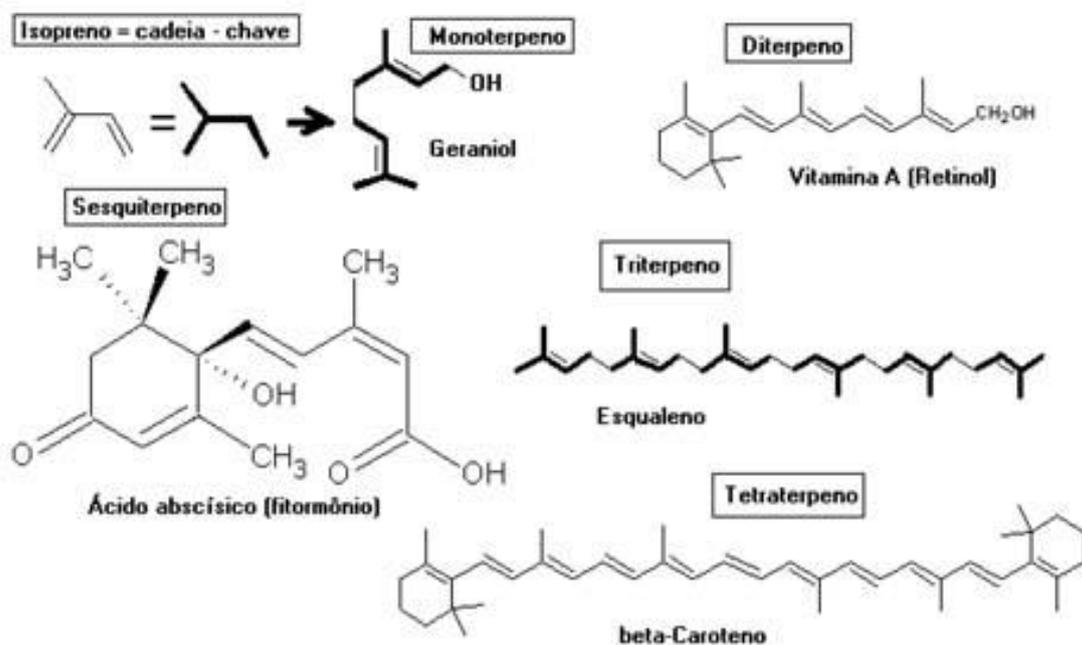
### 3.3.2 Terpenos

São polímeros formados por unidades de isopreno ou isopentenilpirofosfato (IPP) e classificados de acordo com o número de unidades que entram em sua montagem. O IPP é derivado do ácido mevalônico e dá origem a todos os outros terpenos. De acordo com sua estrutura, podem ser classificados em: isoprenos ou hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30), tetraterpenos ou carotenos (C40) e os politerpenos (mais de 40C) (Figura 10) (GUIMARÃES; SERAFINI; QUINTANS-JÚNIOR, 2014; PERES, 2009).

O interesse crescente na aplicação clínica dos terpenoides é atribuído à ampla gama de propriedades biológicas desses compostos que tem sido descrita, incluindo os efeitos quimiopreventivos de câncer, atividade antimicrobiana, antifúngica, antiviral, anti-hiperglicêmica, analgésica, anti-inflamatória e anti-parasitária (GURIB-FAKIM, 2006; GUIMARÃES; SERAFINI; QUINTANS-JÚNIOR, 2014).

Entre os terpenos de aplicação clínica mais importante, destaca-se paclitaxel (taxol), um importante agente antitumoral que apresenta um amplo espectro de atividade contra vários tipos de câncer que não respondem a outros agentes (GURIB-FAKIM, 2006). Outro terpeno que também se destaca no mercado farmacêutico é o mentol, um monoterpeno utilizado como analgésico tópico que é amplamente utilizado, principalmente por atletas (FEUCH; PATEL, 2010).

**Figura 11.** Alguns exemplos de terpenos. O isopreno é a cadeia chave, originando os demais terpenos por fusão de moléculas.



Fonte: Hans Wolfgang Halbe, (2011).

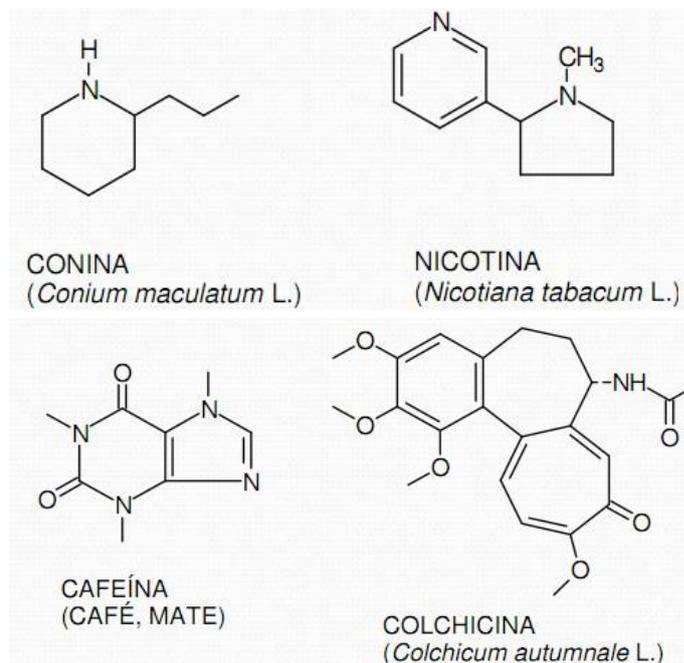
### 3.3.3 Alcaloides

São compostos orgânicos que possuem pelo menos um átomo de nitrogênio no seu anel (Figura 11), sendo originados a partir de aminoácidos (ornitina, lisina, tirosina e triptofano). Eles são sintetizados no retículo endoplasmático e concentram-se nos vacúolos, não aparecendo em células vegetais jovens (PERES, 2009). Com base em suas estruturas, os alcaloides são divididos em alcaloides não-heterocíclicos e alcaloides heterocíclicas, que são novamente divididos em 12 grandes grupos, de acordo com sua estrutura básica do anel (GURIB-FAKIM, 2006).

Nas plantas, os alcaloides desempenham um papel importante de proteção, além de atuarem na germinação e serem estimulantes do crescimento vegetal. Algumas famílias são conhecidas por possuírem alto teor de alcaloides: Liliaceae, Amaryllidaceae, Apocynaceae, Berberidaceae, Leguminosae, Papaveraceae, Ranunculaceae, Rubiaceae e Solanaceae (GURIB-FAKIM, 2006).

Os alcaloides são famosos por possuírem substâncias com acentuado efeito no sistema nervoso animal, sendo utilizadas como venenos e alucinógenos. Dentre os mais difundidos, estão a nicotina e a cafeína, e muitos remédios para distúrbios emocionais são derivados de alcaloides. Além disso, drogas ilícitas, LSD e cocaína, também possuem alcaloides em sua composição (GURIB-FAKIM, 2006; PERES, 2009).

**Figura 12.** Alguns exemplos de alcaloides.



Fonte: Luis Ricardo dos Santos, (2007).

Diversos estudos têm relacionado a atividade biológica de plantas com sua composição de metabólicos secundários. Fabani et al. (2013) relacionaram a alta atividade antioxidante de *Pistacia vera* L., conhecida popularmente como pistache, ao seu teor de compostos fenólicos: ácido gálico,

miricetina, isoquercitrina e um dímero de protocianidina. Resultado semelhante foi encontrado no trabalho de Hossan e Rahman (2011), que avaliaram a atividade antioxidante e o teor de fenóis totais nos extratos obtidos a partir do fruto de *Ananas comosus* L. No trabalho realizado por Silva et al. (2013) a presença de compostos fenólicos também está relacionada à atividade antimicrobiana, na ação combinada entre eritromicina e extratos dos frutos de espécies vegetais da Caatinga, sendo detectados quercitina, ácido gálico, rutina e compostos derivados de ácido gálico no extratos que apresentaram atividade antimicrobiana positiva.

### 3.4 Antioxidantes

#### 3.4.1 Radicais livres e estresse oxidativo

Espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio (EROs/ERNs), também conhecidas como radicais livres e oxidantes, são átomos ou moléculas produzidos durante os processos metabólicos, tendo importante função para o metabolismo celular na transferência de elétrons em várias reações químicas (ALVES et al., 2007; SEIFRIED et al., 2007). A formação de espécies reativas é uma consequência natural do metabolismo aeróbico, sendo parte integrante para a manutenção da homeostase nos tecidos (SEIFRIED et al., 2007). Eles são essenciais na produção de energia para as atividades biológicas (SILVA, et al., 2011), sendo produzidos em organelas que metabolizam oxigênio, nitrogênio e cloro (mitocôndria, peroxissomos), atuando também na sinalização intercelular, em processos inflamatórios, fagocitose, na regulação do crescimento celular e produção de substâncias biológicas importantes. Além disso, existem fatores externos que ajudam a promover a produção de radicais livres no organismo, como fumo, poluição ambiental, radiação, drogas, pesticidas, solventes industriais e ozônio (BARREIROS; DAVID, 2006).

As principais EROs distribuem-se em dois grupos, os radicalares: hidroxila ( $\text{HO}\bullet$ ), superóxido ( $\text{O}_2\bullet$ ), peroxila ( $\text{ROO}\bullet$ ) e alcoxila ( $\text{RO}\bullet$ ); e as não-radicalares: oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Dentre as ERNs estão o óxido nítrico (NO), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) e peroxinitritos ( $\text{ONOO}^-$ ) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 200; SEIFRIED et al., 2007).

Os radicais derivados de oxigênio compõem o mais importante grupo de radicais livres gerado em sistemas vivos (Tabela 1). (VALKO et al., 2007). A adição de um elétron ao  $\text{O}_2$  forma o radical ânion superóxido ( $\text{O}_2\bullet^-$ ) na cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, onde durante a transdução de energia parte dos elétrons é transferida para o oxigênio prematuramente, formando o radical. Ele é produzido através de processos metabólicos de produção de energia ou após a ativação de oxigênio por irradiação física, sendo considerado a EROs primária, e pode promover interação com outras moléculas para gerar EROs secundárias (LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013). Já o radical  $\text{HO}\bullet$  é o mais deletério ao organismo, principalmente devido a sua meia-vida muito curta e

por reagir próximo ao seu local de formação, o que dificulta o seu sequestro *in vivo*. (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; VALKO et al., 2007) Ele frequentemente ataca as moléculas por abstração de hidrogênio e por adição a insaturações (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006), sendo formado no organismo principalmente por dois mecanismos: reação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com metais de transição e homólise da água por exposição à radiação ionizante (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; VALKO et al., 2007).

**Tabela 1.** Caracterização das principais espécies reativas de oxigênio, formadas *in vivo*.

Intermediário	Origem	Sítio de formação
Radical supeóxido	Formado a partir da redução parcial do oxigênio molecular por 1 elétron	Reações de autooxidação envolvendo flavoproteínas e ciclos redox.
Peróxido de hidrogênio	Formado a partir da redução parcial do oxigênio molecular por 2 elétrons	Vias catalisadas por oxidase e pela peróxido dismutase.
Radical hidroxil	Formado a partir da redução do oxigênio molecular por 3 elétrons.	Locais adjacentes à formação de ânion superóxido/ peróxido de hidrogênio na presença de metais, principalmente ferro; produto de reação do óxido nítrico com o radical superóxido.
Radical alcóxil	Radical orgânico centrado no oxigênio.	Intermediário na peroxidação de lipídios de membrana
Radical peróxil	Formado a partir de hidroperóxidos orgânicos.	Intermediário na peroxidação de lipídios de membrana.

Fonte: Ribeiro, (2005).

Os maiores alvos de EROs são proteínas, DNA e RNA, açúcares e lipídios (LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013). Em relação às proteínas, existem três maneiras distintas de modificação oxidativas: modificação de aminoácidos específicos; clivagem de peptídeo; e formação de proteínas da ligação transversal devido à reação com produtos da peroxidação lipídica (LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013; VALKO et al., 2007). O dano induzido por radicais livres ao DNA pode ocorrer por: produção de sítios de base livre, deleção, modificação de todas as bases, formação

de ligações cruzadas e de rearranjos cromossômicos. Uma importante reação relacionada com danos ao DNA é a produção de radical hidroxila através da reação de Fenton, que é um radical conhecido por reagir com todos os componentes da molécula de DNA (CAROCHO; FERREIRA, 2013). Tratando-se dos açúcares, a formação de radicais livres de oxigênio durante glicação precoce pode contribuir para danos glicosidativos (VALKO et al., 2007; CAROCHO; FERREIRA, 2013). Já a atuação de oxidantes em moléculas lipídicas, chamada peroxidação lipídica, é iniciada por um ataque em direção aos ácidos graxos de cadeia lateral por um radical, a fim de abstrair um átomo de hidrogênio de um átomo de carbono metileno. Depois de removido, o carbono central do radical lipídico pode sofrer rearranjo molecular e reagir com o oxigênio formando um radical peróxil (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013). O radical hidroxilo é um dos principais radicais em peroxidação de lipídios, que é formado em sistemas biológicos (VALKO et al., 2007; LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013).

Durante as últimas décadas, tem sido proposto o estresse oxidativo, definido como o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e a defesa antioxidante (VALKO et al., 2007). Ele é originado de um aumento na produção de EROs ou de uma queda na rede antioxidante, sendo caracterizado pela inabilidade dos antioxidantes endógenos em neutralizar o dano oxidativo em alvos biológicos (SEIFRIED et al., 2007; ALVES et al., 2010). O balanço entre a produção e a neutralização de radicais livres por antioxidantes é muito delicado e se este balanço tender à maior produção de EROs, a célula começa a sofrer as consequências do estresse oxidativo (SEIFRIED et al., 2007; VALKO et al., 2007; CAROCHO; FERREIRA, 2013).

O estresse oxidativo pode implicar em variáveis condições patológicas envolvendo doenças, como câncer, doenças cardiovasculares, aterosclerose, distúrbios neurológicos, renais e no fígado, hipertensão, artrite reumatoide, doenças auto-imunes, distúrbios degenerativos, obesidade, autismo, catarata, diabetes mellitus, glomerulonefrites, entre outras (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; SEIFRIED et al., 2007; CAROCHO; FERREIRA, 2013).

### 3.4.2 Atividade antioxidante

Segundo Khlebnikov et al. (2007) antioxidante é qualquer substância que retarda, impede ou elimina os danos oxidativos para uma molécula alvo. A atividade antioxidante é usualmente entendida como a habilidade destes compostos em neutralizar radicais livres, como exemplificado abaixo (VALKO et al., 2007; LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013), onde AH e FR• representam um antioxidante e um radical livre, respectivamente (CAROCHO; FERREIRA, 2013).



A atividade antioxidante pode ser realizada de várias formas: através das reações de oxidação de radicais livres (prevenção de oxidantes); pela inibição da formação de radicais livres lipídicos; pela interrupção da propagação das reações de autooxidação em cadeia; através do sinergismo com outros antioxidantes; com a ação de antioxidantes como agentes redutores, que convertem hidroperóxidos em compostos estáveis; através da ação de antioxidantes como quelantes de metais, que convertem pro-oxidantes (derivados de ferro e cobre) em produtos estáveis; e finalmente como inibidores de enzimas pro-oxidativas (lipooxigenases) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; CAROCHO; FERREIRA, 2013).

Os antioxidantes podem ser subdivididos em sintéticos e naturais. Os sintéticos são comumente usados na indústria alimentícia, para prevenir a deterioração oxidativa, aumentando a vida de prateleira de alimentos lipídicos. São exemplos de antioxidantes sintéticos: o butilhidroxitolueno (BHT), o butilhidroxianisol (BHA), o propilgalato (PG) e o terciobutilhidroxinona (TBHQ). No entanto, propriedades carcinogênicas têm sido atribuídas aos antioxidantes sintéticos (ALVES et al., 2007), o que ressalta a importância da investigação de compostos antioxidantes de fontes naturais.

Já os sistemas antioxidantes naturais que atuam no corpo humano são divididos em dois grandes grupos: antioxidantes enzimáticos e antioxidantes não-enzimáticos (CAROCHO; FERREIRA, 2013; LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013).

Os antioxidantes enzimáticos, por sua vez, podem ser divididos em defesa enzimática primária e secundária (KHLEBNIKOV et al., 2007; CAROCHO; FERREIRA et al., 2014). A defesa enzimática primária é composta por três enzimas importantes, que agem impedindo a formação ou neutralizando os radicais livres: glutatona peroxidase, que doa dois elétrons para reduzir os peróxidos e elimina também os peróxidos como substrato potencial para a reação de Fenton; catalase, que converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular e tem uma das maiores taxas de *turnover* conhecida, uma vez que apenas uma molécula de catalase é necessária para converter 6 bilhões de moléculas de peróxido de hidrogênio; e, finalmente, superóxido dismutase, que converte superóxido em peróxido de hidrogênio, como um substrato para catalase (VALKO et al., 2007; LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013). Já a defesa enzimática secundária inclui: glutatona redutase, que reduz a glutatona (antioxidante) a partir da sua forma oxidada, reciclando-a para continuar a neutralizar os radicais livres; e a glicose-6-fosfato desidrogenase, que regenera o NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato - coenzima utilizada em reações anabólicas), criando um ambiente redutor (VALKO et al., 2007; CAROCHO; FERREIRA, 2013). Já os antioxidantes não enzimáticos incluem o ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), glutatona (GSH), carotenoides, flavonoides, compostos nitrogenados (como o ácido úrico), dentre outros

(KHLEBNIKOV et al., 2007; VALKO et al., 2007; CAROCHO; FERREIRA, 2013; LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013).

Os flavonoides formam um grupo de compostos naturais que vem sendo bastante relatado na literatura por suas propriedades antioxidantes (CAROCHO; FERREIRA, 2013). Este grupo inclui flavonóis, antocianinas, isoflavonoides, flavononas e flavonas (PERES, 2009). As propriedades antioxidantes são conferidas aos flavonoides pelos grupos de hidroxila fenólicos ligados às estruturas do anel, sendo eles capazes de atuar como agentes redutores, doadores de hidrogênio, capturarem radicais superóxidos e até mesmo atuarem como quelantes de metais, além de serem capazes de ativar enzimas antioxidantes. Alguns dos mais importantes antioxidantes são flavonoides catequina, galato-catequina, quercitina e campferol (KHLEBNIKOV *et al.*, 2007; CAROCHO; FERREIRA, 2013).

Levando-se em conta a complexidade envolvida na ação de antioxidantes *in vivo*, diferentes metodologias *in vitro* têm sido desenvolvidas para estimar, de uma forma experimental simples, a capacidade de antioxidantes de amostras complexa, bem como sua interação com EROs. Os ensaios são baseados em diversas estratégias e são utilizados para a avaliação da capacidade de captura de radicais livres de compostos antioxidantes e produtos naturais e comerciais. Têm sido aplicados também para os produtos naturais e os fluidos biológicos, tais como plasma, urina e fluido seminal (ALVES et al., 2010; NIKI, 2010; LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013). Estão listados abaixo os principais métodos de avaliação da atividade antioxidante *in vitro*.

- Atividade de “sequestro” para os radicais livres DPPH e ABTS

Os antioxidantes chamados “sequestradores” têm função de capturar os radicais livres ativos antes que eles ataquem moléculas biologicamente essenciais, doando átomo de hidrogênio ou elétrons, além de transferirem prótons para produzir um composto estável e um radical derivado de antioxidante. As taxas de estas reações são determinadas primeiramente pela propriedade redox, tal como energia de ligação de dissociação e o potencial de ionização do antioxidante (NIKI, 2010).

DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) é um radical livres estável, que apresenta coloração roxa. E amplamente utilizado para determinar a capacidade antioxidante. DPPH é solúvel em solventes orgânicos e apresenta banda de absorção a 517 nm. Usualmente, a redução da intensidade de absorbância na presença da amostra com atividade antioxidante é registrada depois de um tempo de incubação fixado em 30 min (NIKI, 2010; LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013).

Já o ABTS•+ (2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)) é um radical livre estável e com coloração verde. Ele é solúvel em água e em álcool, sendo utilizado o comprimento de onda 734 nm para sua leitura em espectrofotômetro. Seus resultados também se baseiam na redução da intensidade de absorbância na presença da amostra, que é expressa em porcentagem, com atividade

antioxidante sendo registrada depois de 6 min de incubação (KHLEBNIKOV et al., 2007; NIKI, 2010).

As deficiências desses ensaios são a complexidade dos mecanismos de reação, a dependência do índice com as condições experimentais e a pobre relação de entre as estruturas químicas de DPPH e ABTS com radicais livres produzidos em sistemas biológicos (NIKI, 2010).

- Métodos Competitivos (ensaios ORAC e TRAP)

A capacidade antioxidante e de misturas contendo compostos antioxidantes para eliminação de radicais livres pode ser amplamente determinada pelo método competição, utilizando um composto de referência, como uma sonda. Vários compostos de referência foram aplicados como uma sonda. Vários compostos de referência podem ser aplicados como sonda, e a capacidade antioxidante de capturar radicais livres pode ser determinada pelo grau de supressão de consumo da substância-sonda, sendo ele medido pela absorvância em UV/visível, fluorescência e quimiluminescência (NIKI, 2010). Vários métodos têm sido desenvolvidos e aplicados e, dentre eles, os que têm sido mais utilizados são: capacidade de absorvância do radical oxigênio (ORAC - *oxygen radical absorbance capacity*), parâmetro oxidante radical total (TRAP - *total radical antioxidant parameter*), capacidade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC - *Trolox equivalente antioxidant capacity*) capacidade total do sequestro de oxiradicaís (TOSC - *total oxyradical scavenging capacity*) (KHLEBNIKOV et al., 2007; NIKI, 2010).

Dentre as metodologias para estimar a capacidade antioxidante por competição, o ensaio ORAC é um dos mais empregados. Neste ensaio, a capacidade antioxidante é avaliada pela área na curva (AUC) do perfil cinético. Os valores de AUC são comumente comparados com os valores de ácido gálico ou de trolox (um análogo de vitamina E) permitindo determinar um índice de ORAC em termos desses compostos de referência (NIKI, 2010; CAROCHO; FERREIRA, 2013).

- Método por redução de íons metálicos

Um potente antioxidante na captura de radicais muitas vezes age também como um potente agente redutor. Assim, os métodos de poder redutor do ferro (FRAP - *ferric reducing antioxidant power*) é bastante utilizado, para avaliar a redução de  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$ , dependendo das espécies redutoras disponíveis seguido pela alteração da cor de amarelo para azul e analisados por meio de um espectrofotômetro (NIKI, 2010; CAROCHO; FERREIRA, 2013).

- Capacidade antioxidante total

Muitas tentativas têm sido feitas para quantificar a capacidade e expressar por um valor tal como “capacidade antioxidante total” (TAC - *total antioxidant capacity*). TAC busca medir a capacidade de eliminação (“sequestro”) de radicais livres contidos na amostra teste, pelos antioxidantes. Frequentemente, o trolox é usado como composto de referência e a capacidade total é expressa como equivalente a trolox, porém alguns autores também utilizam o ácido ascórbico como referência (NIKI, 2010; CAROCHO; FERREIRA, 2013).

### 3.5 Anticoagulantes

#### 3.5.1 Hemostasia e processos de coagulação sanguínea

A hemostasia consiste em uma resposta fisiológica protetora aos danos vasculares, através da exposição de camadas subendoteliais da parede do vaso aos componentes sanguíneos (KU *et al.*, 2013), tendo como finalidade a regulação do fluxo sanguíneo, evitando o aparecimento de distúrbios hemorrágicos ou a ativação excessiva da coagulação, que causa formação inadequada de fibrina e pode levar à oclusão vascular (FRANCO, 2001; KU *et al.*, 2013; OSTROWSKI; VALENTINI; PAVANELLI, 2014). Seus componentes incluem plaquetas, vasos sanguíneos, proteínas de coagulação, anticoagulantes naturais e os sistemas de fibrinólise, onde o equilíbrio funcional da hemostasia é garantido por uma série de mecanismos que envolvem interações entre proteínas e respostas celulares complexas (FRANCO, 2001).

O processo de coagulação é composto por uma série de zimogênios que são convertidos, por ativação proteolítica, a enzimas ativas, levando à geração de trombina que, por sua vez, converte fibrinogênio em fibrina. A fibrina se une ao tampão plaquetário instalado no vaso sanguíneo no momento da lesão, formando um coágulo (FRANCO, 2001; PHILLIP OWENS; MACKMAN, 2014). Os mecanismos envolvidos nesse processo constituintes do sistema hemostático devem ser regulados para simultaneamente, evitando a perda excessiva de sangue e, ao mesmo tempo, evitando a formação de trombos intravasculares, decorrentes de formação excessiva de fibrina (FRANCO, 2001; FÉLIX-SILVA *et al.*, 2014).

Há três componentes principais na hemostasia efetiva: plaquetas, a cascata de coagulação do plasma, além de endotélio e subendotélio. (FRANCO, 2001; KU *et al.*, 2013).

Plaquetas circulantes devem ser capazes de manter contato direto e repetido com a parede do vaso sanguíneo no momento de lesão, aderir à parede lesionada, formar um tampão plaquetário e permanecer nele até que não seja mais necessário (BRASS, 2010). Elas circulam no sangue em um estado quiescente graças à liberação de mediadores inibitórios pelas células endoteliais normais, sendo esses mediadores o óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e adenosina (ZARBOCK *et al.*, 2007). Após a lesão vascular, as plaquetas são capazes de formar um complexo entre o colágeno

exposto e o fator de Von Willebrand, ocorrendo posteriormente a interação entre a glicoproteína plaquetária Ib-IX-V à esse fator, processo chamado de hemostasia primária (ZAGO; FALCÃO; PASQUIN, 2005; CHOI et al., 2014; PHILLIP OWENS; MACKMAN, 2014). Com a ativação plaquetária, a glicoproteína IIb/IIIa torna-se capaz de se ligar ao fibrinogênio (ZAGO; FALCÃO; PASQUIN, 2005). A formação de uma única camada de plaquetas não é suficiente, por isso há uma extensão do tampão plaquetário, através do recrutamento de plaquetas circulantes (hemostasia secundária), processo esse chamado de agregação plaquetária (FRANCO, 2001; ZAGO; FALCÃO; PASQUIN, 2005; ZARBOCK et al., 2007). Essa agregação é mediada pelo acúmulo de alguns antagonistas secretados pelas plaquetas e pela geração local de trombina (BRASS, 2010).

A trombina, por sua vez, se liga a um receptor (PARs) da superfície plaquetária e se torna capaz de, por proteólise, converter fibrinogênio solúvel em fibrina insolúvel, que se une às plaquetas, causando agregação e formação de um tampão hemostático definitivo (FRANCO, 2001; MANN et al., 2003). Ela é também responsável pela ativação de outros fatores de coagulação, sendo por isso considerada uma enzima crucial nas vias de coagulação (GUGLIELMONE et al., 2002).

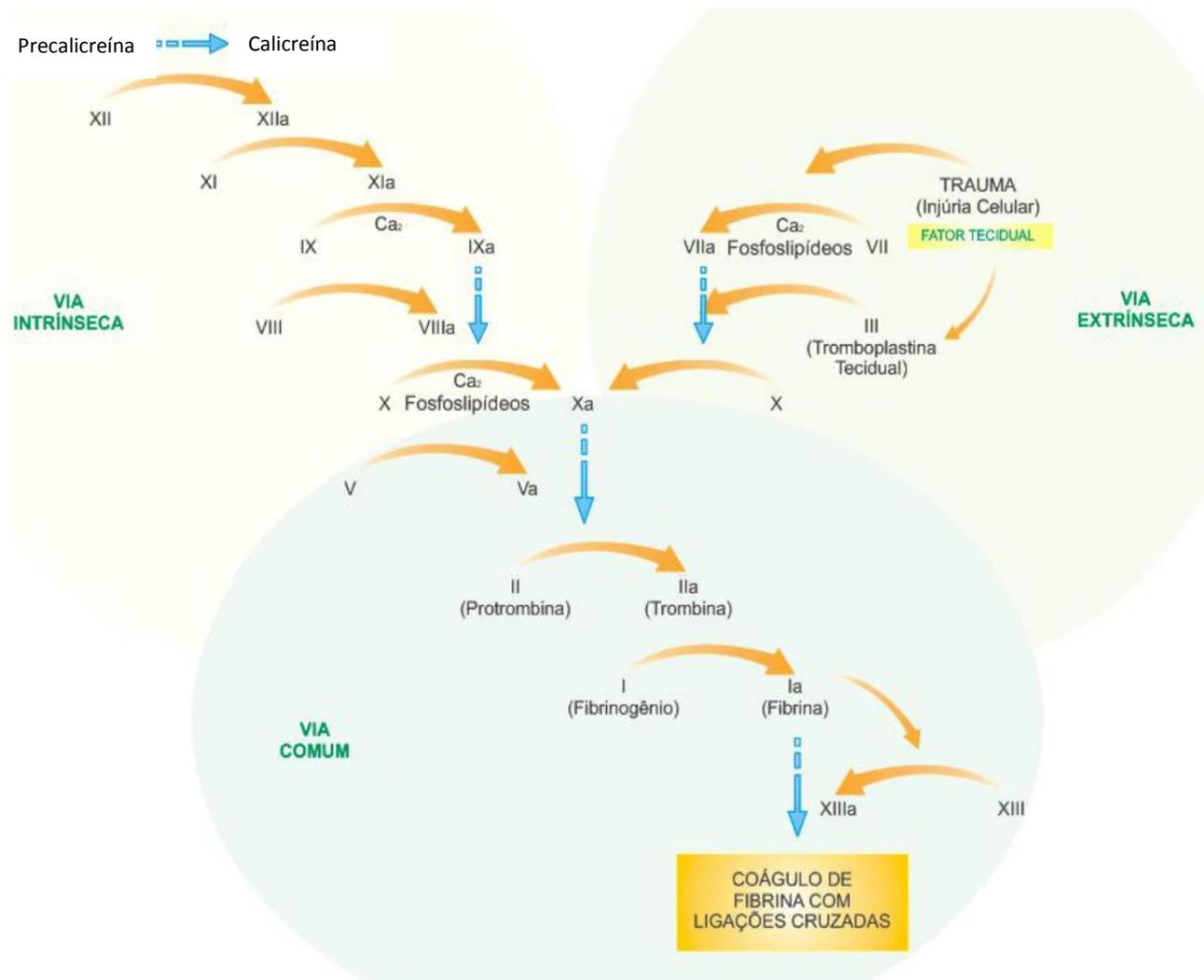
Por questões didáticas, costuma-se dividir o processo de coagulação sanguínea em duas vias: a extrínseca e a intrínseca (Figura 13). Na via extrínseca, ou via do fator tecidual, o fator VII plasmático ativa diretamente o fator X da coagulação, enquanto na extrínseca, ou de contato, há ativação do fator XII (quando o sangue entra em contato com uma superfície contendo cargas elétricas negativas), que ativa o fator XI (FRANCO, 2001; SHI et al., 2012; WILSON; DAVIS, 2014). O fator IX ativado, na presença de fator VIII, ativa o fator X. Ambas convergem para formar uma via comum, que resulta na ativação da trombina, a qual também serve como uma resposta positiva para acelerar a atividade da cascata. As vias intrínseca e extrínseca estão integralmente interligadas e, assim, a distinção entre eles é de pouca importância *in vivo*. (FRANCO, 2001; SHI et al., 2012; WILSON; DAVIS, 2014).

### 3.5.2 Doenças trombóticas e anticoagulantes

O crescimento descontrolado de um tampão plaquetário é a principal causa da formação de trombos e de oclusão arterial, podendo provocar lesões isquêmicas no cérebro e no coração (SHI et al., 2012; PHILLIP OWENS; MACKMAN, 2014). Porém, existem vários mecanismos antitrombóticos endógenos para prevenir a trombose indesejável. A antitrombina III é um inibidor da protease do plasma, que neutraliza a maioria das enzimas da cascata de coagulação, particularmente a trombina. As proteínas C e S também trabalham em conjunto para inativar vários fatores de coagulação. A plasmina converte fibrina para seus produtos de degradação, onde a regulação deste processo ocorre por meio de inibidores de ativação de plasminogênio e antiplasmina (SILVA . et al., 2011; PHILLIP OWENS; MACKMAN, 2014).

Em doenças trombóticas, a trombina é gerada em resposta à lesão vascular, que atua como uma serina protease multifuncional e catalisa a clivagem proteolítica do fibrinogênio solúvel presente no plasma para formar fibrina insolúvel, que conduz a formação de coágulos. Além disso, a trombina também funciona como um potente agonista de plaquetas, amplificando sua própria geração por ativação de *feedback* (SHI et al., 2012; OSTROWSKI; VALENTINI; PAVANELLI, 2014).

**Figura 13.** Representação esquemática da ativação das vias intrínsecas, extrínsecas e comum da coagulação sanguínea.



Fonte: Adaptado de Arjum, (2011).

A trombose é um processo fisiológico muito complicado, que envolve a participação de muitos fatores. a lesão dos vasos sanguíneos, juntamente com a adesão e agregação descontrolada de plaquetas são responsáveis pela fase inicial, sendo seguidas por um bloqueio de sangue que, geralmente, provoca a formação de um trombo nos vasos sanguíneos (GUGLIELMONE et al., 2002). Uma das principais causas das várias doenças cardiovasculares é a trombose intravascular (ARSLAN et al., 2011), que é a formação de uma massa anormal na passagem de um vaso sanguíneo, envolvendo

fatores vasculares, celulares ou humorais. As complicações clínicas de trombose incluem anormalidades da parede vascular, alterações no fluxo sanguíneo e hipercoagulabilidade. A oclusão de qualquer suprimento arterial ou da drenagem venosa pode provocar uma necrose isquêmica da área, com grandes chances de ocorrência de infarto, onde 99% deles são causados por eventos trombóticos ou embólicos. Além disso, a formação do trombo pode desempenhar um papel importante na progressão das placas ateroscleróticas. Por isso, a trombina é principal alvo da maioria dos anticoagulantes. (ARSLAN et al., 2011; SHI et al., 2012; OSTROWSKI; VALENTINI; PAVANELLI, 2014).

As doenças que acometem o sistema circulatório são as principais causas de mortalidade e morbidade no mundo, gerando grandes despesas para os países, principalmente pela grande quantidade de medicamentos com atividades antitrombótica, anticoagulante e anti-plaquetária que é utilizada (PAWLACZYK et al., 2011; SHI et al., 2012; SALU et al., 2014). Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), divulgados em Setembro de 2009, informam que 17,5 milhões de pessoas morreram vítimas de doenças cardiovasculares em 2005, o que representa 30% do número total de mortes registradas naquele ano, sendo estimada para 2015 uma taxa de morte anual por doenças cardiovasculares de aproximadamente 20 milhões (QUIÑONES; MIGUEL; ALEIXANDRE, 2013).

A terapia anticoagulante envolve o uso de drogas que funcionam como anti-plaquetários (também denominados agentes anti-trombóticos), que são usados atualmente para tratar distúrbios tromboembólicos afetando a vias extrínseca e intrínseca da cascata de coagulação, fazendo estender-se o tempo de coagulação sanguínea (SILVA . et al., 2011). Esses medicamentos agem inibindo as enzimas da via de coagulação, ou inibindo a ativação e agregação de plaquetas (PAWLACZYK et al., 2011; SALU et al., 2014). Os anticoagulantes são considerados medicamentos indispensáveis na prevenção primária e secundária de eventos tromboembólicos arteriais e venosos e na realização de cirurgias vasculares e cardíacas (ALVARENGA YOSHIDA et al , 2011).

A indústria farmacêutica utiliza em larga escala os polissacarídeos de origem animal, especialmente para o tratamento de doenças do sistema cardiovascular (PAWLACZYK et al., 2011), sendo a heparina não fracionada (HNF) o mais popular com a aplicação prática mais ampla (ALVARENGA YOSHIDA et al., 2011; FRANCO, 2001). Posteriormente, surgiram outros anticoagulantes como a hirudina (isolada a partir da saliva das sanguessugas - *Hirudo medicinalis*), suas formas recombinantes e seus derivados; e o danaparóide (Orgaran – mistura de glicosaminoglicanos com 84% de sulfato de heparana, 12% de sulfato de dermatana e 4% de sulfato de condroitina), sendo ambos aprovados em algumas situações clínicas, mas o custo e o risco hemorrágico que os envolve constituíram barreiras para disseminação rotineira desses medicamentos na prática clínica (ALVARENGA YOSHIDA et al., 2011). No Brasil, foram desenvolvidos estudos pioneiros com heparina de baixo peso molecular (HBPM) e essa substância permanece em uso clínico

desde a década de 1980, com vantagens importantes em relação à HNF, em termos de eficácia e segurança (ALVARENGA YOSHIDA et al., 2011; PAWLACZYK et al., 2011). Desse modo, as opções de tratamento anticoagulantes atuais são, além da HNF e HBPM, as cumarinas (AVKs) e o pentassacarídeo sintético fondaparinux (Arixtra®) (ALVARENGA YOSHIDA et al., 2011). A anticoagulação prolongada é necessária para um grande número de pacientes, com fibrilação arterial, válvulas mecânicas no coração, trombose venosa profunda e embolia pulmonar, que fazem uso rotineiro de medicação anticoagulante (BARON; KAMATH; MCBANE, 2014).

Embora todas essas drogas tenham se mostrado eficazes no tratamento e na redução do risco a doença tromboembólica ao longo do tempo, elas estariam, por outro lado, associadas a inconvenientes, que limitam seu uso e sua ampla aceitação clínica. A heparina estaria relacionada a problemas de trombocitopenia por ela induzida, baixa biodisponibilidade, além do risco de contaminação devido à sua origem animal (ALVARENGA YOSHIDA et al., 2011; PAWLACZYK et al., 2011).

. Além disso, os tratamentos com as demais drogas anticoagulantes também podem trazer efeitos deletérios ao paciente, como hemorragias, por exemplo, fazendo com que vários usuários destas drogas tenham que realizar exames periódicos para avaliar os níveis de suas proteínas de coagulação (OSTROWSKI; VALENTINI; PAVANELLI, 2014).

Assim, apesar da eficácia desses anticoagulantes, seu risco hemorrágico, sua restrição de vias de administração e a necessidade de controle laboratorial rigoroso são fatores que têm levado à busca por novas opções terapêuticas, que, além de serem eficazes, tenham menor risco hemorrágico, ausência de efeitos colaterais, menor interação com outras medicações ou alimentos, seja de fácil administração, confortável para o paciente e para equipe médica, sem necessidade de controle laboratorial, que sejam também de baixo custo e que possuam um antídoto (ALVARENGA YOSHIDA et al., 2011; PAWLACZYK et al., 2011; YU et al., 2013; OSTROWSKI; VALENTINI; PAVANELLI, 2014)

### **3.5.3 Anticoagulantes e produtos naturais**

Em todo o mundo há uma busca contínua por novos e mais eficazes agentes anticoagulantes ou antiplaquetários, preferencialmente que possuam múltiplos alvos e não apresentem tantos efeitos colaterais. A pesquisa com plantas medicinais para agente anticoagulantes representa uma área de interesse considerável. Por sua diversidade metabólica, materiais vegetais são apontados como uma boa fonte para este tipo de pesquisa (GUGLIELMONE et al., 2002; CARVALHO et al., 2010; CHOI et al., 2014).

Compostos fenólicos formam um grande grupo de compostos não energéticos, largamente presentes em plantas e alimentos. Nos últimos anos, uma dieta rica em polifenóis de plantas tem sido

utilizada para melhorar a saúde e para diminuir a incidência de doenças cardiovasculares, pois esses compostos têm sido apontados por possuírem efeitos antitrombóticos, que podem estar relacionados às suas propriedades anti-inflamatórias e antiaterogênicas (KHAN et al., 2013; QUIÑONES; MIGUEL; ALEIXANDRE, 2013). Estudos realizados com antocianinas, substância pertencente ao grupo dos compostos fenólicos, mostraram que elas podem inibir a função plaquetária (KUNDU et al., 2006). O efeito antitrombótico de polifenóis pode ser explicado pela sua capacidade para inibir enzimas envolvidas na síntese de moléculas derivadas do ácido araquidônico, que estão diretamente envolvidas na regulação da homeostase vascular (QUIÑONES; MIGUEL; ALEIXANDRE, 2013).

Os flavonoides, compostos fenólicos de baixo peso molecular e maior distribuição no reino vegetal, não costumam ser muito estudados em relação à atividade anticoagulante porque, em geral, eles não possuem as características estruturais associadas a essa atividade. Porém, esses compostos se destacam por sua grande reatividade em meios biológicos, estando associados a outras atividades (GUGLIELMONE et al., 2005; LIU et al., 2010), onde vários estudos demonstram que os flavonoides afetam uma grande variedade de enzimas por possuírem atividade eliminadora de radicais livres, propriedades antitumorais, além de efeitos cardioprotetores e inibitórios sobre as plaquetas e leucócitos, que os torna de potencial interesse para o desenvolvimento de inibidores sanguíneos e de interações de parede dos vasos (ARSLAN et al., 2011; CARVALHO et al., 2010; GUGLIELMONE et al., 2005). Além disso, estudos têm demonstrado que os flavonoides podem inibir a adesão, agregação e secreção plaquetária. (GUGLIELMONE et al., 2002, 2005; CARVALHO et al., 2010; SHI et al., 2012).

#### 4. REFERÊNCIAS

AGRA, M.F.; BARACHO, G. S.; NURIT, K.; BASÍLIO, I. J. L. D.; COELHO, V. P. M. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 383–395, 2007.

ALBUQUERQUE, U. P.; BARACHO, G. S.; BASÍLIO, I. J. L. D.; COELHO, V. P. M. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 1, p. 76–91, 2007.

ALBUQUERQUE, U. P.; OLIVEIRA, R. Is the use-impact on native Caatinga species in Brazil reduced by the high species richness of medicinal plants? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 1, p. 156–170, ago. 2007.

ALMEIDA, J. R. G. S.; SILVA-FILHO, R. N.; NUNES, X. P.; DIAS, C. S. D.; PEREIRA, F. O.; LIMA, E. O. Antimicrobial activity of the essential oil of **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202–2210, 2006.

ALVES, C. Q.; BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. LIMA, L. S. Avaliação da atividade antioxidante de flavonoides. **Diálogos e Ciência**, v. 12, 2007.

ALVES, M. J.; KENNED SILVA, A.; MURATORI, L.; FERREIRA, E. J.; SOUSA, G. M.; JESUS, N. D.; LOPES, A. M. G. Teor de fenóis totais e flavonoides, atividade antioxidante e citotóxica das folhas, frutos, cascas dos frutos e sementes de *Piptadenia moniliformis* Benth (Leguminosae-Mimosidae). **Blacpma**, v. 13, n. 5, p.466-476, 2014.

ARAÚJO, A. A.; SOARES, L. A.; FERREIRA, M. R. A.; SOUZA NETO, M. A.; SILVA, G. R.; ARAÚJO JR., R. F.; GUERRA, G. C. B.; MELO, M. C. N. Quantification of polyphenols and evaluation of antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous and acetone–water extracts of *Libidibia ferrea*, *Parapiptadenia rigida* and *Psidium guajava*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 156, p. 88–96, 2014.

ARCOVERDE, J. H. V.; CARVALHO, A. S.; NEVES, F. P. A.; PAIVA, P. M. G.; NAPOLEÃO, T. H.; CORREIA, M. T. S.; SILVA, M. V.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. Screening of Caatinga plants as sources of lectins and trypsin inhibitors. **Natural Product Research**, v. 28, n. 16, p. 1297–1301, 18 ago. 2014.

ARRIAGA, A. M. C.; GOMES, G. A.; BRAZ-FILHO. Constituents of *Bowdichia virgilioides*. **Fitoterapia**. v. 71, p. 211-212, 2000.

ARSLAN, R.; BOR, Z.; BEKTAS, N.; MERIÇLI, A. H.; OZTURK, Y. Antithrombotic effects of ethanol extract of *Crataegus orientalis* in the carrageenan-induced mice tail thrombosis model.

**Thrombosis Research**, v. 127, n. 3, p. 210–213, 2011.

BARBOSA-FILHO, J. M.; ALMEIDA, J. R. G. S.; COSTA, V. C. O.; DA-CUNHA, E. V. L.; SILVA, M. S.; BRAZ-FILHO, R. Bowdichine, a new diaza-adamantane alkaloid from *Bowdichia virgilioides*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 6, n. 1, p. 11–17, 2004.

BARON, T. H.; KAMATH, P. S.; MCBANE, R. D. New anticoagulant and antiplatelet agents: a primer for the gastroenterologist. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 12, n. 2, p. 187–195, 2014.

BARREIROS, A.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química nova**, v. 29, n. 1, p. 113, 2006.

BARROS, W. M.; RAO, V. S. N.; SILVA, R. M.; LIMA, J. C. S.; MARTINS, D. T. O. Anti-inflammatory effect of the ethanolic extract from *Bowdichia virgilioides* HBK stem bark. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** v. 82, n. 3, p. 609–616, 2010.

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Caatinga. 2015. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biomas/caatinga>. (Acesso: Janeiro/2015)

BRASS, L. F. Understanding and evaluating platelet function. **Hematology Am. Soc., Hematol. Educ. Program.**, p. 387-396, 2010.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15-25, 2013.

CARTAXO, S. L.; ALMEIDA SOUZA, M. M.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, n. 2, p. 326–342, 2010.

CARVALHO, M. J.; PEDROSA, T. N.; GUILHON-SIMPLICIO, F.; NUNEZ, C. V.; OHANA, D. T.; PEREIRA, M. M.; LIMA, E. S. Pharmacognostic study and in vitro activity on blood coagulation and platelet aggregation of leaves of *Passiflora nitida* Kunth (Passifloraceae). **Acta Amazonica**, v. 40, n. 1, p. 199–206, 2010.

CHOI, J.; KIM, D.; PARK, S.; CHOI, B.; SAPKOTA, K.; KIM, S. Novel thrombolytic protease from edible and medicinal plant *Aster yomena* (Kitam.) Honda with anticoagulant activity:

Purification and partial characterization. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 118, n. 4, p. 372–377, 2014.

CUSTÓDIO, D. L.; VEIGA-JUNIOR, V. F. True and common balsams. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v. 22, n. 6, p. 1372–1383, 2012.

DA SILVA, Luís Cláudio Nascimento *et al.* Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. **Food and Chemical Toxicology** v. 49, n. 9, p. 2222–2228, 2011.

DAMASCENA, N. P.; SOUZA, M. T. S.; ALMEIDA, A. F.; CUNHA, R. S.; CURVELLO, R. L.; ARAÚJO, B. S. Antioxidant and orofacial anti-nociceptive activities of the stem bark aqueous extract of *Anadenanthera colubrina* (Velloso) Brenan (Fabaceae). **Natural Product Research** v. 28, n. 10, p. 753–756, 2014.

ALVARENGA YOSHIDA, R.; YOSHIDA, W. B.; ALMEIDA ROLLO, H. Novos anticoagulantes para a profilaxia do tromboembolismo venoso em cirurgias ortopédicas de grande porte. **Jornal Vascular Brasileiro** v. 10, n. 2, p. 145–153, 2011.

DRUMOND, Marcos Antônio. Potencialidades de algumas espécies arbóreas madeireiras do bioma Caatinga. In: SILVA, Márcia Vanusa *et al.* (Org.) **A Caatinga e seu potencial**. 23 ed. Recife: Ed. Universitária, 2013, cap.1, p. 1-18.

FABANI, M. P.; LUNA, L.; BARONI, M. V.; MONFERRAN, M. V.; IGHANI, M.; TAPIA, A.; WUNDERLIN, D. A.; FERESIN, G. E. Pistachio (*Pistacia vera* var Kerman) from Argentinean cultivars. A natural product with potential to improve human health. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 3, p. 1347–1356, 2013.

FÉLIX-SILVA, J.; SOUZA, T.; CAMARA, R. B. G.; CABRAL, B.; ILVA-JUNIOR, A. A.; REBECCHI, I. M. M.; ZUCOLOTTO, S. M.; ROCHA, H. A. O.; FERNANDES-PEDROSA, M. F. In vitro anticoagulant and antioxidant activities of *Jatropha gossypifolia* L.(Euphorbiaceae) leaves aiming therapeutical applications. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 14, n. 1, p. 405, 2014.

FERREIRA, E. G. B. S.; MATOS, V. P.; SILVA, R. B.; SANTOS, H. H. D.; SENA, L. H. M. Thermal scarification to overcome *Piptadenia moniliformis* seeds dormancy. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias - Brazilian Journal of Agricultural Sciences** v. 9, n. 1, p. 79–83, 2014.

- FEUCHT, C. L.; PATEL, D. R. Analgesics and anti-inflammatory medications in sports: use and abuse. **Pediatr. Clin. North. Am.**, v. 57, n.3, p.751-774, 2012.
- FRANCO, R. F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 34, n. 3/4, p. 229–237, 2001.
- FRASSON, Amanda Piccoli *et al.* First report of anti-Trichomonas vaginalis activity of the medicinal plant Polygala decumbens from the Brazilian semi-arid region, Caatinga. **Parasitology Research** v. 110, n. 6, p. 2581–2587, 2012.
- FREITAS, A. C. C.; XIMENES, N. C. A.; AGUIAR, J. S.; LINS, T. U. L.; MAGALHÃES, L. R.; COELHO, L. C. B. B.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; GONÇALVES-SILVA, T.; CORREIA, M. T. S. Biological Activities of *Libidibia (Caesalpinia) ferrea* var. *parvifolia* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz Pod Preparations. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** v. 2012, p. 1–7, 2012.
- GIULIETTI, A. M.; QUEIROZ, L. P.; CONCEIÇÃO, A. A. Nordeste semi-árido: caracterização geral e lista das fanerógamas. 2006, pp. 15-359, in A.M. Giuliatti & L.P. de Queiroz (eds.), **Diversidade e caracterização das fanerógamas do semi-árido brasileiro**. Vol. 1. Recife: Associação Plantas do Nordeste. 2006, 488p.
- GUGLIELMONE, H. A.; AGNESE, A. M.; MONTOYA, S. C. N.; CABRERA, J. L. Anticoagulant effect and action mechanism of sulphated flavonoids from *Flaveria bidentis*. **Thrombosis Research**, v. 105, n. 2, p. 183–188, 2002.
- GUGLIELMONE, H. A.; AGNESE, A. M.; MONTOYA, S. C. N.; CABRERA, J. L. Inhibitory effects of sulphated flavonoids isolated from *Flaveria bidentis* on platelet aggregation. **Thrombosis Research**, v. 115, n. 6, p. 495–502, 2005.
- GUIMARÃES, A. G.; SERAFINI, M. R.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Terpenes and derivatives as a new perspective for pain treatment: a patent review. **Expert Opinion on Therapeutic Patents** v. 24, n. 3, p. 243–265, 2014.
- GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 1, p. 1–93, 2006.
- HOSSAIN, M. A.; RAHMAN, S. M. Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of tropical fruit pineapple. **Food Research International**, v. 44, p.672-676, 2011.

JUCK, D. B. F.; REZENDE, L. C.; DAVID, J. P.; QUEIROZ, L. P.; DAVID, J. M. Two new isoflavonoids from *Bowdichia virgilioides*. **Natural Product Research**, v. 20, n. 1, p. 27–30, 2006.

KHAN, M. S. S.; SYEED, S. H.; UDDIN, M. H.; AKTER, L.; ULLAH, M. A.; JAHAN, SS.; RASHID, M. H. Screening and evaluation of antioxidant, antimicrobial, cytotoxic, thrombolytic and membrane stabilizing properties of the methanolic extract and solvent-solvent partitioning effect of *Vitex negundo* Bark. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 3, n. 5, p. 393–400, 2013.

KHLEBNIKOV, A. I., SCHEPETKIN, I. A., DOMINA, N. G., KIRPOTINA, L. N., QUINN, M. T. Improved quantitative structure–activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 15, p. 1749–1770, 2007.

KU, S.; KIM, T. H.; LEE, S; KIM, S. M.; BAE, J. Antithrombotic and profibrinolytic activities of isorhamnetin-3-O-galactoside and hyperoside. **Food and Chemical Toxicology**, v. 53, p. 197–204, 2013.

KUNDU, J. K.; SHIN, Y. K.; KIM, S. H.; SURH, Y. J. Resveratrol inhibits phorbol ester-induced expression of COX-2 and activation of NF-kappaB in mouse skin by blocking IkappaB kinase activity. **Carcinogenesis**, n.27, p. 1465–74, 2006.

LEAL, Inara R. *et al.* Changing the course of biodiversity conservation in the Caatinga of northeastern Brazil. **Conservation Biology** v. 19, n. 3, p. 701–706 , 2005.

LIMA, J. R.; MANSANO, V. F. A família Leguminosae na Serra de Baturité, Ceará, uma área de Floresta Atlântica no semiárido brasileiro. **Rodriguésia-Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 62, n. 3, 2011.

LIU, L.; YANG, N.; GUO, J.; TAO, W.; DUAN, J. A series of natural flavonoids as thrombin inhibitors: structure-activity relationships. **Thrombosis Research**, v. 126, n. 5, p. e365–e378, 2010.

LÓPEZ-ALARCÓN, C.; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. **Analytica Chimica Acta**, v. 763, p. 1–10, 2013.

MANN, K. G.; BUTENAS, S.; BRUMMEL, K. The dynamics of thrombin formation. **Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.**, v. 23, n. 1, p. 17-25, 2003.

- MARISTELA, Martins *et al.* Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* by guaran (*Paullinia cupana* Kunth) and juc (*Libidibia ferrea* Mart) extracts. **African Journal of Biotechnology** v. 13, n. 1, p. 131–137, 2014.
- MARTINS, M.; KLUCZKOVSKI, A. M.; SOUZA, T. P.; PACHECO, C.; SAVI, G. D.; SCUSSSEL, V. M. Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* by guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) and jucá (*Libidibia ferrea* Mart) extracts. **African Journal and Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 131-137, 2014.
- MEDEIROS, P. M.; LADIO, A. H.; ALBUQUERQUE, U. P. Patterns of medicinal plant use by inhabitants of Brazilian urban and rural areas: A macroscale investigation based on available literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 2, p. 729–746, 2013.
- MELO, J. G.; ARAÚJO, T. A. S.; CASTRO, V. T. N. A.; CABRAL, D. L. V.; RODRIGUES, M. D.; NASCIMENTO, S. C.; AMORIM, E. L.C.; ALBUQUERQUE, U. P. Antiproliferative Activity, Antioxidant Capacity and Tannin Content in Plants of Semi-Arid Northeastern Brazil. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 8534–8542, 2010.
- NIKI, E. Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 4, p. 503–515, 2010.
- OHSAKI, A.; TAKASHIMA, J.; CHIBA, N.; KAWAMURA, M. Microanalysis of a selective potent anti-*Helicobacter pylori* compound in a Brazilian medicinal plant, *Myroxylon peruiferum* and the activity of analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 9, p.1109-1112, 1999.
- OLIVEIRA, Y. L. C.; SILVA, L. C. N.; SILVA, A. G.; MACEDO, A. J.; ARAÚJO, J. M.; CORREIA, J. M.; SILVA, M. V. Antimicrobial Activity and Phytochemical Screening of *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) R. A. Howard (Combretaceae: Combretoideae). **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1–6 , 2012.
- OSTROWSKI, A. P.; VALENTINI, S. A.; PAVANELLI, M. F. Atividade anticoagulante do extrato aquoso, hidroetanólico e óleo essencial das folhas de *Tropaeolum majus*. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 9, n. 2, p. 46–53, 2014.
- PANG, Y. WANG, D.; FAN, Z.; CHEN, X.; YU, F.; HU, X.; WANG, K.; YUAN, L. Blumea balsamifera - a phytochemical and pharmacological review. **Molecules**, v. 19, n. 7, p. 9453–9477, 2014.
- PAWLACZYK, I.; CZERCHAWSKI, L.; KULICZKOWSKI, W.; KAROLKO, B.; PILECKI, W.; WITKIEWICZ, W.; GANCARZ, R. Anticoagulant and anti-platelet activity of polyphenolic-

- polysaccharide preparation isolated from the medicinal plant *Erigeron canadensis* L. **Thrombosis Research**, v. 127, n. 4, p. 328–340, 2011.
- PERES, L. Metabolismo Secundário. Piracicaba – São Paulo: **Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, p. 1-10, 2004.
- PHILLIP OWENS, A.; MACKMAN, N. M. The Antithrombotic Effects of Statins. **Annual Review of Medicine** v. 65, n. 1, p. 433–445, 2014.
- QUIÑONES, M.; MIGUEL, M.; ALEIXANDRE, A. Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. **Pharmacological Research**, v. 68, n. 1, p. 125–131, fev. 2013.
- RIBEIRO, T. G.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; VALADARES, D. G.; FRANÇA, J. R.; LAGE, P. S.; DUARTE, M. C.; ANDRADE, P. H. R.; MARTINS, V. T.; COSTA, L. E.; ARRUDA, A. L. A.; FARACO, A. A. G.; COELHO, E. A. F.; CASTILHO, R. O. Antileishmanial activity and cytotoxicity of Brazilian plants. **Experimental Parasitology**, v. 143, p. 60–68, 2014.
- RODRIGUES, I. M. C.; SOUZA FILHO, A. P. S.; FERREIRA, F. A. Estudo fitoquímico de *Senna alata* por duas metodologias. **Planta Daninha**, v. 27, n. 3, p. 507–513, 2009.
- ROMAGNOLO, D. F., SELMIN, O.I. Flavonoids and cancer prevention: a review of the evidence. **Journal of Nutrition in Gerontology Geriatric**. v. 31, p. 206-38.
- SALU, Bruno R. *et al.* CrataBL, a lectin and Factor Xa inhibitor, plays a role in blood coagulation and impairs thrombus formation. **Biological Chemistry** v. 395, n. 9, 2014.
- SAWADA, L. A.; MONTEIRO, V. S. C.; RABELO, G. R.; CUNHA, G. B. D. M.; NASCIMENTO, J. L. M.; BASTOS, G. N. T. *Libidibia ferrea* mature seeds promote antinociceptive effect by peripheral and central pathway: possible involvement of opioid and cholinergic receptors. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–10, 2014.
- SEIFRIED, H. E.; ANDERSON, D. E; FISHER, E. I.; MILNER, J. A. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, n. 9, p. 567–579, 2007.
- SHI, Z.; LI, N.; TANG, Y.; WEI-LI; LIAN-YIN; YANG, J.; DUAN, J. Metabolism-based synthesis, biologic evaluation and SARs analysis of O-methylated analogs of quercetin as thrombin inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 210–222, 2012.

SILVA, J. P.; RODARTE, R. S.; CALHEIROS, A. S.; SOUZA, C. Z.; AMENDOEIRA, F. C.; BARRETO, E. Antinociceptive activity of aqueous extract of *Bowdichia virgilioides* in mice. **Journal of medicinal food**, v. 13, n. 2, p. 348–351, 2010.

SILVA, L. C. N. MIRANDA, R. C. M.; GOMES, E. B.; MACEDO, A. G.; ARAÚJO, J. M.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q.; SILVA, M. V.; CORREIA, M. T. S. Evaluation of combinatory effects of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 32, p 2358-2364, 2013.

SILVA, L. N.; TRENTIN, D. S.; ZIMMER, K. R.; TRETER, J.; BRANDELLI, C. L. C.; FRASSON, A. P.; TASCA, T.; SILVA, A. G.; SILVA, M. V.; MACEDO, A. J. Anti-infective effects of Brazilian Caatinga plants against pathogenic bacterial biofilm formation. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 3, p. 464–468, 2015.

SILVA, M. C.C.; SANTANA, L. A.; SILVA-LUCCA, R. A.; LIMA, A. L. R.; FERREIRA, J. G.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B.; OLIVA, M. L. V.; ZINGALI, R. B.; CORREIA, M. T. S. Immobilized Cratylia mollis lectin: An affinity matrix to purify a soybean (*Glycine max*) seed protein with in vitro platelet antiaggregation and anticoagulant activities. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 74–80, 2011.

SOUZA, Ana Valéria. Potencialidades de algumas espécies arbóreas madeireiras do bioma Caatinga. In: SILVA, Márcia Vanusa *et al.* (Org.) **A Caatinga e seu potencial**. 23 ed. Recife: Ed. Universitária, 2013, cap.4, p. 89-99.

THOMAZZI, S. M.; SILVA, C. B.; SILVEIRA, D. C. R.; VASCONCELLOS, C. L. C.; LIRA, A. F.; CAMBUI, E. V. F.; ESTEVAM, C. S.; ANTONIOLLI, A. R. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Bowdichia virgilioides* (sucupira). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 2, p. 451–456, 2010.

TRENTIN, D. S.; GIORDANI, R. B.; ZIMMER, K. R.; SILVA, A. G.; SILVA, M. V.; CORREIA, M. T. S.; BAUMVOL, I. J. R.; MACEDO, A. J. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 327–335, 2011.

TRENTIN, D. S.; ZIMMER, K. R.; SILVA, M. V.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Medicinal plants from brazilian Caatinga: antibiofilm and antibacterial activities against *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista Caatinga**, v. 27, n. 3, p. 264–271, 2014.

TROVÃO, Dilma M. *et al.* Variações sazonais de aspectos fisiológicos de espécies da Caatinga. **R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental** v. 11, n. 3, p. 307–311, 2007.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MOLCON, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.

VASCONCELOS, C.F.B.; MARANHÃO, H. M. L.; BATISTA, T. M.; CARNEIRO, E. M.; FERREIRA, F.; COSTA, J.; SOARES, L. A. L.; SÁ, M. D. C.; SOUZA, T. P.; WANDERLEY, A. G. Hypoglycaemic activity and molecular mechanisms of *Caesalpinia ferrea* Martius bark extract on streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 137, n. 3, p. 1533–1541, 2011.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006.

WILSON, M. D.; DAVIS, J. E. Antithrombotic Reversal Agents. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v. 32, n. 3, p. 715–725, 2014.

WYREPKOWSKI, C. C.; COSTA, D. L. M. G.; SINHOIN, A. P.; VILEGAS, W.; DE GRANDIS, R. A.; RESENDE, F. A.; VARANDA, E. A.; SANTOS, L. C. Characterization and Quantification of the Compounds of the Ethanolic Extract from *Caesalpinia ferrea* Stem Bark and Evaluation of Their Mutagenic Activity. **Molecules**. v. 19, n. 10, p. 16039–16057, 2014.

YU, P.; ZHOU, Q.; ZHU, W.; WU, Y.; WU, L.; LIN, X.; CHEN, M.; QIU, B. Effects of quercetin on LPS-induced disseminated intravascular coagulation (DIC) in rabbits. **Thrombosis Research**, v. 131, n. 6, p. 270–273, 2013.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUIN, R. Hematologia: fundamentos e prática. 1 ed. São Paulo. **Ed. Atheneu**, 2005.

ZARBOCK, A.; POLANOWSKA-GRABOWSKA; R. K.; LEY, K. Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation. **Blood Review**, v. 21, n. 2, p.99-111, 2007.

## ARTIGO



***In vitro* evaluation of the antioxidante and anticoagulant activity of  
Caatinga plants**

**Priscilla A. Moura<sup>a\*</sup>; Clóvis M. Bezerra Filho<sup>a</sup>; Amanda D. A. Uchôa<sup>a</sup>;  
Rafael M. Ximenes<sup>b</sup>; Marlon V. Brito<sup>c</sup>; Maria Luiza V. Oliva<sup>c</sup>; Márcia  
V. Silva<sup>a</sup>, Maria Tereza S. Correia<sup>a</sup>.**

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brasil.

<sup>b</sup> Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brasil.

<sup>c</sup> Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brasil.

\* Endereço: Avenida Professor Moraes Rêgo, s/n Cidade Universitária, Recife, PE, 50670-420 Pernambuco, Brazil. Tel.: +55(81)21268540; fax: +55(81)21268541. E-mail: pri-moura88@hotmail.com

This study evaluated the antioxidant capacity and anti coagulant plants of Caatinga, compared to *in vitro* testing methods. Six plants were collected in the Paequr Nacional do Catimbau (Pernambuco-Brazil) and these were prepared organic extracts with dichloromethane, tetrahydrofuran and acetone. To evaluate the antioxidant capacity, we used *in vitro* testing methods (total antioxidant capacity, DPPH, ABTS and DNA protection). In the evaluation of anticoagulant activity, were employed *in vitro* assays Prototrombina Time (PT) Activated Partial of Thromboplastin Time (aPTT). Additionally, phytochemical profile and dosage phenolic compounds were obtained. Of the eighteen tested extracts showed the best results of antioxidant activity: AcTHF, BtTHF, BtACE, LfTHF, LfACE, PmTHF and PmACE, which also showed high content of phenolic compounds. In anticoagulant activity assays, and PmTHF PmACE extracts altered coagulation time in PT and aPTT. The phytochemical profile attests to the presence mainly flavonoids, cinnamic derivatives, terpenes and protoantocianidinas. Thus, it concludes that plants of Caatiga have antioxidant and anticoagulant potential importance of being carrying out studies aimed at fractionation and the elucidation of its compounds.

## 1. INTRODUCTION

The Caatinga, exclusively Brazilian morphoclimatic domain and located in the Northeast, has a large variety of plant species, and many of them endemic and adapted, through its rich metabolic production, the characteristic conditions of environmental stress the semiarid region where they are located (low rainfall, high temperatures and high evapotranspiration rates) [1, 2]. Several plant species of the Caatinga have

been widely used by the population that lives this region, because of its supposed medicinal properties through teas and infusions prepared using extracts of these plants [1, 3]. Several plant species of the Caatinga have been widely used by the population that lives this region, because of its supposed medicinal properties through prepared teas and infusions of plant extracts are using [1, 3] and are used in the treatment against

various diseases, such as cancer, anemia, diabetes, pain, infection, in general, cardiovascular disorders, among others [4-6]. The popular medicinal use coupled with the metabolic wealth that the plant species of the Caatinga present, are indications that they may be promising sources of biomolecules of interest, with diversified biotechnology applications [3, 7]. Therefore, the development of further studies related to the phytochemical composition and therapeutic properties of these plants is necessary.

Oxidation processes play an essential role in energy production in the cells to the biological activities. However, as a result of this process, free radicals are produced which, when excessive, can cause oxidative damage to cellular major compounds: DNA, proteins and lipids [8, 9]. The unbalance between these free radicals and antioxidants (substances that stabilize and / or eliminate these radicals) produced in our body because the so-called oxidative stress [10]. Studies indicate that oxidative stress can be directly related to the development of various degenerative diseases, such as cancer, atherosclerosis, diabetes, gastric ulcers, aging, cardiovascular diseases, among others [11, 12]. The interest in finding natural antioxidants for use in food or medicinal materials to replace the synthetic antioxidants has grown considerably since the synthetic may be related to adverse effects such as carcinogenic properties [13].

The functional balance of hemostasis is secured by a variety of mechanisms that has the

purpose of regulating blood flow, preventing the onset of bleeding disorders as well as excessive activation of coagulation which causes inadequate fibrin formation and may lead to vascular occlusion and thrombosis [14, 15]. Treatment with anticoagulant drugs such as heparin, are quite widespread, but its continued use can bring harmful effects to the patient, such as bleeding. Because of this, there has been growing interest in search for new therapeutic options [15, 16, 17].

Several studies have reported high potential of plants for the production of compounds that exhibit various properties including antioxidant and anticoagulant [14, 17, 18, 20]. Therefore, this study aimed to select plants of Caatinga with antioxidant and anticoagulant activity.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1. Plant material

The plant species *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, *Bowdichia virgilioides* Kunth, *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) R.A. Howard, *Libidibia ferrea* (Mart.) L.P. Queiroz, *Myroxylon peruiferum* L. f. (92004), *Pityrocarpa moniliformis* (Benth.) Luckow & R. W. Jobson were collected at Parque Nacional do Catimbau, Conservation Unit of the Caatinga biome, Municipalities of Buíque, Ibimirim and Tupanatinga, Pernambuco State, Brazil. Leaves were collected in February (2012) and the plants were botanically identified at Herbarium IPA, from Instituto Agronômico de Pernambuco (Agronomic Institut of Pernambuco

State), Brazil. Voucher species were deposited at the herbarium IPA.

## 2.2. Preparation of leaf extracts

The leaves of each plant were dried at room temperature for 7 days, and then crushed. To obtain the extract, 10 g of powder was added to 100 ml of the organic solvent, and then the mixture was subjected to agitation (300 rpm, 24 hours). After shake, the extract was filtered through Whatman filter paper No. 1. This procedure was repeated three times for each solvent. They used the diclotometano organic solvents (Dic), tetrahydrofuran (THF) and acetone (ACE), in this order.

## 2.3. Phytochemical profile

Following the method of Matos [20], the chemical survey was performed using the Thin Layer Chromatography (TLC). Aliquots were applied (10 L) in extracts of chromatographic plates silica gel (Macherey-Nagel®, ref. 818 133), using appropriate developers and elution systems, to attest the presence of cyanogenic glycosides, flavonoids, cinnamic derivatives, triterpenes, steroids, mono and sesquiterpenes, alkaloids and proanthocyanidins in plant extracts.

## 2.4. Total phenolic compounds

The content of phenolic compounds was determined according to the Folin-Ciocalteu method. 200 uL plant extracts (at a concentration of 1 mg / ml) were added to tubes, along with 1 mL of Folin-Ciocalteu reagent (1: 1 / v: v) and 2.5 ml of sodium carbonate (20%). The mixture

was incubated for 30 min at room temperature. The absorbance was measured at 765 nm and the estimated total phenolic compounds was calculated using an equation obtained from the calibration curve gallic acid, are performed in triplicate [21].

## 2.5. Antioxidant activity

### 2.5.1. Total antioxidant activity

The total antioxidant activity (TAC) was evaluated by the method of Pietro et al. [22]. An aliquot of 0.1 ml of the sample solution (1 mg / ml using methanol as solvent) was mixed with 1 ml of the reagent solution (600 mM sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate, and 4 mM ammonium molybdate). The tubes were covered and incubated in a thermostated bath at 95 ° C for 90 min. After the samples reached room temperature, the absorbance was measured at 695 nm against blank (1 ml of reagent and 0.1 ml of solvent). The total antioxidant activity was expressed in relation to ascorbic acid and calculated using the formula:

$$\%TAC = (A_a - A_c) \times 100 / (A_{aa} - A_c)$$

wherein  $A_c$  is the absorbance of control (reagent solution without extract),  $A_a$  absorbance in the presence of the extract and the absorbance  $A_{aa}$  ascorbic acid, which was used as standard.

### 2.5.2. DPPH scavenging assay

The antioxidant potential of the compounds was evaluated through scavenging of free radical 2,2-diphenyl - 1 - picrylhydrazyl (DPPH) [23]. A solution of 0.2 mM DPPH in methanol was prepared. For DPPH 250 uL, 10 uL

of each sample were used (concentrations of 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625 g / ml, using DMSO as solvent) and added in a 96-well plate. The plate was incubated in the dark for 30 min at room temperature. After incubation, the absorbance was measured at 517 nm. The percentage of DPPH radical capturing activity was calculated using the formula:

$$\text{DPPH\% Reduction} = [(A_c - A_s) / A_c]$$

wherein  $A_c$  is the absorbance of control (DPPH + DMSO) and  $A_s$  is the absorbance of the samples.

### 2.5.3. ABTS scavenging assay

The capture radical ABTS activity was determined according Re et al. [24] The radical cation ABTS<sup>+</sup> is produced by reaction between an ABTS solution + 14mmol.L<sup>-1</sup> and a solution of potassium persulfate (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) to 4.9 mmol.L<sup>-1</sup>, kept at room temperature and protected from light for 16 h. Before use, this solution was diluted with ethanol to obtain an absorbance of  $0.700 \pm 0.020$  at the 734 nm. To the reaction were mixed in 3 ml of ABTS solution and + 30 uL of plant extract (concentration 1 mg / ml). The mixture was homogenised and incubated at room temperature for 6 i. After incubation, the absorbance of the samples were measured at 734 nm and the Trolox was used as a standard, from which a calibration curve was made. From the readings, it calculated the percentage of inhibition of ABTS, using the formula:

$$\% \text{ Redução de ABTS} = [(A_c - A_s) / A_c] \times 100$$

wherein  $A_c$  is the absorbance of control and  $A_s$  is the absorbance of the samples.

### 2.5.4. DNA protection assay

The DNA protection was performed using plasmids belonging to the Laboratory of Molecular Biology Library (Department of Biochemistry - UFPE). For the reaction, we used was Fenton's reagent (30 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 50 mM ascorbic acid and 80 mM FeCl<sub>3</sub>) and plant extracts in concentrations of 250, 100 and 50 ug/ml. The final volume of the mixture was made up to 20 uL with distilled water. The solution was then incubated at 37 ° C for 30 min and, after incubation, subjected to electrophoresis on agarose 1% gel (1 g of agarose in 100 ml of 0.5 x TBE buffer) [12].

## 2.5. Anticoagulant Activity

### 2.5.1. Human plasma

The human blood ("pool" five volunteer donors) for the coagulation assay was collected by venipuncture in the basilic vein in syringe containing sodium citrate, 1/10 volume of 3.8% solution, and collection carried out slowly evitando- hemolysis of the blood. Then the blood was centrifuged at 3000g for 10 minutes at 25 ° C to obtain platelet poor plasma (PPP). The plasma was then divided into small fractions and stored in a freezer at -80 ° C for further conducting the tests.

### 2.5.3. Determination of prothrombin time (PT)

The prothrombin time was determined by semi-automated coagulometer (BFT II - Dade

Behring) after addition of tissue thromboplastin (Factor III) to the platelet-poor plasma.

For the determination of prothrombin time reagent used was Dade Behring (lyophilized rabbit brain thromboplastin) reconstituted at the time of use, according to the manufacturer's instructions. In a heated patterned 37 °C tube was added 50 uL plasma and 50 uL of test substances. After incubation at 37 °C for 60 seconds, 100 uL thromboplastin was added, then if triggering the timer. The experiments were performed in duplicate, and the results expressed in seconds, the maximum time of the test 300/2. Finally, a repetition was made, where the experiment was heated to 100 ° C [25].

#### **2.5.4. Determination of activated partial thromboplastin time (aPTT)**

The determination of the activated partial thromboplastin time was also performed in a semi-automatic coagulometer (BFT II - Dade Behring) using activated cephalin from rabbit brain containing celite as an activator.

Standard tube heated to 37°C were used to determine the APTT, to which was added plasma 50 µL , cephalin 50 µL in the presence of 50 µL test substances. After incubation at 37 °C for 120 seconds, are added 50 µL CaCl<sub>2</sub> (0.025 M), previously heated to 37°C simultaneously being triggered the timer.

The measurements were performed in duplicate and the results expressed at different time obtained in the test plasma. They were expressed in seconds, the maximum time of the

test 300/2. Additionally, a repetition was made by heating the samples at 100 ° C [25].

### **3. RESULTS e DISCUSSION**

#### **3.1. Phytochemical profile**

The phytochemical profile of the plant extracts was assessed by Thin Layer Chromatography (TLC), following the methodology Matos [20]. The results are described in Table 1.

From the results it can be seen that the tetrahydrofuran organic extract showed the greatest compounds content for all the plants, followed by acetone, which may indicate the use of these solvents for the extraction of plant compounds of biotechnological interest. Furthermore, it was observed that flavonoids, belonging to the group of phenolic compounds, were found in all the extracts, with the highest incidence those obtained from THF and acetone. There was also a high incidence of terpenes, which appeared mainly in dichloromethane extracts and THF.

Flavonoids, colored pigments in plants, are compounds quite reported to possess various biological activities, such as scavenger of free radicals, anti-tumor properties, cardioprotective effects [14, 27] and may also act as vasodilators, antivirals (including HIV), antioxidants, anti-hemorrhagic, antiinflammatories, antimicrobials and altiulcerogênico [9, 28, 29].

**Table 1.** Phytochemical profile.

<b>Clase de metabolitos secundarios</b>	<i>Anadenanthera colubrina</i>			<i>Buchenavia tetraphylla</i>		
Cyanogenic heterosides (leaves)	Present			Absente		
<b>EXTRACTS</b>	<b>DIC</b>	<b>THF</b>	<b>ACE</b>	<b>DIC</b>	<b>THF</b>	<b>ACE</b>
Flavonoids (aglic)*	-	-	-	-	+	+
Flavonoids (het)**	-	+	+	-	+	+
Cinnamic derivatives	-	-	-	+	-	-
Triterpenes and steroids	++	tr	tr	+++	+	+
Mono and sesquiterpenes	+++	++	+	+++	+	+
Alkaloids	-	-	-	-	-	-
Proanthocyanidins	-	+	+	-	+++	++
<hr/>						
	<i>Myroxylon peruiferum</i>			<i>Bowdichia virgilioides</i>		
Cyanogenic heterosides (leaves)	Present			Absente		
<b>EXTRACTS</b>	<b>DIC</b>	<b>THF</b>	<b>ACE</b>	<b>DIC</b>	<b>THF</b>	<b>ACE</b>
Flavonoids (aglic)*	-	+	+	-	+	+
Flavonoids (het)**	-	+++	+++	-	+++	+++
Cinnamic derivatives	++	+++	+++	-	+++	+++
Triterpenes and steroids	++	++	tr	++	+	+
Mono and sesquiterpenes	+++	++	+	+++	++	+
Alkaloids	-	-	-	-	-	-
Proanthocyanidins	-	tr	tr	-	++	+
<hr/>						
	<i>Libidibia ferrea</i>			<i>Pityrocarpa moniliformis</i>		
Cyanogenic heterosides (leaves)	Present			Absente		
<b>EXTRACTS</b>	<b>DIC</b>	<b>THF</b>	<b>ACE</b>	<b>DIC</b>	<b>THF</b>	<b>ACE</b>
Flavonoids (aglic)*	-	+	+	-	++	++
Flavonoids (het)**	-	+++	+++	-	+++	+++
Cinnamic derivatives	-	+++	+++	-	+++	+++
Triterpenes and steroids	++	+	+	++	+	+
Mono and sesquiterpenes	+++	++	+	+++	++	+
Alkaloids	-	-	-	-	-	-
Proanthocyanidins	-	+++	++	-	++	+

\* Flavonoides agliconas; \*\*: Flavonoid glycosides;

tr: traces; +: infrequent; ++: frequent; +++: very frequent; - : absent.

Terpenes with antioxidant properties are rare but a few examples are known as rosmanol, triterpenes and also some quinonamethide, as Celastrol and pristimerin [28, 30, 31].

Work related to the phytochemical profile of plant species of Caatinga are scarce. Melo et al. [32] related the high content of tannins in methanol extracts on antioxidant activity of three plants of Caatinga: *Poincianella pyramidalis*, *Jatropha mollissima* and *Anadenanthera colubrina*. Studies with extracts of bark and root of *Bowdichia virgilioides* revealed the presence of tannins, alkaloids and terpenoids [33-35]. Performed work on the phytochemical prospecting of *Libidibia ferrea* confirmed the presence of the condensed tannins, catechins and tannins hydrolysates, such as gallic acid and ellagic acid, in its extracts [7, 36, 37]. Phytochemical analysis performed with *B. virgilioides* detected the presence of flavonoids, benzofuranoides, terpenoids and alkaloids [33, 35, 38]. Silva et al. [39] showed the presence of phenolic compounds quercetin and rutin in *Pityrocarpa moniliformis* extracts.

### 3.2. Total phenolic compounds

The results obtained in the determination of phenolic compounds were expressed as gallic acid equivalents (GAE)/ gram of extract (Table 2). Dichloromethane extracts showed no significant levels of phenolic compounds. For all plants, THF and acetone extracts showed high levels of phenolic compounds, when compared to data from other plant species described in the literature [17, 40, 41]. For all plants, THF

extracts showed the highest levels, data that corroborates with the phytochemical profile, where the compounds belonging to the group of total phenols shown in great quantity.

Several studies have reported that the antioxidant activity of many plants with therapeutic properties may be related to the presence of natural substances, especially phenolic compounds [32, 41]. Silva et al. [10] evaluated high levels of phenolic compounds in ethanolic extracts of *A. colubrina*, *L. ferrea* and *P. moniliformis*, relating this aspect to the antioxidant activity displayed by them. Phenolic compounds contribute to various biological effects on plants by removing free radicals by acting as chelating metals as catalysts and also as activators of antioxidant enzymes [17, 42].

### 3.3. Antioxidant activity

#### 3.3.1. Total antioxidant activity

The total antioxidant capacity of plant extracts was measured by the phosphomolibdeno method, which is based on the reduction of Mo(IV) to Mo(V) by the antioxidant compound, forming a complex between Mo(V) and phosphate with green coloration, which is formed under acidic pH conditions, it can be monitored by spectrophotometry at 695 nm [43]. After the reaction, the higher the absorbance, the greater the total antioxidant capacity. According to the results obtained, listed in Figure 1, all extracts from *A. colubrina*, *B. virgilioides*, *B. tetraphylla*, *L. ferrea*, *M. peruvianum* and *P. moniliformis* had antioxidant capacity. The best results were

**Table 2.** Content of total phenolic compounds

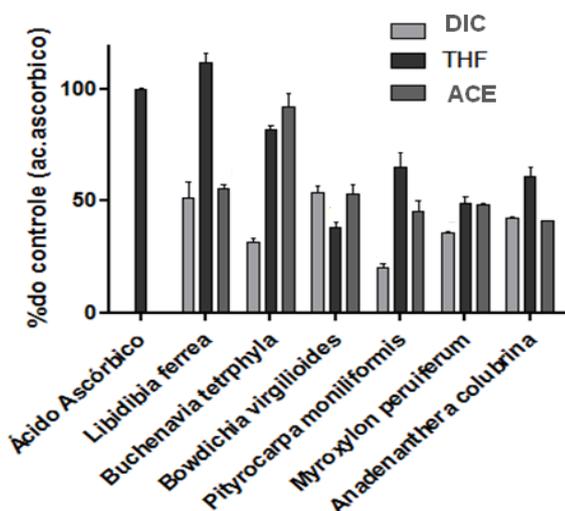
Extracto	Total Phenolic compounds (mg GAE/g extract) *
AcTHF	104,891 ± 7,12
AcACE	63,108 ± 2,91
BvTHF	135, 666 ± 5,00
BvACE	52, 178 ± 0,33
BtTHF	146,984 ± 1,15
BtACE	92,256 ± 1,82
LfTHF	162,023 ± 8,07
LfAce	158,845 ± 0,13
MpTHF	147, 992 ± 5,55
MpACE	60,317 ± 8,72
PmTHF	153,340 ± 1,28
PmACE	43,729 ± 0,54

obtained in LfTHF ( $79.300 \pm 3.19$ ) BtTFH ( $56.7863 \pm 1.1587$ ) and BtACE ( $61.624 \pm 4.72$ ).

In studies Kuman et al. [41] the free radical scavenging activity was in line with the phenolic content in plant extracts, and antioxidant capacity values followed the same order of magnitude as the phenolic content.

### 3.3.2. DPPH scavenging assay

To evaluate the antioxidant activity of the extracts, it used the free radical DPPH scavenging method, where its results are based on the reduction of the radical absorbance after the reaction. IC<sub>50</sub> was calculated from the samples (Table 3), which would be the amount of extract required to eliminate 50% of DPPH. Regarding the reduction in absorbance of DPPH, the best results were obtained with AcTHF, AcACE, LfTHF, LfACE, BvTHF and BtTHF extracts (reduction of about 80%), PmTHF and BtACE (approximately 70%) results attest the antioxidant potential of these extracts against DPPH. The best IC<sub>50</sub> indexes were detected in the extracts AcTHF, AcACE, BvACE, MpTHF, PmTHF and PmACE.

**Figure 1.** Total antioxidante capacity

Kumar and Chattopadhyay [46] and Kumar et al. [41] evaluated antioxidant potential in methanolic extracts of *Mentha spicata* and *Pistachia vera*, respectively, by the DPPH assay, and both associate this potential to the high concentration of phenolic compounds found in the samples. Similar results were obtained in the work of Baba and Malik [45], where the methanolic extracts of *Gentiana kurroo*

presented antioxidant and antimicrobial potential also associated with higher total phenolic and flavonoid values. Oliveira et al. [40] evaluated the antioxidant potential of leaves *Encholirium*

*spectabile*, Caatinga plant with medicinal properties and has reported high levels of phenolic compounds and flavonoids, getting IC<sub>50</sub> 39.24 in ethanolic extract and 57.64 ug / ml in fractions of ethyl acetate.

The DPPH assay was also used to evaluate the antioxidant potential of plant Combretaceae and Fabaceae families, which corroborates the results of this work. *Bauhinia glabra* (Fabaceae) was reported by presenting antioxidant activity in the work of Campos et al. [47] where their hexanics fractions reducing the DPPH at 73.54% and chloroform fractions decreased by 64.40%, and these results according to the high amount of phytosterols found in this extract. *Terminalia arjuna* (Combretaceae) also showed significant antioxidant activity in their extracts against to the DPPH, and was reported a positive relation between this activity and the content of phenolic compounds and flavonoids obtained [48].

This test, as others performed in vitro, have become standard tools and extremely necessary in the initial selection of substances which may be used as pharmaceuticals, helping the researchers in the evaluating the activity of compounds isolated from natural products, as well as obtained from synthetic sources. Furthermore, these methods can assist in the

choice of the plant species to chemical and pharmacological studies, as well as degree of maturation, environmental conditions, etc. and prove the presence of antioxidant substances [28, 40, 44].

**Table 3. IC<sub>50</sub> scavenging assay**

Extract	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
AcDIC	180,221
AcTHF	49,521
AcACE	58,719
BvDIC	917,01
BvTHF	208,028
BvACE	48,996
BtDIC	3053, 022
BtTHF	140,001
BtACE	173,666
LfDIC	128,285
LfTHF	142,623
LfACE	383,916
MpDIC	3896,865
MpTHF	14,345
MpACE	522,585
PmDIC	752,410
PmTHF	88,803
PmACE	26,772

### 3.3.3. ABTS scavenging assay

The ABTS radical scavenging assay was performed according Re et al. [24] which estimates the potential for reducing the absorbance of ABTS reagent, in percentage.

The results found (Figure 2), the best percentages of inhibition of ABTS were made by extracts of THF and acetone in *L. ferrea*, *P. moniliformis* and *B. tetraphylla*.

Corroborating the results shown in this work, Dzoyem et al. [49] and Ahmed et al. [50] found potential antioxidant in plants belonging to the Fabaceae and Combretaceae family respectively. In the first, the antioxidant activities were evaluated in acetonic extracts obtained from the leaves of nine plants of the family Fabaceae, where the *Xylia torreana* species showed the best results. In the second, was evaluated the oxidant potential of four plants of the genus *Combretum*, which are widely used as medicinal plants for communities in Africa, obtaining significant results. Both cases related indexes of antioxidant activity to the high content of phenolic compounds, mainly flavonoids, present in the extracts.

### 3.3.4. DNA nicking assay

This trial evaluated the antioxidant activity of plant extracts by plasmid DNA protection to the damaging effects caused by hydroxyl radicals [10]. These radicals are generated in the Fenton reaction, which occurs in living systems, which is the production of free hydroxyl radicals (OH •) from the action of endogenous reagents, such as intracellular iron.

Figure 2. ABTS scavenging assay.

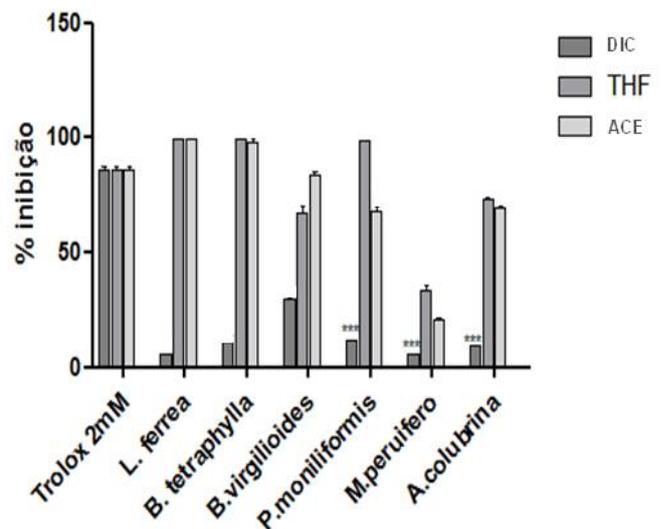
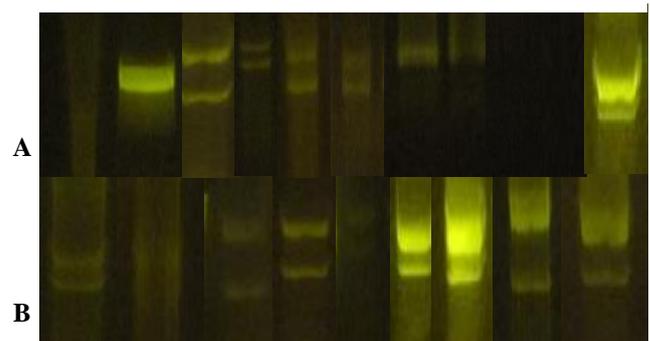


Figura 3. DNA nicking assay.



A: Positive control (DNA+ Fenton), negative control (only DNA), AcACE, LfACE, PmTHF, MpTHF, AnTHF, LfTHF, BvTHF, BtTHF, LfDIC.

B: BvACE, BtACE, MpACE, PmACE, AcDIC, BtDIC, MpDIC, PmDIC, BvDIC.

During this reaction,  $H_2O_2$  is cleaved into •OH by transfer of iron electrons, and this radical formed a highly reactive oxidant species [9, 11].

Thus, the DNA protection assay, the plasmid used takes on linear forms "matches" that present a mobility different run on agarose gels [12].

In this study, eighteen extracts Caatinga plants were tested against the DNA of protection (Figure 3) and the presence of bands in agarose gel were indicative of protective effect. The best results were obtained at a concentration 250 ug / mL with THF and acetone extracts, for tests performed with dichloromethane showed DNA degradation signals in agarose gel. In relation to the plants, *Pytirocarpa moniliformis* presented the best protective activities.

Silva et al. [10] reported the potential of *Libidibia ferrea* extracts, *Anadenanthera colubrina* and *Pityrocarpa moniliformis* in relation to the DNA protective effect, obtaining significant results. The protective activity of DNA per plant extracts was also evaluated by Leba et al. [12], where the acetone and aqueous extract of *Oenocarpus bataua* showed a protective effect, and Kumar et al. [41], obtained protective effect against DNA damage methanolic extracts of *Mentha spicata*.

The DNA protection assay was developed because of damage caused in the genome, particularly by free radicals, being the center of the development of degenerative diseases such as Parkinson's and Alzheimer, such as cancer [11]. Thus, it is very important to develop research related to substances that have a protective effect, mainly from natural sources.

### 3.4. Anticoagulant activity

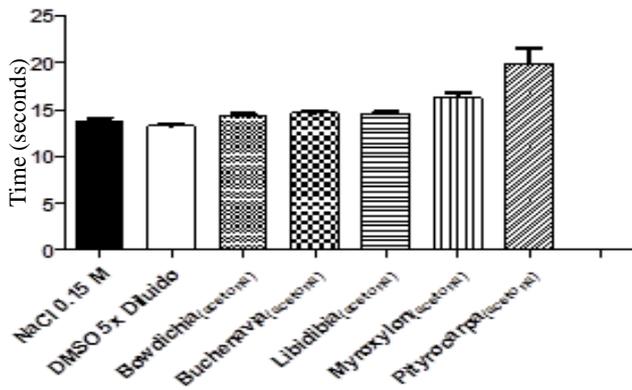
#### 3.4.1. Determination of Prothrombin Time (PT) and Activated Partial Thromboplastin Time (APTT)

The action of plant extracts on the hemostatic system was evaluated for its anticoagulant activity of Prothrombin Time (PT), which assesses the action on the extrinsic pathway of coagulation; and Activated Partial Thromboplastin Time (APTT), which is a way of evaluating the action in the intrinsic pathway of coagulation, using human plasma.

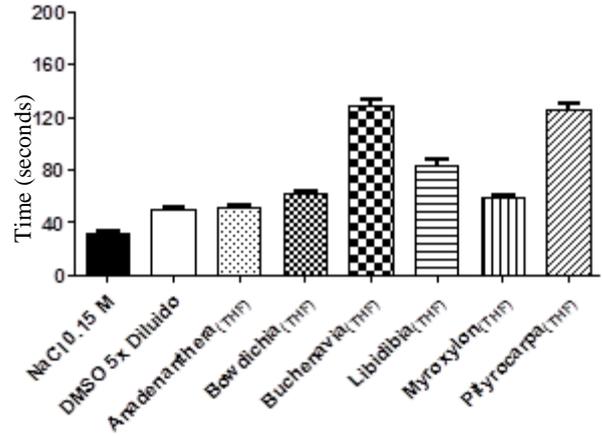
Two experiments PT and APTT were performed. At first, the 18 extracts were subjected to the tests and the results are shown in Figures 5-10, which extracts PmTHF, PmACE, BtTHF and BtACE showed changes in both TP and in APTT compared to controls (NaCl 0.15M and DMSO diluted 5X).

Extracts positive activity were subjected to second experiments PT and APTT, which is realized with two repetitions, where in one the samples were heated to 100 °C, in order to assess whether the compounds would enzymatic composition (Figures 11-18). The PmTHF and PmACE extracts showed the greatest change in both the APTT and in PT concentration of 0.5 mg, indicating that they have the potential to be investigated in other assays related anticoagulant activity. There was not difference in results between the tests with and without heating, making sure that the compounds involved in the anticoagulant activity are non-enzymatic.

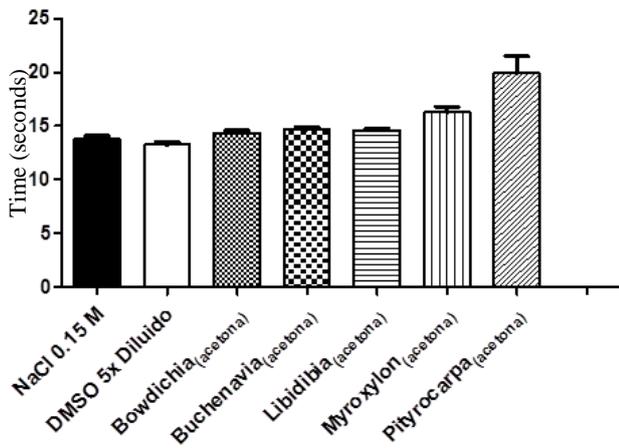
**Figure 4.** PT assay, dichloromethane extract.



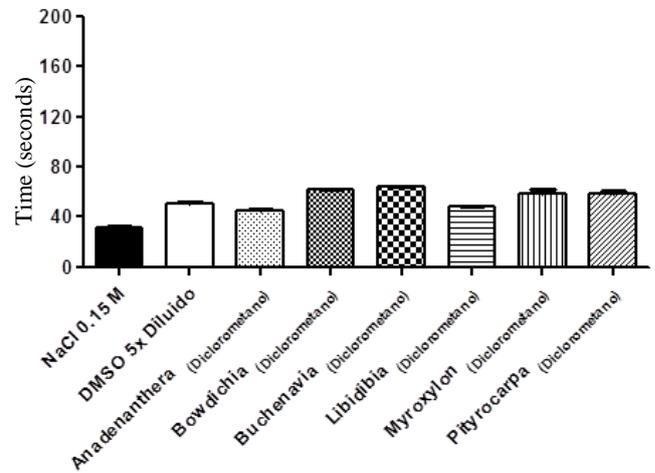
**Figure 5.** PT assay, THF extract.



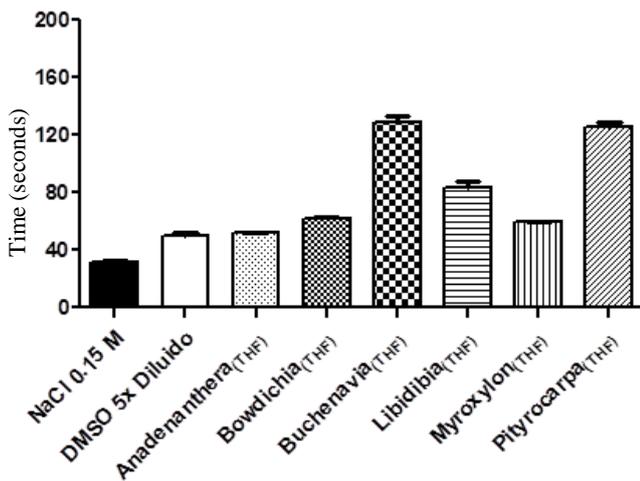
**Figure 6.** PT assay, acetone extract.



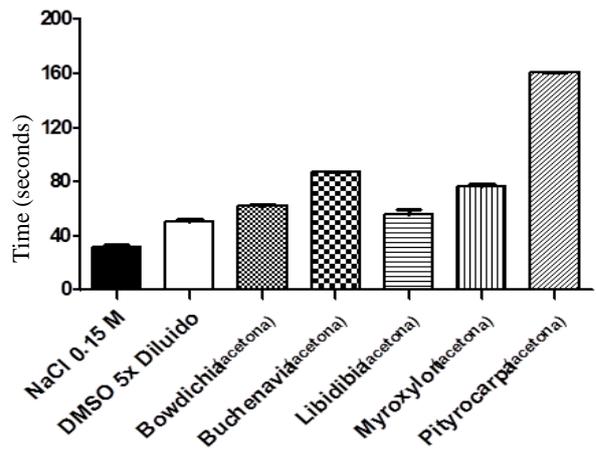
**Figure 7.** ATTP assay, dichloromethane extract.



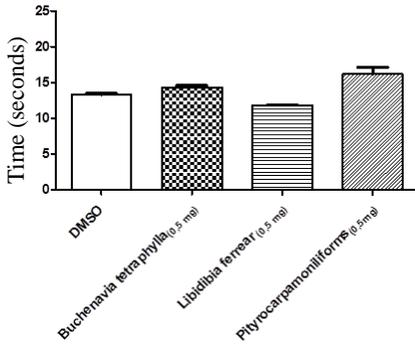
**Figure 8.** ATTP assay, THF extract.



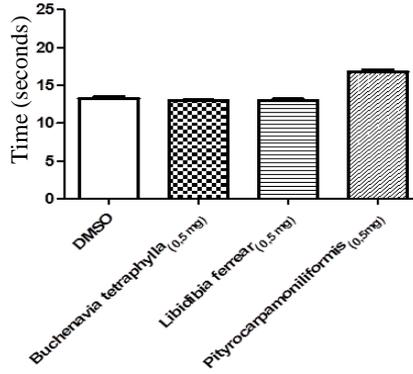
**Figure 9.** ATTP assay, acetone extract.



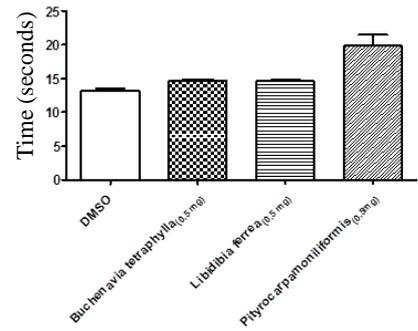
**Figure 10.** PT assay, THF extract.



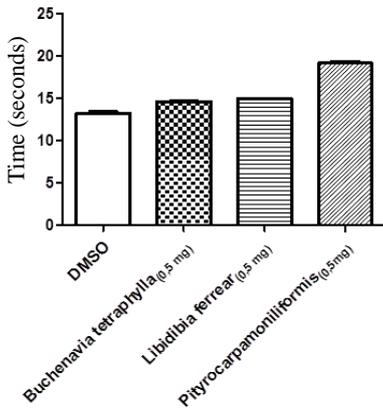
**Figure 11.** PT assay, THF extract (samples heated to 100 ° C)



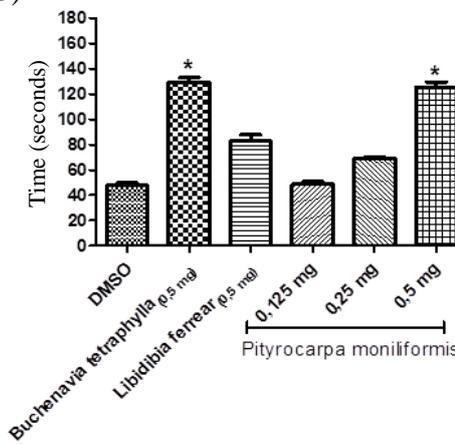
**Figure 12.** PT assay, acetone extract.



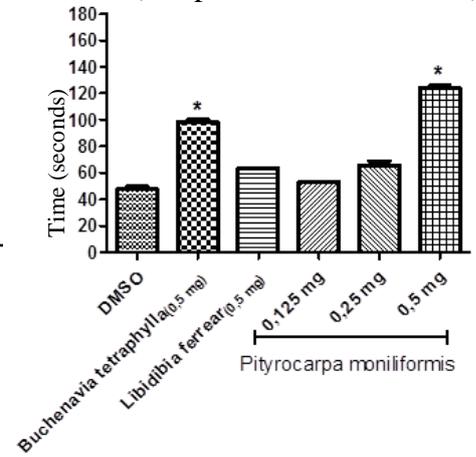
**Figure 13.** PT assay, acetone extract (samples heated to 100 ° C)



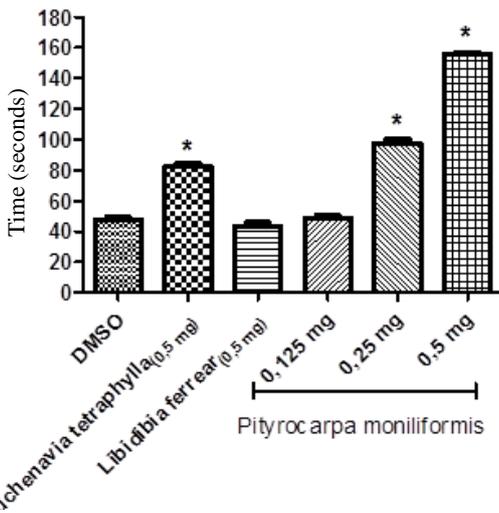
**Figure 14.** APPT assay, THF extract.



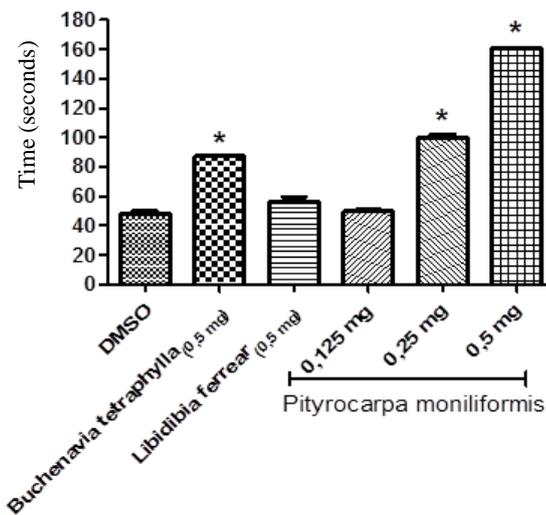
**Figure 15.** APPT assay, THF extract (samples heated to 100 ° C)



**Figure 16.** APPT assay, acetone extract.



**Figure 17.** APPT assay, acetone extract (samples heated to 100 ° C)



The antithrombotic activity of plant extracts has been reported in several studies. Felix-Silva et al. [17] showed significant anticoagulant activity in aqueous extracts of the leaves of *Jatopha gossypifolia*, through the PT and APTT assays. Choi et al. [16] and Salu et al. [19] evaluated the CrataBL antithrombotic potential, a lectin obtained from *Crataeva tapia*, which is able to inhibit the Xa coagulation factor, playing thus an important role in antithrombotic activity. Additionally, Choi et al. [16] suggested that quitamase, thrombolytic protein purified from *Aster yomena* plant, has the potential to be a therapeutic agent against thrombosis, since it leads to increases the PT and APTT rates.

The results obtained on PT and APTT in this work compared to the phytochemical profile of extracts obtained suggests a relationship between the anticoagulant potential and the presence of phenolic compounds (flavonoids and proanthocyanidins). Some studies have related the antithrombotic potential of plant extracts to its phytochemical composition, mainly by the presence of phenolic compounds [15, 18].

Phenolic compounds have been shown to possess antithrombotic effects, which may be related to their anti-inflammatory and anti-atherogenic properties. This suggests that these compounds may be capable of acting against cardiovascular diseases [51, 52].

Several natural flavonoids have been evaluated as potential thrombin inhibitors, when using the method of action on PT, where

myricetin and quercetin and proved the best thrombin inhibitors tested [53]. Ostrowski et al. [15] relates the change in APTT to the presence of flavonoids in *Tropaeolum majus* plant material. Yu et al. [54] claimed that the intravenous administration of quercetin showed a significant increase in APTT and PT. Guglielmone et al. [14] reported the inhibitory effects on the platelet aggregation process in flavonoids obtained from *Flaveria bidentis*.

#### 4. CONCLUSION

According to the results obtained in this study, tetrahydrofuran and acetone solvents are capable of extracting of plants compounds with important biological activities, such as antioxidant and anticoagulant. The leaves *Anadenanthera colubrina* and *Libidibia ferrea* present a high antioxidant potential in *in vitro* assays, while the leaves of *Pityrocarpa moniliformis* present in addition to the *in vitro* antioxidant activity, potential for obtaining compounds having anticoagulant activity. Thus, more specific methods should be conducted with the leaf extracts of these species, in the search for purified compounds of biotechnological interest.

#### ACKNOWLEDGEMENT

The authors acknowledge the financial support of CNPq (National Council for Scientific and Technological Development). The authors also thank the collaboration of the inhabitants of the study areas, the financial support of NANOBIOTEC-Brazil, the Higher Education Personnel Improvement Coordination (CAPES),

Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation (ICMbio) for authorizing collection in PARNA Catimbau and the curator of the Herbarium IPA (Agronomic Institute of Pernambuco) for allowing access to the collection.

## REFERENCES

- [1] M. F. Agra, G. S. Baracho, K. Nurit, I. J. D. Basílio, and V. P. Coelho. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 111, no. 2, pp. 383–395, 2007.
- [2] S. L. Cartaxo, M. M. Almeida Souza, and U. P. Albuquerque. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 131, no. 2, pp. 326–342, 2010.
- [3] U. P. Albuquerque, and R. F. Oliveira. Is the use-impact on native Caatinga species in Brazil reduced by the high species richness of medicinal plants? *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 113, no. 1, pp. 156–170, 2007.
- [4] J. R. G. S. Almeida, R. N. Silva-filho, X. P. Nunes, C. S. D. Dias, F. O. Pereira, and E. O. Lima. Antimicrobial activity of the essential oil of *Bowdichia virgilioides* Kunt. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 16, pp. 638–641, 2006.
- [5] J. H. V. Arcoverde, A. S. Carvalho, F. P. A. Neves, P. M. G. Paiva, T. H. Napoleão, M. T. S. Correia, M. V. Silva, and M. G. Carneiro-da-cunha. Screening of Caatinga plants as sources of lectins and trypsin inhibitors. *Natural Product Research*, vol. 28, no. 16, pp. 1297–1301, 2014.
- [6] P. M. Medeiros, A. H. Ladio, and U. P. Albuquerque. Patterns of medicinal plant use by inhabitants of Brazilian urban and rural areas: A macroscale investigation based on available literature. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 150, no. 2, pp. 729–746, 2013.
- [7] A. A. Araújo, L. A. Soares, M. R. A. Ferreira, M. A. Souza Neto, G. R. Silva, r. F. Araújo Jr., G. C. B. Guerra, and M. C. N. Melo. Quantification of polyphenols and evaluation of antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous and acetone–water extracts of *Libidibia ferrea*, *Parapiptadenia rigida* and *Psidium guajava*. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 156, pp. 88–96, 2014.
- [8] E. Niki. Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 49, no. 4, pp. 503–515, 2010.
- [9] M. Carochi, and I. C. F. R. A. Ferreira. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, vol. 51, pp. 15–25, 2013.
- [10] L. C. N. Silva, C. A. Silva Jr., R. M. Souza, A. J. Macedo, M. V. Silva and M. T. S. Correia. Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. *Food and Chemical Toxicology*, vol. 49, no. 9, pp. 2222–2228, 2011.
- [11] C. López-alarcón, and A. Denicola. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*, vol. 763, pp. 1–10, 2013.
- [12] L. Leba, C. Brunschwig, M. Saout, K. Martial, E. Vulcain, and D. Beraud, J. Robinsin. Optimization of a DNA nicking assay to evaluate *Oenocarpus bataua* and *Camellia sinensis* antioxidant capacity. **International**

**Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 10, p. 18023–18039, 2014.

[13] M. A. Hossain, and S. M. M. Rahman. Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of tropical fruit pineapple. *Food Research International*, vol. 44, no. 3, pp. 672–676, 2011.

[14] H. A. Guglielmone, A. M. Agnese, S. C. N. Montoya, and J. L. Cabrera. Inhibitory effects of sulphated flavonoids isolated from *Flaveria bidentis* on platelet aggregation. *Thrombosis Research*, vol. 115, no. 6, pp. 495–502, 2005.

[15] A. P. Ostrowski, S. A. Valentini, and M. F. Pavanelli. Atividade anticoagulante do extrato aquoso, hidroetanólico e óleo essencial das folhas de *Tropaeolum majus*. *SaBios-Revista de Saúde e Biologia*, vol. 9, no. 2, pp. 46–53, 2014.

[16] J. Choi, D. Kim, S. Park, B. Choi, K. Sapkota, and S. Kim. Novel Novel thrombolytic protease from edible and medicinal plant *Aster yomena* (Kitam.) Honda with anticoagulant activity: Purification and partial characterization. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 118, no. 4, pp. 372–377, 2014.

[17] J. Félix-Silva, T. Souza, R. B. G. Camara, B. Cabral, A. A. Ilva-Junior, I. M. M. Rebecchi, S. M. Zucolotto, H. A. O. Rocha, and M. F. Fernandes-Pedrosa. In vitro anticoagulant and antioxidant activities of *Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae) leaves aiming therapeutical applications. *BMC complementary and alternative medicine*, vol. 14, no. 1, pp. 405, 2014.

[18] I. Pawlaczyk, L. Czerchawski, W. Kuliczkowski, B. Karolko, W. Pilecki, W. Witkiewicz, and R. Gancarz. Anticoagulant and anti-platelet activity of polyphenolic-polysaccharide preparation isolated from the medicinal plant *Erigeron canadensis* L.

*Thrombosis Research*, vol. 127, no. 4, pp. 328–340, 2011.

[19] B. R. Salu, R. S. Ferreira, M. V. Brito, T. F. Ottaiano, J. W. M. C. Cruz, M. C. C. Silva, M. T. S. Correia, P. M. G. Paiva, and M. L. V. Oliva. CrataBL, a lectin and factor Xa inhibitor, plays a role in blood coagulation and impairs thrombus formation. *Biological Chemistry*, vol. 395, no. 9, 2014.

[20] F. J. A. Matos. Introdução à Fitoquímica Experimental. 3ª Edição, UFC, Fortaleza, 2010.

[21] V. L. Singleton, and J. A. Rossi. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* vol. 16, pp144–158. 1965.

[22] P. Pietro, M. Pineda, and M. Aguilar. Spectrophotometric quantification of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem*, vol. 269, pp. 337–341, 1999.

[23] M. S. Blois. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, vol.181, pp.1199–1200, 1958.

[24] R. Re, N. Pelegri, A. Prolegente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization. *Free Radical & Medicine*, vol. 6, no. 9/10, pp. 1231-1237, 1999.

[25] M. V. Brito, C. Oliveira, B. R. Salu, S. A. Andrade, P. M. D. Malloy, A. C. Sato, C. P. Vicente, M. U. Sampaio, F. H. A. Maffei, M. L. V. Oliva. The Kallikrein Inhibitor from *Bauhinia bauhinioides* (BbKI) shows antithrombotic properties in venous and arterial thrombosis models. *Thrombosis Research*, vol. 133, no. 5, pp. 945–951, 2014.

- [26] I. M. C. Rodrigues, A. P. S. Souza Filho, F. A. Ferreira. Estudo fitoquímico de *Senna alata* por duas metodologias. *Planta Daninha*, vol. 27, no. 3, pp. 507–513, 2009.
- [27] R. Arslan, Z. Bor, N. Bektas, A. H. Meriçli, Y. Ozturk. Antithrombotic effects of ethanol extract of *Crataegus orientalis* in the carrageenan-induced mice tail thrombosis model. *Thrombosis Research*, vol. 127, no. 3, pp. 210–213, 2011.
- [28] D. Krishnaiah, R. Sarbatly, R. Nithyanandam. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing*, vol. 89, no. 3, pp. 217–233, 2011.
- [29] C. M. M. Sousa, H. R. Silva, G. M. Vieira-Jr, M. C. Ayres, C. L. S. Costa, D. S. Araújo, L. C. D. Cavalcante, E. D. S. Barros, P. B. M. Araújo, M. S. Brandão, M. H. Chaves. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, vol. 30, no. 2, pp. 351–355, 2007.
- [30] A. Gurib-Fakim. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 27, no. 1, pp. 1–93, 2006.
- [31] J. C. Velloso. Pesquisa de produtos naturais: plantas e radicais livres. *Revista Eletrônica de Farmácia*, vol. 4, no. 2, 2007.
- [32] J. G. Melo, T. A. S. Araújo, V. T. N. A. Castro, D. L. V. Cabral, M. D. Rodrigues, S. C. Nascimento, E. L. C. Amorim, U. P. Albuquerque. Antiproliferative Activity, Antioxidant Capacity and Tannin Content in Plants of Semi-Arid Northeastern Brazil. *Molecules*, vol. 15, nn. 12, pp. 8534–8542, 2010.
- [33] J. M. Barbosa-Filho, J. R. G. S. Almeida, V. C. O. Costa, E. V. L. Cunha, M. S. Silva, R. Braz-Filho. Bowdichine, a new diazadamantane alkaloid from *Bowdichia virgilioides*. *Journal of Asian Natural Products Research*, vol. 6, nn. 1, pp. 11–17, 2004.
- [34] D. B. F. Juck, L. C. Rezende, J. P. David, L. P. Queiroz, J. M. David. Two new isoflavonoids from *Bowdichia virgilioides*. *Natural Product Research*, vol. 20, nn. 1, pp. 27–30, 2006.
- [35] W. M. Barros, V. S. N. Rao, R. N. Silva, J. C. S. Lima, D. T. Martins. Anti-inflammatory effect of the ethanolic extract from *Bowdichia virgilioides* HBK stem bark. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, vol. 82, nn. 3, pp. 609–616, 2010.
- [36] A. P. Frasso, O. Santos, M. Duarte, D. S. Trentin, R. B. Giordani, A. G. Silva, M. V. Silva, T. Tasca, A. J. Macedo. First report of anti-*Trichomonas vaginalis* activity of the medicinal plant *Polygala decumbens* from the Brazilian semi-arid region, Caatinga. *Parasitology Research*, vol. 110, no. 6, pp. 2581–2587, 2012.
- [37] C. C. Wyrepkowski, D. L. M. G. Costa, A. P. Sinhoin, W. Vilegas, R. A. Grandis, F. A. Resende, E. A. Varanda, L. C. Santos. Characterization and Quantification of the Compounds of the Ethanolic Extract from *Caesalpinia ferrea* Stem Bark and Evaluation of Their Mutagenic Activity. *Molecules*, vol. 19, no. 10, pp. 16039–16057, 2014.
- [38] J. P. Silva, R. S. Rodarte, A. S. Calheiros, C. Z. Souza, F. C. Amendoeira, E. Barreto. Antinociceptive activity of aqueous extract of *Bowdichia virgilioides* in mice. *Journal of medicinal food*, vol. 13, no. 2, pp. 348–351, 2010.
- [39] L. C. N. Silva, R. C. M. Miranda, E. B. Gomes, A. G. Macedo, J. M. Araújo, R. C. B. Figueiredo, M. V. Silva, M. T. S. Correia. Evaluation of combinatory effects of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and

*Pityrocarpa moniliformis* against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medicinal Plants Research*, vol. 7, no. 32, pp. 2358-2364, 2013.

[40] R. G. Oliveira Jr, G. R. Souza, A. L. Guimarães, A. P. Oliveira, A. C. S. Morais, E. C. C. Araújo, X. P. Nunes, J. R. G. S. Almeida. Dried extracts of *Encholirium spectabile* (Bromeliaceae) present antioxidant and photoprotective activities *in vitro*. *Journal of Young Pharmacists*, vol. 5, no. 3, pp. 102–105, 2013.

[41] S. Kumar, R. Sandhir, S. Ojha. Evaluation of antioxidant activity and total phenol in different varieties of *Lantana camara* leaves. *BMC research notes*, vol. 7, no. 1, pp. 560, 2014.

[42] A. Tomaino, M. Martorana, T. Arcoraci, D. Monteleone, C. Giovinazzo, A. Saija. Antioxidant activity and phenolic profile of pistachio (*Pistacia vera* L., variety Bronte) seeds and skins. *Biochimie*, vol. 92, no. 9, pp. 1115–1122, 2010.

[43] P. Prieto, M. Pineda, M. Aguilar. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem*, vol. 269, pp. 337-41, 1999.

[44] C. Q. Alves, J. M. David, J. P. David, M. V. Bahia, R. M. Aguiar. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. *Química Nova*, vol. 33, no. 10, pp. 2202–2210, 2010.

[45] S. A. Baba, S. A. Malik. Evaluation of antioxidant and antibacterial activity of methanolic extracts of *Gentiana kurroo* royle. *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 21, no. 5, pp. 493–498, 2014.

[46] A. Kumar, C. Sharmila. DNA damage protecting activity and antioxidant potential of pudina extract. *Food Chemistry*, vol. 100, pp. 1377-1384, 2007.

[47] R. Campos, V. B. Oliveira, C. S. Paula, R. Pontarolo, J. P. G. Dias, M. D. MIGUEL, S. M. Warumey, O. G. Miguel. Multivariate analysis between the phytochemical features and antioxidant properties of the *Bauhinia glabra* Jacq. (Fabaceae). *Inter. J. P. Pharm. Science*, vol. 6, no. 8, 2014.

[48] SINGH, P. P.; CHAUHAN, S. M. S. Activity-guided isolation of antioxidants from the leaves of *Terminalia arjuna*. **Natural Product Research**, v. 28, n. 10, p. 760–763, 2014.

[49] J. P. Dzoyem, L. J. McGaw, J. N. Eloff. *In vitro* antibacterial, antioxidant and cytotoxic activity of acetone leaf extracts of nine under-investigated Fabaceae tree species leads to potentially useful extracts in animal health and productivity. *BMC complementary and alternative medicine*, vol. 14, no. 1, pp. 147, 2014.

[50] A. S. Ahmed, L. J. McGaw, E. E. Elgorashi, V. Naidoo, J. N. Eloff. Polarity of extracts and fractions of four *Combretum* (Combretaceae) species used to treat infections and gastrointestinal disorders in southern African traditional medicine has a major effect on different relevant *in vitro* activities. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 154, no. 2, pp. 339–350, 2014.

[51] M. S. S. Khan, S. H. Syeed, M. H. Uddin, L. Akter, M. A. Ullah, S. Jahan, M. H. Rashid. Screening and evaluation of antioxidant, antimicrobial, cytotoxic, thrombolytic and membrane stabilizing properties of the methanolic extract and solvent-solvent partitioning effect of *Vitex negundo* Bark. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, vol. 3, no. 5, pp. 393–400, 2013.

[52] M. Quiñones, M. Miguel, A. Aleixandre. Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. *Pharmacological Research*, vol. 68, no. 1, pp. 125–131, 2013.

[53] L. Liu, H. Ma, N. Yang, Y. Tag, J. Guo, W. Tao, J. Duan. A Series of Natural Flavonoids as Thrombin Inhibitors: structure-activity

relationships. *Thrombosis Research*, vol. 126, no. 5, pp. e365–e378, 2010.

[54] P. Yu, Q. Zhou, W. Zhu, Y. Wu, L. Wu, X. Lin, M. Chen, B. Qiu. Effects of quercetin on LPS-induced disseminated intravascular coagulation (DIC) in rabbits. *Thrombosis Research*, vol. 131, no. 6, pp. e270–e273, 2013.

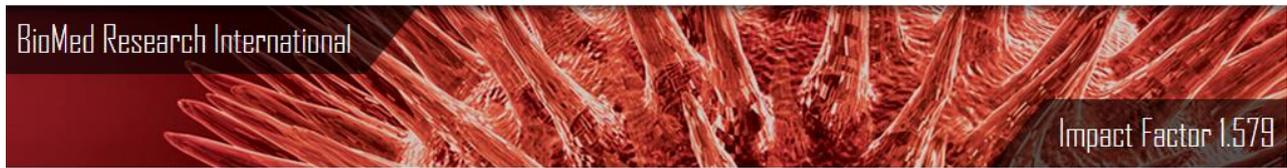
## 5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, podemos concluir que:

- Os solventes tetrahidrofurano e acetona foram capazes de extrair das plantas compostos que possuem importantes atividades biológicas;
- As plantas da Caatinga *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea*, *Pityrocarpa moniliformis* e *Buchenavia tetraphylla* foram selecionadas como potenciais produtoras de compostos com ação antioxidante *in vitro*, devendo ser mais investigadas neste aspecto, principalmente em relação à proteção contra danos ao DNA;
- Os extratos de *Pityrocarpa moniliformis* apresentaram ação anticoagulante em ensaios *in vitro*, devendo ser submetidos a mais estudos;
- Os resultados obtidos apontam novas perspectivas para este trabalho, como o fracionamento e purificação das amostras, ensaios com as amostras purificadas, elucidação dos compostos, bem como a avaliação da citotoxicidade e da mutagenicidade os compostos.

## ANEXOS

### Normas da Revista: Biomed Research International



## Author Guidelines

### *Submission*

---

Manuscripts should be submitted by one of the authors of the manuscript through the online Manuscript Tracking System. Regardless of the source of the word-processing tool, only electronic PDF (.pdf) or Word (.doc, .docx, .rtf) files can be submitted through the MTS. There is no page limit. Only online submissions are accepted to facilitate rapid publication and minimize administrative costs. Submissions by anyone other than one of the authors will not be accepted. The submitting author takes responsibility for the paper during submission and peer review. If for some technical reason submission through the MTS is not possible, the author can contact [bmri@hindawi.com](mailto:bmri@hindawi.com) for support.

### *Terms of Submission*

---

Papers must be submitted on the understanding that they have not been published elsewhere and are not currently under consideration by another journal published by Hindawi or any other publisher. The submitting author is responsible for ensuring that the article's publication has been approved by all the other coauthors. It is also the authors' responsibility to ensure that the articles emanating from a particular institution are submitted with the approval of the necessary institution. Only an acknowledgment from the editorial office officially establishes the date of receipt. Further correspondence and proofs will be sent to the author(s) before publication unless otherwise indicated. It is a condition of submission of a paper that the authors permit editing of the paper for readability. All inquiries concerning the publication of accepted papers should be addressed to [bmri@hindawi.com](mailto:bmri@hindawi.com).

### *Peer Review*

---

All manuscripts are subject to peer review and are expected to meet standards of academic excellence. If approved by the editor, submissions will be considered by peer-reviewers, whose identities will remain anonymous to the authors.

### *Microarray Data Submission*

---

Before publication, the microarray data should be deposited in an appropriate database such as Gene Expression Omnibus (GEO) or Array Express, and an entry name or accession number must be included in the manuscript prior to its publication. Microarray data should

be MIAME compliant. During the reviewing process, submitting authors are committed to provide the editor and the reviewers handling his/her manuscript with the login information by which they can access this information in the database.

---

### *Concurrent Submissions*

In order to ensure sufficient diversity within the authorship of the journal, authors will be limited to having two manuscripts under review at any point in time. If an author already has two manuscripts under review in the journal, he or she will need to wait until the review process of at least one of these manuscripts is complete before submitting another manuscript for consideration. This policy does not apply to Editorials or other non-peer reviewed manuscript types.

---

### *Article Processing Charges*

BioMed Research International is an open access journal. Open access charges allow publishers to make the published material available for free to all interested online visitors. For more details about the article processing charges of BioMed Research International, please visit the Article Processing Charges information page.

---

### *Units of Measurement*

Units of measurement should be presented simply and concisely using System International (SI) units.

---

### *Title and Authorship Information*

The following information should be included

- Paper title
- Full author names
- Full institutional mailing addresses
- Email addresses

---

### *Abstract*

The manuscript should contain an abstract. The abstract should be self-contained and citation-free and should not exceed 200 words.

---

### *Introduction*

This section should be succinct, with no subheadings.

---

### *Materials and Methods*

This part should contain sufficient detail so that all procedures can be repeated. It can be divided into subsections if several methods are described.

---

## *Results and Discussion*

---

This section may each be divided by subheadings or may be combined.

---

## *Conclusions*

---

This should clearly explain the main conclusions of the work highlighting its importance and relevance.

---

## *Acknowledgments*

---

All acknowledgments (if any) should be included at the very end of the paper before the references and may include supporting grants, presentations, and so forth.

---

## *References*

---

Authors are responsible for ensuring that the information in each reference is complete and accurate. All references must be numbered consecutively and citations of references in text should be identified using numbers in square brackets (e.g., “as discussed by Smith [9]”; “as discussed elsewhere [9, 10]”). All references should be cited within the text; otherwise, these references will be automatically removed.

---

## *Preparation of Figures*

---

Upon submission of an article, authors are supposed to include all figures and tables in the PDF file of the manuscript. Figures and tables should not be submitted in separate files. If the article is accepted, authors will be asked to provide the source files of the figures. Each figure should be supplied in a separate electronic file. All figures should be cited in the paper in a consecutive order. Figures should be supplied in either vector art formats (Illustrator, EPS, WMF, FreeHand, CorelDraw, PowerPoint, Excel, etc.) or bitmap formats (Photoshop, TIFF, GIF, JPEG, etc.). Bitmap images should be of 300 dpi resolution at least unless the resolution is intentionally set to a lower level for scientific reasons. If a bitmap image has labels, the image and labels should be embedded in separate layers.

---

## *Preparation of Tables*

---

Tables should be cited consecutively in the text. Every table must have a descriptive title and if numerical measurements are given, the units should be included in the column heading. Vertical rules should not be used.

---

## *Proofs*

---

Corrected proofs must be returned to the publisher within 2-3 days of receipt. The publisher will do everything possible to ensure prompt publication. It will therefore be appreciated if the manuscripts and figures conform from the outset to the style of the journal.

### *Copyright*

---

Open Access authors retain the copyrights of their papers, and all open access articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided that the original work is properly cited.

The use of general descriptive names, trade names, trademarks, and so forth in this publication, even if not specifically identified, does not imply that these names are not protected by the relevant laws and regulations.

While the advice and information in this journal are believed to be true and accurate on the date of its going to press, neither the authors, the editors, nor the publisher can accept any legal responsibility for any errors or omissions that may be made. The publisher makes no warranty, express or implied, with respect to the material contained herein.

### *Disclosure Policy*

---

A competing interest exists when professional judgment concerning the validity of research is influenced by a secondary interest, such as financial gain. We require that our authors reveal any possible conflict of interest in their submitted manuscripts.

If there is no conflict of interest, authors should state that “The author(s) declare(s) that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.”

### *Clinical Study*

---

When publishing clinical studies, Hindawi aims to comply with the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) on trials registration.

Therefore, authors are requested to register the clinical trial presented in the manuscript in a public trials registry and include the trial registration number at the end of the abstract.

Trials initiated after July 1, 2005 must be registered prospectively before patient recruitment has begun. For trials initiated before July 1, 2005, the trial must be registered before submission.

### *Ethical Guidelines*

---

In any studies that involve experiments on human or animal subjects, the following ethical guidelines must be observed. For any experiments on humans, all work must be conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (1964). Papers describing experimental work which carries a risk of harm to human subjects must include a statement that the experiment was conducted with the human subjects’ understanding and consent, as well as a statement that the responsible Ethical Committee has approved the experiments. In the case of any animal experiments, the authors must provide a full description of any anesthetic or surgical procedure used, as well as evidence that all possible steps were taken to avoid animal suffering at each stage of the experiment.