

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**LEONARDO OLIVEIRA FONSECA**

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO EXTRATO DE *Campomanesia sessiliflora*  
(GUABIROBA VERDE) E MODULAÇÃO SOBRE A HIDRÓLISE DE  
NUCLEOTÍDEOS EM SORO DE RATOS**

**PATOS DE MINAS  
JUNHO DE 2018**

**LEONARDO OLIVEIRA FONSECA**

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO EXTRATO DE *Campomanesia sessiliflora*  
(GUABIROBA VERDE) E MODULAÇÃO SOBRE A HIDRÓLISE DE  
NUCLEOTÍDEOS EM SORO DE RATOS**

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Ribas Fürstenau

**PATOS DE MINAS  
JUNHO DE 2018**

**LEONARDO OLIVEIRA FONSECA**

**Potencial antioxidante do extrato de *Campomanesia sessiliflora* (guabiroba verde) e modulação sobre a hidrólise de nucleotídeos em soro de ratos**

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Banca examinadora:

---

Prof. Dra. Cristina Ribas Fürstenau – IBTEC - UFU  
Presidente

---

Prof. Dra. Joyce Ferreira da Costa Guerra - IBTEC - UFU  
Membro

---

Dra. Luciana de Oliveira Almeida - IBTEC - UFU  
Membro

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus a oportunidade, saúde e forças nesses últimos três anos. Obrigado pela capacidade de superação que me oferece a cada dia.

A meus pais, que sempre apoiaram a minha escolha profissional. Em especial à minha mãe, pela paciência em me aguentar nos melhores e piores dias, na qual me espelho a cada dia pelo exemplo de superação, humildade e bondade.

Às minhas irmãs, em especial à Leidiane. Obrigado por toda compreensão que tem me proporcionado em especial nos últimos anos. Aos meus sobrinhos que sempre trazem alegria para a “casa da vó”, que mesmo nos piores dias conseguem arrancar vários sorrisos.

À minha melhor amiga Natália Landi. Obrigado por me ouvir nesses dez anos de amizade, obrigado pelas risadas, pelas histórias e principalmente pelo amor envolvido na nossa amizade.

Aos meus amigos Rafaella e Willian, os principais responsáveis pela minha entrada na Biotecnologia, obrigado ainda por todos esses anos de amizade e compreensão, em especial à Rafaella meu porto seguro para desabafar e pelo carinho da sua família comigo.

Aos amigos que a faculdade me deu: Willow, Isabella, João Lucas, Dayanne, Mikaelle, Pedro Henrique, Iara, as Danis, Franciele, Amanda. Aos meus amigos Nathália Gonçalves e Rafael Machado pelo companheirismo, paciência e confiança que em tão pouco tempo de amizade se tornou adimensional.

Agradeço a minha orientadora e inspiradora Profa. Dra. Cristina Ribas Furstenau pela paciência, atenção, motivação e por me acolher em seu grupo de pesquisa Bioquímica Vascular, o qual agradeço cada integrante pela disponibilidade em auxiliar e sanar dúvidas.

Agradeço à Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade em desenvolver este trabalho.

## RESUMO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é um problema mundial de saúde. A sinalização purinérgica tem se demonstrado promissora como alvo de tratamento dessa patologia, pois regula processos importantes a fim de restabelecer a homeostase do fluxo sanguíneo. A *Campomanesia sessiliflora*, pertencente à família Myrtaceae, é uma planta vastamente empregada na medicina popular. Objetivos: obter o extrato metanólico das folhas de *Campomanesia sessiliflora*, determinar sua atividade antioxidante, o conteúdo de flavonoides e de fenóis totais e avaliar o efeito do extrato sobre as hidrólises de ATP, ADP e AMP em soro de ratos. O extrato das folhas de guabioba foi obtido utilizando-se metanol como solvente. O conteúdo de fenóis totais, flavonoides e a determinação da atividade antioxidante foram realizados por métodos colorimétricos, bem como a determinação da atividade enzimática. O rendimento do extrato metanólico foi de 12,6%, o conteúdo de fenóis totais resultou em  $62,30 \pm 2,42$  mg Eq AG/ g e o de flavonoides foi de  $16,74 \pm 1,3$  mg Eq quercetina/ g. Ainda, o extrato exibiu alta atividade antioxidante, sendo capaz de inibir o radical DPPH• em 57,12%, 69,37% e 90,2% nas concentrações de 200, 250 e 500 µg/ mL, respectivamente. Não foram observados resultados significativos para a modulação das atividades de hidrólise dos nucleotídeos pelo extrato. Embora a *Campomanesia sessiliflora* não tenha demonstrado modulação significativa na sinalização purinérgica em soro, ela exibiu potente atividade antioxidante e grande conteúdo de flavonoides, cujo potencial farmacológico deve ser melhor aprofundado tendo em vista as ações terapêuticas atribuídas a essas moléculas.

Palavras chave: Atividade antioxidante. Ectonucleotidases. Flavonoides. Hipertensão arterial sistêmica. Sinalização purinérgica

## ABSTRACT

Systemic arterial hypertension (SAH) is a worldwide health problem. Purinergic signaling has been shown to be promising as a treatment target for this pathology, since it regulates important processes to restore blood flow homeostasis. *Campomanesia sessiliflora* belongs to the Myrtaceae family, which has already been widely used in folk medicine. Objective: to obtain the methanolic extract of the leaves of *Campomanesia sessiliflora*, to determine its antioxidant activity, the content of flavonoids and total phenols and to evaluate the effect of the extract on the hydrolysis of ATP, ADP and AMP in rat blood serum. Leaves extract was obtained using methanol as solvent. The content of total phenols, flavonoids and the determination of the antioxidant activity were obtained by colorimetric methods, as well as the determination of the enzymatic activity. The yield of the methanolic extract was 12.6%, the total phenol content resulted in  $62.30 \pm 2.42$  mg Eq AG/ g and that of flavonoids was  $16.74 \pm 1.3$  mg Eq quercetin/ g. In addition, the extract showed high antioxidant activity, being able to inhibit the DPPH• radical in 57.12%, 69.37% e 90.2% at concentrations of 200, 250 and 500 µg/ mL, respectively. No significant results were observed for the modulation of nucleotide hydrolysis activities by the extract. Although *Campomanesia sessiliflora* did not demonstrate significant modulation in purinergic signaling in blood serum, it exhibited potent antioxidant activity and high flavonoid content, whose pharmacological potential should be better studied in view of the therapeutic actions attributed to these molecules.

Key words: Antioxidant activity. Ectonucleotidases. Flavonoids. Systemic arterial hypertension. Purinergic signaling.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu$ L: microlitros  
ADP: adenosina difosfato  
Ado: adenosina  
AMPc: adenosina monofosfato cíclico  
AMP: adenosina monofosfato  
ATP: adenosina trifosfato  
DP: desvio padrão  
DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil  
Eq quercetina/ g: equivalentes de quercetina em 1 g de amostra  
Eq AG/ g: equivalentes de ácido gálico em 1 g de amostra  
E-NPP: ecto-nucleotídeo pirofosfatase/ fosfodiesterase  
ENTPDase: ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase  
g: grama  
HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica  
mg: miligramas  
mL: mililitros  
mmHg: milímetros de mercúrio  
NMN: mononucleotídeo de nicotinamida  
NO: óxido nítrico  
pH: potencial hidrogeniônico  
rpm: rotações por minuto  
TEAC: capacidade antioxidante equivalente a trolox  
Trolox: 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismo de exposição de purinas para o meio extracelular.....	12
Figura 2 - Representação das ectonucleotidases envolvidas na sinalização purinérgica .....	13
Figura 3 - Receptores purinérgicos.....	14
Figura 4 - Folhas de <i>C. sessiliflora</i> utilizadas nos experimentos .....	22
Figura 5 - Extrato metanólico bruto das folhas de <i>C. sessiliflora</i> .....	22
Figura 6 - Ensaio para determinação de fenóis totais das folhas de <i>C. sessiliflora</i> por meio do reagente de Folin- Ciocalteau .....	23
Figura 7 - Ensaio para determinação de flavonoides das folhas de <i>C. sessiliflora</i> por meio do método de Hossain (2011) .....	23
Figura 8 - Teste para determinação da atividade antioxidante, avaliando a capacidade de eliminação do radical DPPH.....	24
Figura 9 - Gráfico da porcentagem de inibição do radical DPPH em diferentes concentrações do extrato metanólico das folhas <i>C. sessiliflora</i> e do antioxidante Trolox utilizado como padrão.....	25
Figura 10 - Efeito do tratamento com extrato de <i>C. sessiliflora</i> na hidrólise de ATP em soro sanguíneo de ratos.....	26
Figura 11 - Efeito do tratamento com extrato de <i>C. sessiliflora</i> na hidrólise de ADP em soro sanguíneo de rato .....	26
Figura 12 - Efeito do tratamento com extrato de <i>C. sessiliflora</i> na hidrólise de AMP em soro sanguíneo de rato .....	27

## SÚMARIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>11</b>
<b>2.1 Hipertensão arterial sistêmica</b> .....	<b>11</b>
<b>2.2 Sinalização purinérgica</b> .....	<b>11</b>
<b>2.3 Liberação das purinas</b> .....	<b>12</b>
<b>2.4 Ectonucleotidasas</b> .....	<b>13</b>
<b>2.5 Receptores purinérgicos</b> .....	<b>14</b>
<b>2.6 Sinalização purinérgica e hipertensão arterial sistêmica</b> .....	<b>14</b>
<b>2.7 Compostos antioxidantes</b> .....	<b>16</b>
<b>2.8 <i>Campomanesia sessiliflora</i></b> .....	<b>17</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>17</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>17</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
<b>4.1 Coleta de folhas de <i>Campomanesia sessiliflora</i></b> .....	<b>18</b>
<b>4.2 Obtenção do extrato metanólico de folhas de <i>C. sessiliflora</i></b> .....	<b>18</b>
<b>4.3 Determinação do conteúdo fenólico total do extrato metanólico de folhas de <i>C. sessiliflora</i></b> .....	<b>18</b>
<b>4.4. Determinação do conteúdo de flavonóides totais das folhas de <i>C. sessiliflora</i></b> .....	<b>19</b>
<b>4.5 Determinação da atividade antioxidante do extrato metanólico das folhas de <i>C. sessiliflora</i></b> .....	<b>19</b>
<b>4.6 Obtenção do soro sanguíneo de ratos</b> .....	<b>19</b>
<b>4.7 Determinação da proteína presente no soro</b> .....	<b>20</b>
<b>4.8 Avaliação das hidrólises de ATP, ADP e AMP em soro de ratos tratados <i>in vitro</i> com extrato de folhas de <i>C. sessiliflora</i></b> .....	<b>20</b>
<b>4.9 Análise estatística</b> .....	<b>21</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>21</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>28</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>29</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) é grande problema de saúde, sendo responsável por contribuir em grande parte da taxa de morbidade na população adulta no Brasil e no mundo. A HAS representa, ainda, um grande fator de risco no agravamento de doenças cerebrovasculares e cardíacas (SBH,2015; BRASIL, 2016).

A sinalização purinérgica participa nos mais variados processos biológicos em uma gama de tecidos. Seus efetores ATP, ADP, AMP e adenosina, são exportados para o meio extracelular, local onde exercem seus efeitos ao interagir com seus receptores específicos, localizados na membrana plasmática. Em seguida, o efeito é interrompido pela metabolização de enzimas denominadas ectonucleotidasas, as quais hidrolisam ligações  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  presentes na estrutura de nucleotídeos até formar seu produto final de degradação, o nucleosídeo de adenina (RALEVIC; BURNSTOCK, 2003; BURNSTOCK, 2017).

Embora haja diversas rotas de sinalização distintas que participam na regulação da homeostase constante do sistema vascular, a sinalização purinérgica se destaca por desencadear diversos processos importantes, como o controle do fluxo sanguíneo, sendo capaz de promover a vasoconstrição e vasodilatação, que promovem o aumento ou declínio da pressão arterial respectivamente. Assim, a sinalização purinérgica se torna um alvo extremamente relevante no desenvolvimento de pesquisas e/ ou terapias para reverter o número de hipertensos.

Atualmente, as pesquisas envolvendo produtos naturais, principalmente oriundos de plantas, vêm ganhando maior destaque no tratamento de doenças, uma vez que dispomos de uma biodiversidade de flora abundante, a qual necessita ser explorada para que assim possam gerar produtos com finalidade terapêutica, bem como servir como embasamento para diversas pesquisas.

Dentre os compostos com propriedades farmacológicas encontrados nas plantas, a classe de compostos fenólicos se destaca pelo alto poder de óxido-redução, assim sendo moléculas com capacidade antioxidante, as quais combatem os radicais livres causadores do estresse oxidativo, responsável pelo desenvolvimento de diversas patologias. Ainda, alguns constituintes dessa classe podem modificar a atividade de catalisação de diversas classes de enzimas, incluindo as ectonucleotidasas.

A *Campomanesia sessiliflora* é abundantemente encontrada no Cerrado mineiro e apresenta grandes potenciais terapêuticos, porém os estudos farmacológicos acerca do mecanismo de ação dos compostos presentes nessa espécie são ainda escassos. Nesse estudo,

em particular, é explorada a modulação das ectonucleotidases, componentes do sistema purinérgico, pelo extrato das folhas de *C. sessiliflora*, amostra rica em compostos antioxidantes, os quais exibem ações contra radicais livres, responsáveis por diversos danos à componentes celulares e que, em casos mais graves, desencadeiam diversas patologias.

Portanto, o presente estudo teve como objetivo geral avaliar o efeito do extrato metanólico da *C. sessiliflora* (Guabiroba verde) sobre a hidrólise de nucleotídeos em soro de ratos. Ainda, os objetivos específicos foram: 1) coletar as folhas de *C. sessiliflora*; 2) obter o extrato metanólico das folhas de *C. sessiliflora*; 3) determinar o conteúdo fenólico total, flavonoides e atividade antioxidante do extrato metanólico das folhas *C. sessiliflora*; 4) obter o soro sanguíneo de ratos; 5) tratar o soro sanguíneo de ratos com o extrato metanólico das folhas de *C. sessiliflora*; e 6) determinar as hidrólises de ATP, ADP e AMP em soro de ratos tratados com o extrato metanólico das folhas de *C. sessiliflora*.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1. Hipertensão Arterial Sistêmica**

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é a principal causa de morbidade e mortalidade cardiovascular prematura (LIM et al, 2012), destacando-se como uma das principais causas de patologias cardiovasculares e cerebrovasculares, responsáveis pela morte de mais de 40 milhões de pessoas no Brasil (SBH, 2015; MALACHIAS et al, 2016). Ainda, pode-se responsabilizar a HAS pela morte de pelo menos 40% das vítimas de acidente vascular cerebral e 25% da doença arterial coronariana (BRASIL, 2016).

A HAS é caracterizada pelo aumento da pressão sistólica e diastólica, maior ou igual a 130 mmHg e 80 mmHg, respectivamente (WHELTON et al., 2018). O desenvolvimento desta patologia pode ser associado à diversos fatores, entre eles envelhecimento, excesso de peso, tabagismo, condição socioeconômica, consumo de bebidas alcoólicas e cor da pele, em que pessoas negras são mais atingidas (SILVEIRA, 2013; MALACHIAS et al., 2016).

### **2.2. Sinalização Purinérgica**

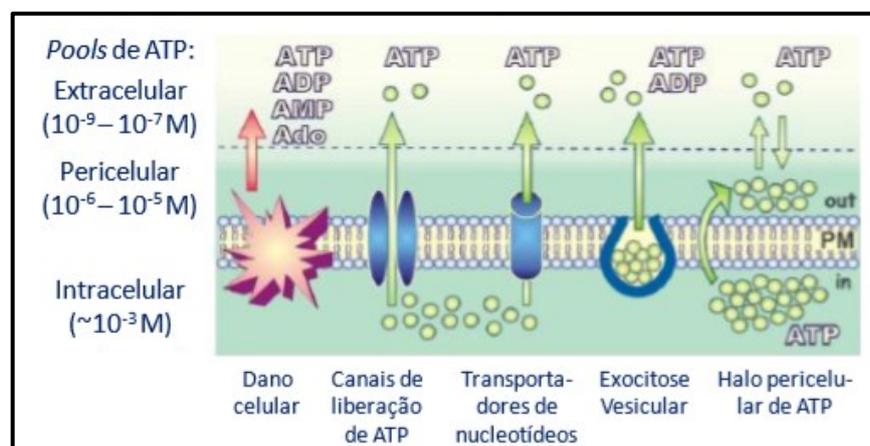
O papel do ATP foi, por muito tempo, associado exclusivamente à fonte de energia intracelular, envolvido em diversos ciclos metabólicos (CORI, 1974). No início da década de 1970, entretanto, Burnstock atribuiu outra função para o nucleotídeo trifosfatado, dessa vez

como uma molécula sinalizadora responsável por realizar a neurotransmissão muscular na bexiga urinária e intestino (WHITE; BURNSTOCK, 2006; BURNSTOCK, 2012). Atualmente, purinas e pirimidinas encontradas no meio extracelular já são compreendidas como efetores da via de sinalização purinérgica, a qual participa de diversos processos biológicos, como a neurotransmissão, distribuição do fluxo sanguíneo e do oxigênio por meio de vasodilatação e vasoconstrição, agregação plaquetária, processos inflamatórios, resposta imunológica, contração do músculo liso, apoptose, proliferação celular, diferenciação celular dentre outros (BARNA, 2015; RALEVIC; BURNSTOCK, 1998; WHITE; BURNSTOCK, 2006). Devido a essa grande participação na homeostase metabólica, o sistema purinérgico é um importante alvo para diferentes terapias no tratamento de diversas patologias.

### 2.3. Liberação das Purinas

Nucleotídeos como ATP, ADP, AMP e seu produto final de desfosforilação, adenosina, exercem uma importante rota de comunicação autócrina e/ou parácrina nos mais diversos tecidos (YEGUTKIN, 2008; FURSTENAÜ, 2010). A sinalização purinérgica inicia-se quando nucleotídeos e/ ou nucleosídeo são expostos ao meio extracelular por meio de terminais pré e pós-sinápticos através de mecanismos fisiológicos ou em resposta a danos celulares, estresse de cisalhamento, hipóxia e injúrias (BURNSTOCK, 2013; BURNSTOCK; VERKHRATSKY, 2009; RALEVIC; BURNSTOCK, 1998). Dentre a gama de condições que podem promover o extravasamento de purinas, a Figura 1, representa as vias conhecidas de liberação dessas moléculas para o meio extracelular (YEGUTKIN, 2008).

Figura 1. Mecanismos de exposição de purinas para o meio extracelular

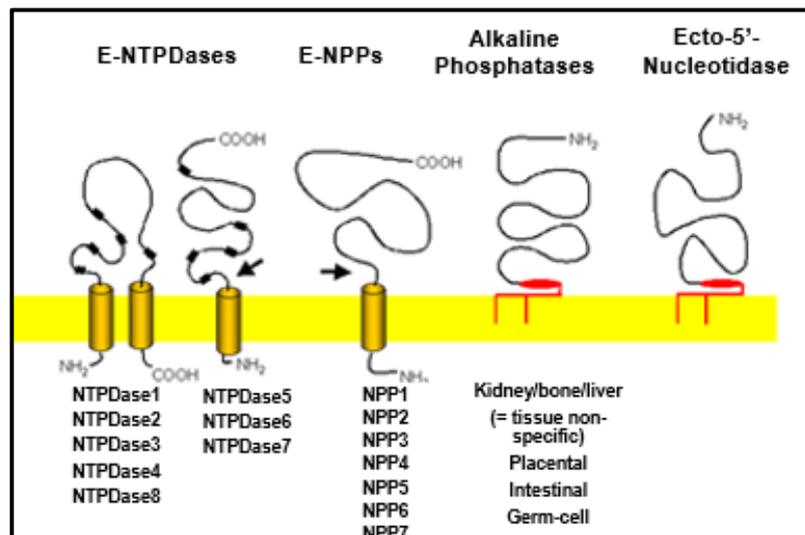


Fonte: YEGUTKIN (2008).

## 2.4. Ectonucleotidases

A concentração de nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares, é regulada por enzimas denominadas ectonucleotidases, as quais podem ser encontradas ancoradas na membrana plasmática com seu sítio catalítico projetado para o meio extracelular, internalizadas ou ainda sob a forma solúvel (circulante) (THOMÉ, 2012; FURSTENAÜ, 2010, ZIMMERMANN, 2001). As ectonucleotidases são classificadas em diversas famílias (Figura 2): 1) ENTPDase (ecto-nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase); 2) E-NPP (ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase); 3) fosfatases alcalinas; e 4) ecto-5'-nucleotidase, as quais são classificadas de acordo com a preferência pelo substrato, além de diferenças moleculares e de distribuição tecidual (THOMÉ, 2012; FURSTENAÜ, 2010).

Figura 2. Representação das ectonucleotidases envolvidas na sinalização purinérgica



Fonte: ZIMMERMANN, 2001; FÜRSTERNAU, 2006.

As ENTPDases possuem capacidade hidrolítica na presença de ligações gama e/ou beta existente na estrutura de nucleotídeos tri e difosfatados. Sua ação resulta em produtos pós ação catalítica ADP e AMP. Essa família ainda possui 8 membros com diferentes preferências por substrato e distintas localizações, podendo apresentar-se ancoradas à membrana plasmática ou à membranas de organelas subcelulares, bem como sob a forma solúvel (ZIMMERMANN, 2001; OSES et al., 2004).

A família das E-NPPs é composta por sete representantes (NPP1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7), sendo caracterizadas por terem como substratos 3'5-AMPc, ATP, ADP, NMN e diadenosina fosfatos (APnA), os quais são passíveis de sofrerem hidrólise (RÜCKER, 2009;

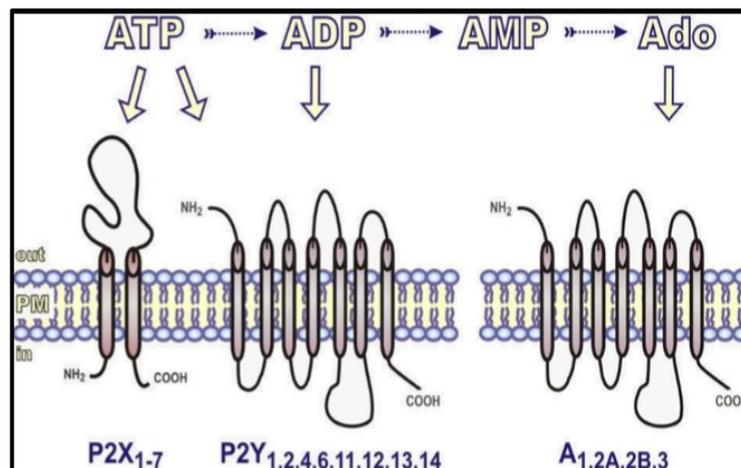
YEGUTKIN, 2008). Geralmente essas enzimas são encontradas ancoradas na membrana plasmática, embora já tenha sido descrita uma forma solúvel do subtipo NPP2 (STEFAN et al., 2006, RÜCKER, 2009).

A ecto-5'-nucleotidase participa da catálise de AMP em adenosina, por meio da afinidade com as ligações alfa do nucleotídeo monofosfatado. Essa enzima possui uma localização primária na membrana plasmática, mas pode sofrer clivagem e adquirir uma forma solúvel (ZIMMERMANN, 1992; STRÄTER, 2006).

## 2.5. Receptores Purinérgicos

O reconhecimento dos efetores dessa sinalização é realizado a partir de receptores purinérgicos localizados na membrana celular (Figura 3). A classificação dos purinoreceptores varia de acordo com sua estrutura, efeito farmacológico e com a afinidade a seu ligante. Assim, os receptores do tipo P1 têm como ligante exclusivo a adenosina, enquanto os do tipo P2 possuem afinidade tanto pelo ATP quanto por ADP, UTP e UDP-glicose. Os purinoreceptores do tipo P2 podem ainda ser subdivididos em ionotrópicos (P2X), em que o único ligante é o ATP, e metabotrópicos (P2Y), os quais têm como ligantes as purinas e pirimidinas (BURNSTOCK G, 2012; WHITE; BURNSTOCK, 2006).

Figura 3. Receptores purinérgicos



Fonte: YEGUTKIN, 2008.

## 2.6. Sinalização Purinérgica e Hipertensão Arterial Sistêmica

A sinalização purinérgica contribui diretamente para a regulação da homeostase do

sistema vascular, promovendo eventos cruciais para manter a pressão arterial em níveis normais. A participação dos nucleotídeos em processos biológicos nesse sistema já é vastamente explorada, podendo atribuir à essa rota de comunicação atividades como a de vasoconstrição, vasodilatação, agregação plaquetária, desenvolvimento de processos inflamatórios, apoptose e controle de processos de diferenciação e proliferação celular (FÜRSTENAÜ, 2006; BURNSTOCK, 2017).

No sistema vascular, o ATP pode ser liberado como um neurotransmissor de terminais nervosos simpáticos e, ao se ligar à receptores P2X, localizados nas células musculares lisas promove a vasoconstrição. Por outro lado, quando esse nucleotídeo trifosfatado é liberado por meio de células endoteliais e se liga aos receptores P2Y é capaz de promover a vasodilatação (FÜRSTENAU, 2010). O ADP possui grande contribuição em processos hemorrágicos e/ou trombóticos, uma vez que é capaz de promover a ativação e agregação plaquetária. O ADP ainda pode atuar em eventos de vasodilatação estimulando a síntese de NO ou por meio da interação com receptores do tipo P2Y1 em células musculares lisas e endoteliais (RALEVIC; BURNSTOCK, 2003; RÜCKER, 2009). A adenosina também contribui para diversos eventos nesse sistema, podendo ser associada a ações vasodilatadoras, estimulação da angiogênese, citoproteção e imunossupressão.

O controle da biodisponibilidade desses efetores no sangue para alcançar a homeostase, pode ser atribuída as ectonucleotidases, uma vez que podem ser clivadas da sua localização primária, a membrana celular, e assumir uma forma hidrossolúvel, assumindo a capacidade de circular na corrente sanguínea e realizar o equilíbrio na concentração de purinas (FÜRSTENAU, 2010; SPYCHALA et al., 1999). As ectonucleotidases têm sido alvo de diversas terapias envolvendo inibição ou otimização da sua atividade enzimática. A NTPDase1, a ectonucleotidase mais abundante na vasculatura, exibe grande importância na inibição de processos pró-trombóticos e pró-inflamatório, possuindo grande potencial terapêutico para a prevenção da formação de coágulos. Alguns estudos testaram essa enzima na forma solúvel para fins terapêuticos em processos trombóticos, os quais foram obtidos resultados promissores quanto à inibição da agregação plaquetária *in vitro* (YEGUTKIN, 2008; ROBSON et al., 2006; ROSA, 2010).

Conforme mencionado anteriormente, os fluidos corporais, como o soro sanguíneo, possuem formas solúveis das ectonucleotidases. A NPP2, pertencente à família pirofosfatase/fosfodiesterase, por exemplo, existe apenas sob a forma solúvel (ROSA, 2010). Outra enzima que pode sofrer clivagem e ser encontrada na forma solúvel é a ecto-5'-nucleotidase, a qual regula as concentrações de AMP e adenosina extracelular, podendo promover a vasodilatação

por meio da ativação de receptores A2, e inibir a agregação plaquetária (KAWASHIMA; NAGASAWA; NINOMIYA, 2000; RALEVIC; BURNSTOCK, 2003).

## **2.7. Compostos antioxidantes**

Os radicais livres são átomos, grupos de átomos ou moléculas que possuem elétrons livres na sua camada de valência, sendo assim moléculas que apresenta alta instabilidade e elevada reatividade. O acúmulo dessas moléculas sem um sistema de neutralização compatível com a concentração dessas moléculas, causa o estresse oxidativo, o qual é responsável pelo envelhecimento e por uma gama de patologias (KIRKHAM; RAHMAN, 2006).

As espécies reativas são formadas por processos naturais do organismo, podendo ser oriundos do citoplasma, mitocôndrias ou membrana ou ainda por estímulo de agentes externos como a radiação, cigarro, álcool e alimentação. Após sua formação, os radicais livres podem comprometer a forma ativa de diversos componentes celulares como DNA, proteínas, lipídios e carboidratos, os quais são indispensáveis para a vitalidade celular (YU; ANDERSON, 1997; YILDRIM; MAVI; KARA, 2001).

O organismo possui mecanismos de defesa, os quais atrasam ou inibem a oxidação de outras moléculas por meio de agentes enzimáticos e não enzimáticos, podendo ainda ser classificados como endógenos de defesa, como por exemplo as enzimas superóxido dismutase, catalase, peroxidase e metaloproteínas (BRENNAN; PAGLIARINI, 2001; YILDRIM, MAVI & KARA, 2001) ou como exógenos sendo adquiridos na dieta por meio do consumo de alimentos ricos em antioxidantes como compostos fenólicos, vitamina C, vitamina E, carotenoides, entre outros (HALLIWELL, 2011).

Os compostos fenólicos são os antioxidantes mais abundantes nos alimentos. Dentre eles, os flavonoides, compostos pelas flavonas, flavanonas, flavonóis, isoflavonas, flavanóis e antocianinas, se destacam devido à sua capacidade de neutralizar os radicais livres (AHERNE; O'BRIEN, 2002; DECKER, 2009).

Um vasto número de estudos visam a bioprospecção de moléculas capazes de modular a atividade das ectonucleotidases, as quais são responsivas pelo controle da biodisponibilidade dos efetores da sinalização purinérgica. Recentemente, estudos demonstraram alterações na atividade catalítica dessas enzimas em resposta a exposição à flavonoides como o resveratrol e curcumina (SCHMATZ, 2009; JAQUES, 2011).

## 2.8. *Campomanesia sessiliflora*

A utilização de medicamentos oriundos de plantas tem sido empregada em larga escala no tratamento de diversas doenças no Brasil. A espécie *Campomanesia sessiliflora*, conhecida popularmente como guabiroba-verde, pertence à família Myrtaceae, a qual é vastamente utilizada na medicina popular devido ao potencial cicatrizante, anti-séptico, anti-inflamatório e antidiarréico presente em suas folhas (BARBOSA, 2015).

Barbosa (2015) descreveu ainda a presença de compostos fenólicos tais como flavonóides em *C. sessiliflora*, os quais estão associados à atividade antioxidante da planta. A propriedade antioxidante pode ser encontrada em algumas plantas, a qual pode ser utilizada como fator inibidor na produção de espécies reativas de oxigênio, as quais estão associadas ao estresse oxidativo responsivo por diversas patologias (SOUZA et al., 2007; PEREIRA; CARDOSO, 2012; REUTER et al., 2010).

## 3. OBJETIVOS

### 3.1. Objetivo Geral

- Avaliar a capacidade antioxidante e caracterizar o conteúdo fitoquímico do extrato metanólico das folhas de *Campomanesia sessiliflora* (Guabiroba verde) e avaliar seu efeito sobre as ectonucleotidases circulantes.

### 3.2. Objetivos Específicos

- Coletar as folhas de *C. sessiliflora*;
- Obter o extrato metanólico de folhas de *C. sessiliflora*;
- Determinar o conteúdo fenólico total, de flavonoides e a atividade antioxidante do extrato metanólico das folhas de *C. sessiliflora*;
- Obter o soro sanguíneo de ratos;
- Tratar *in vitro* o soro sanguíneo de ratos com o extrato metanólico das folhas de *C. sessiliflora*;
- Determinar das hidrólises de ATP, ADP e AMP em soro de ratos tratados *in vitro* com o extrato metanólico das folhas de *C. sessiliflora*.

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1. Coleta de folhas de *Campomanesia sessiliflora***

A espécie foi identificada na região de Monjolinho (latitude 18°46'15"S e longitude 46°14'50"W), no município de Lagoa Formosa, Minas Gerais, Brasil. Após identificação, sob supervisão da professora Dra. Terezinha Teixeira, as folhas da espécie *C. sessiliflora* foram coletadas. Posteriormente, as amostras foram lavadas com água corrente, congeladas à -80 °C, liofilizadas por 48 horas e trituradas.

### **4.2. Obtenção do extrato metanólico de folhas de *C. sessiliflora***

A amostra das folhas de *C. sessiliflora* triturada foi submetida à extração por maceração, utilizando-se metanol puro como solvente. Cerca de 70 gramas do material vegetal selecionado foi pesado e, em seguida, misturado em 470 mL de metanol à temperatura ambiente, mantido em repouso por 72 horas ao abrigo da luz. Após esse período, a mistura foi submetida à filtração, para se retirar as partículas indesejáveis. Em seguida, foi executada a por meio de um rotaevaporador (Marca:Fisatom. Modelo:802), a evaporação do solvente a uma temperatura de 54° para evaporação do solvente, para obtenção do extrato metanólico bruto como produto final.

### **4.3. Determinação do conteúdo fenólico total do extrato metanólico de folhas de *C. sessiliflora***

A determinação do conteúdo fenólico total do extrato metanólico obtido anteriormente foi realizada por análise em espectrofotômetro utilizando o reagente Folin-Ciocalteu (Sigma), segundo a metodologia descrita por Wettasinghe & Shahidi (1999), utilizando como padrão o ácido gálico ( $R^2 = 0,9967$ ). O conteúdo fenólico da *C. sessiliflora* foi expresso em miligramas equivalentes de ácido gálico (GAE) por grama de amostra. Todos os resultados foram realizados em triplicata.

#### 4.4. Determinação do conteúdo de flavonóides totais em folhas de *C. sessiliflora*

A determinação do conteúdo de flavonóides de *C. sessiliflora* foi realizada por meio do método descrito por Hossain (2011) com algumas adaptações. Um total de 0,1 g do extrato metanólico de *C. sessiliflora* foi diluído em 1 mL de metanol. A partir da solução mãe (0,1 g/mL) do extrato metanólico, foram testadas nas diluições de 100, 50 e 40 vezes. Assim, às amostras de extrato metanólico bruto das folhas de *C. sessiliflora* foram misturados 10% de cloreto de alumínio (20 mL), 1 M de acetato de potássio (20 mL) e água destilada (860 µL). Logo após, a solução foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente. A absorbância foi medida a 415 nm usando espectrofotômetro (UV-340G, Gehaka, PR, Brasil). Para a curva de calibração foi utilizado o flavonóide quercetina ( $R^2 = 0,9879$ ). Os ensaios foram realizados em triplicada.

#### 4.5. Determinação da atividade antioxidante do extrato metanólico das folhas de *C. sessiliflora*

A metodologia para determinar a capacidade antioxidante foi embasada no estudo de Brand-Williams et al. (1995), o qual utiliza como padrão o ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico (Trolox) na capacidade de eliminar o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH •). Para o teste foi utilizado uma solução de DPPH a 60 µmol em metanol 80%, o ensaio foi realizado em triplicata e as concentrações de extrato testadas foram de 200, 250 e 500 µg/ mL. A absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro (UV-340G, Gehaka, PR, Brasil), em 515 nm, após 30 min de incubação no escuro. O Trolox (100 - 800 µmol/ L) foi utilizado como referência correspondendo a 100% de atividade eliminadora de radicais. A curva padrão de Trolox resultou em valor de  $R^2 = 0,9978$ . Os resultados calculados da porcentagem da inibição do radical DPPH foram obtidos por meio da fórmula  $(A_0 - A_{test}) / (A_0) * 100$ .

#### 4.6. Obtenção do soro sanguíneo de ratos

Para a obtenção do soro sanguíneo, foram utilizados ratos *Wistar* machos, de 60 dias de idade, com peso de aproximadamente 250 gramas, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Os animais foram submetidos à condições controladas de temperatura ( $\pm 25$  °C) e luz (ciclo claro/ escuro 12h/ 12 h, com as luzes acesas

entre 7 e 19 h). Além de receber água e ração para ratos *ad libitum*. As amostras de soro foram colhidas após a eutanásia por decapitação dos animais, como descrito por Yegutkin (1997). O sangue coletado foi centrifugado (Centrífuga, Modelo: NO 1801, Maca: Nova Instruments) em tubos plásticos, a 5000 rpm por 15 minutos, a temperatura ambiente. As amostras séricas obtidas foram, em seguida, armazenadas em gelo e utilizadas nos experimentos. Todos os protocolos utilizados foram previamente submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da UFU (Número do protocolo: 067/15).

#### **4.7. Determinação da proteína presente nos soros**

A proteína foi determinada pelo método do Coomassie Blue utilizando albumina bovina sérica como padrão (Bradford, 1976). O soro foi submetido a uma diluição de 40 vezes em água mili-Q, proporção 39:1. Após a diluição, 50  $\mu$ L da solução diluída foi misturada com 2,5 mL de Coomassie Blue. Em seguida, foi realizada a leitura em espectrofotômetro (Marca: UV-340G, Gehaka, PR, Brasil) a 595 nm. O resultado obtido nas dosagens de proteínas totais do soro é utilizado para fins de cálculo das atividades enzimáticas.

#### **4.8. Avaliação das hidrólises de ATP, ADP e AMP em soro de ratos tratados *in vitro* com extratos de folhas de *C. sessiliflora***

O ensaio enzimático das ectonucleotidases presentes nas amostras de soro foi realizado usando uma modificação do método previamente descrito por Yegutkin (1997). A solução da reação foi constituída por 50 mM de Tris-HCl, pH 8,0, 20  $\mu$ L de soro em cada tubo (aproximadamente 1 mg/ mL de proteína) e diferentes concentrações (0, 125, 250 e 500  $\mu$ g/mL) do extrato metanólico das folhas de *C. sessiliflora*. Antes das ectonucleotidases serem expostas ao substrato, foi realizada uma pré-incubação, a qual durou 10 minutos, a temperatura de 37 ° C em banho-maria (CT-245-28, Cientec, MG, Brasil). Para iniciar as reações, substratos (ATP, ADP ou AMP) foram adicionados na concentração de 3,0 mM em um volume final de 200  $\mu$ L com intervalos de 20 segundos entre cada tubo. Após 40 minutos de incubação, as reações enzimáticas foram interrompidas com a adição de 200  $\mu$ L de TCA, seguindo a mesma sequência em que foi adicionado o substrato. Os tubos foram colocados em com o gelo para ter uma maior eficiência na interrupção da atividade enzimática. Logo após a incubação, os controles para hidrólise não enzimática do substrato receberam o soro

sanguíneo para corrigir o volume final da reação. Em seguida, todos os tubos foram submetidos à centrifugação (Centrífuga Modelo: NO 1801, Maca: Nova Instruments) 5000 rpm por 5 minutos e o sobrenante foi diluído 10 vezes em água mili-Q. Para a reação colorimétrica do fosfato inorgânico livre (Pi) presente no meio de reação, foram adicionados 1 mL do reagente de verde de malaquita. Os tempos de incubação e as concentrações proteicas foram escolhidos para garantir a linearidade das reações enzimáticas. A quantidade de fosfato inorgânico liberado foi mensurada a 630 nm (espectrofotômetro UV-340G, Gehaka, PR, Brasil). As atividades enzimáticas foram expressas como nmol Pi liberado/ min/ mg de proteína (CHAN; DELFERT; JUNGER, 1986).

#### **4.9. Análise Estatística**

Com base nos resultados dos experimentos, foram calculadas a média e desvio padrão (D.P.). A comparação entre os grupos foi avaliada pela análise de variância de uma via (oneway ANOVA), utilizando o GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). As diferenças foram consideradas significativas para  $P \leq 0,05$ .

### **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O extrato metanólico preparado a partir das folhas de *C. sessiliflora* (Figura 4), foi submetido à avaliação da capacidade antioxidante, determinação de fenóis totais, determinação de flavonoides e a avaliação do seu efeito na modulação da sinalização purinérgica. Os resultados e sua discussão correspondente são apresentados a seguir.



Figura 4. Folhas de *C. sessiliflora*, utilizadas nos experimentos.

O rendimento do extrato metanólico (Figura 5) foi de 12,6%, o qual foi determinado pela seguinte equação:

$$R = (M_f / M_0) * 100$$

Onde:

R = rendimento do extrato em porcentagem

M<sub>f</sub> = massa do extrato ao final da rotaevaporação (g)

M<sub>0</sub> = massa da amostra inicial (g)

100 = fator de conversão para porcentagem



Figura 5. Extrato metanólico bruto obtido das folhas de *C. sessiliflora*

A escolha do metanol como solvente foi baseada em seu baixo ponto de ebulição (aproximadamente 65°C, à pressão atmosférica), o qual, ao ser submetido ao processo de rotaevaporação, seria evaporado sem degradar a amostra de interesse. Ainda, foi levado em consideração a sua polaridade, que confere a capacidade de extrair moléculas menores de vegetais como os compostos fenólicos, moléculas de interesse do trabalho.

O conteúdo de fenóis totais (Figura 6) e flavonoides (Figura 7) presente no extrato metanólico das folhas de *C. sessiliflora* foi de  $62,30 \pm 2,42$  mg Eq AG/ g e  $16,74 \pm 1,3$  mg Eq quercetina/g, respectivamente. Esse teste mostrou a presença significativa de 26,8% de flavonoides do conteúdo total de fenóis.



Figura 6. Figura representativa do ensaio para determinação de fenóis totais das folhas de *C. sessiliflora* por meio do reagente de Folin-Ciocalteu. Amostras diluídas 500 vezes a partir da solução mãe 0,1g/ mL de extrato.



Figura 7. Figura representativa do ensaio para determinação de flavonoides das folhas de *C. sessiliflora* por meio do método de Hossain (2011). Amostras diluídas 40 vezes a partir da solução mãe 0,1g/ mL de extrato.

A quantidade de fenóis totais e flavonoides determinada no presente estudo foi aproximadamente 18 e 22 vezes, respectivamente, maior do que a obtida no trabalho realizado

por Barbosa (2015), o qual também utilizou a mesma espécie e partiu dos mesmos padrões, ácido gálico e quercetina para fenóis totais e flavonoides, respectivamente. Essa diferença de resultados pode ser atribuída aos solventes utilizados, uma vez que Barbosa fez uso de etanol ao invés de metanol. É importante considerar que o metanol possui polaridade maior do que o etanol, podendo extrair moléculas mais polares, aumentando sua eficiência para extrair compostos fenólicos. Além da diferença nos solventes utilizados nos estudos comparados, a diferença entre os resultados pode ser também atribuída às diferenças de composição de solo, época da colheita, estação em que a planta foi coletada e clima.

No estudo conduzido por Tibulo et al. (2016), os autores avaliaram componentes do extrato etanólico das folhas de 5 cultivares diferentes da espécie *Eugenia uniflora* (pitanga), também representante da família Myrtaceae, a qual exibiu resultados equivalentes a 8,08% à 15,94% do valor de fenóis totais de *C. sessiliflora*. No mesmo estudo também foi avaliado o conteúdo de flavonoides das folhas de pitanga, podendo ser observada a diferença nítida entre a quantidade desses componentes entre as duas espécies comparadas, a qual exibiu valores de 3,38% à 5,85% do valor de flavonoides da *C. sessiliflora*. Dessa maneira, corroborou-se a abundância desses metabólitos secundários presentes na guabiroba verde, sinalizando que os mesmos tem potencial para serem explorados na área farmacológica, uma vez que os flavonoides são metabólitos conhecidos por exibirem atividades antioxidante, antimicrobianas, antiinflamatória, antivirais e antitumorais (DOS SANTOS; RODRIGUES, 2017).

O teste para avaliar a capacidade antioxidante na eliminação do radical DPPH• do extrato metanólico da guabiroba verde (Figura 8) foi realizado nas concentrações 200, 250 e 500 µg/ mL.

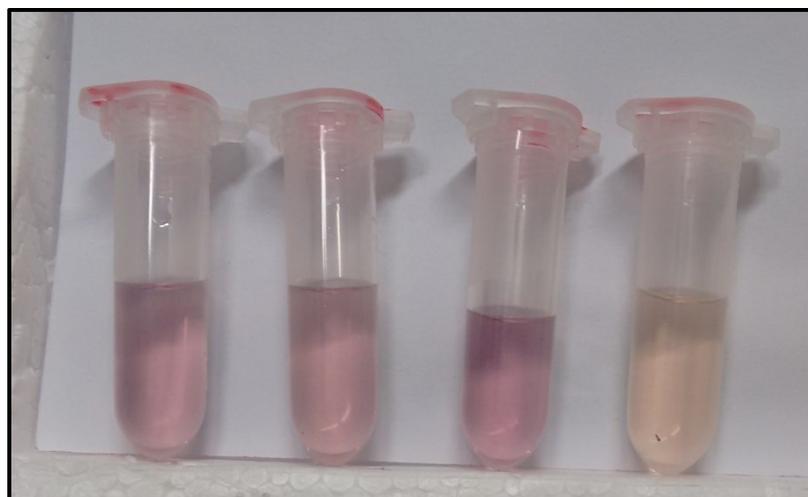


Figura 8. Figura representativa do teste para determinação da atividade antioxidante.

A Figura 9 apresenta a porcentagem de inibição do radical DPPH•. A *C. sessiliflora* exibiu porcentagem de inibição de 57,12%, 69,37% e 90,2% nas concentrações de 200, 250 e 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de extrato metanólico respectivamente enquanto que o padrão Trolox exibiu a porcentagem de inibição do radical DPPH• de 60,35%, 80,66 % e 92,46% para as concentrações 500, 700 e 800  $\mu\text{mol}/\text{L}$ , respectivamente. Assim, a guabiroba verde apresentou capacidade de inibição do radical DPPH• semelhante ao padrão Trolox na faixa de 500 a 800  $\mu\text{mol}/\text{L}$ .

Considerando os dados obtidos até aqui, o extrato metanólico das folhas de *C. sessiliflora* apresentou capacidade antioxidante significativamente alta. A atividade antioxidante pode ser explicada pelo seu alto conteúdo de flavonoides descrito anteriormente. Barbosa (2015) ainda caracterizou a presença de flavonóis, flavonas e antocianinas, os quais são representantes da classe de flavonoides.

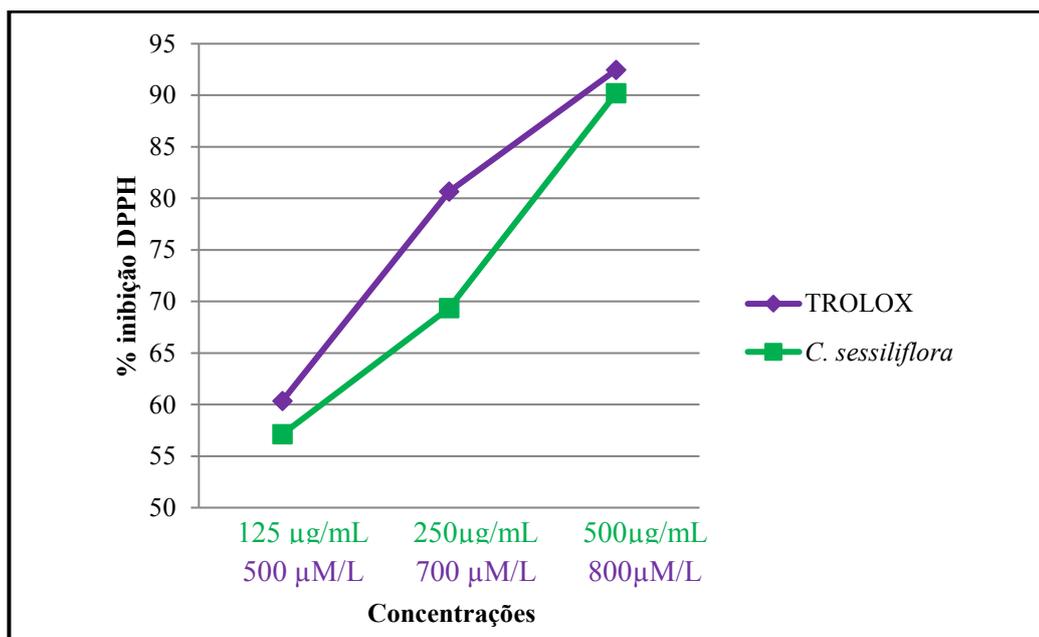


Figura 9. Gráfico da porcentagem de inibição do radical DPPH em diferentes concentrações do extrato metanólico das folhas de *C. sessiliflora* e antioxidante Trolox utilizado como padrão. Resultados realizados em triplicata.

Os resultados da hidrólise enzimática para todos os substratos testados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre o controle (0 extrato) e as concentrações testadas (125, 250 e 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), levando em consideração  $P \leq 0,05$ . ATP (Figura 10), ADP (Figura 11) e AMP (Figura 12).

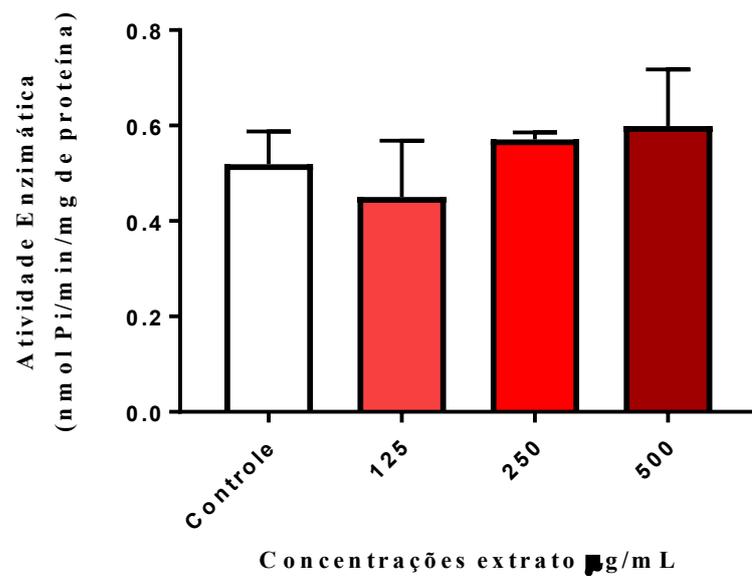


Figura10. Efeito do tratamento com extrato de *C. sessiliflora* na hidrólise de ATP em soro sanguíneo de ratos. Os resultados são expressos como médias  $\pm$  DP, n = 3. Não houve diferenças significativas entre os grupos. A comparação entre os grupos foi feita pela análise de variância de uma via (ANOVA).

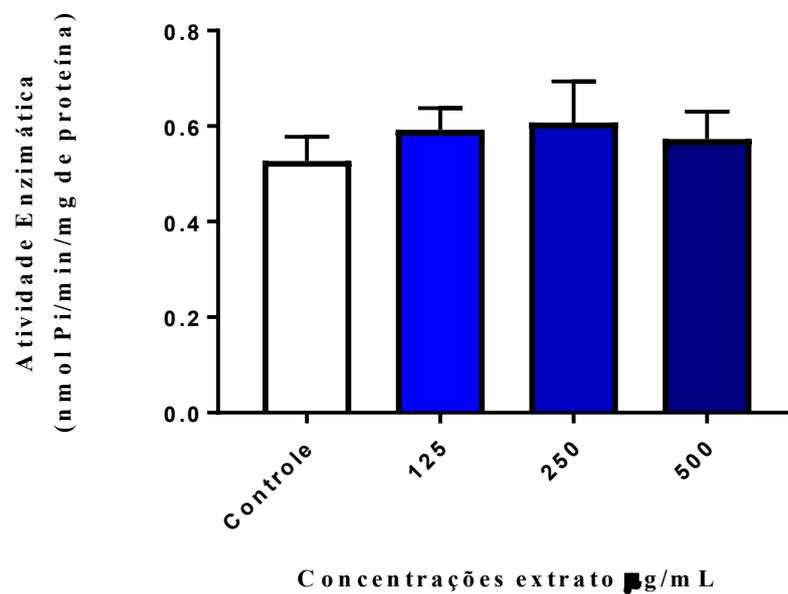


Figura10. Efeito do tratamento com extrato de *C. sessiliflora* na hidrólise de ADP em soro sanguíneo de ratos. Os resultados são expressos como médias  $\pm$  DP, n = 3. Não houve diferenças significativas entre os grupos. A comparação entre os grupos foi feita pela análise de variância de uma via (ANOVA).

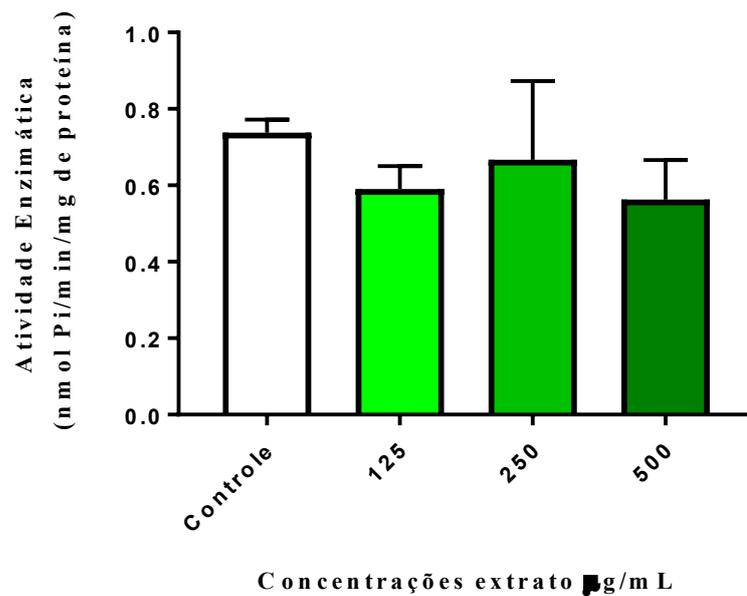


Figura10. Efeito do tratamento com extrato de *C. sessiliflora* na hidrólise de AMP em soro sanguíneo de ratos. Os resultados são expressos como médias  $\pm$  DP, n = 3. Não houve diferenças significativas entre os grupos. A comparação entre os grupos foi feita pela análise de variância de uma via (ANOVA).

Apesar de o extrato não apresentar modulação na hidrólise dos substratos testados, ainda não se pode descartar a hipótese de haver moléculas com potenciais moduladores dessas enzimas na guabiroba verde, instigando a utilização de outras frações do extrato ou teste de moléculas isoladas. Vale considerar que o solvente de extração escolhido pode ter extraído altas concentrações de moléculas sem ações farmacológicas em solução, assim mascarando possíveis moléculas com ações que poderiam ser exploradas, como por exemplo flavonoides, que posteriormente será apresentados estudos que já exploraram algumas dessas moléculas que alteraram a atividade das ectonucleotidases.

Embora os resultados não foram significativos para a hidrólise enzimática utilizando o extrato da *C. sessiliflora*, outros trabalhos já demonstraram a ação de metabólitos secundários como compostos fenólicos alterando a atividade catalítica das ectonucleotidases. Flavonoides já foram descritos atuando sobre as ectonucleotidases. No estudo conduzido por Baldissarelli e colaboradores (2016), os autores utilizaram a quercetina, a qual demonstrou exercer inibição na atividade catalítica da ecto-5'-nucleotidase e da NTPDase. O tipo de inibição observado foi competitiva e mista, respectivamente. Ainda em 2016, Oboh e colaboradores testaram o efeito do extrato oriundo do caule do sorgo (*Sorghum bicolor*), o qual exibiu um alto conteúdo fenólico e capacidade de inibir a atividade catalítica da ecto-5'-nucleotidase.

Esses resultados descritos por outros autores corroboram o potencial terapêutico

dessas moléculas na via purinérgica, moléculas capazes de estimular diversos processos biológicos através da ação sobre as ectonucleotidases. No presente trabalho, uma possível modulação das ectonucleotidases presentes no soro, poderia alterar a biodisponibilidade de nucleotídeo e/ou nucleosídeo na circulação sanguínea, os quais conseqüentemente ficariam propensos à interagir com receptores distribuídos em células da vasculatura, células do sistema imune e plaquetas, assim poderiam desenvolver respostas favoráveis no tratamento da hipertensão como a vasodilatação ou até mesmo estimular efeitos negativos como o estímulo da vasoconstrição e agregação plaquetária.

Finalmente, o estudo instiga utilizar o extrato obtido no presente trabalho em outros estudos, como por exemplo, em ratos que possuem algum estado patológico, uma vez que o extrato de guabiroba poderia influenciar na biodisponibilidade tanto de nucleotídeos extracelulares quanto na atividade de enzimas circulantes. Ainda, poderia-se utilizar o estudo *in vivo* para avaliar se houve alguma biotransformação estrutural dos componentes do extrato, em consequência da sua metabolização pelo fígado, sendo assim o produto originado dessa pós-metabolização poderia promover modulação na atividade das ectonucleotidases.

## 6 CONCLUSÃO

A *C. sessiliflora*, apresenta um grande conteúdo de compostos fenólicos, entre eles flavonoides, os quais instigam a exploração de futuras aplicações biotecnológicas da espécie, uma vez que essas moléculas podem atuar como antioxidantes.

Embora o extrato metanólico não tenha apresentado efeito significativo sobre a atividade das ectonucleotidases circulantes em ratos em condições clínicas de homeostase, ainda é possível que o extrato exerça modificações nessa via em ratos acometidos por patologias e/ou distúrbios, fazendo assim necessário testes nesses grupos.

Em relação à modulação da via em ratos em condição de homeostase como foi abordado no presente trabalho, é necessário o emprego de outras frações do extrato, o isolamento de compostos bioativos para testes e utilização de frações em outros contextos biológicos, como em células da parede dos vasos, responsáveis por regular a pressão arterial, por exemplo.

## REFERÊNCIAS

- AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. **Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 75–81, jan. 2002. Doi: 10.1016/S0899-9007(01)00695-5
- BALDISSARELLI, J. et al. Quercetin changes purinergic enzyme activities and oxidative profile in platelets of rats with hypothyroidism. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 84, p. 1849–1857, dez. 2016. Doi: 10.1016/j.biopha.2016.10.109
- BARBOSA, R. M. A. **Avaliação da atividade Antioxidante e fotoprotetora do extrato etanólico de *Campomanesia sessiliflora***. 2015.66 f. Dissertação para obtenção do título de mestre-Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, 2015.
- BARNA, B. F. **O bloqueio purinérgico no núcleo retrotrapezóide (RTN) atenua as respostas respiratórias promovidas pela ativação dos quimiorreflexos centar e periférico em ratos**. 2015. 137 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.
- BRAD -WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, jan. 1995. Doi: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 7 maio 1976. Doi
- BRASIL. Ministério da saúde. Portal da Saúde, 2016. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/814-sasraiz/daetraiz/doencas-cronica/11-doencas-cronica/22067-hipertensao-arterial-e-diabetes>>. Acesso em: 05 março 2018.
- BRENNA, O. V.; PAGLIARINI, E. Multivariate Analysis of Antioxidant Power and Polyphenolic Composition in Red Wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4841–4844, out. 2001. Doi: 10.1021/jf0104376
- BURNSTOCK, G. Purinergic Signalling: Pathophysiology and Therapeutic Potential. **The Keio Journal of Medicine**, v. 62, n. 3, p. 63–73, 2013. Doi: 10.2302/kjm.2013-0003-RE
- BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: Its unpopular beginning, its acceptance and its exciting future. **BioEssays**, v. 34, n. 3, p. 218–225, mar. 2012. Doi: 10.1002/bies.201100130
- BURNSTOCK, G. Purinergic Signaling in the Cardiovascular System. **Circulation Research**, v. 120, n. 1, p. 207–228, 6 jan. 2017. Doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309726
- BURNSTOCK, G.; VERKHRATSKY, A. Evolutionary origins of the purinergic signalling system. **Acta Physiologica**, v. 195, n. 4, p. 415–447, abr. 2009. Doi: 10.1111/j.1748-1716.2009.01957.x

CHAN, K.-M.; DELFERT, D.; JUNGER, K. D. A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup>-stimulated ATPase activity. **Analytical Biochemistry**, v. 157, n. 2, p. 375–380, set. 1986. Doi: 10.1016/0003-2697(86)90640-8

CORI, C. F. Some highlights of the early period of bioenergetics. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 5, n. 1–2, p. 47–53, 15 nov. 1974.

DECKER, A. Phenolics: Prooxidants or Antioxidants? **Nutrition Reviews**, v. 55, n. 11, p. 396–398, 27 abr. 2009. Doi: 10.1111/j.1753-4887.1997.tb01580.x

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 1, 30 jun. 2004.

DOS SANTOS, D. S.; RODRIGUES, M. M. F. Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 3, p. 29, 6 nov. 2017. Doi: 10.18468/estcien.2017v7n3.p29-35

**Entienda Sus Numeros**. Disponível em:

<[http://www.heart.org/HEARTORG/Conditions/HighBloodPressure/Entienda-Sus-Numeros\\_UCM\\_496809\\_SubHomePage.jsp#](http://www.heart.org/HEARTORG/Conditions/HighBloodPressure/Entienda-Sus-Numeros_UCM_496809_SubHomePage.jsp#)>. Acesso em: 16 jun. 2018.

ERLINGE, D.; BURNSTOCK, G. P2 receptors in cardiovascular regulation and disease. **Purinergic Signalling**, v. 4, n. 1, p. 1–20, mar. 2008. Doi: 10.1007/s11302-007-9078-7

FUKUMASU, H. et al. Fitoterápicos e potenciais interações medicamentosas na terapia do câncer. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 21, n. 2, p. 49–59, 2008.

FURSTENAU, C. R. **Sistema purinérgico em plaquetas de ratos adultos e interações com o sistema renina-angiotensina**. 2006. 77 f. Dissertação de mestrado - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

FURSTENAU, C. R. **Participação da Sinalização Purinérgica na Hipertensão Arterial Induzida por L-NAME**. 2010. 172 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants – quo vadis? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, n. 3, p. 125–130, mar. 2011.

HOSSAIN, M. A. et al. In vitro total phenolics, flavonoids contents and antioxidant activity of essential oil, various organic extracts from the leaves of tropical medicinal plant *Tetrastigma* from Sabah. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, n. 9, p. 717–721, set. 2011.

JANSEN, S. Proteolytic maturation and activation of autotaxin (NPP2), a secreted metastasis-enhancing lysophospholipase D. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. 14, p. 3081–3089, 15 jul. 2005. Doi: 10.1242/jcs.02438

JAQUES, J. A. S. et al. Lung and blood lymphocytes NTPDase and acetylcholinesterase activity in cigarette smoke-exposed rats treated with curcumin. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 1, n. 2, p. 109–115, abr. 2011. Doi: 10.1016/j.bionut.2011.02.003

KAWASHIMA, Y.; NAGASAWA, T.; NINOMIYA, H. Contribution of ecto-5J-nucleotidase to the inhibition of platelet aggregation by human endothelial cells. v. 96, n. 6, p. 7, 2000.

KIRKHAM, P.; RAHMAN, I. Oxidative stress in asthma and COPD: Antioxidants as a therapeutic strategy. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 111, n. 2, p. 476–494, ago. 2006. Doi: 10.1016/j.pharmthera.2005.10.015

LIM, S. S. et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **The Lancet**, v. 380, n. 9859, p. 2224–2260, dez. 2012. Doi: 10.1016/S0140-6736(12)61766-8

MALACHIAS, M. et al. Capítulo 1 - Conceituação, Epidemiologia e Prevenção Primária. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 107, n. 3, 2016.

OBOH, G. et al. Sorghum stem extract modulates Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, ecto-5'-nucleotidase, and acetylcholinesterase activities. **Comparative Clinical Pathology**, v. 25, n. 4, p. 749–756, jul. 2016. Doi: 10.1007/s00580-016-2259-4

OSSES, J. P. et al. Soluble NTPDase: An additional system of nucleotide hydrolysis in rat blood serum. **Life Sciences**, v. 74, n. 26, p. 3275–3284, maio 2004. Doi: 10.1016/j.lfs.2003.11.020

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4: p. 146-152, 2012.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Actions mediated by P2-purinoreceptor subtypes in the isolated perfused mesenteric bed of the rat. **British Journal of Pharmacology**, v. 95, n. 2, p. 637–645, out. 1988. Doi: 10.1111/j.1476-5381.1988.tb11686.x

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Involvement of purinergic signaling in cardiovascular diseases. **Drug News & Perspectives**, v. 16, n. 3, p. 133–140, abr. 2003.

REUTER, S. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 11, p. 1603–1616, dez. 2010. Doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006

ROBSON, S. C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signalling**, v. 2, n. 2, p. 409, 1 jun. 2006. Doi: 10.1007/s11302-006-9003-5

ROSA, C. S. D. **Perfil da atividade de ectonucleotidases e agregação plaquetária em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico**. 2010. 74 f. Dissertação para obtenção do título de mestre- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

RÜCKER, B. **Perfil bioquímico e molecular das ectonucleotidases no sistema cardiovascular de ratos diabéticos por estreptozotocina**. 2009. 192 f. Tese (Doutorado em Bioquímica)- Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

**SBH Sociedade Brasileira De Hipertensão - FAQ.** Disponível em: <<http://www.sbh.org.br/geral/faq.asp>>. Acesso em: 01 abr. 2018.

SCHMATZ, R. et al. Effects of resveratrol on nucleotide degrading enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. **Life Sciences**, v. 84, n. 11–12, p. 345–350, mar. 2009. Doi: 10.1016/j.lfs.2008.12.019

SILVA, B. F. **O bloqueio purinérgico no núcleo retrotrapezóide (RTN) atenua as respostas respiratórias promovidas pela ativação dos quimiorreflexos centrais e periférico em ratos.** 2015. 137 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

SILVEIRA, J. DA et al. Fatores associados à hipertensão arterial sistêmica e ao estado nutricional de hipertensos inscritos no programa Hiperdia. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 21, n. 2, p. 129–134, jun. 2013.

SOUSA, C. M. DE M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351–355, abr. 2007. Doi: 10.1590/S0100-40422007000200021

SPYCHALA, J.; ZIMMERMANN, A. G.; MITCHELL, B. S. Tissue-specific regulation of the ecto-5'-nucleotidase promoter. Role of the camp response element site in mediating repression by the upstream regulatory region. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 32, p. 22705–22712, 6 ago. 1999.

STEFAN, C.; JANSEN, S.; BOLLEN, M. Modulation of purinergic signaling by NPP-type ectophosphodiesterases. **Purinergic Signalling**, v. 2, n. 2, p. 361–370, jun. 2006. Doi: 10.1007/s11302-005-5303-4

STEFAN, C.; JANSEN, S.; BOLLEN, M. NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 30, n. 10, p. 542–550, out. 2005. Doi: 10.1016/j.tibs.2005.08.005

STRÄTER, N. Ecto-5'-nucleotidase: Structure function relationships. **Purinergic Signalling**, v. 2, n. 2, p. 343–350, jun. 2006. Doi: 10.1007/s11302-006-9000-8

THOMÉ, G. R. **Avaliação da atividade de ectonucleotidases e acetilcolinesterase em ratos expostos à fumaça de cigarro e nicotina.** 2012. 120 f. Tese para obtenção do título de doutor – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

TIBULO, E. P. S. et al. Avaliação da qualidade de folhas de pitangueira *Eugenia uniflora L* (Myrtaceae). **Anais do EVINCI - UniBrasil**, v. 2, n. 2, p. 444–456, 8 nov. 2016.

WETTASINGHE, M.; SHAHIDI, F. Evening primrose meal: a source of natural antioxidants and scavenger of hydrogen peroxide and oxygen-derived free radicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 5, p. 1801–1812, maio 1999.

WHELTON, P. K. et al. 2017

ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the

Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. **Hypertension**, v. 71, n. 6, p. e13–e115, jun. 2018. Doi: 10.1161%2FHYP.0000000000000065

WHITE, N.; BURNSTOCK, G. P2 receptors and cancer. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 27, n. 4, p. 211–217, abr. 2006. Doi: 10.1016/j.tips.2006.02.004.

YEGUTKIN, G. G. Kinetic analysis of enzymatic hydrolysis of ATP in human and rat blood serum. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 62, n. 6, p. 619–622, jun. 1997.

YEGUTKIN, G. G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1783, n. 5, p. 673–694, maio 2008. Doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.01.024

YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A. A. Determination of Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Rumex crispus* L. Extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 8, p. 4083–4089, ago. 2001.

YU, T.W.; ANDERSON, D. Reactive oxygen species-induced DNA damage and its modification: A chemical investigation. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 379, n. 2, p. 201–210, out. 1997.

ZIMMERMANN, H. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. **The Biochemical Journal**, v. 285, p. 345–365, 15 jul. 1992.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. **Drug Development Research**, v. 52, n. 1–2, p. 44–56, jan. 2001. Doi: 10.1002/ddr.1097