

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

DANIELE DE OLIVEIRA FREITAS

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO EXTRATO DE MANGABA (*Hancornia
speciosa* GOMES) E SEU EFEITO SOBRE A HIDRÓLISE DE
NUCLEOTÍDEOS EM SORO DE RATOS**

PATOS DE MINAS - MG JULHO DE 2018

DANIELE DE OLIVEIRA FREITAS

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO EXTRATO DE MANGABA (*Hancornia speciosa*
GOMES) E SEU EFEITO 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 - MG JULHO DE 2018
DANIELE DE OLIVEIRA FREITAS

Potencial antioxidante do extrato de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) e seu efeito 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:

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

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

Prof. Dr. Aulus Estevão Anjos de Deus Barbosa - IBTEC - UFU
Membro

Patos de Minas-MG, 06 de julho de 2018.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha mãe Carla, pela ajuda e esforço realizado para que este dia chegasse, além da sua compreensão, apoio constante e amor incondicional. Agradeço também minha irmã, pelos momentos de felicidade e calma proporcionados.

A minha querida orientadora, Profa. Dra. Cristina Ribas Fürstenau, pois além de compartilhar seu carinho e conhecimento, tornou a realização deste trabalho possível. Ao meu grupo de pesquisa em Bioquímica Vascular, principalmente ao Leonardo Oliveira, Janayne Silva e Douglas Oliveira pela ajuda e motivação para que o trabalho fosse concluído.

A todos os professores da faculdade a quem tive o prazer de conhecer e obter tamanho conhecimento ao longo desses quatro anos, acima de tudo aos membros desta banca examinadora, Professores Aulus Estevão e Joyce Guerra, pelo tempo disponível e apoio.

Aos meus queridos amigos Caio César, Amanda Brandão, Leticia Schiavon e Léo Biscassi, por estarem comigo nos momentos felizes e também nos difíceis desta etapa, acima de tudo por serem pessoas tão incríveis as quais tive oportunidade de conhecer e criar um laço tão forte.

Por fim agradeço aos demais amigos que estarão sempre em meu coração e também a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada a todos!

RESUMO

As doenças cardiovasculares são as principais causas de morte no mundo. A sinalização purinérgica é uma via de sinalização que tem importante papel na vasculatura, influenciando a agregação plaquetária, os processos inflamatórios e vários parâmetros da função cardíaca. Sabendo que a mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) possui diversas propriedades medicinais, como efeito antioxidante, anti-inflamatória e é popularmente utilizada para o tratamento da hipertensão, o objetivo deste estudo foi avaliar o conteúdo de fenóis totais e a atividade antioxidante do extrato etanólico das folhas da planta, bem como determinar seu efeito sobre a hidrólise de ATP, ADP e AMP em soro de ratos sobre. Primeiramente, o extrato foi obtido utilizando-se etanol como solvente. O conteúdo de fenóis totais do extrato, avaliado pelo método de FolinCiocalteu, variou de 250,10 a 514,77 mg Eq AG/ 100g⁻¹ amostra de acordo com as diferentes concentrações avaliadas (125, 250, 500 µg/mL). A capacidade antioxidante, medida pelo método do DPPH, foi similar ao antioxidante padrão (Trolox) em todas as concentrações testadas (0,05, 0,025, 0,5, 0,25 mg / mL). A hidrólise dos nucleotídeos foi avaliada na presença do extrato em diferentes concentrações (0, 125, 250, 500 µg/mL), a partir do método colorimétrico do verde de Malaquita, gerando resultados não significativos. Embora o resultado do efeito do extrato sobre a hidrólise dos nucleotídeos não tenha sido significativo no soro, os demais resultados do presente estudo evidenciaram que o extrato etanólico das folhas da mangabeira possui uma alta capacidade antioxidante, que por sua vez é responsável pela modulação de várias classes de enzimas. Tal potencial vem, em sua maioria, dos compostos fenólicos que estão ali presentes em elevada quantidade.

Palavras chave: Sinalização purinérgica. *Hancornia speciosa*. Mangaba. Atividade antioxidante. Compostos fenólicos. Plantas do Cerrado.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are the leading causes of death in the world. Purinergic signaling is a signaling pathway that shows an important role in the vasculature, influencing platelet aggregation, inflammatory processes and various parameters of cardiac function. Knowing that the mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) exhibits several medicinal properties as an antioxidant and anti-inflammatory plant and is also popularly used for the treatment of hypertension, the aim of this study was to evaluate the content of total phenols and the antioxidant activity of the ethanolic extract of the leaves of the plant as well as to determine the effect of such extract on the hydrolysis of ATP, ADP and AMP in rat blood serum. The extract was obtained from the leaves of the plant, using ethanol as a solvent. Total phenolic content was evaluated by FolinCiocalteu method and showed results varying from 250.10 to 514.77 mg Eq AG/ 100g¹ of sample in accordance to the different concentrations tested (125, 250, 500 µg/mL). Antioxidant capacity was measured by the DPPH method and the extract showed the same pattern as the control antioxidant (Trolox) in all tested concentrations (0.05, 0.025, 0.5, 0.25 mg/mL). Nucleotides hydrolyses were evaluated in the presence of mangaba extract in distinct concentrations (0, 125, 250, 500 µg/mL), using the colorimetric method of Malachit green, yielding non-significant results. Although no significant results were observed on the effect of the extract on nucleotides hydrolyses in rat blood serum, other results of the present study showed up that the ethanolic extract from mangabeira leaves presents a high antioxidant capacity, which is responsible by the modulation of different enzymes. This potential may be related to the phenolic compounds that are present in high amounts in this plant.

Keywords: Purinergic signaling. *Hancornia speciosa*. Mangaba. Antioxidant activity. Phenolic compounds. Cerrado plants.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP: Trifosfato de adenosina
ADP: Difosfato de adenosina
AMP: Monofosfato de adenosina
DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
E-NPP: Ecto-nucleotídeo pirofosfatase/ fosfodiesterase
ENTPDase: Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase
HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica
NO: Óxido nítrico
OMS: Organização Mundial da
Saúde pH: Potencial hidrogeniônico
rpm: Rotações por minuto μL :
Microlitros mg: Miligramas mL:
Mililitros
mmHg: Milímetros de mercúrio

SUMÁRIO 1 INTRODUÇÃO	Erro! Indicador não definido.
2 REFERENCIAL TEÓRICO	7
2.1. Sinalização Purinérgica	7
2.2. Nucleotídeos e Nucleosídeos Extracelulares	7
2.3. Receptores Purinérgicos	8
2.4. Ectonucleotidases	8
2.5. Sinalização Purinérgica e sua Ação na vasculatura	9
2.6. Compostos Fenólicos e Atividade Antioxidante	10
2.7. <i>Hancornia speciosa</i> Gomes	10
3 OBJETIVOS.....	11
3.1. Objetivo Geral	11
3.2. Objetivos Específicos	11
4 MATERIAL E MÉTODOS	11
4.1. Coleta de folhas de <i>H. speciosa</i>	11
4.2. Obtenção do extrato etanólico de folhas de <i>H. speciosa</i>	11
4.3. Determinação do conteúdo fenólico total em folhas de <i>H. speciosa</i>	12
4.4. Determinação da atividade antioxidante das folhas de <i>H. speciosa</i>	12
4.5. Obtenção e tratamento do soro sanguíneo de ratos com extrato de folhas de <i>H. speciosa</i>	13
4.5.1. Obtenção do soro	13
4.5.2. Tratamento <i>in vitro</i> do soro com extrato da mangaba (<i>Hancornia speciosa</i> Gomes)	13
4.6. Determinação da proteína dos soros	13
4.7. Avaliação das hidrólises de ATP, ADP e AMP em soro de ratos tratados <i>in vitro</i> com extratos de folhas de <i>H. speciosa</i>	14
4.8. Análise Estatística	14
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
6 CONCLUSÃO	20

1 INTRODUÇÃO

Uma das principais causas das doenças cardiovasculares é a hipertensão arterial sistêmica (HAS), sendo responsável pela morte de aproximadamente 300 mil brasileiros anualmente, deixando o Brasil na sexta colocação entre os países com a mais alta taxa de mortalidade por doenças cardíacas, infartos e hipertensão arterial (SBH, 2017). A HAS é considerada um estado clínico multifatorial, onde há a ocorrência de altos e constantes níveis de pressão arterial sistêmica (SKROVÁNKOVÁ et al., 2012).

A sinalização purinérgica tem importante papel na vasculatura, influenciando na agregação plaquetária, processos inflamatórios e na função cardíaca (ERLINGE; BURNSTOCK, 2009). Esta sinalização é mediada por purinas e constitui uma rota comum de comunicação celular, que influencia distintos processos fisiológicos e patológicos, visando sempre alcançar a homeostasia do organismo. (ABBRACCHIO, 2009). Ela é desempenhada pelos nucleotídeos e nucleosídeos, que atuam como sinalizadores extracelulares através da sua ligação a receptores específicos de membrana, chamados purinoceptores, podendo estes ser do tipo P1 ou P2 (BURNSTOCK; KNIGHT, 2004).

A sinalização desempenhada pelos nucleotídeos e nucleosídeos precisa ser finalizada e regulada. Para isso, estes são hidrolisados através de uma cascata enzimática. As ectonucleotidases são responsáveis por esta hidrólise, nas quais se incluem a família das E-NTPDases (ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases), ENPPs (ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterases), fosfatases alcalinas e ecto-5' nucleotidase (ZIMMERMANN, 2000).

Diferentes estudos têm buscado esclarecer os mecanismos celulares e moleculares de atuação das plantas medicinais, amplamente utilizadas pela população no tratamento de distintas patologias. Entendemos como plantas medicinais aquelas que possuem, em sua composição físico-química, propriedades terapêuticas capazes de preservar a saúde, tratar doenças e restaurar o bem-estar do ser humano (ALVIN et al, 2006, ALMEIDA, 2011). Nesse cenário, as frutas do Cerrado estão ganhando popularidade no mercado devido aos seus sabores agradáveis e também ao seu valor nutritivo e terapêutico (LIMA et al, 2015).

Com isso, sabendo que a mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) possui diversas propriedades medicinais e que algumas de suas partes, tais como casca, raiz, folhas e fruto são popularmente utilizadas para o tratamento da hipertensão arterial e os processos inflamatórios (FERREIRA et al., 2007, LIMA et al., 2015, MARINHO et al., 2011), e,

ainda, que a sinalização pelos nucleotídeos está envolvida em muitos destes processos biológicos, nossa hipótese é de que a sinalização purinérgica está envolvida nos efeitos anti-hipertensivos e anti-inflamatórios exibidos pela *H. speciosa*. O estudo dessa planta pode ser bastante promissor na busca de novas alternativas aos tratamentos associados à elevação da pressão arterial, relacionados à modulação da atividade das ectonucleotidasas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Sinalização Purinérgica

É bem definido que o ATP (trifosfato de adenosina) é fonte de energia intracelular e está envolvido em diversos processos metabólicos como o Ciclo de Krebs (BURNSTOCK, 2016). Somente em 1970, entretanto, o papel do ATP como molécula de sinalização intercelular e a sinalização purinérgica foram inicialmente sugeridos, quando este foi identificado como transmissor no sistema nervoso autônomo. Em 1972, o conceito de nervos purinérgicos e transmissão purinérgica foram reformulados e é amplamente aceito na atualidade (BURNSTOCK, 1972).

A sinalização purinérgica está envolvida em muitas vias metabólicas. Ela é entendida como uma rota comum de comunicação célula-célula, sendo o mecanismo pelo qual nucleotídeos e nucleosídeos atuam como moléculas de sinalização no meio extracelular. Esta sinalização está envolvida em muitos mecanismos, tanto neuronais, quanto não neuronais. (BURSTOCK, 2002, BURNSTOCK, 2011, VAUGHN; ROBSON; LONGHI, 2014). Este tipo de sinalização também está envolvida no remodelamento vascular; estimula a agregação plaquetária; regula a coagulação sanguínea, inflamação, desempenha um papel fundamental na proliferação, diferenciação, apoptose, síntese de lipídeos e regeneração celular (BURNSTOCK, 2009, STAGG; THOMPSON; DWYER, 2012).

2.2. Nucleotídeos e Nucleosídeos Extracelulares

O ATP participa de vários processos celulares, sendo a principal fonte de energia celular. Contudo, os nucleotídeos purínicos (ATP, ADP), pirimidínicos (UTP e UDP) e o nucleosídeo adenosina destacam-se também por atuarem como moléculas sinalizadoras no ambiente extracelular. Para isto, as purinas, que se encontram no interior celular, precisam ser liberadas para o exterior das células.

Embora tenha sido afirmado que as fontes de nucleotídeos extracelulares seriam injúria e a morte celular, atualmente acredita-se que células endoteliais, uroteliais, odontoblastos, osteoblastos, células do sistema imune, dentre outros tipos, sejam são capazes de liberar estas moléculas por diversas vias, como canais de liberação de ATP, exocitose vesicular, transportadores de nucleotídeos e frente a condições de estresse, como dano celular (BURNSTOCK, 2009, DI VIRGILIO, 2012, SCHMID et al., 2015, STELLA et al., 2010).

2.3. Receptores Purinérgicos

No ambiente extracelular, os nucleotídeos e nucleosídeos se ligam a receptores purinérgicos, chamados purinoreceptores, para completar sua ação sinalizadora. Estes receptores se encontram distribuídos por todo o organismo e, em situações fisiopatológicas, a liberação de ATP e a expressão dos receptores purinérgicos pelas células são consideravelmente aumentadas (BURNSTOCK, 2006).

Estes são compreendidos pela família P2R, a qual é dividida em duas classes (P1 e P2) conforme seu ligante. Os receptores do tipo P1 são acoplados à proteína G e respondem exclusivamente à adenosina, enquanto que os receptores P2 ligam-se as moléculas ATP, ADP, UTP, UDP e UDP-glicose (BURNSTOCK, 2006). Os receptores P1 são compostos por quatro subtipos A₁, A_{2A}, A_{2B}, e A₃. Os receptores P2 ainda são subdivididos em ionotrópicos (P2X) em que o ATP é o único ligante, e metabotrópicos (P2Y), os quais são responsivos a purinas e pirimidinas. (BURNSTOCK, 2009, ROCKENBACH et al., 2014).

2.4. Ectonucleotidases

Uma vez liberados no espaço extracelular, os nucleotídeos podem ser metabolizados pela ação das enzimas ectonucleotidases. Estas se encontram ancoradas na membrana plasmática das células, as quais são responsáveis pela hidrólise de ATP extracelular em ADP, AMP e adenosina, a fim de controlar a concentração destas moléculas no meio extracelular (FÜRSTENAU, 2010, BURNSTOCK, 2009, SILVA et al., 2015, STAGG; THOMPSON; DWYER, 2012). O grupo das ectonucleotidases é composto pelas famílias E-NTPDase (ecto-nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase), ENPP (ecto-nucleotídeo pirofosfatase/ fosfodiesterase), fosfatase alcalina (ALP) e ecto5'-nucleotidase (FÜRSTENAU, 2010).

A família das E-NTPDases é composta por 8 membros (E-NTPDase 1-8), as quais são capazes de hidrolisar os fosfatos γ e β dos nucleosídeos di e trifosfatados, sendo as E-NTPDases 1, 2, 3 e 8 situadas na membrana externa da célula, hidrolisando ATP e ADP extracelulares a AMP (BURNSTOCK, 2006, ZIMMERMANN, 2012, ZIMMERMANN, 1992). As ectonucleotidases da família E-NPP também se encontram na superfície da membrana plasmática e são constituídas por um grupo de 7 elementos (E-NPP 1-7), contudo, apenas os membros E-NPP1, 2 e 3 atuam como moduladores do sistema purinérgico sendo responsáveis pela hidrólise das ligações fosfodiésteres e pirofosfatos dos nucleotídeos (CAPPELLARI, 2012, ZIMMERMANN, 2009).

As fosfatases alcalinas são consideradas um grupo expressivo na catálise de AMP em adenosina assim como as ecto-5'-nucleotidases. Esta classe é formada por apenas quatro enzimas que ainda podem participar da hidrólise de outros nucleotídeos extracelulares, tais como ATP, ADP e PPi, o que caracteriza sua importância no contexto da sinalização purinérgica (CAPPELLARI, 2012, ZIMMERMANN, 1992).

2.5. Sinalização Purinérgica e sua Ação na vasculatura

No sistema vascular, quando ATP é liberado como um neurotransmissor de nervos simpáticos, vincula-se aos receptores P2X de células musculares lisas, ocasionando a vasoconstrição. Porém, quando liberado pelas células endoteliais, se liga aos receptores P2Y, causando a vasodilatação (FÜRSTENAU, 2010). Além de vasoconstrição e vasodilatação, os nucleotídeos do meio extracelular estão envolvidos com processos de angiogênese, agregação plaquetária, regulação da coagulação e processos inflamatórios (RALEVIC; BURNSTOCK, 2003, BURNSTOCK, 2002).

Entre as classes de ectonucleotidases, as E-NTPDases, além de inibir a agregação plaquetária, podem também controlar o tônus vascular em combinação com a ecto-5'-nucleotidase, que hidrolisa o AMP à adenosina, a qual tem reconhecida ação vasodilatadora (FONTELLA, 2005). As ectonucleotidases estão comumente ancoradas à membrana plasmática das células, porém, estas podem existir também sob as formas clivada e solúvel. Este fato permite que estas enzimas sejam capazes de circular através do sangue e controlar a homeostasia das purinas também neste ambiente (FÜRSTENAU, 2010).

2.6. Compostos Fenólicos e Atividade Antioxidante

O consumo de frutas tropicais tem aumentado nos últimos anos, pois, além de seu valor nutricional, os frutos são reconhecidos como grande fonte de compostos bioativos, dando a elas um possível caráter medicinal (RUFINO et al, 2010, SOUZA et al, 2012). As moléculas bioativas obtidas de plantas e seus potenciais curativos já são amplamente documentados. Estudos recentes mostraram que um grande número de produtos fitoterápicos, incluindo substâncias polifenólicas, pode ser considerado como o mais abundante dos metabolitos secundários de plantas com estruturas altamente diversificadas (XU, 2012, LAHMAR et al., 2017).

Compostos fenólicos possuem forte atividade antioxidante, que está positivamente associada à proteção contra o estresse oxidativo no organismo. Este estresse ocorre no corpo humano quando as espécies reativas de oxigênio estão em desequilíbrio com os antioxidantes ali presentes. Esses compostos foram associados a doenças cardiovasculares, distúrbios neurológicos, câncer, diabetes e também com doenças crônico-degenerativas (VALKO et al., 2007, ALMEIDA et al., 2011, CLERICI; CARVALHO, 2011).

2.7. *Hancornia speciosa* Gomes

A *Hancornia speciosa* Gomes, membro da família Apocynaceae, popularmente conhecida como "mangabeira", é uma espécie vegetal encontrada no Cerrado brasileiro, distribuindo-se por todo o Centro-Oeste, Sudeste, Norte e Nordeste do Brasil. Seu fruto, amangaba, é comumente utilizado para a produção de sorvetes, biscoitos, calda, suco, vinho, licor, geleia, compotas de frutas, álcool e vinagre (CLERICI; CARVALHO, 2011, MORAES et al, 2008, SILVA et al, 2016). Ainda, a mangaba é fonte de vários elementos essenciais da nossa dieta como ácido ascórbico, cálcio, zinco, ferro e carotenóides, tais como β -caroteno, β -criptoxantina, α -tocoferol e α -, β - e γ -tocotrienóis (LIMA et al, 2015). Na medicina tradicional, suas folhas têm atividades anti-hipertensiva, vasodilatadora, anti-inflamatória e antidiabética. Sua casca tem atividades antidiabética, anti-obesidade, antimicrobiana e gastroprotetora. Ainda, é utilizada como tratamento para hipertensão, distúrbios estomacais, doenças inflamatórias, dermatose, diabetes, doenças hepáticas e como agente anti-inflamatório. Suas raízes possuem atividade antihipertensiva e cicatrizante, sendo aproveitadas para tratar reumatismo e hipertensões. Além disso, o látex, que tem atividade anti-inflamatória, vem sendo usado para tratar doenças

relacionadas com a infecção fúngica, tuberculose e úlceras (FERREIRA et al, 2015, LIMA et al, 2015, MARINHO et al, 2011, MORAES et al, 2008, PEREIRA et al., 2015).

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a capacidade antioxidante e o efeito do extrato etanólico da *Hancornia speciosa* Gomes (mangabeira) sobre a hidrólise de nucleotídeos em soro de ratos.

3.2. Objetivos Específicos

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

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta de folhas de *H. speciosa*

A identificação da planta foi realizada pela profa. Dra. Terezinha Aparecida Teixeira. As amostras de folhas da *H. speciosa* foram localizadas e coletadas no município de Patrocínio, no estado de Minas Gerais, Brasil (latitude 18° 56' 38" S, longitude 46° 59' 33" W). Após a coleta, as folhas foram devidamente lavadas, congeladas a -80 °C e então liofilizadas, trituradas e mantidas em temperatura ambiente até o uso.

4.2. Obtenção do extrato etanólico de folhas de *H. speciosa*

A preparação do extrato foi realizada com a amostra triturada previamente. Foi pesado 30 g deste produto e extraído com o solvente EtOH 96% (3 x 30 mL) sob sonicação (3 x 15 min). A mistura obtida foi submetida à filtração para que todas as partículas indesejadas fossem separadas. O solvente foi então removido à vácuo em um rotaevaporador (Marca: Fisatom. Modelo: 802) a 55 °C, fornecendo um extrato bruto escuro. O rendimento do extrato foi determinado pela seguinte equação:



4.3. Determinação do conteúdo fenólico total em folhas de *H. speciosa*

Através de método espectrofotométrico, utilizando o reagente Folin-Ciocalteu, foi realizada a determinação do conteúdo fenólico total extrato etanólico obtido anteriormente. Esta etapa foi desempenhada segundo metodologia descrita por Wettasinghe e Shahidi (1999) e curva padrão de ácido gálico, sendo analisados em espectrofotômetro a 760 nm. Os resultados estão expressos em miligramas de fenólicos totais equivalente de ácido gálico por grama do extrato.

4.4. Determinação da atividade antioxidante das folhas de *H. speciosa*

A metodologia para determinar a capacidade antioxidante foi baseada no estudo de Brand-illiams, Cuvelier e Berset (1995), o qual utiliza como padrão o ácido 6hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcRome-2-carboxílico (Trolox) na capacidade de eliminar o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). Resumidamente, 975 µL de solução de DPPH (60 µM), dissolvido em metanol 80%, foram adicionados a 25 µL da solução da amostra (extrato etanólico das folhas de mangaba) (5 mg/ mL) em diversas concentrações (0,025; 0,05; 0,25; 0,5 mg / mL). A mudança de cor do violeta para o amarelo claro ocorreu após 30 min de incubação no escuro, tendo sua absorbância medida a 517 nm no espectrofotômetro, utilizando o metanol 80% para zerar o aparelho. O Trolox (100 - 800 µmol / L) foi utilizado como referência correspondendo a 100% de atividade inibidora de radicais. O percentual de inibição é determinado de acordo com a seguinte equação:



4.5. Obtenção e tratamento do soro sanguíneo de ratos com extrato de folhas de *H. speciosa*

4.5.1. Obtenção do soro

Para obtenção do soro, foram utilizados ratos *Wistar* machos de aproximadamente 60 dias de idade, pesando cerca de 250 gramas, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($\pm 24^{\circ}\text{C}$) e luz (ciclo claro/ escuro 12h/ 12 h, com as luzes acesas entre 7 e 19 h). Ainda, os ratos receberam água e ração para ratos *ad libitum*. As amostras de sangue foram colhidas após a eutanização por decapitação dos animais, como descrito por Yegutkin (1997), e foram rapidamente centrifugadas em tubos plásticos, a 5000 rpm por 15 minutos a 20°C . As amostras séricas obtidas foram, em seguida, armazenadas congeladas até serem utilizadas nos experimentos. Todos os protocolos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da UFU (Número do protocolo: 067/15).

4.5.2. Tratamento *in vitro* do soro com extrato da mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes)

Para avaliar o efeito do extrato das folhas de mangaba sobre a hidrólise dos nucleotídeos no soro de ratos, diferentes concentrações (0, 125, 250, 500 $\mu\text{g/mL}$) do extrato etanólico das folhas de mangaba foram adicionados ao meio de reação durante a pré-incubação (10 minutos) para posterior avaliação das atividades de hidrólise de ATP, ADP e AMP, conforme descrito a seguir.

4.6. Determinação da proteína dos soros

A proteína total dos soros foi determinada pelo método do Coomassie Blue, utilizando albumina bovina sérica como padrão (Bradford, 1976). Na preparação do soro para o experimento, este foi diluído em 40 vezes com água mili-Q. Feito isto, foi pego 50 μL desta diluição e adicionados 2500 μL do reagente Coomassie Blue. A leitura foi realizada no espectrofotômetro, a 595 nm. Tal quantificação é fundamental para o cálculo das atividades enzimáticas.

4.7. Avaliação das hidrólises de ATP, ADP e AMP em soro de ratos tratados *in vitro* com extratos de folhas de *H. speciosa*

As hidrólises de ATP, ADP e AMP foram determinadas usando colorimétrico do verde de Malaquita, descrito por Chan e colaboradores (1986). A mistura de reação utilizada foi composta por 50 mM TrisHCl, pH 8,0, 20 µL do soro (exceto nos controles, a fim de corrigir a hidrólise não enzimática) e o extrato etanólico das folhas de mangaba em diferentes concentrações (0, 125, 250, 500 µg/mL). De início, foi realizada uma pré-incubação de 10 minutos à temperatura de 37 °C em banho maria, momento em que foi adicionado o extrato da planta nas diferentes concentrações testadas. As reações foram iniciadas pela adição de 60 µL dos nucleotídeos (ATP, ADP, AMP) com intervalos de 20 segundos entre cada microtubo. Os ensaios enzimáticos foram terminados após 40 minutos de incubação, ainda a 37 °C. A reação foi interrompida pela adição de 200 µL de TCA (5%), também com intervalo de 20 segundos entre cada microtubo e, por fim, as amostras foram colocadas no gelo para melhor interrupção da reação. Após serem adicionados os 20 µL do soro nos controles, os microtubos foram submetidos à centrifugação de 5000 rpm por 5 minutos, então uma alíquota do sobrenadante foi retirada e feita uma diluição de 10 vezes com água mili-Q.

Ao fim do experimento, foram adicionados 1000 µL do reagente colorimétrico verde de Malaquita, e os ensaios foram lidos a 630 nm, a fim de detectar os fosfatos inorgânicos (Pi) livres. A atividade enzimática foi expressa como nanomoles de Pi liberado por minuto por miligrama de proteína. Os tempos de incubação e concentração de proteínas foram escolhidos para assegurar a linearidade da reação.

4.8. Análise Estatística

Com base nos resultados dos experimentos, foram calculadas a média e desvio padrão (D.P.) de cada grupo. A comparação entre os grupos será aplicada através de análise de variância de uma via (oneway ANOVA). As diferenças serão consideradas significativas quando a análise estatística apresentar $P \leq 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O rendimento do extrato etanólico feito a partir das folhas de mangabeira foi de 47,3%, de acordo com o cálculo citado anteriormente.

Os extratos de plantas são produtos que tem naturalmente composições químicas complexas. A composição química dos extratos de folhas da mangabeira é dada pelos seguintes componentes: ciclitóis, como o bornesitol, o quínico e os ácidos clorogênicos; flavonóides, tais como rutina, diglicósido de kaempferol e triglicósido de kaempferol; e triterpenos e esteróides, tais como, amirina, lupeol, sitosterol, obtusalina e eritrodiol (PEREIRA et al., 2015, NEVES et al., 2016, ENDRINGER; PEZZUTO; BRAGA, 2009). Esses compostos são responsáveis pela atividade biológica dos extratos e podem agir sozinhos ou sinergicamente. As quantidades de flavonoides totais e compostos fenólicos em produtos naturais são parâmetros importantes a serem considerados na avaliação da qualidade e potencial biológico dos produtos naturais (MOREIRA et al., 2008).

Entre os principais compostos químicos responsáveis pelas atividades antioxidantes das plantas medicinais, os compostos fenólicos e os flavonoides, como citado anteriormente, são os mais proeminentes devido ao seu papel contra o estresse oxidativo. Os compostos fenólicos são doadores de hidrogênio capazes de capturar diretamente os radicais livres e reduzir o dano oxidativo, o que os torna potentes antioxidantes. (SANTOS et al., 2016). O dano oxidativo é considerado um evento importante no desenvolvimento de algumas doenças, como doenças cardiovasculares; consequentemente, muitas investigações científicas têm sido focadas no possível papel dos antioxidantes naturais em retardar ou suprimir o estresse oxidativo e seus efeitos secundários, como a modulação de atividades enzimáticas (SRINIVASAN, 2013). Já foi descrito que a concentração de compostos fenólicos totais no extrato etanólico a partir das folhas de *H. speciosa* foi maior que no extrato da fruta (ALMEIDA et al., 2011), justificando a escolha das folhas feita para nosso estudo. Além disso, a alta solubilidade de fenóis em solventes polares fornece uma alta concentração desses compostos nos extratos (MOHSEN; AMMAR, 2009). Sabendo disso, o extrato preparado foi submetido à determinação da capacidade antioxidante e também dos compostos fenólicos totais.

O conteúdo de fenóis totais presente no extrato, cujo ensaio está representado na Figura 1, foi proporcional e decrescente de acordo com o incremento nas concentrações testadas, como mostrado na Tabela 1. O uso de diferentes protocolos de extração e métodos distintos para medir o conteúdo fenólico dificulta a comparação entre dados de diferentes artigos.

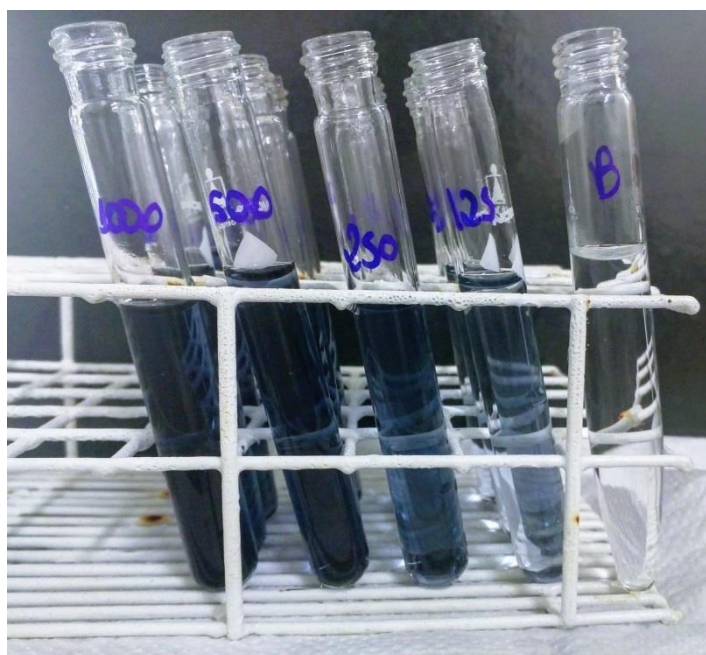


Figura 1 – Ensaio representativo para determinação de fenóis totais das folhas de *H. speciosa* por meio do reagente de Folin-Ciocalteu.

Tabela 1 – Conteúdo de compostos fenólicos totais no extrato etanólico das folhas de *H. speciosa*.

Extrato de <i>H. speciosa</i>	Conteúdo fenólico (mg Eq AG / 100g ⁻¹ amostra)
125 µg/mL	4,95 ± 0,17
250 µg/mL	10,16 ± 0,34
500 µg/mL	18,41 ± 0,16
1000 µg/mL	24,53 ± 0,12

Seguindo o método DPPH, a porcentagem da capacidade antioxidante por inibição do radical DPPH em diferentes concentrações do extrato e o reconhecido antioxidante Trolox, utilizado como controle positivo, é mostrada na Figura 2. O extrato etanólico foi testado a partir de diluições (5, 10, 50 e 100 vezes) feitas de uma solução mãe (5 mg/ mL), rendendo as concentrações 0,05, 0,025, 0,5, 0,25 mg / mL. Assim como verificado para o conteúdo total de fenóis, houve um aumento da capacidade antioxidante proporcional às crescentes concentrações do extrato. Os altos valores de porcentagem da atividade máxima de eliminação do radical livre são condizentes com outros estudos presentes na literatura. No entanto, assim como no teste para a avaliação de fenóis, a diferença entre

as metodologias, condições experimentais utilizadas nos diferentes estudos e as unidades de expressão dos resultados dificulta a comparação dos resultados obtidos neste trabalho (DUTRA et al., 2017, SANTOS et al., 2016).

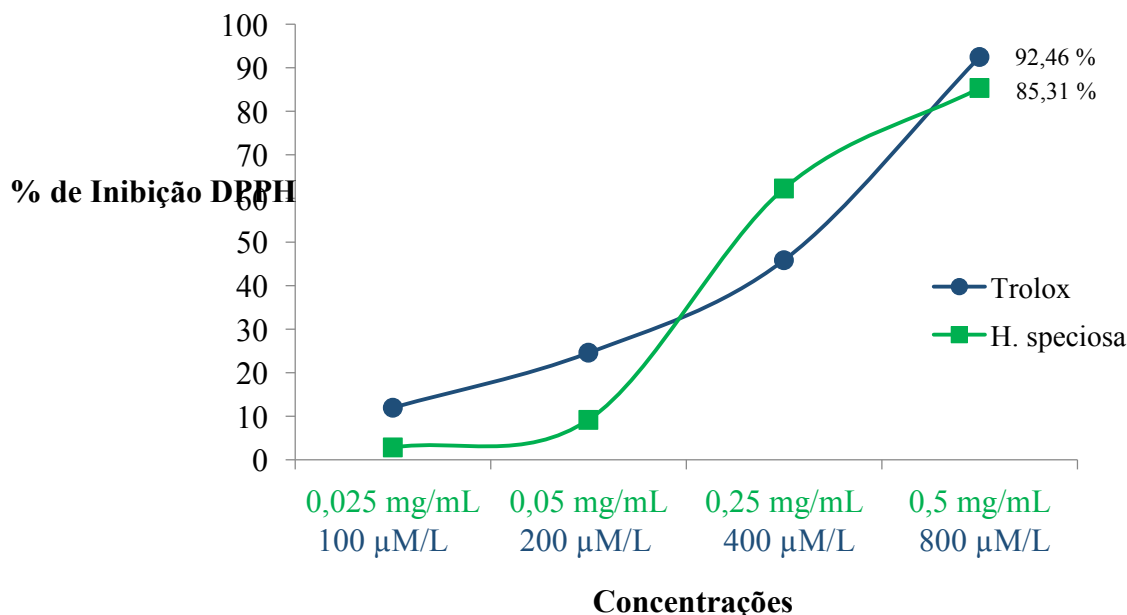


Figura 2 - Porcentagem de inibição do radical DPPH pelo extrato de *H. speciosa* e pelo Trolox (antioxidante padrão).

A Figura 3 mostra um experimento representativo de avaliação das atividades de hidrólise dos nucleotídeos, feita a partir do ensaio colorimétrico utilizando o reagente verde de Malaquita. A intensidade da cor verde é proporcional à quantidade de produto (fosfato inorgânico) formada. Com relação ao efeito do extrato sobre as hidrólises de nucleotídeos, não houve diferença estatisticamente significativa ($P \leq 0,05$) na ausência ou na presença de extrato de mangaba em qualquer concentração testada (125, 250 e 500 µg / mL) (Figuras 4, 5 e 6). Este resultado, embora não tenha sido significativo, abre portas a teorias explicativas e para possíveis novos estudos, como a diferença entre as metodologias, condições experimentais utilizadas no preparo do extrato e frações biológicas testadas, uma vez que a modulação do tônus vascular pela mangaba já é conhecido (FERREIRA et al., 2007). Há também a possibilidade de utilização de outras frações do extrato, obtidas com outros solventes e, portanto, com a separação de moléculas distintas, para realização do estudo em questão, assim como a utilização de compostos isolados já conhecidos na composição da planta.

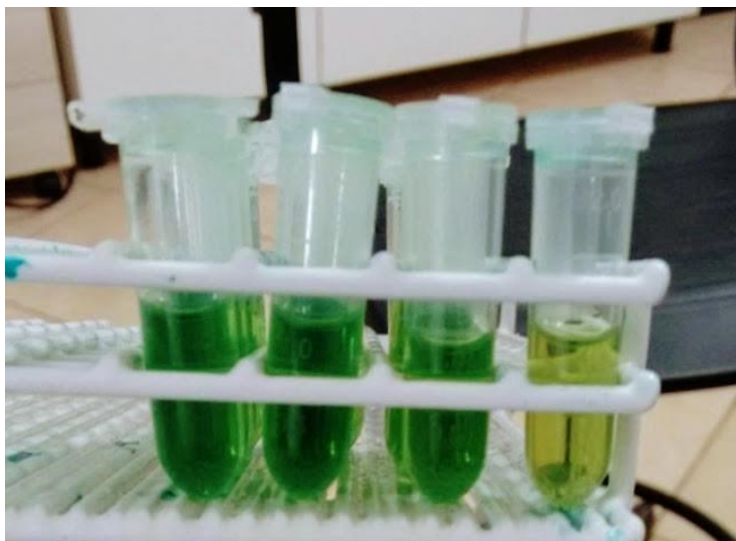


Figura 3 – Ensaio representativo de avaliação das hidrólises de ATP, ADP e AMP em soro de ratos submetidos ao tratamento com extratos de folhas de *H. speciosa* nas concentrações 0, 125, 250 e 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A intensidade da cor verde é proporcional à quantidade de produto (fosfato inorgânico) formada.

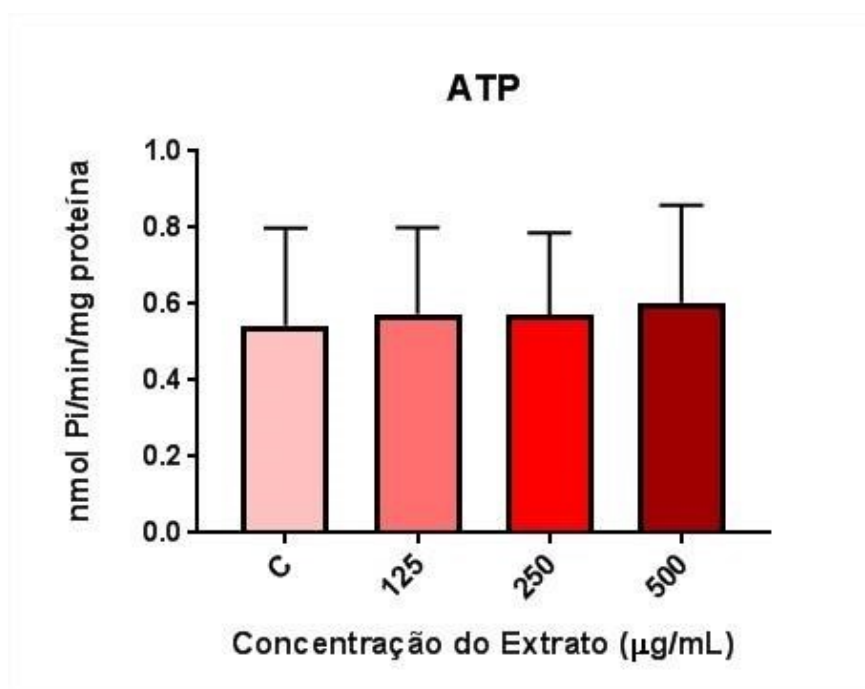


Figura 4 - Efeito do tratamento com extrato das folhas de *Hancornia speciosa* na hidrólise de ATP em soro sanguíneo de ratos. Os resultados são expressos como médias $\pm$ DP, $n = 3$. A comparação entre os grupos foi analisada por análise de variância unidirecional (ANOVA), $P \leq 0,05$.

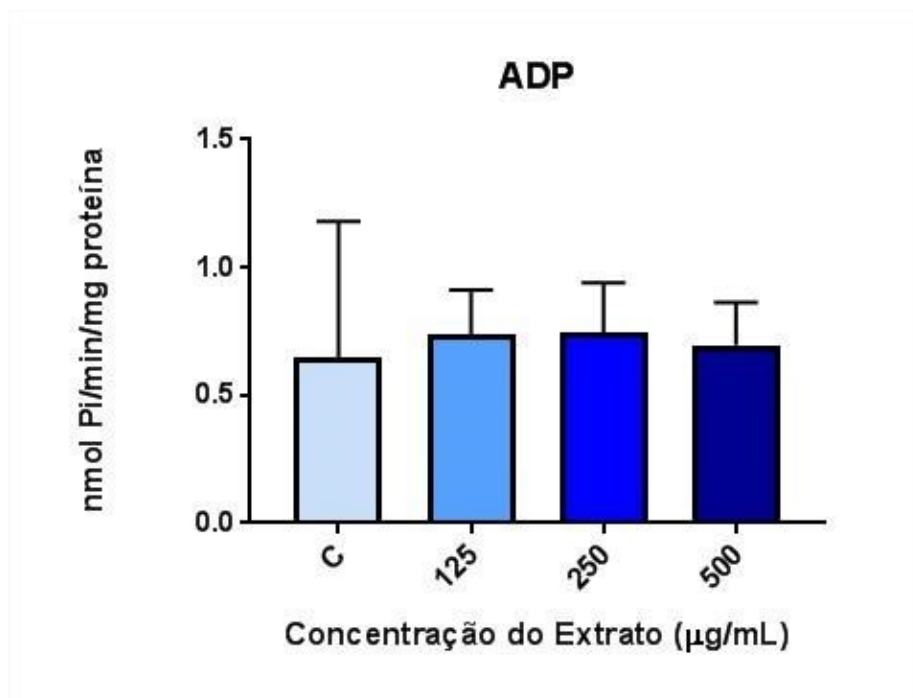


Figura 5 - Efeito do tratamento com extrato das folhas de *Hancornia speciosa* na hidrólise de ADP em soro sanguíneo de ratos. Os resultados são expressos como médias $\pm$ DP, $n = 3$. A comparação entre os grupos foi analisada por análise de variância unidirecional (ANOVA), $P \leq 0,05$.

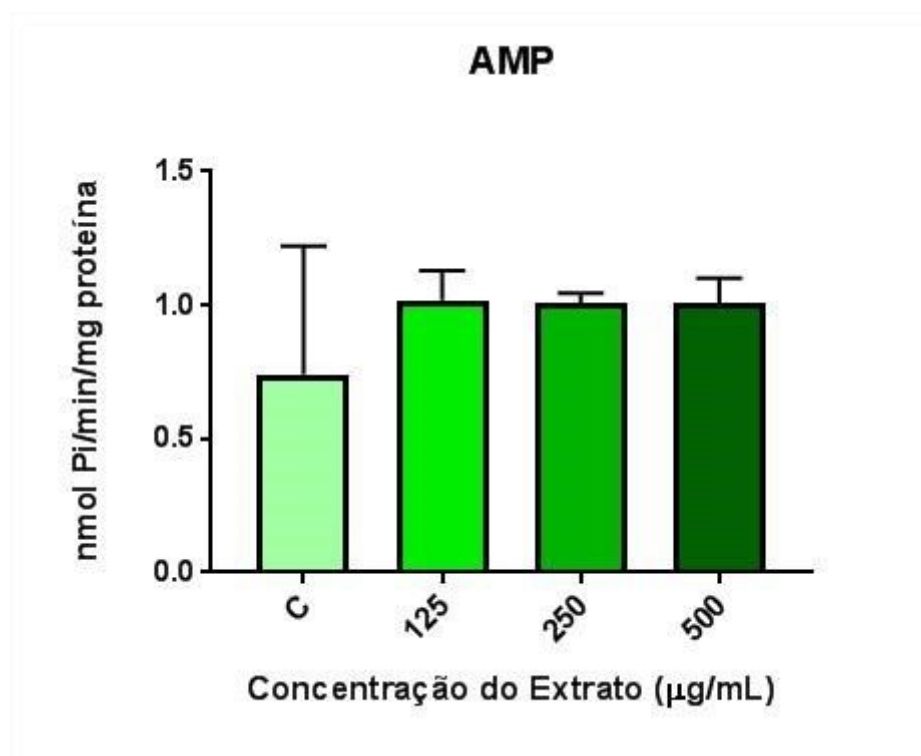


Figura 6 - Efeito do tratamento com extrato das folhas de *Hancornia speciosa* na hidrólise de AMP em soro sanguíneo de ratos. Os resultados são expressos como médias

± DP, n = 3. A comparação entre os grupos foi analisada por análise de variância unidirecional (ANOVA), $P \leq 0,05$.

É conhecido que o extrato etanólico da mangabeira apresenta um potencial efeito anti-hipertensivo, tendo como base a redução do nível plasmático de angiotensina II; redução da resistência periférica induzida pela inibição da enzima conversora de angiotensina I; aumento na produção de óxido nítrico (NO) pelo endotélio via a ativação da fosfatidil inositol 3-quinase (PI3K); pela redução do nível plasmático de angiotensina II e mecanismo de aumento da produção de H_2O_2 nas artérias mesentéricas de camundongos hipertensos (BASTOS et al., 2017, SILVA et al., 2011, SILVA et al., 2016). Outros estudos demonstram que o extrato da planta induz uma potente vasodilatação na artéria mesentérica superior de rato através de um mecanismo dependente da produção de NO, na ativação de canais de potássio, devido ao flavonoide rutina, que contribui para o efeito vasodilatador, promovendo a inibição da peroxidação lipídica no tecido cardíaco de ratos submetidos ao estresse oxidativo (FERREIRA et al., 2007). Sabendo que as artérias musculares menores desempenham um papel significativo na regulação da pressão arterial, o efeito vasodilatador do extrato de *H. speciosa* corrobora o uso tradicional da planta no tratamento da hipertensão (FERREIRA et al., 2007).

Os resultados descritos acima, pelos estudos de outros pesquisadores, suportam o uso da *Hancornia speciosa* pela medicina tradicional como anti-hipertensivo. No presente trabalho a hidrólise dos nucleotídeos foi testada nas ectonucleotidases circulantes porque elas podem contribuir para uma alteração na concentração das purinas presentes no soro, as quais podem interagir com os receptores localizados nas células das paredes dos vasos sanguíneos e promover vasodilatação ou vasoconstrição, além de interagirem também com plaquetas e células do sistema imune. Para um futuro estudo, uma avaliação da hidrólise nas células das paredes dos vasos, como células endoteliais e musculares lisas, cuja atividade das ectonucleotidases impacta de maneira preponderante sobre a concentração de purinas na circulação, devem ser levadas em consideração para uma abordagem completa da possível ação da mangabeira na sinalização purinérgica.

6 CONCLUSÃO

Embora o resultado das hidrólises dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP não tenha sido significativo, os demais resultados do estudo em questão mostrou que o extrato etanólico das folhas da mangabeira possui uma alta capacidade antioxidante, que por sua vez é

responsável pela modulação de várias classes de enzimas. Tal potencial vem, em sua maioria, dos compostos fenólicos que estão ali presentes em elevada quantidade. O presente estudo, portanto, também abre portas para questões que podem ser abordadas em novos trabalhos, utilizando frações diferentes do extrato ou até mesmo compostos isolados conhecidos da planta, para avaliar seu comportamento na hidrólise dos nucleotídeos em outras frações biológicas, tais como as células das paredes dos vasos, responsáveis pela modulação do tônus vascular e da pressão arterial.

REFERÊNCIAS

- ABBRACCHIO, M. P. et al. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. **Trends In Neurosciences**, v. 32, n. 1, p.19-29, jan. 2009.
- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 114-140, mar 2007.
- ALMEIDA, M. M. B. et al. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Food Research International**, [s.l.], v. 44, n. 7, p.2155-2159, ago. 2011.
- ALVIM, N. A. T. et al. The use of medicinal plants as a therapeutical resource: from the influences of the professional formation to the ethical and legal implications of its applicability as an extension of nursing care practice. **Revista Latino-americana de Enfermagem**, v. 14, n. 3, p. 316-323, jun 2006.
- CHAN, K. M.; DELFERT, D.; JUNGER, K. D. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. **Analytical Biochemistry**, [s.l.], v. 157, n. 2, p.375-380, set. 1986.
- BASTOS, K. et al. Identification of Phenolic Compounds from *Hancornia speciosa* (Apocynaceae) Leaves by UHPLC Orbitrap-HRMS. **Molecules**. v. 22, n. 1, p.143154, 15 jan. 2017.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.; 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.
- BURNSTOCK, G. Vessel tone and remodeling. **Nature Medicine**, v. 12, n. 1, p. 16-17, jan 2006.
- BURNSTOCK, G. Purinergic signaling in the gastrointestinal tract. **World Journal Of Gastrointestinal Pathophysiology**, v. 2, n. 2, p. 31-34, 2011.

BURNSTOCK, G; KNIGHT, G. E. Cellular Distribution and Functions of P2 Receptor Subtypes in Different Systems. **International Review Of Cytology**, n. 240, p.31-304, 2004.

BURNSTOCK, G. Purinergic regulation of vascular tone and remodelling. **Autonomic And Autacoid Pharmacology**, v. 29, n. 3, p. 63-72, jul 2009.

BURNSTOCK, G. Purinergic nerves. **Pharmacol Rev**, v. 24, n. 3, p. 509-581. 1972.

BURNSTOCK, G. Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**. v. 22, n. 3, p. 364-373, 2002.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. **Journal Of Ethnopharmacology**. v. 100, n. 1-2, p. 131-134, ago 2005.

CAPPELLARI, A. R. et al. Characterization of Ectonucleotidases in Human Medulloblastoma Cell Lines: ecto-5'NT/CD73 in Metastasis as Potential Prognostic Factor. **Plos One**. v. 7, n. 10, p. 158-179, out 2012.

CLERICI, M. T. P. S.; CARVALHO, L. B. S. Nutritional bioactive compounds and technological aspects of minor fruits grown in Brazil. **Food Research International**. v. 44, n. 7, p. 1658-1670, ago 2011.

DI VIRGILIO, F. Purines, Purinergic Receptors, and Cancer. **Cancer Research**. v. 72, n. 21, p.5441-5447, out. 2012

DUTRA, R. L. T. et al. Bioaccessibility and antioxidant activity of phenolic compounds in frozen pulps of Brazilian exotic fruits exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**. v. 100, p.650-657, 2016.

ENDRINGER, D. C.; PEZZUTO, J. M.; BRAGA, F. C. NF- κ B inhibitory activity of cyclitols isolated from *Hancornia speciosa*. **Phytomedicine**. v. 16, n. 11, p.10641069, nov. 2009.

FERREIRA, H. C. et al. Endothelium-dependent vasodilation induced by *Hancornia speciosa* in rat superior mesenteric artery. **Phytomedicine**. v. 14, n. 7-8, p. 473-478, ago 2007.

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, Ufrgs, Rio Grande do Sul, 2010.

GRANDI, T. S. M. et al. Plantas medicinais de Minas Gerais, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**. v. 3, n. 21, p.185-224, 1989.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 4, n. 3, p. 206-220, fev 2005.

LAHMAR, I. et al. Nutritional Composition and Phytochemical, Antioxidative, and Antifungal Activities of *Pergularia tomentosa* L. **Biomed Research International**. v. 2017, p.1-9, 2017.

LIMA, J. P. et al. First evaluation of the antimutagenic effect of mangaba fruit in vivo and its phenolic profile identification. **Food Research International**. v. 75, p. 216-224, set 2015.

MARINHO, D. G. et al. The latex obtained from *Hancornia speciosa* Gomes possesses anti-inflammatory activity. **Journal Of Ethnopharmacology**. v. 135, n. 2, p. 530-537, maio 2011.

MOHSEN, S. M.; AMMAR, A. S. M. Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts. **Food Chemistry**. v. 112, n. 3, p.595-598, fev. 2009.

MORAES, T. M. et al. *Hancornia speciosa*: Indications of gastroprotective, healing and anti-*Helicobacter pylori* actions. **Journal Of Ethnopharmacology**. v. 120, n. 2, p. 161-168, nov 2008.

MOREIRA, L. et al. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. **Food And Chemical Toxicology**. v. 46, n. 11, p.3482-3485, nov. 2008.

NEVES, J. S. et al. Evaluation of the osteogenic potential of *Hancornia speciosa* latex in rat calvaria and its phytochemical profile. **Journal Of Ethnopharmacology**. v. 183, p.151-158, maio 2016.

PEREIRA, A. C. et al. *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae) as a potential anti-diabetic drug. **Journal Of Ethnopharmacology**. v. 161, p.30-35, fev. 2015.

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

ROCKENBACH, L. et al. NTPDase3 and ecto-5'-nucleotidase/CD73 are differentially expressed during mouse bladder cancer progression. **Purinergic Signalling**. v. 10, n. 3, p.421-430, jan. 2014.

RUFINO, M. S. M. et al. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**. v. 121, n. 4, p.9961002, ago. 2010.

SANTOS, U. P. et al. Antioxidant, Antimicrobial and Cytotoxic Properties as Well as the Phenolic Content of the Extract from *Hancornia speciosa* Gomes. **Plos One**. v. 11, n. 12, p.531-550, 1 dez. 2016.

SBH Sociedade Brasileira De Hipertensão - FAQ. Disponível em:

<<http://www.sbh.org.br/geral/faq.asp>>. Acesso em: 06 mai. 2018.

SCHMID, S. et al. Altered purinergic signalling in the tumor associated immunologic microenvironment in metastasized non-small-cell lung câncer. **Lung Cancer**. n. 90, p.516-521, Out. 2015.

SILVA, G. C. et al. Potent antihypertensive effect of *Hancornia speciosa* leaves extract. **Phytomedicine**. v. 23, n. 2, p. 214-219, fev 2016.

SILVA, G. C. et al. *Hancornia speciosa* Gomes induces hypotensive effect through inhibition of ACE and increase on NO. **Journal Of Ethnopharmacology**. v. 137, n. 1, p.709-713, set. 2011.

SKROVÁNKOVÁ, S.; MISURCOVÁ, L.; MARCHU, L. Antioxidant Activity and Protecting Health Effects of Common Medicinal Plants. **Advances in Food Nutrition Research**. v. 67, p 75–139, 2012.

SOUZA, V. R. et al. Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits. **Food Chemistry**. v. 134, n. 1, p.381-386, set. 2012.

SRINIVASAN, K. Antioxidant Potential of Spices and Their Active Constituents. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 54, n. 3, p.352372, nov. 2013.

STAGG, John; THOMPSON, Linda F.; DWYER, Karen M. Ectonucleotidases in Cancer and Inflammation. **Journal Of Biomedicine And Biotechnology**. v. 2012, p.1-2, 2012.

STELLA, J. et al. Differential ectonucleotidase expression in human bladder cancer cell lines. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**. v. 28, n. 3, p.260-267, maio 2010.

VALKO, M. et al. 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, jan. 2007.

VAUGHN, B. P.; ROBSON, S. C.; LONGHI, M. S. Purinergic Signaling in Liver Disease. **Digestive Diseases**. v. 32, n. 5, p. 516-524, 2014.

VENDRAMINI, A. L.; TRUGO, L. C. Chemical composition of acerola fruit (*Malpighia puniceifolia* L.) at three stages of maturity. **Food Chemistry**. n. 71, p. 195–198. 2000.

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.18011812, maio 1999.

XU, Z. Important Antioxidant Phytochemicals in Agricultural Food Products. **Analysis Of Antioxidant-rich Phytochemicals**. p.1-24, 21 fev. 2012.

Yegutkin, G. G. Kinetic analysis of enzymatic hydrolysis of ATP in human and rat blood serum. **Biochemistry (Mosc)**. v. 62, n. 6, p. 619-622. 1997.

ZIMMERMANN, H. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. **Biochem J**. n. 285, p. 345-365, 1992.

ZIMMERMANN, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**. n. 362, p. 299-309, 2000.