



**UNIVERSIDADE DE CRUZ ALTA
UNIVERSIDADE REGIONAL DO NOROESTE DO ESTADO DO RIO GRANDE
DO SUL**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM ATENÇÃO INTEGRAL
À SAÚDE**

**PERFIL REDOX E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DAS INFUSÕES DE *Baccharis trimera* (Less.) DC e de
Baccharis articulata (Lam.) Pers EM MULHERES NA PÓS-MENOPAUSA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

GABRIELA TASSOTTI GELATTI

Cruz Alta-RS, Brasil

2017

**PERFIL REDOX E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DAS INFUSÕES DE *Baccharis trimera* (Less.) DC e de
Baccharis articulata (Lam.) Pers **EM MULHERES NA PÓS-MENOPAUSA****

Por

GABRIELA TASSOTTI GELATTI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde, da Universidade de Cruz Alta (UNICRUZ, RS), em associação ampla à Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUÍ, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Atenção Integral à Saúde**.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Roberta Cattaneo Horn

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Evelise Moraes Berlezi

Cruz Alta-RS, Brasil

2017

G28p

Gelatti, Gabriela Tassotti

Perfil redox e avaliação *in vitro* da atividade antioxidante das infusões de *baccharis trimera* (less.) dc e de *baccharis articulata* (lam.) pers em mulheres na pós-menopausa/ Gabriela Tassotti Gelatti. – 2017. 113 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade de Cruz Alta - UNICRUZ/RS. Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul - UNIJUI/RS, Programa de pós-graduação stricto sensu em atenção integral à saúde.

Mestrado em atenção integral à saúde.

Orientador: Prof. Dra. Roberta Cattaneo Horn.

Co-orientador: Prof. Dra. Evelise Moraes Berlezi

1. Pós-menopausa. 2.Reposição hormonal. 3. Estresse oxidativo.
I. Horn, Roberta Cattaneo. II. Berlezi, Evelise Moraes. III. Título.

CDU 618.173

Catálogo na fonte: Bibliotecária Eliane C. Reck da Rosa CRB-10/2404.

UNIVERSIDADE DE CRUZ ALTA E UNIVERSIDADE REGIONAL DO NOROESTE
DO RIO GRANDE DO SUL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM ATENÇÃO INTEGRAL
À SAÚDE

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

PERFIL REDOX E AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DAS INFUSÕES DE BACCHARIS TRIMERA (LESS.)
DC E DE BACCHARIS ARTICULATA (LAM.) PERS EM MULHERES
NA PÓS-MENOPAUSA

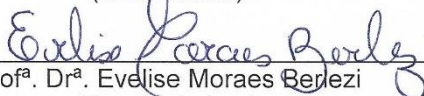
elaborada por:

GABRIELA TASSOTTI GELATTI

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Atenção Integral à Saúde

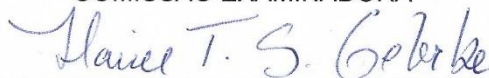


Prof^a. Dr^a. Roberta Cattaneo Horn
(Orientadora)



Prof^a. Dr^a. Evelise Moraes Berezzi
(Coorientadora)

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Ilaine Teresinha Seibel Gehrke - (UNIJUÍ)



Prof^a. Dr^a. Gabriela Bonfanti - (UNICRUZ)



Prof^a. Dr^a. Gabriela Elisa Hirsch - (UNICRUZ)

Cruz Alta, 23 de março de 2017

*Dedico este trabalho aos meus queridos
pais, Cidnei e Rosane, que sempre me
apoiaram e me incentivaram. Amo vocês!*

AGRADECIMENTOS

A Deus, que iluminou o meu caminho e o das pessoas que eu amo durante esta caminhada;

Aos meus pais e irmão, Cidnei, Rosane e Gabriel, meu infinito agradecimento. Obrigada pelo apoio, incentivo e amor incondicional. Vocês são os exemplos da minha vida, amo vocês!

Ao meu namorado, Jerry, pela cumplicidade, paciência, ideias e carinho;

A minha orientadora, Roberta Cattaneo Horn, pela oportunidade, disposição, conhecimento prestado, confiança e amizade;

A minha co-orientadora, Evelise Moraes Berlezi, pelos conhecimentos estatísticos compartilhados, pela amizade e por sempre acreditar na minha capacidade;

As amigas do LaMOx, Ana, Mari e Tami, pelo auxílio nas análises laboratoriais, mas principalmente pela adorável convivência diária, conselhos, risadas, companheirismo e parceria de congressos e cursos;

A companheira de GERON, Daia, pela amizade mesmo distante e ajuda na coleta de dados;

Aos professores do PPGAIS, que de alguma forma contribuíram para a minha formação;

As professoras componentes da banca examinadora, pela disponibilidade em contribuir com este trabalho;

A UNICRUZ e UNIJUÍ pelo espaço concedido;

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

PERFIL REDOX E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS INFUSÕES DE *Baccharis trimera* (Less.) DC E DE *Baccharis articulata* (Lam.) Pers EM MULHERES NA PÓS-MENOPAUSA

Na pós-menopausa ocorre à depleção dos níveis de estrogênio, o que pode causar um desequilíbrio entre a produção de Espécies Reativas (ERs) e o sistema de defesa antioxidante a favor da geração excessiva de ERs. A terapia de reposição hormonal apresenta efeito benéfico sobre o estresse oxidativo, tendo em vista que atua como antioxidante. Entretanto, devido aos efeitos adversos graves e contraindicações, seu uso vem sendo evitado. Nesses casos, alternativas não medicamentosas são muito procuradas, dentre elas as plantas medicinais, na qual se destaca o gênero *Baccharis*. Sendo assim, considerando que de modo geral as mulheres no período da pós-menopausa apresentam elevados níveis de marcadores oxidativos e baixos níveis de marcadores de defesa antioxidante e em função do vasto uso popular de diversas espécies de carqueja na forma de infusão, se buscou com esse estudo avaliar o perfil redox de mulheres na pós-menopausa e após verificar se as infusões de *Baccharis trimera* e de *Baccharis articulata* possuem potencial antioxidante *in vitro* nos eritrócitos destas mulheres e verificar qual das espécies é a mais eficaz. Para isso, foi realizado um estudo experimental com amostra sanguínea de mulheres na pós-menopausa participantes do projeto “Estudo do Envelhecimento Feminino”. O controle positivo foi constituído por mulheres com idade reprodutiva e o controle negativo por mulheres na pós-menopausa sem tratamento com as plantas. Foram dosados os níveis de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), Proteínas Carboniladas (PCs) e Glutationa Reduzida (GSH) no plasma das participantes do estudo. Após, os eritrócitos das mulheres na pós-menopausa foram tratados *in vitro* durante uma hora com as infusões de *B. trimera* e de *B. articulata* nas concentrações de 4,17; 8,34; 16,67; 33,34 e 66,67 g/L. Após o tratamento, foram dosados os níveis de TBARS, PCs e GSH nos eritrócitos. Com relação ao perfil redox, os resultados demonstraram que os níveis de TBARS e PCs aumentaram 114% ($p < 0,001$) e 10,9% ($p = 0,043$), respectivamente, e os níveis de GSH diminuíram 31,4% ($p = 0,002$) no grupo pós-menopausa em relação ao controle positivo, sugerindo desequilíbrio no perfil redox de mulheres pós-menopausadas. A respeito do tratamento *in vitro* com as carquejas, as infusões de *B. trimera* e de *B. articulata* nas concentrações de 33,34 ($p < 0,001$) e 66,67 g/L ($p < 0,001$) reduziram os níveis de TBARS em relação ao controle negativo e o tamanho do efeito (TDE) para esta redução foi pequeno. Não houve redução dos níveis de PCs após o tratamento dos eritrócitos com ambas as infusões. Os níveis de GSH aumentaram após o tratamento com a infusão de *B. trimera* na concentração de 66,67 g/L ($p < 0,001$) e nas concentrações de 33,34 ($p < 0,001$) e 66,67 g/L ($p < 0,001$) de *B. articulata* quando comparado com o controle negativo e o TDE para este aumento foi médio. Em conclusão, as mulheres na pós-menopausa apresentam elevados níveis de marcadores oxidativos e baixos níveis do principal antioxidante endógeno. As infusões de *B. trimera* e de *B. articulata* possuem potencial antioxidante *in vitro*, demonstrando efeito semelhante em relação à redução do dano oxidativo em lipídeos e aumento da proteção antioxidante endógena. Sendo assim, as evidências científicas desse estudo contribuem para a importância da inclusão de antioxidantes, como as plantas medicinais, em intervenções terapêuticas a fim de melhorar a saúde de mulheres na pós-menopausa.

Palavras-chave: Envelhecimento. Estrogênio. Estresse Oxidativo. Carqueja. Efeito Antioxidante.

ABSTRACT

REDOX PROFILE AND *IN VITRO* EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *Baccharis trimera* (Less.) DC AND *Baccharis articulata* (Lam.) Pers INFUSIONS IN POSTMENOPAUSAL WOMEN

In postmenopausal, depletion of estrogen levels occurs, which may cause an imbalance between the production of Reactive Species (REs) and the antioxidant defense system in favor of excessive RE generation. Hormone replacement therapy has a beneficial effect on oxidative stress, since it acts as an antioxidant. However, due to the serious adverse effects and contraindications, its use has been avoided. In these cases, non-drug alternatives are much sought after, among them medicinal plants, in which the genus *Baccharis* stands out. Therefore, considering that, in general, women in the postmenopausal period have high levels of oxidative markers and low levels of antioxidant defense markers and due to the vast popular use of several species of carqueja in the form of infusion, the aim of this study was to evaluate the redox profile of postmenopausal women and to evaluate if infusions of *Baccharis trimera* and *Baccharis articulata* have antioxidant potential *in vitro* in erythrocytes of these women and to verify which of the species is the most effective. For this, an experimental study with blood sample of postmenopausal women participating in the project "Study of the Aging of Women" was carried out. Positive control consisted of women in reproductive age and negative control by postmenopausal women without treatment with the plants. The levels of Thybarbituric Acid Reactive Substances (TBARS), Carbonylated Proteins (CPs) and Reduced Glutathione (GSH) in the plasma of the study participants were measured. Afterwards, the erythrocytes of postmenopausal women were treated *in vitro* for an hour with infusions of *B. trimera* and *B. articulata* at concentrations of 4.17, 8.34, 16.67, 33.34 and 66.67 g/L. After treatment, the levels of TBARS, CPs and GSH in the erythrocytes were measured. Regarding the redox profile, the results showed that the levels of TBARS and CPs increased by 114% ($p<0.001$) and 10.9% ($p=0.043$), respectively, and GSH levels decreased by 31.4% ($p=0.002$) in the postmenopausal group in relation to the positive control suggesting imbalance in the redox profile of postmenopausal women. Regarding *in vitro* treatment with carquejas, infusions of *B. trimera* and *B. articulata* at concentrations of 33.34 ($p<0.001$) and 66.67 g/L ($p<0.001$) reduced the levels of TBARS in comparison to the negative control, the Effect Size (ES) for this reduction was small. There was no reduction in CP levels after treatment of erythrocytes with both infusions. GSH levels increased after treatment with *B. trimera* at a concentration of 66.67 g/L ($p<0.001$) and at concentrations of 33.34 ($p<0.001$) and 66.67 g/L ($p<0.001$) of *B. articulata* when compared to the negative control, and the ES for this increase was average. In conclusion, postmenopausal women have high levels of oxidative markers and low levels of the main endogenous antioxidant. Infusions of *B. trimera* and *B. articulata* present antioxidant potential *in vitro*, demonstrating a similar effect in relation to reduction of oxidative damage in lipids and increase of endogenous antioxidant protection. Therefore, the scientific evidence from this study contributes to the importance of the inclusion of antioxidants, such as medicinal plants, in therapeutic interventions to improve the health of postmenopausal women.

Keywords: Aging. Estrogen. Oxidative Stress. Carqueja. Antioxidant Effect.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 - Nomenclatura dos estágios da vida reprodutiva feminina.....	21
Figura 2 - Esquema do processo de peroxidação lipídica.....	25
Figura 3 - Diferentes rotas para a carbonilação de proteínas.....	26
Figura 4 - Integração dos sistemas de defesa enzimáticos.....	30
Figura 5 - Estrutura química geral de um flavonoide.....	32
Figura 6 - Estruturas químicas de tanino hidrolisável e tanino condensado.....	32
Figura 7 - <i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC.....	36
Figura 8 - <i>Baccharis articulata</i> (Lam.) Pers.....	37

MANUSCRITO II

Figure 1 - Levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (η mol MDA/g Hb) in erythrocytes of postmenopausal women treated <i>in vitro</i> with different concentrations of <i>B. trimera</i> and <i>B. articulata</i> infusions.....	67
Figure 2 - Levels of carbonylated proteins (CP) (η mol CP/mg TP) in erythrocytes of postmenopausal women treated <i>in vitro</i> with different concentrations of <i>B. trimera</i> and <i>B. articulata</i> infusions.....	68
Figure 3 - Levels of reduced glutathione (GSH) (μ mol GSH/mL) in erythrocytes of postmenopausal women treated <i>in vitro</i> with different concentrations of <i>B. trimera</i> and <i>B. articulata</i> infusions.....	69

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 - Classificação dos compostos fenólicos de acordo com o esqueleto básico.....31

MANUSCRITO I

Table 1 - Characteristics and metabolic markers in postmenopausal women (post-menopause group) and in women with regular menstrual cycle (control group).....51

Table 2 - Oxidative stress markers in postmenopausal women (post-menopause group) and in women with regular menstrual cycle (control group).....52

MANUSCRITO II

Table 1 - Oxidative stress markers in women with regular menstrual cycles (positive control) and in postmenopausal women without treatment with infusions (negative control).....70

Table 2 - Quantification of total phenolic compounds, total flavonoids, and condensed tannins present in hydroethanolic extracts (HE) and the infusions of *B. trimera* and *B. articulata*.....71

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP - Adenosina Trifosfato

CAT - Catalase

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa

DCVs - Doenças Cardiovasculares

DNA - Ácido desoxirribonucleico

ERs - Espécies Reativas

EREs - Espécies Reativas de Enxofre

ERNs - Espécies Reativas de Nitrogênio

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

FSH - Hormônio Folículo Estimulante

GO - Glutaciona Oxidase

GPx - Glutaciona Peroxidase

GR - Glutaciona Redutase

GSH - Glutaciona Reduzida

GSSG - Glutaciona Oxidada

GST - Glutaciona Transferase

H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio

HOCl - Ácido Hipocloroso

HOH[•] - Íon Peroxil

LDL - Lipoproteína de Baixa Densidade

LDL-MM - Lipoproteína de Baixa Densidade Minimamente Modificada

LDL-ox - Lipoproteína de Baixa Densidade Oxidada

LH - Hormônio Luteinizante

LOO[•] - Radical Peroxila

LOOH - Hidroperóxido Lipídico

LPO - Lipoperoxidação

MDA - Malondialdeído

NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato

NO - Óxido Nítrico

O₂^{•-} - Ânion Superóxido

OH[•] - Íon Hidroxila

ONOO⁻ - Peroxinitrito

PC - Proteína Carbonilada

SOD - Superóxido Dismutase

TBA - Ácido Tiobarbitúrico

TBARS - Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TRH - Terapia de Reposição Hormonal

UNICRUZ - Universidade de Cruz Alta

UNIJUÍ - Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	83
APÊNDICE B - Variáveis de Interesse do Instrumento de Coleta de Dados da Pesquisa Estudo do Envelhecimento Feminino.....	85
APÊNDICE C - Instrumento de Coleta de Dados do Grupo Controle.....	87

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A - Parecer Consubstanciado do CEP da Pesquisa Estudo do Efeito Antioxidante de Diferentes Princípios Ativos.....	88
ANEXO B - Parecer Consubstanciado do CEP da Pesquisa Estudo do Envelhecimento Feminino.....	91
ANEXO C - Normas da Revista Menopause.....	103
ANEXO D - Normas da Revista Maturitas.....	108

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	16
1.INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
3.1 Envelhecimento reprodutivo.....	20
3.1.1 Estrogênio.....	21
3.2 Estresse oxidativo.....	22
3.2.1 Peroxidação lipídica.....	24
3.2.2 Oxidação proteica.....	26
3.2.3 Sistema de defesa antioxidante.....	27
3.2.4 Antioxidantes naturais.....	30
3.3 Gênero <i>Baccharis</i>	33
3.3.1 <i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC.....	34
3.3.2 <i>Baccharis articulata</i> (Lam.) Pers.....	36
3.3.4 Eritrócito humano como modelo experimental.....	37
4. MANUSCRITOS CIENTÍFICOS.....	40
4.1 Manuscrito I.....	41
4.2 Manuscrito II.....	53
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	72
REFERÊNCIAS.....	73

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação é composta de uma breve introdução a respeito do tema abordado, após são apresentados os objetivos do estudo e posteriormente é reiterado com uma revisão bibliográfica. Os resultados são apresentados na forma de manuscritos, os quais se encontram no item manuscritos científicos e estão estruturados com resumo, palavras-chave, introdução, metodologia, resultados, discussão dos resultados, conclusão e referências. No final desta dissertação encontra-se o item considerações finais, com interpretações e comentários gerais sobre os manuscritos científicos. O item referências menciona somente às citações da introdução e revisão bibliográfica desta dissertação.

1. INTRODUÇÃO

O aumento da expectativa de vida feminina a partir da segunda metade do século XX faz com que o período pós-reprodutivo constitua uma das prioridades na saúde pública, visto que, cada vez mais as mulheres estão vivendo no período pós-menopáusicas, ou seja, cerca de um terço ou mais do tempo de vida em estado de deficiência hormonal (DE LORENZI *et al.*, 2006; POLI; SCHWANKE; CRUZ, 2010).

A deficiência hormonal inicia na perimenopausa, que abrange além da fase de transição menopausal, caracterizada por ciclos irregulares, o primeiro ano após a última menstruação. Decorrido esse período de amenorreia é reconhecida a pós-menopausa (FERNANDES *et al.*, 2008; HARLOW *et al.*, 2012). O declínio dos níveis de estrogênio observado na pós-menopausa faz com que muitas mulheres sofram com os sintomas próprios deste período, dos quais, os mais característicos são ondas de calor, suores noturnos, insônia, taquicardia, alterações de humor e de memória, dispareunia, além de significativas alterações no metabolismo lipídico e ósseo e atrofia urogenital (FEBRASGO, 2010).

Além disso, a depleção de estrogênio pode causar estresse oxidativo (SÁNCHEZ-RODRIGUES *et al.*, 2012), que ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de Espécies Reativas (ERs) e o sistema de defesa antioxidante em favor da geração excessiva de ERs ou em detrimento da velocidade de remoção destas, resultando em lesões em macromoléculas e estruturas celulares, como a peroxidação lipídica, a carbonilação de proteínas e danos ao Ácido Desoxirribonucleico (DNA) (BARBOSA *et al.*, 2010). Para neutralizar esses efeitos nocivos, o organismo humano está equipado com uma variedade de moléculas antioxidantes, além das obtidas pela dieta (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014). Contudo, durante a pós-menopausa pode haver uma diminuição dos níveis dos antioxidantes endógenos quando comparadas com mulheres em idade reprodutiva (OGUNRO *et al.*, 2014; KOLESNIKOVA *et al.*, 2015).

Segundo Doshi e Argawal (2013), o estresse oxidativo está associado a um risco aumentado de Doenças Cardiovasculares (DCVs), além de uma maior frequência de sintomas vasomotores em mulheres na pós-menopausa. Essas mudanças repercutem na saúde da mulher, podendo afetar sua qualidade de vida e autoestima, e também na longevidade (BRASIL, 2008; FEBRASGO, 2010).

Para aliviar os sintomas decorrentes da redução de estrogênio, comumente é prescrita a Terapia de Reposição Hormonal (TRH) como medida terapêutica, principalmente visando reduzir as manifestações vasomotoras e urogenitais (NAMS, 2013). Além disso, de acordo

com Mueck e Seeger (2004), a TRH possui efeito benéfico sobre o estresse oxidativo, reforçando os mecanismos de defesa antioxidante em mulheres na pós-menopausa, o que favorece a qualidade de vida das mesmas. Entretanto, devido aos possíveis efeitos adversos graves com o uso prolongado de TRH, como câncer de mama (ANDERSON *et al.*, 2006; LASSERRE; FOURNIER, 2016) e tromboembolismo venoso (LEE *et al.*, 2015), houve uma redução do uso prolongado de TRH. Ainda, há mulheres que não desejam o tratamento hormonal e para algumas esta conduta é contraindicada. Nesses casos, há alternativas não medicamentosas, entre elas a acupuntura, a homeopatia e o uso de plantas medicinais (BRASIL, 2008).

As plantas constituem uma importante fonte de compostos fenólicos, destacando-se os flavonoides e os taninos, que apresentam ação antioxidante (SIMÕES *et al.*, 2017) e estão presentes em várias espécies de carqueja, pertencente ao gênero *Baccharis* (ALONSO, 2016). Segundo Campos *et al.* (2016), dentre as espécies aladas mais estudadas farmacologicamente estão a *Baccharis trimera* (Less.) DC. e a *Baccharis articulata* (Lam.) Pers., as quais são amplamente utilizadas na medicina popular, principalmente para dispepsia.

Alguns autores relataram atividade antioxidante dos extratos (obtidos por maceração) n-butanólico (OLIVEIRA *et al.*, 2004), aquoso (SIMÕES-PIRES, 2005), hidroalcoólico (MENDES; TABACH; CARLINI, 2007; PÁDUA *et al.*, 2014), clorofômico, acetato de etila, etanol absoluto e etanol 50% (DIAS *et al.*, 2009) e fenólico (DE OLIVEIRA *et al.*, 2012) das partes aéreas de *B. trimera* e as frações n-butanólica (DE OLIVEIRA *et al.*, 2003) e acetato de etila (BORGO *et al.*, 2010) do extrato de *B. articulata*. Contudo, há poucas informações na literatura sobre a atividade antioxidante dessas espécies na forma de infusão, que segundo o Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira é o principal modo de preparo pela população para administração oral (BRASIL, 2011).

Neste sentido, considerando que de modo geral as mulheres no período da pós-menopausa apresentam elevados níveis de marcadores oxidativos e baixos níveis de marcadores de defesa antioxidante, devido a redução dos níveis de estrogênio, e em função do vasto uso popular de diversas espécies de carqueja na forma de infusão, se buscou com esse estudo avaliar o perfil redox de mulheres na pós-menopausa, além de verificar se as infusões de *B. trimera* e de *B. articulata* possuem potencial atividade antioxidante *in vitro* nos eritrócitos destas mulheres e qual das espécies estudadas é a mais eficaz.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil redox de mulheres na pós-menopausa, além de verificar se as infusões de *B. trimera* e de *B. articulata* possuem potencial atividade antioxidante *in vitro* nos eritrócitos destas mulheres e qual das espécies estudadas é a mais eficaz.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os níveis de 17 β -estradiol e o perfil lipídico de mulheres na pós-menopausa;
- Avaliar o perfil redox de mulheres na pós-menopausa;
- Comparar o teor de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e taninos condensados nas infusões e nos extratos hidroetanólicos de *B. trimera* e de *B. articulata*;
- Avaliar os níveis de marcadores oxidativos e antioxidantes em eritrócitos de mulheres na pós-menopausa tratadas *in vitro* com as infusões de *B. trimera* e de *B. articulata*;
- Verificar qual das espécies estudadas *in vitro* é a mais eficaz na redução dos marcadores oxidantes e aumento do marcador antioxidante.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Envelhecimento reprodutivo

Os Stages of Reproductive Aging Workshop (STRAW) dividem a vida das mulheres adultas em três grandes fases: reprodutiva, transição menopausal e pós-menopausa (Figura 1) (HARLOW *et al.*, 2012).

O início da transição menopausal é estimado entre 44-48 anos, com uma variação entre 31-54 anos, e é dividida em duas fases: a inicial e a tardia. A inicial é caracterizada por ciclos menstruais que variam em duração (sete dias ou mais de alteração) quando comparados com o padrão individual. Já na tardia, pelo menos dois ciclos estão alterados, com um período de amenorreia de 60 dias ou mais. Esse período é chamado de perimenopausa, que abrange além da fase de transição menopausal, o primeiro ano após a última menstruação. Desde o início das irregularidades menstruais até a ocorrência da menopausa decorre um tempo médio de um a três anos (FERNANDES *et al.*, 2008; HARLOW *et al.*, 2012).

A menopausa caracteriza-se como a última menstruação espontânea, quando não há mais níveis de estradiol suficientes para proliferar o endométrio (NAMS, 2013). Para a Organização Mundial de Saúde (1996), a menopausa é definida como a fase da vida da mulher que cessa a capacidade reprodutiva. A idade em que habitualmente ocorre a última menstruação varia entre 48 e 52 anos, quando ocorre antes dos 40 anos é chamada menopausa precoce e após os 55 anos menopausa tardia (FEBRASGO, 2010). Após 12 meses consecutivos de amenorreia é reconhecida a pós-menopausa, que se divide em recente, correspondente aos primeiros três a seis anos, e tardia com duração até a morte (FERNANDES *et al.*, 2008; HARLOW *et al.*, 2012).

Como consequência destas mudanças de fases, ocorrem alterações fisiológicas no organismo feminino. Na perimenopausa observa-se a diminuição dos folículos ovarianos que acarreta o declínio progressivo de estradiol e da inibina, em contrapartida, o Hormônio Folículo Estimulante (FSH) e o Hormônio Luteinizante (LH) se elevam na tentativa de manter a foliculogênese. Essas alterações hormonais vão tornando-se mais acentuadas, gerando um encurtamento ou prolongamento dos ciclos, sendo que a maior parte é anovulatória, podendo gerar sangramentos irregulares. Por fim, a menopausa se instala quando há um esgotamento folicular ou insensibilidade dos receptores de gonadotrofinas nos folículos. Na pós-menopausa, o FSH poderá estar aumentado cerca de 10 a 15 vezes e o LH, de três a cinco vezes. Já o estradiol diminui substancialmente e vai sendo nesta fase substituído pela estrona, que predomina na pós-menopausa (BRASIL, 2008; FEBRASGO, 2010).

Figura 1 - Nomenclatura dos estágios da vida reprodutiva feminina.

Estágio	-5	-4	-3b	-3a	-2	-1	+1a	+1b	+1c	+2
Terminologia	IDADE REPRODUTIVA				TRANSIÇÃO MENOPAUSAL		PÓS-MENOPAUSA			
	Inicial	Pico	Tardia		Inicial	Tardia	Inicial			Tardia
					PERIMENOPAUSA					
Duração	Variável				Variável	1-3 anos	2 anos		3-6 anos	Até a morte
Ciclos menstruais	Regular ou variável	Regular	Regular	Mudança sutil no fluxo/duração	Ciclos que variam em duração \geq 7 dias	Intervalo de amenorreia \geq 60 dias				
Endócrino FSH AMH* Inibina B			Baixo Baixo	Variável Baixo Baixo	↑ Variável Baixo Baixo	↑ >25 UI/mL Baixo Baixo	↑ Variável Baixo Baixo		Estabilizado Muito baixo Muito baixo	

*Hormônio anti-mulleriano

Fonte: Adaptado de Harlow *et al.*, 2012.

3.1.1 Estrogênio

O estrogênio é um hormônio esteroide sexual que regula o crescimento, o desenvolvimento e a função do sistema reprodutivo feminino. Pode ser classificado em relação à sua estrutura em esteroide, e na dependência de sua origem em natural e artificial. Os principais estrogênios naturais são o estradiol, a estrona e o estriol, que são moléculas lipofílicas produzidas pelas células granulosas, tecaís, células teca-luteínicas no corpo lúteo e pela suprarrenal. Desses, o mais ativo é o 17β -estradiol, que por ser metabolizado e inativado no fígado tem como principais derivados o sulfato de estrona e o glicuronato de estriol (SILVA, 2010).

O declínio dos níveis de estrogênio faz com que muitas mulheres tenham sintomas próprios da perimenopausa, dos quais, os mais característicos são manifestações neurogênicas, como ondas de calor, suores noturnos, insônia, tonturas e fadiga; manifestações psicogênicas, como irritabilidade, depressão, ansiedade e diminuição da autoestima e manifestações urogenitais, destacando o sangramento e ressecamento vaginal, além de dispareunia. Posteriormente, na pós-menopausa, ocorre uma exacerbação dos sintomas decorrentes do hipoestrogenismo, além de significativas alterações no metabolismo lipídico e ósseo e atrofia urogenital (BRASIL, 2008; NAMS, 2013). Essas mudanças repercutem na saúde da mulher, podendo afetar sua qualidade de vida e autoestima, e também na longevidade (FEBRASGO, 2010).

A TRH é o tratamento de escolha para o alívio destes sintomas nesta etapa da vida, principalmente para as manifestações vasomotoras e urogenitais (FEBRASGO, 2010; NAMS,

2013). Por outro lado, seu uso em longo prazo pode ocasionar efeitos adversos graves como câncer de mama (ANDERSON *et al.*, 2006; LASSERRE; FOURNIER, 2016) e tromboembolismo venoso (LEE *et al.*, 2015). Com relação às contraindicações, esta terapia não é indicada para mulheres acometidas por câncer de mama, câncer de endométrio, tromboembolismo agudo, hepatopatia aguda e/ou grave, cardiopatia grave e sangramento uterino sem causa diagnosticada (PARDINI, 2014).

Ainda sobre a redução acentuada de estrogênio, esta tem mostrado aumentar os níveis de marcadores de estresse oxidativo no organismo feminino, levando a um estado pró-oxidante (DOSHI; ARGAWAL, 2013). Isso pode ser explicado porque o estrogênio em altas concentrações apresenta efeito antioxidante, que ocorre devido, em parte, a sua estrutura hidrofênolica, que pode doar átomos de hidrogênio para uma molécula instável, tornando-se um radical menos prejudicial; o anel da molécula do estrogênio se reorganiza e se estabiliza, retirando do meio um radical livre. Este papel é uma atividade *per se*, ou seja, do próprio hormônio (RUIZ-LARREA *et al.*, 1997; BELLANTI *et al.*, 2013). Além disso, o estrogênio age como antioxidante direto, ativador de receptores, modulador de neurotransmissores (OGE *et al.*, 2003) e estimula a expressão de enzimas antioxidantes (BORRÁS *et al.*, 2003).

3.2 Estresse oxidativo

As Espécies Reativas (ERs) são produzidas a partir do oxigênio (EROs), nitrogênio (ERNs) e/ou enxofre (EREs) como resultado do metabolismo celular normal e são divididas em radicais livres e ERs não radicalares (CAROCHO; FERREIRA, 2013; RAHAL *et al.*, 2014).

Os radicais livres são moléculas que possuem pelo menos um elétron desemparelhado em seus orbitais externos, permitindo a transferência de elétrons com moléculas vizinhas. Em geral são instáveis, possuem uma meia vida muito curta e reagem rapidamente com diversos compostos e alvos celulares (MAGDER, 2006; BIRBEN *et al.*, 2012). Os radicais livres de maior importância fisiológica são: íon hidroxila (OH^{\bullet}), íon peroxil (HOH^{\bullet}), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e peroxinitrito (ONOO^-). Já as ERs não radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ácido hipocloroso (HOCl), não possuem elétrons livres, sendo, portanto, menos instáveis que os radicais livres, mas também podem reagir com moléculas na sua redondeza (CZERSKA *et al.*, 2015).

Em condições fisiológicas, as mitocôndrias são as principais fontes intracelulares de EROs (HALLIWELL, 2012). Nessas organelas, o oxigênio sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água, sendo a citocromo oxidase a

enzima catalisadora dessa reação. Na fase terminal da cadeia transportadora de elétrons, a enzima supracitada oxida quatro moléculas de citocromo C removendo um elétron de cada uma delas, sendo esses elétrons adicionados ao oxigênio para formar água. O papel da citocromo oxidase é controlar a geração de ERs, impedindo sua geração excessiva na mitocôndria. No entanto, cerca de 2% a 5% do oxigênio metabolizado nas mitocôndrias são desviados para outra via metabólica, e reduzidos de forma univalente, dando origem as ERs (INOUE *et al.*, 2003; MURPHY, 2009). Além disso, fatores exógenos, como tabagismo, radiação ionizante, dieta excessivamente calórica, atividade física intensa, metais pesados, pesticidas, entre outros, também induzem a formação de ERs (BIRBEN *et al.*, 2012).

As ERs são essenciais para que células, tecidos e órgãos exerçam adequadamente suas funções, entre elas sinalização intracelular, defesa imunitária mediada contra microorganismos patogênicos, regulação de vias de transdução de sinal que alteram a expressão gênica, e contribuem em última instância para o crescimento, autofagia, apoptose e senescência celular (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014; YAN, 2014). Entretanto, níveis elevados destas espécies podem causar efeitos adversos aos componentes celulares, como peroxidação de lipídeos, carbonilação de proteínas e danos ao DNA, que são indicativos de estresse oxidativo (HALLIWELL, 2012).

Neste sentido, o estresse oxidativo é o resultado de um desequilíbrio entre a produção de ERs e o sistema de defesa antioxidante em favor da geração excessiva de ERs ou em detrimento da velocidade de remoção destas (SIES; JONES, 2007; SIES, 2015). Há várias razões para esse desequilíbrio: aumento dos níveis de compostos endógenos e exógenos que entram em auto-oxidação juntamente com a produção de EROs; esgotamento das reservas de antioxidantes de baixa massa molecular; inativação e/ou diminuição da produção de enzimas antioxidantes e combinação de dois ou mais dos fatores listados acima (LUSHCHAK, 2014).

Salienta-se que a intensidade e a patogenicidade do desequilíbrio entre ERs e antioxidantes vão depender naturalmente das concentrações locais destes componentes, das constantes de velocidade de reação com moléculas alvo e da compartimentalização celular destes processos, nos quais os fatores de solubilidade e difusibilidade são determinantes (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Na idade reprodutiva geralmente há um equilíbrio adequado entre ERs e antioxidantes, o que de modo geral não é observado na pós-menopausa. Signorelli *et al.* (2006) constataram níveis elevados de marcadores oxidativos (Malondialdeído (MDA), Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL) oxidado e 4-hidroxinonenal) em mulheres na pós-menopausa quando comparado com mulheres em idade fértil, revelando a presença de estresse

oxidativo na pós-menopausa. Kolesnikova *et al.* (2015) verificaram em seu estudo uma diminuição progressiva das concentrações dos antioxidantes α -tocoferol, retinol e redução da atividade antioxidante total em mulheres na pós-menopausa, mostrando que a redução das defesas antioxidantes também está relacionada a fase da menopausa.

O estresse oxidativo não pode induzir a menopausa, mas ele pode ocasionar uma variedade de patologias, tendo em vista que está associado a um risco aumentado de DCVs e uma maior frequência de sintomas vasomotores, que são eventos típicos dessa fase da vida (DOSHI; ARGAWAL, 2013).

3.2.1 Peroxidação lipídica

Os lipídeos são componentes estruturais das membranas celulares e participam na formação da barreira de permeabilidade das células e organelas subcelulares sob a forma de bicamada lipídica. Além disso, podem controlar o estado fisiológico de uma organela modificando seus aspectos biofísicos, tais como a polaridade e permeabilidade e podem atuar como moléculas de sinalização (AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014).

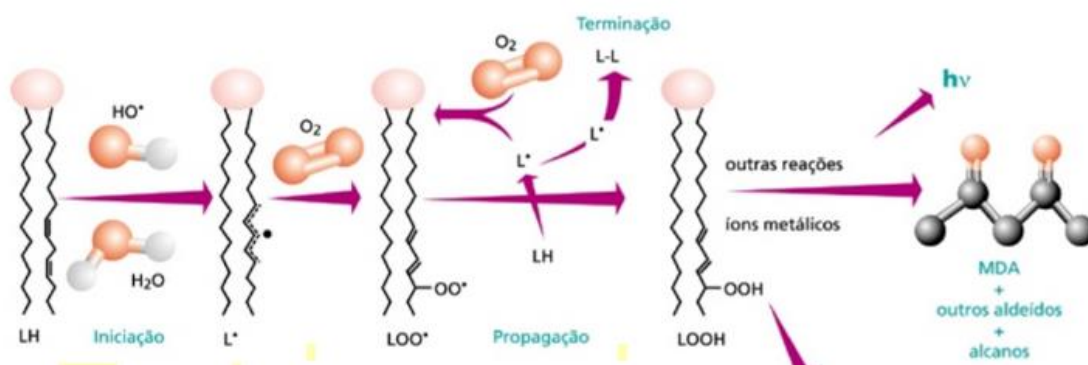
Uma das consequências do estresse oxidativo é a peroxidação lipídica, na qual há formação de seus produtos oxidativos. Essa alteração é altamente prejudicial ao organismo, pois pode modificar a permeabilidade, a fluidez e a integridade das membranas, e eventualmente resultar em citotoxicidade grave, dando origem ao crescimento celular descontrolado ou a morte celular. Em decorrência, contribui para o desenvolvimento de várias patologias, tais como diabetes, síndrome metabólica, dislipidemia, degeneração neuronal e vascular, toxicidade hepática e renal, câncer, retinopatia da prematuridade, isquemia, além de envelhecimento acelerado (CIRCU; AW, 2010; UMESH; RAMANA, 2013).

Nos sistemas biológicos, a peroxidação lipídica ocorre por duas vias: a via enzimática e a não enzimática. A primeira envolve as ciclo-oxigenases e peroxidases na oxigenação dos ácidos graxos poli-insaturados, e a via não enzimática envolve a participação de EROs e metais (LIMA; ABDALLA, 2001; MASSEY; NICOLAOU, 2011).

Através da via não enzimática, o processo da Lipoperoxidação (LPO) divide-se em três fases: iniciação, propagação e terminação. Na fase de iniciação, um radical reativo com o radical hidroxila remove um hidrogênio do ácido graxo insaturado do lipídeo, produzindo um radical lipídico (\cdot L). Este reage com o oxigênio molecular, formando um radical peroxila ($\text{LOO}\cdot$), o qual abstrai um hidrogênio de outro lipídeo. Na fase de propagação, forma-se um hidroperóxido lipídico (LOOH) e outro \cdot L que reage com o oxigênio, e assim por diante. Depois, na terminação, dois radicais se combinam e formam um composto não radicalar. O

LOOH pode sofrer outras reações, a maioria degradativa, que produzem aldeídos e alcanos de diferentes pesos moleculares (Figura 2) (AUGUSTO, 2006; VASCONCELOS *et al.*, 2007; YIN; XU; PORTER, 2011).

Figura 2 - Esquema do processo de peroxidação lipídica.



Fonte: Augusto, 2006.

Entre os diferentes aldeídos formados como produtos secundários da LPO, o MDA é o produto mais mutagênico gerado (AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014). O MDA é amplamente utilizado como biomarcador para quantificar a peroxidação lipídica no organismo através do método de Substâncias Reativas ao Ácido tiobarbitúrico (TBARS), cujo princípio consiste na reação do MDA e outros aldeídos com o Ácido Tiobarbitúrico (TBA), formando como produto um cromógeno de cor rosa fluorescente capaz de ser detectado a partir de leitura espectrofotométrica (JENTZSCH *et al.*, 1996).

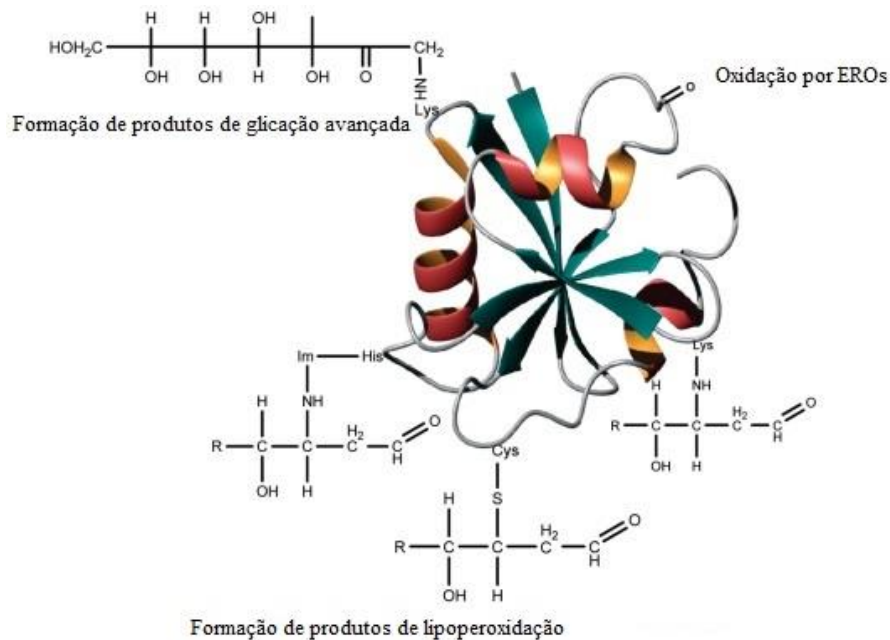
Uma das consequências da LPO são as DCVs, pois a LDL-oxidada (LDL-ox) possui papel chave no desenvolvimento da aterosclerose (SALHOTRA, 2009). O processo de formação da placa aterosclerótica inicia quando a LDL sofre oxidação gradual até a formação da LDL Minimamente Modificada (LDL-MM), que pode conter produtos oxidativos de lipídios sem modificação proteica. A LDL somente passa a ser chamada de oxidada quando existe modificação da apolipoproteína B e a LDL perde a afinidade com o seu receptor, tornando-se reconhecida por outro receptor, o receptor *scavenger* do macrófago. Como resposta inflamatória, a LDL-ox leva à ativação de monócitos que são transformados em macrófagos no espaço subendotelial. Conforme os macrófagos começam a fagocitar os lipídios, vão se formando células espumosas, derivadas dos macrófagos, que contêm lipídios principalmente sobre forma de colesterol livre (KRÜGER *et al.*, 2015). Tendo em vista que as mulheres na pós-menopausa apresentam elevado risco cardiovascular, devido ao declínio nos níveis de estrogênio, a redução dos danos oxidativos em lipídeos torna-se importante (SIGNORELLI *et al.*, 2006).

3.2.2 Oxidação proteica

As proteínas estão entre os principais alvos dos oxidantes nas condições de estresse oxidativo, devido a alta afinidade das EROs com estas biomoléculas e sua abundância nos sistemas biológicos (HÖHN; KÖNIG; GRUNE, 2013). Essas reações frequentemente ocorrem em resíduos de metionina, cisteína, prolina, histidina, arginina, lisina, triptofano, tirosina, fenilalanina e valina. Como consequência são gerados compostos carbonílicos, produtos nitrados, pontes dissulfeto, ligações cruzadas, peróxidos, entre outros (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014).

A carbonilação proteica pode ser decorrente da oxidação direta de resíduos de aminoácidos por EROs, através da formação de intermediários reativos gerados durante a peroxidação lipídica, que pode reagir com o grupo sulfidríla da cisteína, o grupo ϵ -amino da lisina ou o grupo imidazol de resíduos de histidina, formando produtos finais avançados da LPO, ou produzido por meio da reação de açúcares redutores ou dos seus produtos de oxidação com resíduos de lisina de proteínas, levando à formação de produtos finais de glicação avançada (Figura 3) (THÉROND *et al.*, 2000; VASCONCELOS *et al.*, 2007; BUTTERFIELD; DALLE-DONNE, 2012).

Figura 3 - Diferentes rotas para a carbonilação de proteínas.



Fonte: Adaptado de Madian e Regnier (2010).

As proteínas oxidativamente modificadas em sua maioria não são reparadas, mas sim, removidas por degradação proteolítica. Sendo assim, para manter a integridade celular é essencial dispor de sistemas que são capazes de reconhecer e degradar proteínas danificadas ou mal dobradas de um modo eficiente, para impedir a agregação das mesmas e reticulação (HÖHN; KÖNIG; GRUNE, 2013).

Um deles é o sistema proteassoma, cuja função é dependente de Adenosina Trifosfato (ATP) e ubiquitina. A estrutura do proteassoma 26S é formada por um núcleo catalítico (20S) e por um complexo regulatório (19S). A ubiquitinação de proteínas envolve a ação cooperativa de enzimas ativadoras de ubiquitina (E1), enzimas de conjugação de ubiquitina (E2) e ligase de proteína-ubiquitina (E3). As cadeias de ubiquitina são reconhecidas pelo regulador 19S e o núcleo catalítico 20S promove a degradação proteica, formando peptídeos e aminoácidos livres (MERKER; GRUNE, 2000; DAVIES, 2001; STOLZING; GRUNE, 2001; HÖHN; KÖNIG; GRUNE, 2013).

Vários estudos têm mostrado um aumento nos níveis de Proteínas Carboniladas (PCs) em decorrência do envelhecimento (GRUNE *et al.*, 2001; VOSS; SIEMS, 2006), em particular no coração, músculos (GIANNI *et al.*, 2004), cérebro (FLOYD; HENSLEY, 2002) e plasma (GIL *et al.*, 2006). Uma das hipóteses para explicar o acúmulo de proteínas alteradas com o avanço da idade é a diminuição da atividade do proteassoma. Existem muitas razões para a disfunção proteossômica durante o envelhecimento, tais como a montagem prejudicada, acúmulo de proteínas reticuladas inibitórias ou expressão da subunidade alterada (FAROUT e FRIGUET, 2006; KELLER, GEE, DING, 2002). Ainda, EROs, assim como produtos de peroxidação de lipídeos reativos são capazes de prejudicar o funcionamento do sistema proteassoma (ISHII *et al.*, 2005).

As proteínas danificadas e modificadas podem formar ligações cruzadas e fornecer uma base para alterações associadas à senescência e ainda contribuir para uma variedade de patologias, como aterosclerose, câncer, Alzheimer e Parkinson (LEVINE; STADTMAN, 2006; ERGIN; HARIRY; KARASU, 2013; HÖHN, KÖNIG; GRUNE, 2013).

De acordo com Dalle-Donne *et al.* (2003), as PCs formam-se rapidamente e possuem elevada estabilidade, visto que se degradam dentro de horas a dias e por esses motivos são largamente utilizadas como marcadores de dano oxidativo em proteínas.

3.2.3 Sistema de defesa antioxidante

Para neutralizar os efeitos nocivos causados pela produção excessiva de ERs, o organismo humano está equipado com uma variedade de moléculas antioxidantes, que

trabalham em sinergia através de diferentes mecanismos de ação: impedindo a formação das ERs (sistemas de prevenção), eliminando as ERs (sistemas varredores) ou ainda, favorecendo o reparo e a reconstituição das estruturas biológicas lesadas (sistemas de reparo) (KOURY; DONANGELO, 2003).

A eliminação de ERs é realizada a partir do sistema de defesa antioxidante enzimático e não enzimático, sendo que a Superóxido Dismutase (SOD), a Catalase (CAT), a Glutathione Peroxidase (GPx) e a Glutathione Transferase (GST) são os principais antioxidantes enzimáticos. Já o sistema de defesa não enzimático inclui compostos sintetizados pelo organismo, como a Glutathione Reduzida (GSH), a coenzima Q e o ácido úrico. Além disso, há antioxidantes de baixo peso molecular que são obtidos através da dieta, como o ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, antocianinas, polifenóis, entre outros (DURACKOVÁ, 2010; RAHAL *et al.*, 2014). Ainda, as proteínas quelantes de metais, como a transferrina e a ceruloplasmina, transportam ferro e cobre, impedindo que esses metais circulem na forma “livre” e catalisem a formação de ERs (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014).

A SOD está presente no organismo sob três isoformas: citoplasmática, dependente de cobre e zinco; mitocondrial, dependente de manganês; e extracelular, dependente de cobre e zinco. A principal função desta enzima é catalisar a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 . O H_2O_2 por meio das reações de *Fenton* e *Haber-Weiss*, juntamente com os seus cofatores (Fe^{2+} ou Cu^+), é bioativado em OH^{\cdot} contra o qual não há sistema enzimático de defesa. Para a bioativação em OH^{\cdot} não ocorrer, o H_2O_2 gerado é eliminado pela CAT e GPx (Figura 4) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; BARBOSA *et al.*, 2010, FUKAI; FUKAI, 2011).

A CAT é uma hemoproteína com quatro grupos *heme* e está enclausurada no peroxissoma, a principal organela responsável pela desintoxicação celular e pela oxidação de ácidos graxos de cadeia longa. Além disso, também é encontrada nas mitocôndrias das células do tecido cardíaco. Sua principal função é reduzir o H_2O_2 à água e oxigênio, diminuindo o risco da formação do OH^{\cdot} (Figura 4) (THÉROND *et al.*, 2000; KODYDKOVÁ *et al.*, 2014).

A GPx integra o grupo de selenoproteínas, que possui em seu sítio ativo o selênio obtido da dieta ligado à metionina, em alimentos de origem vegetal (selenometionina) e, ligado à cisteína, em alimentos de origem animal (selenocisteína). Nas células, cerca de 2/3 de sua atividade encontram-se no citoplasma e 1/3 nas mitocôndrias. A outra forma de detoxificação do H_2O_2 ocorre a partir da ação da GPx, que reduz esta ER não radicalar à água, utilizando a GSH para tal reação. Assim, a reação catalisada pela GPx só ocorre a partir da conversão da GSH em Glutathione Oxidada (GSSG), catalisada pela Glutathione Oxidase (GO).

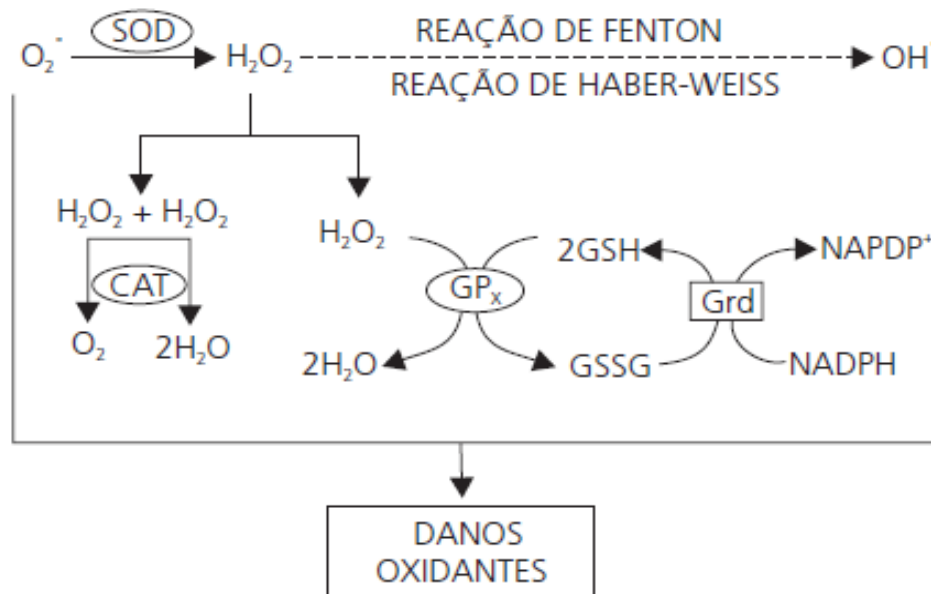
Além disso, para essas reações é de extrema importância a ação da Glutathione Redutase (GR), pois ela é responsável pela recuperação da GSH, na presença de Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (NADPH), possibilitando a manutenção da integralidade do ciclo redox da glutathione e, conseqüentemente, do equilíbrio adequado entre os sistemas de defesa enzimáticos (Figura 4) (ROVER JÚNIOR; HOEHR; VELLASCO, 2001; VASCONCELOS *et al.*, 2007; TOPPO *et al.*, 2009).

As GSTs compreendem uma família de enzimas multifuncionais e nos mamíferos podem ser divididas em GST citossólica, GST mitocondrial e GST microsomal. As duas primeiras compreendem enzimas solúveis, enquanto que as do tipo microsomal se encontram associadas à membrana. Estas enzimas catalisam o ataque nucleofílico da GSH a compostos que apresentam um carbono, um nitrogênio ou um átomo de enxofre eletrofílico (HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005; HUBER; ALMEIDA; DE FÁTIMA, 2008). Além disso, a atuação das GSTs é uma importante estratégia de defesa da célula contra xenobióticos e controle da formação excessiva de produtos da peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados presentes nas membranas celulares (PRABHU *et al.*, 2004).

Entre os antioxidantes não enzimáticos destaca-se a GSH, um tripeptídeo formado a partir de ácido glutâmico, cisteína e glicina. O componente funcional fundamental da GSH é a porção tiol no resíduo de cisteína, que pode atuar como um redutor e um nucleófilo. Além disso, a GSH também está firmemente ligada a outros pares redox, quer metabolicamente ou devido à sua capacidade para formar dissulfuretos mistos tiol-glutathione, com pequenas moléculas, bem como com proteínas (ZIEGLER, 1985; COTGREAVE; GERDES, 1998).

A GSH está envolvida em várias funções biológicas, tendo em vista que possui papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos, participando também na redução de ribonucleotídeos e desoxirribonucleotídeos. Além disso, é uma forma de reserva de cisteína, armazena e transporta Óxido Nítrico (NO), participa do metabolismo dos estrogênios, leucotrienos e prostaglandinas, e defende as células contra o estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; LUSHCHAK, 2012). Entretanto, para que sua atividade protetora expressa pela redução de ERs, e conseqüente oxidação da GSH à GSSG seja mantida, a GSH precisa ser regenerada através do ciclo catalítico da glutathione (HUBER; ALMEIDA; DE FÁTIMA, 2008), representado na Figura 4.

Figura 4 - Integração dos sistemas de defesa enzimáticos.



Fonte: Barbosa *et al.*, 2010.

Estudo de Ogunro *et al.* (2014) verificaram menores níveis de capacidade antioxidante total, GPx, SOD, CAT e GSH durante a pós-menopausa em comparação com as mulheres na idade reprodutiva, mostrando que nesta fase pode haver uma redução das defesas antioxidantes no organismo feminino.

O aumento das defesas antioxidantes não é apenas útil na obtenção de um equilíbrio redox favorável no organismo, mas também estão associadas a um risco reduzido de DCV, que é mediado através da inibição da oxidação do LDL. Esse incremento de antioxidantes é de grande relevância em mulheres no período de pós-menopausa, tendo em vista que nessa fase da vida há uma redução dos níveis de estrogênio, que entre inúmeras funções, apresenta papel cardioprotetor (DOSHI; AGARWAL, 2013).

3.2.4 Antioxidantes naturais

A natureza é uma fonte importante de moléculas úteis para a terapêutica. Preparações caseiras e farmacêuticas obtidas de fontes naturais, sobretudo plantas, foram à base da farmacoterapia até meados do século XIX e são até hoje essenciais em sistemas de medicina tradicional (SIMÕES *et al.*, 2017).

Os vegetais possuem metabólitos primários, que exercem função ativa nos processos de fotossíntese, respiração e assimilação de nutrientes; e os secundários, que estão intimamente associados às estratégias de defesa das plantas (NASS, 2007). Os principais metabólitos secundários são distribuídos em três grupos de acordo com sua rota biossintética:

terpenos, compostos fenólicos e compostos contendo nitrogênio (TAIZ; ZEIGER, 2004; SILVA *et al.*, 2010).

Os compostos fenólicos pertencem a uma classe de compostos que inclui uma grande diversidade de estruturas, simples e complexas, que possuem pelo menos um anel aromático, no qual, ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila. Esse grupo de metabólitos secundários pode ser classificado segundo o tipo de esqueleto principal, conforme representado na Tabela 1 (SIMÕES *et al.*, 2010).

Tabela 1 - Classificação dos compostos fenólicos de acordo com o esqueleto básico.

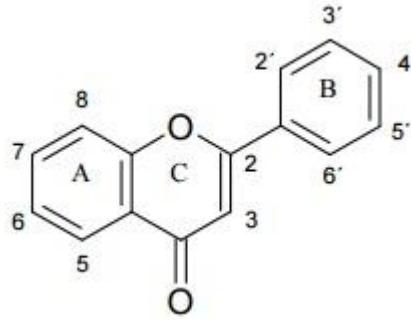
Esqueleto básico	Classe de compostos fenólicos
C6	Fenóis simples, benzoquinonas
C6-C1	Ácidos fenólicos
C6-C2	Acetofenonas e ácidos fenilacéticos
C6-C3	Fenilpropanóides: ácidos cinâmicos e compostos análogos, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas e cromonas
C6-C4	Naftoquinonas
C6-C1-C6	Xantonas
C6-C2-C6	Estilbenos, antraquinonas
C6-C3-C6	Flavonoides e isoflavonoides
(C6-C3) ₂	Lignanais
(C6-C3-C6) ₂	Diflavonóides
(C6) _n	Melaninas vegetais
(C6-C3) _n	Ligninas
(C6-C1) _n	Taninos hidrolisáveis
(C6-C3-C6) _n	Taninos condensados

Fonte: Simões *et al.* 2010.

Dentre os antioxidantes naturais, os compostos fenólicos são o maior grupo de fitoquímicos e têm atraído cada vez mais atenção como potenciais agentes para a prevenção e tratamento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo. Isso se justifica devido aos compostos fenólicos possuírem ação antioxidante, determinada por sua estrutura, em especial por hidroxilas que podem doar elétrons e suportar como resultado a deslocalização em torno do sistema aromático (DORNAS *et al.*, 2007).

De acordo com Oga, Camargo e Batistuzzo (2014), os flavonoides (Figura 5) apresentam ação antioxidante através da quelação de metais de transição, ação direta contra os radicais livres por meio da transferência de átomos de hidrogênio, além da inibição das enzimas cicloxigenase, lipogenase, NADPH-oxidase, xantina oxidase e fosfolipase, e estimulação de enzimas com atividade antioxidante, como a catalase e a superóxido dismutase.

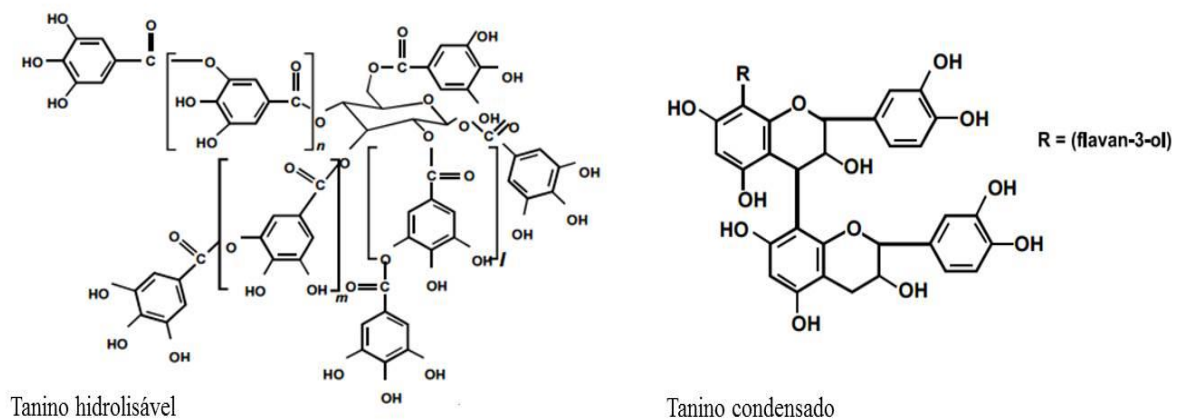
Figura 5 - Estrutura química geral de um flavonoide.



Fonte: Behling *et al.*, 2004.

Os taninos, por sua vez, são compostos fenólicos de alto peso molecular presentes sob a forma de polímeros, que conferem ao alimento a sensação de adstringência, e classificam-se em dois grupos, baseados em seu tipo estrutural: taninos hidrolisáveis e taninos condensados (Figura 6). Os primeiros contêm um núcleo central de glicose ou um álcool poliidríco, esterificado com ácido gálico ou elágico, e são prontamente hidrolisáveis com ácidos, bases ou enzimas. Os outros são constituídos por unidades flavanol: flava-3-ols (catequina) ou flavan 3,4-diols (leucoantocianinas), não hidrolisáveis por tratamento ácido (MONTEIRO *et al.*, 2005). Sugere-se que os possíveis mecanismos de ação antioxidante dos taninos no organismo estejam relacionados a três propriedades: a complexação com íons metálicos (ferro, manganês, vanádio, cobre, alumínio, cálcio, entre outros); a atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres e a habilidade de complexar com macromoléculas, tais como proteínas e polissacarídeos (HASLAM, 2007; SIMÕES *et al.*, 2017).

Figura 6 - Estruturas químicas de tanino hidrolisável e tanino condensado.



Fonte: Adaptado de Battestin, Matsuda e Macedo, 2004.

3.3 Gênero *Baccharis*

O nome do gênero *Baccharis* deriva do latim *baccar* ou *bacchar*, que se refere a plantas com raiz perfumada ou também a espécies arbustivas (SAAD *et al.*, 2016). Pertence à família Asteraceae, e é constituído por cerca de 500 espécies, distribuídas principalmente no Brasil, Argentina, Colômbia, Chile e México. Atualmente, 178 espécies de *Baccharis* foram registradas no Brasil e destas, 83 são encontradas no estado do Paraná, que é um dos maiores centros de diversidade de *Baccharis* no Brasil (HEIDEN; RIBAS, 2012; HEIDEN; SCHNEIDER, 2015). Segundo Campos *et al.* (2016) as espécies mais estudadas são a *Baccharis dracunculifolia*, *Baccharis trimera*, *Baccharis articulata*, *Baccharis uncinella*, *Baccharis salicifolia* e *Baccharis gaudichaudiana*.

Este gênero compreende plantas herbáceas perenes, subarbustos e arbustos, com altura entre 0,5 a 4 metros (BUDEL *et al.*, 2005). Os arbustos são bastante ramificados na base e possuem caules e ramos verdes com expansões trialadas. As inflorescências são do tipo capítulo, que podem ser de uni a multiflores, dispostas lateralmente nos ramos, de cor esbranquiçada. São plantas dioicas com inflorescências masculinas e femininas em plantas separadas (BOLDT, 1989; AGOSTINI *et al.*, 2005). Algumas espécies possuem cladódios e são conhecidas popularmente como carqueja, carqueja amarga, carqueja-amargosa, carquejo ou vassoura (LORENZI; MATOS, 2008). Crescem sobre terrenos altos, solos rochosos, pradarias, beiras de caminhos e em campos arenosos, até 2800 m acima do nível do mar (ALONSO, 2016).

No que diz respeito as suas características químicas, mais de 140 compostos foram isolados e identificados, e cerca de 120 espécies foram quimicamente analisadas e entre estas, em torno de 30 apresentam estudos com atividade biológica (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005; ABAD; BERMEJO, 2007; CAMPOS *et al.*, 2016). A composição química da carqueja pode ser considerada regioseletiva, pois no sistema radicular encontram-se diésteres terpênicos relacionados com o carquejol. Já na parte aérea os constituintes químicos encontrados são: diterpenos (bacrispina, 1-desoxibacrispina, ácido hautriwaico e sua lactona), lactonas diterpênicas do tipo *trans*-clerodano (malonil clerodanos), estigmasterol, óleo essencial composto por α -pineno, β -pineno, canfeno, limoneno, acetato de carquejilo, carquejol, β -ocimeno, ledol, uma saponina derivada do ácido equinocístico e principalmente flavonoides (hispidulina, rutina, eupatorina, luteolina, nepetina, apigenina, campferol, cirsimaritina, cirsiol, eriodictiol, 5-hidroxi-3',4',6,7-tetrametoxiflavona, quercetina, genkwanina e 7,4'-di-*o*-metilapigenina) (ALONSO; DESMARCHELIER, 2006).

Quanto à importância ecológica, espécies de *Baccharis* ajudam no combate à erosão. Além disso, podem ser utilizadas como plantas ornamentais e na agricultura são aproveitadas pelas propriedades alelopáticas retardando a velocidade na germinação de sementes, inibindo o crescimento micelial de fungos e de raízes de trigo. Também são utilizadas na indústria de cervejaria como substituto do lúpulo e na aromatização de refrigerantes e de licores; mas o maior destaque está na medicina, onde várias espécies são utilizadas popularmente principalmente para dispepsia (CASTRO; FERREIRA, 2000; BUDEL *et al.*, 2005).

3.3.1 *Baccharis trimera* (Less.) DC.

Entre as diversas espécies de carquejas, a *Baccharis trimera* (Less) DC., conhecida popularmente como carqueja, carqueja-amarga, carqueja-do-mato, bacanta ou caia-amarga (SAAD *et al.*, 2016) é a espécie indicada pelo Ministério da Saúde (Figura 7). Foi incluída da 1ª edição da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 1929), sendo mantida na 5ª edição (BRASIL, 2010). Está presente na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (BRASIL, 2009), no Anexo I da RDC 10/2010 (BRASIL, 2010) e no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2011), devido à vasta utilização pela população. Caracteriza-se por um subarbusto pequeno, dioico, ramificado, com ramos sem folhas, triplados, com alas interrompidas alternadamente, membranosas a levemente coriáceas (SIMÕES *et al.*, 1998).

Os principais princípios ativos identificados nessa espécie são flavonoides (quercetina, genkwanina, apigenina, eupafolina, cirsimarina, hispidulina, eupatorina, luteolina, rutina, nepetina, eriodictiol, cirsiol, canferol, 5-OH-6,7,3,4-OMe flavona e 5,7,3,4-OH-3-O-ramnosil-glicosil), compostos diterpênicos (clerodânicos e os tipos de labdano), triterpenos, saponinas, taninos, ácido clorogênico, ácido 3,4-O-[E]- dicafeoil-quínico, ácido 3,5-O-[E]- dicafeoil-quínico, ácido 4,5-O-[E]-dicafeoil-quínico, ácido tricafeoil-quínico e óleos essenciais (α -pineno, carquejol, β -pineno, canfeno, limoneno, acetato de carquejilo, β -ocimeno e ledol) (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005; ALONSO, 2016). Segundo Karam *et al.* (2013), os flavonoides estão entre os metabólitos secundários encontrados em maior quantidade e que apresentam maior atividade terapêutica nesta planta.

De acordo com a RDC 10/2010 e o Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, a *B. trimera* é indicada para dispepsia e deve ser preparada na forma de infusão, utilizando 2,5 gramas das partes aéreas secas e 150 mL de água fervente, podendo ser utilizada de duas a três vezes ao dia (BRASIL 2010; 2011). Porém, estudos mostraram que o seu extrato aquoso preparado por maceração apresentou atividade antibacteriana sobre

Staphylococcus aureus (OLIVEIRA *et al.*, 2005; BETONI *et al.*, 2006), atividade hepatoprotetora (SOICKE; LENG-PESCHLOW, 1987), anti-inflamatória (PAUL *et al.*, 2009), analgésica (GENÉ *et al.*, 1996) e antigenotóxica (RODRIGUES *et al.*, 2009). O extrato aquoso, bruto liofilizado e o extrato liofilizado da resina apresentaram potencial antiulcerogênico (GAMBERINI *et al.*, 1991; DIAS *et al.*, 2009). O extrato metanólico mostrou atividade antimutagênica (NAKASUGI; KOMAI, 1998), antifúngica (FABRI *et al.*, 2011) e também se mostrou útil como adjuvante no tratamento da obesidade (SOUZA *et al.*, 2012). Já a fração aquosa do extrato obtido por maceração demonstrou uma possível atividade anti-diabética (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Alguns autores investigaram o efeito antioxidante em diferentes frações de extratos desta espécie. Dentre eles, Oliveira *et al.* (2004) verificaram a atividade antioxidante dos extratos diclorometano, n-butanol, acetato de etila e resíduo aquoso a partir da dosagem do potencial antioxidante reativo total e prevenção da formação de TBARS induzida por H₂O₂, e os resultados mostraram que as partições polares apresentaram maior atividade antioxidante, destacando-se a fração n-butanol. Já Simões-Pires *et al.* (2005), a partir da reação com 2,2'-difetil-1-picril-hidrazil (DPPH) identificaram compostos antioxidantes no extrato aquoso desta espécie e Mendes, Tabach e Carlini (2007) relataram que o extrato hidroalcoólico apresentou atividade antioxidante.

Dias *et al.* (2009) verificaram evidente atividade antioxidante no extrato bruto liofilizado, extrato bruto liofilizado da “resina”, pó da droga e frações clorofórmica, acetato de etila, etanol absoluto e etanol 50%, também através da reação com DPPH. De Oliveira *et al.* (2012) verificaram que os extratos fenólicos e acetato de etila apresentaram maior atividade antioxidante do que o ácido ascórbico, e estes autores sugeriram que a atividade antioxidante da *B. trimera* se deve a presença de compostos fenólicos. Pádua *et al.* (2014) verificaram que o extrato hidroetanólico desta planta reduziu o estresse oxidativo causado por lesão hepática induzida por acetaminofeno em ratos através do aumento da atividade da CAT e aumento dos níveis da GSH.

De acordo com Simões *et al.* (2017), flavonoides, cumarinas, fenilpropanóides e terpenóides têm sido relatados como sequestradores e inibidores da peroxidação lipídica. Dados da literatura relataram a presença de diterpenoides, flavonoides e saponinas na *B. trimera*, o que pode estar relacionado com sua potencial atividade antioxidante (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005).

Figura 7 - *Baccharis trimera* (Less.) DC.

Fonte: Flora Digital do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Fotógrafa Rosângela Gonçalves Rolim.

3.3.2 *Baccharis articulata* (Lam.) Pers.

A *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. é conhecida popularmente como carquejinha, carqueja doce, carqueja branca, vassoura ou carqueja miúda (Figura 8) (LORENZI; MATOS, 2008). Difere-se da *B. trimera* por possuir ramos bialados, verde-acinzentados (SIMÕES *et al.*, 1998; SIQUEIRA; ALICE; THIESEN, 1988). Esta espécie não está presente no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, entretanto, se encontra registrada pela 7ª edição da Farmacopeia Nacional Argentina (ARGENTINA, 2003) e autorizada para consumo pela Resolução ANMAT 2673/99 (ANMAT, 1999).

Quanto a sua constituição química, é relatada a presença de taninos, diterpenos clerodanos (8 β -hidroxi-7-oxo-ent-cleroda-3-en-15,18-diácido-16,19dilactona), 7-oxo-16,19-dihidroxi-3,4-deidroclerodan15,20-diacid-dilactona, 15,16-epoxi-7 α -18-dihidroxi-15-metoxi-ent-clero-da-3-eno, acetato de articulina, ácidos fenólicos (4'-O- β -D-glucopiranosil-3',5'-dimetoxibenzil cafeato, ácido clorogênico), óleo volátil (β -Pineno, espatulenol, *trans*-nerolidol, germacreno D, α - β -cariofileno, τ -gurjunene, α -candinol) e flavonoides (luteolina, quercetina, santonina, absintina, acacetina, 7,4-dimetil-apigenina, circimaritina, salvigenina, jaceidina, jaceosidina) (SIMÕES *et al.*, 1998; AGOSTINI *et al.*, 2005; BORELLA *et al.*, 2006).

O extrato etanólico das partes aéreas apresenta atividade antifúngica (LUPI *et al.*, 2009) e o extrato aquoso também possui atividade antifúngica (LUPI *et al.*, 2009), além de atividade antiviral (TORRES *et al.*, 2011), antiproliferativa e mutagênica (FACHINETTO;

TEDESCO, 2009; CARIDDI *et al.*, 2012). Na Argentina, acredita-se que tenha atividade no tratamento de impotência sexual masculina e de esterilidade feminina. No Paraguai é utilizada como anti-hipertensiva e antidiabética (ABAD; BERMEJO, 2007). Ainda, De Oliveira *et al.* (2003) demonstraram que o composto Ball (4'-O- β -D-glucopiranosil-3',5'-dimetoxibenzil cafeato), isolado a partir da fração n-butanólica das partes aéreas de *B. articulata* apresentou atividade antioxidante comparável ao Trolox[®], análogo sintético da vitamina E e Borgo *et al.* (2010) também verificaram potencial atividade antioxidante do extrato na concentração de 100 μ g/mL através do ensaio de inibição da xantina oxidase.

Figura 8 - *Baccharis articulata* (Lam.) Pers.



Fonte: Flora Digital do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Fotografia Rosângela Gonçalves Rolim.

3.4 Eritrócito humano como modelo experimental

O eritrócito humano maduro é uma célula simples, que vive aproximadamente 120 dias na circulação periférica. Sua função vital é transportar oxigênio aos tecidos, através da hemoglobina. A membrana tem um papel fundamental na manutenção da forma do eritrócito, visto que é constituída por 42% de lipídeos, 52% de proteínas e 7% de carboidratos (DACIE; LEWIS, 1995).

A distribuição dos fosfolipídeos na bicamada dos eritrócitos é assimétrica: quase toda a esfingomiéline e fosfatidilcolina, ambas redutoras da fluidez da membrana, são encontradas

do lado externo da membrana. Em contraste, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e fosfatidilinositol, responsáveis por membranas mais fluidas, são preferencialmente encontradas no lado citosólico da membrana. Essa distribuição dos lipídeos pode estar relacionada com a curvatura da membrana (LODISH, 2004).

As proteínas que compõem a membrana eritrocitária são estruturalmente classificadas em integrais ou transmembrana e periféricas ou extra-membrana. As proteínas integrais penetram ou atravessam a bicamada lipídica e interagem com a porção hidrofóbica das moléculas lipídicas. Entre elas estão as proteínas de transporte, como a banda 3, denominada proteína transportadora de íons; e as glicoforinas A, B, C e D, que possuem receptores de membrana e antígenos, os quais participam do reconhecimento célula-célula na extremidade externa e auxiliam na estabilização do citoesqueleto através de ligações com a proteína 4.1 na face interna da membrana. Das diferentes proteínas da membrana eritrocitária, o domínio citoplasmático da banda 3 se destaca como um grande centro organizacional que interage com muitas outras proteínas periféricas ou ligantes: anquirina, considerada a maior ponte para o citoesqueleto espectrina-actina, proteína 4.1, proteína 4.2, aldolase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, fosfofrutoquinase, desoxihemoglobina, tirosinaquinase e hemicromos, que regulam a interação do citoesqueleto com enzimas glicolíticas (MURADOR; DEFFUNE, 2007).

O eritrócito constitui um sistema celular adequado para o estudo dos efeitos das ERs devido a sua simplicidade estrutural, acessibilidade e vulnerabilidade dos seus constituintes a oxidação, bem como a presença de um sistema antioxidante enzimático e não enzimático. As principais estruturas eritrocitárias afetadas pelas ERs são os constituintes de membrana e a hemoglobina, tendo em vista que a membrana dos eritrócitos é rica em ácidos graxos insaturados, suscetíveis a peroxidação lipídica, e as proteínas presentes na membrana também podem ser modificadas no processo oxidativo, sobretudo se possuem grupos sulfidril (-SH), ocorrendo uma acumulação intracelular de proteínas desnaturadas. Além disso, por serem células anucleadas, são incapazes de reparar os componentes danificados (MAURYA; KUMAR; CHANDRA, 2015). A limitação deste sistema é que não reproduz precisamente as condições do organismo, pois se perdem as funções sistêmicas como a endócrina e a nervosa (CASADEVALL, 2009).

Diversos estudos vêm sendo realizados com esse modelo experimental. Schmitz *et al.* (2008) investigaram a atividade anti-hemolítica da *Camellia sinensis*; Horn *et al.* (2015) avaliaram o efeito antioxidante do extrato aquoso de *Physalis peruviana* em eritrócitos humanos expostos ao herbicida 2,4-D; Horn *et al.* (2016) também realizaram um estudo a fim

de avaliar o efeito antioxidante da infusão de *Cunila microcephala* Benth em eritrócitos de agricultores. Neste sentido, considera-se um bom modelo experimental para avaliar dano oxidativo, pois o eritrócito não é capaz de reparar tal dano, sendo assim, eles ficam estáveis, facilitando a avaliação *in vitro*.

4. MANUSCRITOS CIENTÍFICOS

Os resultados apresentados nesta dissertação estão organizados em manuscritos científicos, os quais se encontram aqui estruturados. Os itens metodologia, resultados, discussão dos resultados e referências encontram-se nos próprios manuscritos.

O manuscrito I intitulado “Oxidative and antioxidant parameters in postmenopausal women” se encontra estruturado de acordo com as normas da revista *Menopause* e o manuscrito II intitulado “*In vitro* antioxidante potential of *Baccharis trimera* (Less.) DC and *Baccharis articulata* (Lam.) Pers infusions in postmenopausal women” se encontra nas normas da revista *Maturitas*.

4.1 Manuscrito I

OXIDATIVE AND ANTIOXIDANT PARAMETERS IN POSTMENOPAUSAL WOMEN

Postmenopausal Oxidative Stress

Gabriela Tassotti Gelatti¹, Ana Caroline Tissiani¹, Mariana Spanamberg Mayer¹, Tamiris Felippin¹, Daiana Meggiolaro Gewehr², Evelise Moraes Berlezi², Roberta Cattaneo Horn¹

¹University of Cruz Alta (UNICRUZ), Rio Grande do Sul, Brazil

²Regional University of the Northwestern Rio Grande do Sul (UNIJUÍ), Rio Grande do Sul, Brazil

Funding

The authors did not receive funding to carry out this study.

Conflict of Interests

The authors declare no conflict of interest.

Corresponding Author

Roberta Cattaneo Horn

Dr. Ulysses Guimarães University Campus - Rodovia Municipal Jacob Della Méa, km 5.6, Parada Benito 98.005-972, Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brazil.

Phone number: (55) 55991420578

E-mail: rcattaneo@unicruz.edu.br

Abstract

Objective: To evaluate oxidative stress markers in postmenopausal women.

Methods: Blood samples were collected from 55 postmenopausal women and 53 women with regular menstrual cycle (control group). The levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), carbonylated proteins (CPs), and reduced glutathione (GSH) in the plasma of the participants were measured, as well as, serum levels of 17 β -estradiol and markers of the lipid profile.

Results: The levels of TBARS and CPs increased by 114% ($p=0.000$) and 10.9% ($p=0.043$), respectively, whereas GSH level decreased by 31.4% ($p=0.002$) in the postmenopausal group compared with that in the control group. We found a negative correlation between TBARS and 17 β -estradiol levels ($r=-0.36$, $p=0.009$) and a positive correlation between levels of TBARS and total cholesterol ($r=0.33$, $p=0.001$), TBARS and low-density lipoprotein ($r=0.26$, $p=0.019$) and TBARS and very low-density lipoprotein ($r=0.30$, $p=0.002$).

Conclusion: Postmenopausal women showed high oxidative damage in lipids and proteins and low level of the main endogenous antioxidant. These changes are related to the changes in the lipid profile and decline in estrogen level occurring at this life stage.

Keywords: Post-menopause; Estrogen; Oxidative Stress.

Introduction

The increase in life expectancy has generated new challenges in public health.¹ With this increase, women now live one-third or more of their lives in a hormonal deficiency state.^{2,3} Therefore, the female post-reproductive period deserves particular attention.

During menopause, the action of antioxidant agents is very important because these molecules neutralize reactive oxygen species (ROS) and prevent lesions due to oxidative stress such as lipid peroxidation, protein carbonylation, and damage to the deoxyribonucleic acid (DNA).⁴

In addition to the endogenous defenses, estrogen at high concentration exerts antioxidant activity partly owing to its hydrophenolic structure, which can donate hydrogen atoms to unstable molecules such as free radicals and, therefore, removes them from the medium.^{5,6} Estrogen acts as a positive regulator of antioxidant enzymes⁷ and inhibits 8-hydroxylation of guanine bases in DNA.⁸

However, during the female aging process, the endogenous antioxidant effect of estrogen may decrease,⁹ which is associated with various postmenopausal effects, including cardiac diseases,¹⁰ vasomotor disorders¹¹ and osteoporosis.¹²

The objective of this study was to evaluate oxidative stress markers in postmenopausal women to better understand the biological events associated with the decline of estrogen level. The results of this report could help improve longevity and quality of life of this population.

Methods

Ethical aspects

The present study resulted as a subproject of the research projects: “Study of the Antioxidant Effect of Different Active Principles” developed at the University of Cruz Alta (UNICRUZ), and approved by the Research Ethics Committee (REC) of this university under Consolidated Opinion No. 273,167; and “Study of Female Aging” developed at the Regional University of the Northwestern Rio Grande do Sul (UNIJUÍ), and approved by the REC of this university under Consolidated Opinion No. 864,988. All participants signed free and informed consent forms.

Samples

Blood samples were collected from 55 postmenopausal women (post-menopause group) and 53 women with regular menstrual cycle (control group).

- Inclusion criteria for the post-menopause group: women with active register in the primary health care of the urban area of the city of Ijuí/RS and participants of the “Study of the Aging Female” research project, with at least 12 months of amenorrhea;
- Exclusion criteria for the post-menopause group: use of hormone replacement therapy (HRT), antioxidant medications, or vitamin supplements.
- Inclusion criteria for the control group: women with regular menstrual cycle, The inclusion of women using contraceptives is a limitation of the study;
- Exclusion criteria for the control group: use of antioxidant medications or vitamin supplements.

A medical history questionnaire was administered to the participants. The variables of interest were: age, use of medications or supplements, and information about the menstrual cycle.

Blood collection and sample preparation

Blood samples were collected after 12 hours of fasting, with the use of a vacutainer without anticoagulants to obtain the serum, and a vacutainer containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) to obtain the plasma. These samples were centrifuged at 3,000 rpm for 10 minutes. Samples were then stored in a freezer at - 20°C until laboratory analysis was performed.

Laboratory analysis

The concentrations of 17 β -estradiol were measured in serum by chemiluminescence, according to the protocol for the Immulite[®] commercial kit. The results are expressed in $\rho\text{g/mL}$.

The levels of total cholesterol (TC), triglycerides (TG), and high-density lipoprotein (HDL) were measured in the serum, according to the protocol for the Labtest[®] commercial kit. The level of low-density lipoprotein (LDL) in the samples with TG < 400 mg/dL was estimated using the Friedewald formula, [LDL (mg/dL) = TC - (HDL + TG/5)], and the level of very low-density lipoprotein (VLDL) was calculated using the formula VLDL = TG/5. The results were expressed in mg/dL.

The levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in the plasma were determined by exploiting the colorimetric reaction between malondialdehyde (MDA) and thiobarbituric acid (TBA), which was detected using a Bel Photonics spectrophotometer at a

wavelength of 532 nm, according to the protocol of Jentzsch et al.¹³ The results are expressed in $\eta\text{mol MDA/mL}$.

Total proteins (TP) were dosed according to the protocol for the Labtest[®] commercial kit and carbonylated proteins (CPs) concentration was determined according to the technique described by Levine.¹⁴ This technique consists of dosing CPs by colorimetric reaction with 10 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) after they have been denatured upon addition of 2M hydrochloric acid (HCl) followed by treating the resulting pellet with 3% sodium dodecyl sulfate (SDS) at pH 6,8. Absorbance of the samples and blanks was measured using a spectrophotometer at a wavelength of 370 nm. The results are expressed in $\eta\text{mol/mg TP}$.

Reduced glutathione (GSH) was determined according to the method described by Ellman,¹⁵ which is based on the colorimetric reaction between GSH and 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), detected at a wavelength of 412 nm. The results are expressed in $\mu\text{mol/mL}$.

Statistical analysis

The Kolmogorov-Smirnov test was performed to verify the distribution of the sample. Median, upper limit, lower limit, and relative frequency were used to describe quantitative variables. The Mann-Whitney test was performed to compare the median of the variables of the control group and the post-menopause group. Spearman correlation was performed to investigate the association of the studied parameters. Moreover, $p < 0.05$ at a 95% confidence interval was considered statistically significant.

Results

Regarding the lipid profile, the median increased by 19.5% for TC ($p=0.001$); 22.7% for LDL ($p=0.009$); 27.3% for VLDL ($p=0.010$); and 25.2% for TG ($p=0.011$) in postmenopausal women compared to that in the control group. There was no difference in HDL levels in the studied group compared to the control (Table 1).

Regarding the oxidative stress parameters, levels of TBARS and CPs increased by 114% ($p < 0.001$) and 10.9% ($p=0.043$), respectively, in postmenopausal women compared to that in the control group. The level of GSH decreased by 31.4% ($p=0.002$) in the post-menopause group compared to that in the control group (Table 2).

We found a negative correlation between TBARS and 17 β -estradiol levels ($r=-0.36$, $p=0.009$) and a positive correlation between levels of TBARS and CT ($r=0.33$, $p=0.001$), TBARS and LDL ($r=0.26$, $p=0.019$) and TBARS and VLDL ($r=0.30$, $p=0.002$).

Discussion

The concentration of different reducing and oxidant markers is an important parameter to evaluate the pro-oxidant state in the body tissues.¹⁶ ROS-induced damages contribute to the pathogenesis and physiopathology of many chronic diseases such as neurodegenerative conditions (e.g., Parkinson's disease, Alzheimer's disease, Huntington's disease, and amyotrophic lateral sclerosis), emphysema, cardiovascular diseases (CVDs), inflammatory diseases, cataract, and cancer.¹⁷ Moreover, oxidative stress exerts a negative influence on the biology of aging, which consists of reduction in physiological functions.⁸

In the post-menopause phases, a decline of estrogen levels is observed, which, among many functions, has a cardioprotective role. Consequently, this reduction, affects negatively lipid and lipoprotein metabolism,¹⁹ which was confirmed in this study by showing that postmenopausal women had high levels of TC, LDL, VLDL, and TG compared to women with regular menstrual cycle. This physiological status, especially high levels of oxidized LDL, is responsible for inflammation-induced endothelial injury, which leads to the progression of early atherosclerotic lesions.^{20,21} Vascular endothelial and smooth cells are major sources of ROS and are involved in the occurrence and development of endothelial dysfunctions leading to CVDs.²² It is worth noting that the incidence of CVD increases considerably after menopause.²³

Furthermore, ROS react with polyunsaturated fatty acids and form lipid peroxidation products such as MDA, which are highly damaging to the body.²⁴ Here, it was found that the levels of TBARS increased more than 100% in postmenopausal women compared to that in women with regular menstrual cycle. This finding demonstrates exacerbated lipid damage in the population under study, probably due to the decrease in estradiol level and change in the lipid profile.

The excessive lipid oxidative damage described in this study causes inactivation of the cell's repairing ability, with consequent cell death induction. This process may eventually lead to cellular and molecular damage, thus facilitating the development of various pathologies such as diabetes, metabolic syndrome, dyslipidemia, ischemia, and accelerated aging.^{24,25} These diseases are associated with a higher mortality risk for postmenopausal women compared to men or premenopausal women.²⁶

In addition to lipids, proteins are among the main targets of oxidants under oxidative stress conditions because of their high affinity for ROS and their abundance in biological systems.²⁷ ROS react with proteins in different ways: directly with the protein skeleton, through direct oxidation of amino acid residues, or by formation of CPs. Indirect damages by secondary byproducts (e.g., oxidatively modified sugars, aldehydes, and lipids) can also occur.²⁸

As a consequence of the damage, the affected proteins lose their biochemical functionality, their expression pattern is altered, and formation of aggregates occurs, which is related to various pathologies. Recently, increasing evidence has shown that protein oxidation accompanies neurodegenerative diseases²⁹ such as Huntington's disease³⁰, Parkinson's disease, Alzheimer's disease,³¹ and other age-related disorders.³²⁻³⁴ Given the longer life expectancy of females, postmenopausal women are more likely to present with such diseases compared to males.³⁵

According to Grune et al.³⁶ and Höhn et al.,²⁷ accumulation of CPs, which was detected in this study, naturally occurs during aging, owing to progressive decline in the activity of the 20S and 26S proteasomes. It is known that the most oxidatively modified proteins are not repaired but, rather, removed by proteolytic degradation, thereby increasing the degradation of oxidized proteins.

For the body to defend itself against excessive increase of ROS, it is equipped with endogenous antioxidants, of which GSH stands out.³⁷ According to Rebrin and Sohal,³⁸ changes in GSH level are associated with aging. In this study, it was found that postmenopausal women had low levels of this tripeptide.

Age-related loss of GSH has at least two potentially damaging consequences. First, at steady state, hydrogen peroxide level increases, leading to increased formation of hydroxyl radical and, consequently, increased macromolecular structural damage. Lipid peroxidation results in increased levels of byproducts such as MDA, which may form adducts with DNA or proteins, as well as modify their structure and function.^{39,40} In addition, the formation of mixed protein disulfides may interfere with the catalytic efficiency of enzymes, which leads to a decrease in their ability to assemble adaptive responses under oxidative stress conditions.^{41,42}

Conclusions

Postmenopausal women display high oxidative damage in lipids and proteins and low level of the main endogenous antioxidant. This condition is often related to the reduction in

estrogen level and change in the lipid profile, which leads to lipoperoxidation. One strategy for reducing oxidative damage could be the inclusion of antioxidants in therapeutic interventions aiming at improving the health of postmenopausal women.

References

- 1 Minayo MCS. Aging of the Brazilian population and challenges for the health sector. *Cad Saúde Pública*, 2012;28:208-209.
- 2 Poli MEH, Schwanke CHA, Cruz IBM. The menopause in the gerontologic view. *Sci Med*, 2010;20:176-184.
- 3 NAMS. Sociedade Norte-Americana de Menopausa. Guia da Menopausa. 7.ed. 2013. 87p.
- 4 Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod Biol Endocrinol* 2012;10:1-32.
- 5 Ruiz-Larrea MB, Leal AM, Martin C, Martinez R, Lacort M. Antioxidant action of estrogens in rat hepatocytes. *Rev Esp Fisiol* 1997;53:225-229.
- 6 Bellanti F, Matteo M, Rollo T, et al. Sex hormones modulate circulating antioxidant enzymes: impact of estrogen therapy. *Redox Biol* 2013;1:340-346.
- 7 Borrás C, Gambini J, Gómez-Cabrera MC, et al. 17beta-oestradiol up-regulates longevity-related, antioxidant enzyme expression via the ERK1 and ERK2[MAPK]/NFkappaB cascade. *Aging Cell* 2005;4:113-118.
- 8 Wang Z, Chandrasena ER, Yuan Y, et al. Redox cycling of catechol estrogens generating apurinic/aprimidinic sites and 8-oxo-deoxyguanosine via reactive oxygen species differentiates equine and human estrogens. *Chem Res Toxicol* 2010;23:1365-1373.
- 9 Cervellati C, Bergamini CM. Oxidative damage and the pathogenesis of menopause related disturbances and diseases. *Clin Chem Lab Med* 2016;1;54:739-753.
- 10 Bittner V. Menopause, age, and cardiovascular risk: a complex relationship. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:2374-2375.
- 11 Bonaccorsi G, Romani A, Cremonini E, et al. Oxidative stress and menopause-related hot flashes may be independent events. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2015;54:290-293.
- 12 Cervellati C, Bonaccorsi G, Cremonini E, et al. Oxidative stress and bone resorption interplay as a possible trigger for postmenopausal osteoporosis. *Biomed Res Int* 2014;2014:1-8.
- 13 Jentsch AM, Bachmann H, Fürst P, Biesalski HK. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic Biol Med* 1996;20:251-256.

- 14 Levine RL, Garland D, Oliver CN, Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990;186:464-478.
- 15 Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959;82:70-77.
- 16 Duracková Z. Some current insights into oxidative stress. *Physiol Res* 2010;59:459-469.
- 17 Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. *Eur J Med Chem* 2015;97:55-74.
- 18 Maulik N, McFadden D, Otani H, Thirunavukkarasu M, Parinandi NL. Antioxidants in longevity and medicine. *Oxid Med Cell Longev* 2013;2013.
- 19 Saha KR, Rahman MM, Paul AR, Das S, Haque S, Jafrin W, Mia AR. Changes in lipid profile of postmenopausal women. *Mymensingh Med J* 2013;22:706-711.
- 20 Packard RR, Libby P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin Chem* 2008;54:24-38.
- 21 Salhotra S, Arora S, Anubhuti, Trivedi SS, Bhattacharjee J. Influence of menopause on biochemical markers of endothelial dysfunction – A case-control pilot study in North Indian population. *Maturitas* 2009;62:166-170.
- 22 Higashi Y, Maruhashi T, Noma K, Kihara Y. Oxidative stress and endothelial dysfunction: clinical evidence and therapeutic implications. *Trends Cardiovasc Med* 2014;24:165-169.
- 23 Meirelles R.M.R. Menopause and metabolic syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2014;58:91-96.
- 24 Yadav UC, Ramana KV. Regulation of NF- κ B-induced inflammatory signaling by lipid peroxidation-derived aldehydes. *Oxid Med Cell Longev* 2013;2013:1-11.
- 25 Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med* 2010;48:749-762.
- 26 Lin JW, Caffrey JL, Chang MH, Lin YS. Sex, menopause, metabolic syndrome, and all-cause and cause-specific mortality- -cohort analysis from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:4258-4267.
- 27 Höhn A, König J, Grune T. Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins. *J Proteomics* 2013;92:132-159.
- 28 Cabiscol E, Tamarit J, Ros J. Protein carbonylation: proteomics, specificity and relevance to aging. *Mass Spectrom Rev* 2014;33:21-48.
- 29 Martinez A, Portero-Otin M, Pamplona R, Ferrer I. Protein targets of oxidative damage in human neurodegenerative diseases with abnormal protein aggregates. *Brain Pathol* 2010;20:281-297.

- 30 Sorolla MA, Rodriguez-Colman MJ, Vall-llaura N, Tamarit J, Ros J, Cabiscol E. Protein oxidation in Huntington disease. *Biofactors* 2012;38:173-185.
- 31 Mohsenzadegan M, Mirshafiey A. The immunopathogenic role of reactive oxygen species in Alzheimer disease. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2012;11:203-216.
- 32 Levine RL, Stadtman ER. Oxidative modification of proteins during aging. *Exp Gerontol* 2001;36:1495-1502.
- 33 Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Free Radic Res* 2006;40:1250-1258.
- 34 Baraibar MA, Liu L, Ahmed EK, Friguet B. Protein oxidative damage at the crossroads of cellular senescence, aging, and age-related diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2012; 2012:1-8.
- 35 Ferreira L.L, Cochito T.C., Caíres F., Marcondes L.P., Saad P.C.B. Sociodemographic profile of institutionalized elderly with and without Alzheimer's disease. *J Health Sci Inst* 2014;32:290-293.
- 36 Grune T, Shringarpure R, Sitte N, Davies K. Age-related changes in protein oxidation and proteolysis in mammalian cells. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2001;56:459-467.
- 37 Lushchak VI. Glutathione Homeostasis and Functions: potential targets for medical interventions. *J Amino Acids* 2012;2012:1-26.
- 38 Rebrin I, Sohal RS. Pro-oxidant shift in glutathione redox state during aging. *Adv Drug Deliv Rev* 2008;60:1545-1552.
- 39 Uchida K, Stadtman ER. Quantitation of 4-hydroxynonenal protein adducts. *Methods Mol Biol* 2000;99:25-34.
- 40 Rebrin I, Zicker S, Wedekind KJ, Paetau-Robinson I, Packer L, Sohal RS. Effect of antioxidant-enriched diets on glutathione redox status in tissue homogenates and mitochondria of the senescence accelerated mouse. *Free Radic Biol Med* 2005;39:549-557.
- 41 Cotgreave IA, Gerdes RG. Recent trends in glutathione biochemistry-glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation? *Biochem Biophys Res Commun* 1998;242:1-9.
- 42 Droge W. Aging-related changes in the thiol/disulfide redox state: implications for the use of thiol antioxidants. *Exp Gerontol* 2002;37:1333-1345.

Table 1. Characteristics and metabolic markers in postmenopausal women (post-menopause group) and in women with regular menstrual cycle (control group).

	Post-menopause (n = 55)	Control (n = 53)	<i>p</i>
Age (years)	58 38-71	37 16-54	<0.001*
17 β -estradiol (μ g/mL)	19 12-37	130 46-306	<0.001*
TC (mg/dL)	202 95-334	169 107-230	0.001*
HDL (mg/dL)	48 20-77	49.50 30-88	0.979
LDL (mg/dL)	119 22-252	97 27-162	0.009*
VLDL (mg/dL)	28 11-69	22 9-52	0.010*
TG (mg/dL)	139 53-345	111 46-258	0.011*

Results are reported as median and lower limit-upper limit.

*Statistically significant results ($p \leq 0.05$) according to the Mann-Whitney test.

TC - Total Cholesterol; HDL - High-Density Lipoprotein; LDL - Low-Density Lipoprotein; VLDL - Very Low-Density Lipoprotein; TG - Triglycerides.

Table 2. Oxidative stress markers in postmenopausal women (post-menopause group) and in women with regular menstrual cycle (control group).

	Post-menopause (n = 55)	Control (n = 53)	<i>p</i>
TBARS (ηmol MDA/mL)	14.90 4.34-30.92	6.96 2.49-17.10	<0.001*
CPs (ηmol/mg TP)	5.61 1.65-11.09	5.06 0.83-8.50	0.043*
GSH (μmol/mL)	0.59 0.32-1.26	0.86 0.27-1.54	0.002*

Results are reported as median and lower limit-upper limit.

*Statistically significant results ($p \leq 0.05$) according to the Mann-Whitney test.

TBARS - Thiobarbituric Acid Reactive Substances; CPs - Carbonylated Proteins; GSH - Reduced Glutathione.

4.2 Manuscrito II

▫ **IN VITRO ANTIOXIDANT POTENTIAL OF *Baccharis trimera* (Less.) DC AND *Baccharis articulata* (Lam.) Pers INFUSIONS IN POSTMENOPAUSAL WOMEN**

Gabriela Tassotti Gelatti^a, Ana Caroline Tissiani^a, Mariana Spanemberg Mayer^a, Tamiris Felippin^a, Daiana Meggiolaro Gewehr^b, Jana Koefender^a, Evelise Moraes Berlezi^b, Roberta Cattaneo Horn^a

^aUniversity of Cruz Alta (UNICRUZ), Rio Grande do Sul, Brazil.

^bRegional University of Northwestern Rio Grande do Sul State (UNIJUÍ), Rio Grande do Sul, Brazil.

Corresponding Author

Roberta Cattaneo Horn

Campus Universitário Dr. Ulysses Guimarães - Rodovia Municipal Jacob Della Méa, km 5.6, Parada Benito. 98.005-972. Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brazil.

Phone number: (55)55991420578

E-mail: rcattaneo@unicruz.edu.br

Abstract

Objective: To evaluate *in vitro* whether the infusions of *B. trimera* and *B. articulata* have antioxidant potential in erythrocytes of postmenopausal women and assess which of the species is the most effective. **Methodology:** The erythrocytes from 40 postmenopausal women were treated *in vitro* for an hour with infusions of *B. trimera* and *B. articulata* at the following concentrations: 4.17, 8.34, 16.67, 33.34, and 66.67 g/L. The positive control consisted of erythrocytes from women with reproductive age and negative control by erythrocytes from postmenopausal women both without treatment with the plants. After treatment, the levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), carbonylated proteins (CP), and reduced glutathione (GSH) were measured. **Results:** The infusions of *B. trimera* and *B. articulata* at concentrations of 33.34 g/L ($p < 0.001$) and 66.67 g/L ($p < 0.001$) reduced the level of TBARS in comparison to the negative control, and the effect size (ES) for this reduction was small. The levels of GSH increased after treating with *B. trimera* infusion at a concentration of 66.67 g/L ($p < 0.001$) and with *B. articulata* at concentrations of 33.34 g/L ($p < 0.001$) and 66.67 g/L ($p < 0.001$), when compared with the negative control, and the ES for this increase was average. **Conclusion:** The infusions of *B. trimera* and *B. articulata* show antioxidant potential *in vitro*, thus showing a similar effect with regards to the reduction of oxidative damage to lipids and increased endogenous antioxidant protection. **Keywords:** Postmenopausal, Oxidative Stress, *Baccharis*, Antioxidant.

1. Introduction

Hypoestrogenism triggers significant neurological, psychogenic, and metabolic changes in postmenopausal women [1]. Some of the symptoms that are characteristic of this period of life, such as heat waves, osteoporosis, and cardiovascular diseases (CD), are related to oxidative stress [2]. Oxidative stress occurs whenever there is excess or insufficient removal of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS), which can cause damage to macromolecules and cellular structures, such as lipid peroxidation, protein carbonylation, and damage to DNA. In order to neutralize these harmful effects, the body is equipped with a variety of antioxidant molecules, in addition to those absorbed through the diet [3].

Hormone replacement therapy (HRT) has a beneficial effect on oxidative stress by strengthening antioxidant defense mechanisms in postmenopausal women [2]. However, owing to possible serious adverse effects, such as breast cancer [4] and venous thromboembolism [5], there has been a reduction in the long-term use of HRT. Moreover, this therapy is contraindicated for use in women with breast and endometrial cancers, abnormal uterine bleeding, liver disease, clot history, and CD [1]. There are also women who reject hormonal treatment due to cultural and socioeconomic factors. In such cases, non-medicated alternatives are available, including acupuncture, homeopathy, and use of medicinal plants [6].

The use of medicinal plants contributes significantly to addressing the need for primary health care. In Brazil, its use derives from the difficult access of the population to medical and pharmaceutical assistance, the cost of industrialized medicine, disappointment with the results obtained from conventional treatments, side effects, the damage caused by the abuse and/or incorrect use of medicine, and a consumer tendency to use products of natural origin [7].

The genus *Baccharis* belongs to the Asteraceae family and comprises approximately 500 species distributed across Brazil, Argentina, Colombia, Chile, and Mexico [8]. *Baccharis trimera* (Less.) DC. and *Baccharis articulata* (Lam.) Pers., popularly known as “carqueja” and widely used primarily for dyspepsia, are among the most pharmacologically studied species [9].

Some authors reported the antioxidant activity of n-butanolic [10], aqueous [11], hydro-alcoholic [12,13], chloroformic, ethyl acetate, absolute ethanol, ethanol 50% [14], and phenolic [15] extracts (obtained by maceration) from the aerial parts of *B. trimera*, as well as the n-butanolic [16] and ethyl acetate [17] fractions of *B. articulata* extracts (also obtained by maceration). However, there is a lack of information regarding the activity of those species as infusions, which according to the Brazilian Herbal Pharmacopeia Form is the main preparation for oral administration [18].

Therefore, taking into consideration that postmenopausal women feature high levels of oxidative markers and low levels of antioxidant defense markers due to reduced estrogen levels and also the popularity of several species of “carqueja”, the objective of this study was to analyze *in vitro* whether the infusions of *B. trimera* and *B. articulata* have antioxidant potential in erythrocytes of postmenopausal women and determine which of the species is the most effective.

2. Methodology

2.1 Samples

Forty blood samples from postmenopausal women were included in this study. The negative control consisted of blood samples from 40 postmenopausal women without treatment with the plants infusion and the positive control consisted of 19 blood samples from women with regular menstrual cycle also without treatment with the plants infusion.

- Criteria for the inclusion of postmenopausal women: blood samples from women with an active record in primary health care in the urban area of the municipality of Ijuí/RS; participants in the Female Aging Study research project with at least 12 months of amenorrhea;
- Criteria for exclusion of postmenopausal women: use of HRT, antioxidant medicines, or vitamin supplements.
- Criteria for inclusion in the positive control: blood samples from women with regular menstrual cycles;
- Criteria for exclusion in the positive control: use of antioxidant medicines or vitamin supplements.

2.2 Preparation of *B. trimera* and *B. articulata* infusions

Aerial parts of *B. trimera* and *B. articulata* from the garden of UNICRUZ, Rio Grande do Sul, and the exsiccates of the botanical materials were stored in the herbarium of this university, with registration number 1107 and 1106, respectively. After collection, the aerial parts were dried in an oven at 30° C for four days. The preparation of the infusions involved the following: 150 mL of boiling water (100°C) was poured on 10 g of the dried aerial parts of both plants, in a glass bottle that remained closed and was held still for 10 minutes [18]. The concentration of the infusions of the two species of carquejas used in this study was 66.67 g/L, whereas the other concentrations of the infusions were: 4.17, 8.34, 16.67 and 33.34 g/L which were prepared by dilution.

The phytochemical characterization was performed at the concentration of 66.67 g/L, after freeze-drying.

2.3 Preparation of hydroethanolic extracts of *B. trimera* and *B. articulata*

The hydroethanolic extracts of *B. trimera* and *B. articulata* were prepared in order to compare the concentrations of the phytochemicals present in the respective infusions. The vegetable matter was dried in an oven at 30°C, grinded using a knife grinder and 66.67 g was weighed before extraction was performed. Maceration was performed with absolute ethanol and water (70:30). Both solutions were subjected to daily manual agitations for seven days followed by re-maceration. After this period of 14 days, the extracts were filtered, concentrated in a rotary evaporator, and freeze-dried, thus producing the hydroethanolic extracts [19].

2.4 Phytochemical characterization of the infusions and hydroethanolic extracts of *B. trimera* and *B. articulata*

The total phenolic compounds were determined according to the method described by Chandra and Meija [20]. The results are expressed in milligrams of gallic acid/g dry mass. The total content of flavonoids was determined according to the method described by Woisky and Salatino [21]. The results are expressed in milligrams quercetin/g dry mass. Condensed tannins were determined using the method described by Morrison et al. [22]. The results are expressed in milligrams catechin/g dry mass.

2.5 Blood collection and sample preparation

Blood was collected after 12 hours of fasting, with a vacutainer containing ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA) to obtain the erythrocytes. Samples were centrifuged at 3,000 rpm for 10 minutes. Erythrocytes were then separated and washed three times with an isotonic saline solution (0.9% NaCl) and centrifuged. After a final wash, erythrocytes were resuspended in saline solution (0.9% NaCl), and then diluted to a hematocrit of 10%, according to the technique described by Catagol, Ozden, and Alpertunga [23]. Each group (positive and negative controls) consisted of 1500µL of erythrocytes at 10% hematocrit.

2.5.1 *In vitro* treatments with *B. trimera* and *B. articulata* infusions

Positive control: erythrocytes of women with regular menstrual cycles treated with the vehicle (0.9% NaCl).

Postmenopausal group – *B. trimera*: erythrocytes of postmenopausal women treated with *B. trimera*:

Negative control: erythrocytes of postmenopausal women treated with the vehicle (0.9% NaCl);

4.17 g/L: erythrocytes of postmenopausal women treated with *B. trimera* infusion at 4.17 g/L;

8.34 g/L: erythrocytes of postmenopausal women treated with *B. trimera* infusion at 8.34 g/L;

16.67 g/L: erythrocytes of postmenopausal women treated with *B. trimera* infusion at 16.67 g/L;

33.34 g/L: erythrocytes of postmenopausal women treated with *B. trimera* infusion at 33.34 g/L;

66.67 g/L: erythrocytes of postmenopausal women treated with *B. trimera* infusion at 66.67 g/L.

Postmenopausal Group – *B. articulata*: erythrocytes of postmenopausal women treated with *B. articulata*:

Negative control: erythrocytes of postmenopausal women treated with the vehicle (0.9% NaCl);

4.17 g/L: erythrocytes of postmenopausal women treated with *B. articulata* infusion at 4.17 g/L;

8.34 g/L: erythrocytes of postmenopausal women treated with *B. articulata* infusion at 8.34 g/L;

16.67 g/L: erythrocytes of postmenopausal women treated with *B. articulata* infusion at 16.67 g/L;

33.34 g/L: erythrocytes of postmenopausal women treated with *B. articulata* infusion at 33.34 g/L;

66.67 g/L: erythrocytes of postmenopausal women treated with *B. articulata* infusion at 66.67 g/L.

The treatments were carried out *in vitro* for an hour in a hot water bath at 37°C and after this period, the samples were hemolyzed by vortex agitation for 10 seconds and centrifuged at 3600 rpm for 15 minutes, resulting in the separation of the supernatant, which was stored in a freezer at -20°C until laboratory analysis was performed.

2.6 Laboratory Analyses

The levels of lipid peroxidation were determined using the formation of TBARS, according to the protocol described by Stock and Dormandy [24]. The results were expressed as nmol MDA/g hemoglobin (Hb). Hb levels were determined according to the methodology described by the manufacturers of the Labtest® Kit.

The levels of carbonylated protein (CP) were determined according to the technique described by Levine [25], adapted for use in erythrocytes. The results were expressed as

nmol of CP/mg of total protein (TP). The TP content was quantified in erythrocytes diluted with Hepes, according to the protocol for the Labtest® commercial kit.

The reduced glutathione (GSH) levels were measured according to the technique described by Ellman [26] adapted for use in erythrocytes. The results were expressed as $\mu\text{mol GSH/mL}$ of supernatant.

2.7 Statistical Analysis

Data were analyzed using the *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) v.20 software. The Kolmogorov-Smirnov test was performed to test the distribution of the sample. Quantitative variables were described as mean, standard deviation or standard error, 95% confidence interval (CI), and relative frequency. T-test for independent samples was used to compare the phytochemicals components of hydroethanolic extracts and respective infusions, in addition to the comparison between infusions.

For the comparison between the positive control and negative control, the Mann-Whitney test was used. For the analysis of the five concentrations of each plant species, a One-Way Analysis of Variance test (ANOVA) was performed, followed by a Tukey test. In addition to the statistical significance test, the intra- and inter-group Effect Size (ES) was calculated from Cohen's d test. Values of $r < 0.19$ are considered insignificant, values from 0.20 to 0.49 represent a small ES, values between 0.50 and 0.79 are considered average, and values greater ≥ 0.80 represent a high ES [27]. A value of $p \leq 0.05$ was considered significant for all tests.

3. Results

The redox profiles of the study participants are described in Table 1. Postmenopausal women without infusion treatment (negative control) showed an increase of 212% ($p < 0.001$) and 126% ($p < 0.001$) in TBARS and CP levels, respectively, when compared to women with a regular menstrual cycle (positive control). The negative control showed a decrease of 41.7% ($p < 0.001$) in GSH levels in comparison with the positive control.

Regarding phytochemical characterization, the infusions of *B. trimera* and *B. articulata* showed total phenolic compounds, total flavonoids, and condensed tannins in their compositions, although they contained smaller quantities than their respective hydroethanolic extracts (Table 2). The comparison of these components between the infusions showed a higher content of total phenolic compounds in *B. articulata* ($p = 0.023$).

The infusion of *B. trimera* at concentrations of 33.34 g/L and 66.67 g/L reduced the TBARS levels by 40.2% ($p < 0.001$) and 41.9% ($p < 0.001$), respectively, when compared to the negative control (Figure 1). Moreover, the concentrations of 33.34 g/L ($r = 0.42$, $p < 0.00$) and 66.67 g/L ($r = 0.49$, $p < 0.00$) showed a small ES on lipid peroxidation reduction. The infusion of

B. articulata at concentrations of 33.34 g/L and 66.67 g/L also decreased the TBARS levels by 35.1% ($p < 0.001$) and 42.2% ($p < 0.001$), respectively, in comparison with the negative control (Figure 1). The ES observed for this reduction was small for the concentrations of 33.34 g/L ($r = 0.31$, $p < 0.00$) and 66.67 g/L ($r = 0.39$, $p < 0.00$). After the comparison between species regarding lipid peroxidation decrease, we found no difference in ES, considering that both *B. trimera* and *B. articulata* both showed a small ES.

There was no decrease in CP levels after erythrocyte treatment with both infusions (Figure 2), and both the intra- and inter-group ES were insignificant.

In Figure 3 we observed a 42.9% ($p < 0.001$) increase in GSH levels after the treatment with *B. trimera* infusion at a concentration of 66.67 g/L when compared to the negative control. The ES observed for this concentration was average ($r = 0.51$, $p < 0.00$). The levels of this antioxidant increased 50.5% ($p < 0.001$) and 52.8% ($p < 0.001$) for the concentrations of 33.34 g/L and 66.67 g/L, respectively, for *B. articulata* when compared to the negative control.

An average ES value was calculated for the concentrations of 33.34 g/L ($r = 0.51$, $p < 0.00$), and 66.67 g/L ($r = 0.59$, $p < 0.00$). Comparison between species regarding the increase of GSH showed a difference in the ES for the concentration of 33.34 g/L ($p < 0.00$), i.e., *B. articulata* showed a greater effect on the increase of GSH at the concentration of 33.34 g/L when compared to *B. trimera* at the same concentration.

4. Discussion

This study shows that the highest concentrations of *B. trimera* and *B. articulata* infusions have a potential antioxidant effect in the *in vitro* treatment of erythrocytes of postmenopausal women. It should be noted that this is a low-cost, easily accessed and disseminated in the population, which is widely used by aging women.

This may be justified, first, because both species of carquejas in the infusion preparation mode have antioxidant phytochemicals. The low amount of these phytochemicals in the infusions is due to the time required for extraction, the infusions were in contact with the solvent extractor for 10 minutes, while the incubation for the extracts was 14 days. It is important to study the method of preparation of infusions because of the greater consumption and adherence by the population compared to extracts obtained by encapsulated maceration. This can be explained by the home cultivation of the plants, in addition to a lower cost compared to phytotherapy [28].

Among the quantified components, total phenolic compounds were the largest group of phytochemicals. Their antioxidant potential is due to their structure, particularly because hydroxyls can transfer electrons and thus support their relocation around the aromatic system. Flavonoids have antioxidant properties through the chelation of transition metals,

and can act directly on free radicals through hydrogen transfers. In addition to this, they have the ability to inhibit cyclooxygenase, lipoxygenase, NADPH-oxidase, xanthine oxidase, and phospholipase, and to stimulate antioxidant enzymes, such as catalase and superoxide dismutase. The condensed tannins sequester free radicals and have the ability to complex with macromolecules, such as proteins and polysaccharides [19].

An experimental model was used based on the effects on erythrocytes, taking into consideration that it presents an adequate cellular system for the study the effects of ROS due to the structural simplicity, accessibility and vulnerability of its components to oxidation, as well as the presence of an antioxidant system. In addition, erythrocytes are incapable of repairing damaged components since they are anucleate cells [29].

With this experimental model, it was possible to observe oxidative damages in lipids and proteins and decreased levels of the main endogenous antioxidant in the erythrocytes of postmenopausal women without treatment (negative control) than in women with regular menstrual cycles (positive control). These data are supported by literature, which indicates that oxidative damage occurs in cells and their membranes under normal metabolic conditions. However, the rate of lipid and protein damage increases during post-menopause [30], partly because of reduced levels of estrogen as well as the ability of the antioxidant defense system reduces [31].

Oxidative damage in lipids is highly detrimental to the body since it can alter membrane permeability, fluidity, and integrity. These alterations will eventually lead to severe cytotoxicity, resulting in uncontrolled cellular growth or cell death, facilitating the development of a variety of pathological conditions such as diabetes, metabolic syndrome, dyslipidemia, neural and vascular degeneration, liver and renal toxicity, cancer, and ischemia, in addition to accelerated aging [32,33]. In this study, the infusions of *B. trimera* and *B. articulata* reduced the formation of lipid peroxidation products *in vitro*, mainly malondialdehyde (MDA), at treatment concentrations of 33.34 g/L and 66.67 g/L, when compared to the negative control. This is probably due to the higher content of phenolic components in these concentrations. When comparing species, both concentrations of 33.34 g/L and 66.67 g/L showed a similar effect on the reduction of lipid peroxidation.

In addition to lipids, ROS also causes oxidative damage in proteins. One of the consequences of this is the appearance of carbonyl groups, which can be caused by direct oxidation of amino acid residues and ROS. This is achieved through the formation of a reactive intermediary formed during lipid peroxidation, or produced during the reduction of sugars or their products from oxidation with lysine residues of proteins, leading to the formation of advanced glycation end products [34]. After the *in vitro* treatment with different infusion concentrations, both species showed no decrease in protein carbonylation.

This result may be explained by the fact that the majority of oxidatively modified proteins is not repaired, but removed by proteolytic degradation. Therefore, in order to maintain protein integrity, it is essential to have systems capable of recognizing and degrading damaged or incorrectly folded proteins efficiently, in order to prevent aggregation and cross-linking. One of these is the proteasomal system, particularly proteasome 20S [35]. However, the accumulation of CP is common during aging, due to a progressive decline in the activity of proteasomes 20S and 26S [36], which explains the increase in carbonylation levels seen in the negative control when compared to the positive control.

In order to neutralize the harmful effects caused by the excessive production of ROS, the human body is equipped with a variety of antioxidant molecules, synergistically working through different action mechanisms: preventing the formation of ROS (prevention systems), eliminating ROS (sweeping systems), or even favoring the repair and reconstitution of damaged biological structures (repair systems) [37]. Among the non-enzymatic antioxidants, GSH, a tripeptide formed from glutamic acid, cysteine, and glycine should be mentioned. The antioxidant defense mechanism of GSH is determined by redox active thiol (-SH) of cysteine which oxidizes when GSH reduces target molecules [38]. During aging, there is a decrease in the outflow of cysteine in erythrocytes. As a result, the ratio of GSH:oxidized glutathione decreases with age [39], which explains the decrease in GSH levels observed in the negative control.

After treatment with the infusions, both species showed an increase in GSH, with *B. trimera* being more effective at a concentration of 66.67 g/L, whereas *B. articulata* was more effective at 33.34 g/L and 66.67 g/L. This increase in GSH was probably not caused directly by the “carquejas,” since synthesis of this antioxidant agent is regulated by cysteine [38]. These findings indicate that the reason for the increase in GSH in treatments with 33.34 g/L and 66.67 g/L may have occurred as the “carquejas” decreased the TBARS levels through the antioxidant action of their phytochemical components [19], which consequently caused the accumulation of GSH. Therefore, we suggest that such concentrations of *B. trimera* and *B. articulata* increase antioxidant protection in the body. It should be noted that *B. articulata* had a better effect on GSH at a concentration of 33.34 g/L, when compared with *B. trimera* at the same concentration. Both produced the same effect when administered at 66.67 g/L.

5. Conclusion

The infusions of *B. trimera* and *B. articulata* show antioxidant potential *in vitro*, demonstrating a similar effect both in reducing lipid peroxidation and increasing the body's main endogenous antioxidant.

Contributions

GTG was responsible for the conception and design of the study, study administration, data analysis and interpretation, writing, and review.

ACT was responsible for the study administration, data collection, and laboratory analyses.

MSM was responsible for the study administration, data collection, and laboratory analyses.

TF was responsible for the data collection and laboratory analyses.

DMG was responsible for the data collection and laboratory analyses.

JK was responsible for the plantation and collection of medicinal plants.

EMB was responsible for the conception and design of the study, statistical analysis, and critical review.

RCH was responsible for the conception and design of the study, and critical review.

All authors read and approved the submitted version of the manuscript.

Funding

The authors did not receive any funding to develop this study.

Ethical Approval

This research is a subproject of the research projects: "Study of the Antioxidant Effect of Different Active Principles" developed in the University of Cruz Alta (UNICRUZ), approved by Research Ethics Committee (REC) of this university under Consolidated Opinion No. 273,167; and "Female Aging Study" developed in the Regional University of Northwestern Rio Grande do Sul State (UNIJUÍ) approved by the REC of this university under Consolidated Opinion No. 864,988. All participants signed a free and clarified consent form.

Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

References

- [1] NAMS. Sociedade Norte-Americana de Menopausa. **Guia da Menopausa**. 7.ed. 2013. 87p.
- [2] Doshi, S.B., Agarwal, A. **The role of oxidative stress in menopause**. *J. Midlife. Health*. 4 (2013) 140-146. DOI: doi: 10.4103/0976-7800.118990
- [3] Sies, H. **Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine**. *Redox Biol*. 4 (2015) 180-183. DOI: 10.1016/j.redox.2015.01.002
- [4] Lasserre, A., Fournier, A. **Menopausal hormonal therapy and cancer risks**. *Gynecol. Obstet. Fertil*. 44 (2016) 424-427. DOI: 10.1016/j.gyobfe.2016.05.012

- [5] Lee, C.H., Cheng, C.L., Kao Yang, Y.H., Lin, L.J. **Hormone therapy and risk of venous thromboembolism among postmenopausal women in Taiwan - a 10 year nationwide population-based study.** *Circ. J.* 79 (2015) 1107-1114. DOI: 10.1253/circj.CJ-14-1227
- [6] Borrelli, F., Edzard, E. **Alternative and complementary therapies for the menopause.** *Maturitas.* 66 (2010) 333-343. DOI: 10.1016/j.maturitas.2010.05.010
- [7] Rates, S.M.K. **Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de farmacognosia.** *Rev. Bras. Farmacogn.* 11 (2001) 57-69. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2001000200001>
- [8] Alonso, J., Desmarchelier, C. **Plantas medicinales autóctonas de la Argentina: bases científicas para su aplicación en atención primaria de la salud.** Buenos Aires: LOLA, 2006. 663p.
- [9] Campos, F.R., Bressan, J., Jasinski, V.C.G., Zuccolotto, T., Da Silva, L.E., Cerqueira, L.B. **Baccharis (Asteraceae): chemical constituents and biological activities.** *Chem. Biodivers.* 13 (2016) 1-17. DOI: 10.1002/cbdv.201400363
- [10] Oliveira, S.Q., Dal-Pizzol, F., Moreira, J.C.F., Schenkel, E.P., Gosmann, G. **Antioxidant activity of Baccharis spicata, Baccharis trimera and Baccharis usterii.** *Acta Farm. Bonaer.* 23 (2004) 365-368.
- [11] Simões-Pires, C.A., Queiroz, E.F., Henriques, A.T., Hostettmann, K. **Isolation and on-line identification of antioxidant compounds from three Baccharis species by HPLC-UVMS/MS with post-column derivatisation.** *Phytochem. Anal.* 16 (2005) 307-314. DOI: 10.1002.pca.826
- [12] Mendes, F.R., Tabach, R., Carlini, E.A. **Evaluation of Baccharis trimera and Davilla rugosa in tests for adaptogen activit.** *Phytother. Res.* 21 (2007) 517-522. DOI: 10.1002/ptr.2080
- [13] Pádua, B.C., Rossoni Júnior, J.V., Magalhães, C.L.B., Chaves, M.M., Silva, M.E., Pedrosa, M.L., et al. **Protective effect of Baccharis trimera extract on acute hepatic injury in a model of inflammation induced by acetaminophen.** *Mediators Inflamm.* 2014 (2014) 1-14. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/196598>
- [14] Dias, L.F.T., De Melo, E.S., Hernandez, L.S., Bacchi, E.M. **Antiulcerogenic and antioxidant activities of Baccharis trimera (Less) DC (Asteraceae).** *Rev. Bras. Farmacogn.* 19 (2009) 309-314. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2009000200022>
- [15] De Oliveira, C.B., Comunello, L.N., Lunardelli, A., Amaral, R.H., Pires, M.G., Da Silva, G.L., et al. **Phenolic enriched extract of Baccharis trimera presents antiinflammatory and antioxidant activities.** *Molecules.* 17 (2012) 1113-1123. DOI: 10.3390/molecules17011113
- [16] De Oliveira, S.Q., Dal-Pizzol, F., Gosmann, G., Guillaume, D., Moreira, J.C., Schenkel, E.P. **Antioxidant activity of Baccharis articulata extracts: isolation of a new compound with antioxidant activity.** *Free Radic. Res.* 37 (2003) 555-559. DOI: 10.1080/1071576031000076259
- [17] Borgo, J., Xavier, C.A.G., Moura, D.J., Richter, M.F., Suyenaga, E.S. **The Influence of drying processes on flavonoid level and the antioxidant activity of Baccharis articulata (Lam.) Pers extracts.** *Rev. Bras. Farmacogn.* 20 (2010) 12-17. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2010000100004>

- [18] Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira**. Brasília. 2011. 126p.
- [19] Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., De Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. 1.ed. Artmed, 2017. 502p.
- [20] Chandra, S., Mejia, E.G. **Polyphenolic compounds, antioxidant capacity and quinone reductase activity of na aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green teas (*Camellia sinensis*)**. *J. Agric. Food. Chem.* 52 (2004) 3583-3589. DOI: 10.1021/jf0352632
- [21] Woisky, R.G., Salatino, A. **Analysis of própolis: some parameters and procedures for chemical quality control**. *J. Apic. Res.* 37 (1998) 99-105. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/00218839.1998.11100961>
- [22] Morrison, I.M., Asiedu, E.A., Stuchbury, T., Powell, A.A. **Determination of lignin and tannin contents of Cowpea seed coats**. *Ann. Bot.* 76 (1995) 287-290. DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/anbo.1995.1097>
- [23] Catalgol, B.K., Ozden, S., Alpertunga, B. **Effect of trichlorfon on molondialdehyde and antioxidant system in human erythrocytes**. *Toxicol. In Vitro.* 21 (2007) 1538-1544. DOI: 10.1016/j.tiv.2007.06.002
- [24] Stocks, J., Dormandy, T.L. **The autooxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide**. *Br. J. Haematol.* 20 (1971) 95-111. DOI: 10.1111/j.1365-2141.1971.tb00790.x
- [25] Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., et al. **Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins**. *Methods Enzymol.* 186 (1990) 464-478.
- [26] Ellman, G.L. **Tissue sulfhydryl groups**. *Arch. Biochem. Biophys.* 82 (1959) 70-77. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)
- [27] Cohen, J. **Statistical power analysis for the behavioral sciences**. 2nded. Hillsdale, NJ: Erlbaum; 1988.
- [28] Gelatti, G.T., De Oliveira, K.R., Colet, C.F. **Potential drug interactions in relation with the use, medicine plants and herbal in premenopausal women period**. *J. Res.: Fundam. Care.* 8 (2016) 4328-4346. DOI: 10.9789/2175-5361.2016.v8i2.4328-4346
- [29] Maurya, P.K., Kumar, P., Chandra, P. **Biomarkers of oxidative stress in erythrocytes as a function of human age**. *World J. Methodol.* 5 (2015) 216-222. DOI: 10.5662/wjm.v5.i4.216
- [30] Signorelli, S.S., Neri, S., Sciacchitano, S., Pino, L.D., Costa, M.P., Marchese, G., et al. **Behaviour of some indicators of oxidative stress in postmenopausal and fertile women**. *Maturitas.* 53 (2006) 77-82. DOI: 10.1016/j.maturitas.2005.03.001
- [31] Ogunro, P.S., Bolarinde, A.A., Owa, O.O., Salawu, A.A., Oshodi, A.A. **Antioxidant status and reproductive hormones in women during reproductive, perimenopausal and postmenopausal phase of life**. *Afr. J. Med. Med. Sci.* 43 (2014) 49-57.

- [32] Circu, M.L., Aw, T.Y. **Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis.** *Free Radic. Biol. Med.* 48 (2010) 749-762. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.022
- [33] Umesh, C.S.Y., Ramana, K.V. **Regulation of NF- κ B-induced inflammatory signaling by lipid peroxidation-derived aldehydes.** *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013 (2013) 1-11. DOI: 10.1155/2013/690545
- [34] Butterfield, D.A., Dalle-Donne, I. **Redox proteomics.** *Antioxid. Redox. Signal.* 17 (2012) 1487-1489. DOI: 10.1089/ars.2012.4742
- [35] Davies, K.J. **Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome.** *Biochimie.* 83 (2001) 301-310. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0300-9084\(01\)01250-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0300-9084(01)01250-0)
- [36] Höhn, A., König, J., Grune, T. **Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins.** *J Proteomics.* 92 (2013) 132-159. DOI: 10.1016/j.jprot.2013.01.004
- [37] Koury, J.C., Donangelo, C.M. **Zinc, oxidative stress and physical activity.** *Rev. Nutr.* 16 (2003) 433-441. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732003000400007>
- [38] Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., De Tata, V., Casini, A. F. **The changing faces of glutathione, a cellular protagonist.** *Biochem. Pharmacol.* 66 (2003) 1499-1503. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-2952\(03\)00504-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-2952(03)00504-5) 63
- [39] Kumar, P., Maurya, P.K. **L-cysteine efflux in erythrocytes as a function of human age: correlation with reduced glutathione and total anti-oxidant potential.** *Rejuvenation Res.* 16 (2013) 179-184. DOI: 10.1089/rej.2012.1394

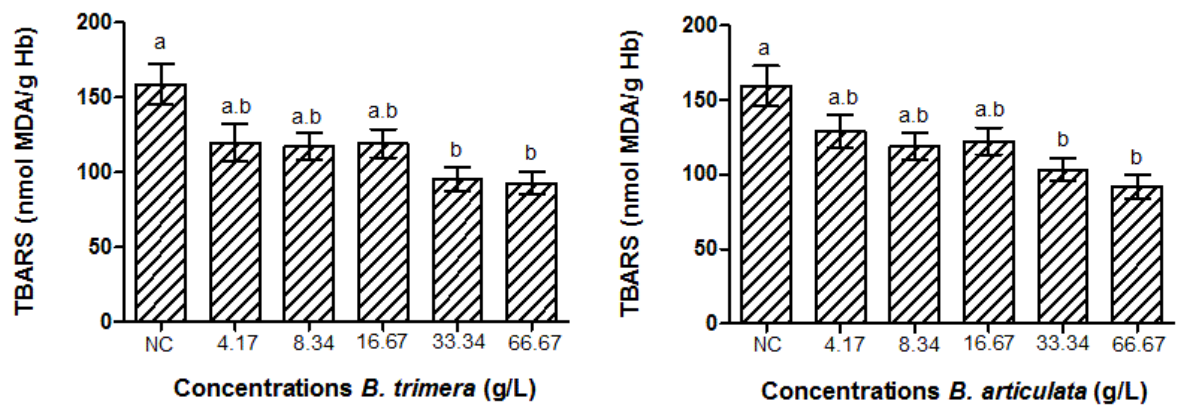


Figure 1: Levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (nmol MDA/g Hb) in erythrocytes of postmenopausal women treated *in vitro* with different concentrations of *B. trimera* and *B. articulata* infusions.

Data are presented as mean \pm standard error.

Different letters represent statistically significant results ($p \leq 0.05$) according to one-way ANOVA, followed by a Tukey test.

NC - Negative Control

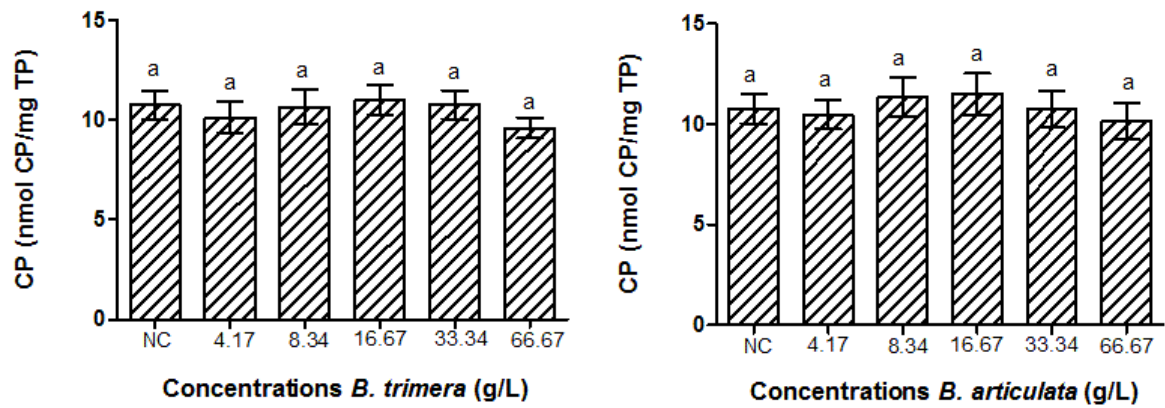


Figure 2: Levels of carbonylated proteins (CP) (nmol CP/mg TP) in erythrocytes of postmenopausal women treated *in vitro* with different concentrations of *B. trimera* and *B. articulata* infusions.

Data are presented as mean \pm standard error.

Different letters represent statistically significant results ($p \leq 0.05$) according to one-way ANOVA, followed by a Tukey test.

NC - Negative Control

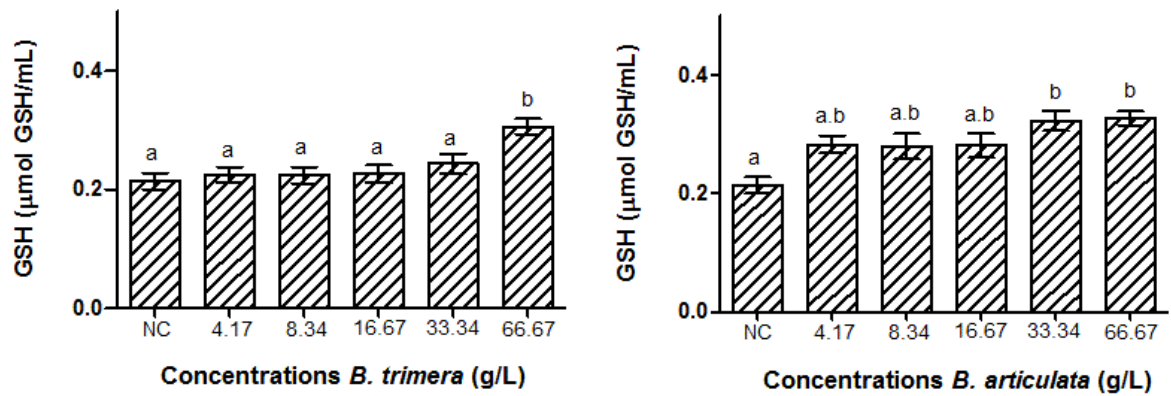


Figure 3: Levels of reduced glutathione (GSH) ($\mu\text{mol GSH/mL}$) in erythrocytes of postmenopausal women treated *in vitro* with different concentrations of *B. trimera* and *B. articulata* infusions.

Data are presented as mean \pm standard error.

Different letters represent statistically significant results ($p \leq 0.05$) according to one-way ANOVA, followed by a Tukey test.

NC - Negative Control

Table 1: Oxidative stress markers in women with regular menstrual cycles (positive control) and in postmenopausal women without treatment with infusions (negative control).

Oxidative Stress Markers	Positive Control	Negative Control	<i>p</i>
TBARS (ηmol/g Hb)	51.10 ± 36.14 33.68 – 68.52	159.44 ± 83.67 131.94 – 186.95	<0.001*
CP (ηmol/mg PT)	5.51 ± 1.5 4.78 – 6.22	12.49 ± 4.05 10.49 – 14.40	<0.001*
GSH (μmol/mL)	0.36 ± 0.11 0.31 – 0.42	0.21 ± 0.09 0.18 – 0.24	<0.001*

Data are presented as mean ± SD with 95% CI.

*Statistically significant results ($p \leq 0.05$) according to the Mann-Whitney test.

TBARS - thiobarbituric acid reactive substances, CP - carbonylated proteins, GSH - reduced glutathione.

Table 2: Quantification of total phenolic compounds, total flavonoids, and condensed tannins present in hydroethanolic extracts (HE) and the infusions of *B. trimera* and *B. articulata*.

Phytochemicals (mg/g)	H.E. <i>B. trimera</i>	Infusion <i>B. trimera</i>	<i>p</i> <i>B. trimera</i>	H.E. <i>B. articulata</i>	Infusion <i>B. articulata</i>	<i>p</i> <i>B. articulata</i>
Total Phenolic Compounds	326.64 ± 6.8	103.25 ± 3.6	<0.001*	339.3 ± 8.4	117.45 ± 5.9	<0.001*
Total Flavonoids	21.51 ± 2.2	15.63 ± 1.8	0.023*	23.73 ± 2.1	16.37 ± 0.7	0.004*
Condensed Tannins	13.32 ± 1.3	9.10 ± 0.5	0.006*	11.87 ± 0.9	8.23 ± 0.3	0.001*

Data are presented as mean ± SD.

*Statistically significant results ($p \leq 0.05$) according to the t-test for independent samples.

H.E. - Hydroethanolic extracts

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As mulheres na pós-menopausa apresentam elevados níveis de marcadores oxidantes e baixos níveis de GSH, um dos principais antioxidantes endógenos. De modo geral, essa condição está relacionada à redução dos níveis de estrogênio, além da mudança no perfil lipídico, que pode ocasionar a LPO. A principal consequência da LPO são as DCVs, pois a LDL-ox apresenta papel chave no desenvolvimento da aterosclerose e salienta-se que a incidência de DCVs aumenta com o envelhecimento populacional especialmente em mulheres na pós-menopausa.

Antioxidantes neutralizam as ERs e assim evitam a exposição excessiva ao estresse oxidativo. Entretanto, durante o envelhecimento há um declínio na produção de antioxidantes endógenos, deixando o organismo suscetível a várias doenças. Portanto, o consumo de alimentos ricos em antioxidantes é útil principalmente no período de pós-menopausa.

Constatamos que após a realização do tratamento *in vitro* com as infusões de *B. trimera* e *B. articulata*, ambas as espécies reduziram o dano oxidativo, além de aumentar os níveis de proteção antioxidante em eritrócitos de mulheres na pós-menopausa. Além disso, cabe ressaltar que as duas espécies estudadas apresentam potencial efeito antioxidante semelhante.

Sendo assim, as evidências científicas desse estudo contribuem para a importância da inclusão de antioxidantes, como as plantas medicinais, em intervenções terapêuticas a fim de melhorar a saúde de mulheres na pós-menopausa e consequentemente aumentar a longevidade, tendo em vista que esta é uma alternativa de baixo custo, de fácil acesso, adesão e preparo, além de ser difundida pela população, especialmente pelas mulheres em processo de envelhecimento.

REFERÊNCIAS

ABAD, M.J.; BERMEJO, P. *Baccharis* (Compositae): a review update. **Archive for Organic Chemistry**, v.7, p.76-96, 2007.

AGOSTINI, F. *et al.* Estudo do óleo essencial de algumas espécies do gênero *Baccharis* (Asteraceae) do sul do Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.3, p.215-220, 2005.

ALONSO, J.R. **Tratado de Fitofármacos e Nutracêuticos**. 1.ed. Pharmabooks. 2016. 1124p.

ALONSO, J.; DESMARCHELIER, C. **Plantas medicinales autóctonas de la Argentina**. Bases científicas para su aplicación en atención primaria de la salud. Buenos Aires: LOLA, 2006. 663p.

ANDERSON, G.L. *et al.* Prior hormone therapy and breast cancer risk in the Women's Health Initiative randomized trial of estrogen plus progestin. **Maturitas**, v.55, n.2, p.103-115, 2006.

ANMAT - Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. **Disposición 2673/99**. Apruébanse normas para la implementación del Registro de Especialidades Medicinales. 1999.

ARGENTINA. ANMAT - Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. **Farmacopea Argentina**. 7.ed. Buenos Aires, ANMAT. 2003. 2745p.

AUGUSTO, O. **Radicaux libres bons, maus e naturels**. 1.ed. Oficina de Textos. 2006. 120p.

AYALA, A.; MUÑOZ, M.F.; ARGÜELLES, S. Lipid Peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.2014, 2014.

BARBOSA, K.B.F. *et al.* Estresse Oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v.23, n.4, p.629-643, 2010.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse Oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v.29, n.1, p.113-123, 2006.

BATTESTIN, V.; MATSUDA, L.K; MACEDO, G.A. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v.15, n.1, p.63-72, 2004.

BEHLING, E.B. *et al.* Flavonóide Quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v.15, n.3, p.285-292, 2004.

BELLANTI, F. *et al.* Sex hormones modulate circulating antioxidant enzymes: impact of estrogen therapy. **Redox Biology**, v.1, n.1, p.340-346, 2013.

BETONI, J.E. *et al.* Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, n.4, p. 387-390, 2006.

BIRBEN, E. *et al.* Oxidative stress and antioxidant defense. **WAO Journal**, v.5, n.1, p.9-19, 2012.

BOLDT, P.E. **Baccharis (Asteraceae), a review of its taxonomy, phytochemistry, ecology, economic status, natural enemies and the potential for its biological control in the United States**. Texas: College Station. 1989.

BORELLA, J.C. *et al.* Variabilidade sazonal do teor de saponinas de *Baccharis trimera* (Less.) DC (carqueja) e isolamento de flavona. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.4, p.557-561, 2006.

BORGO, J. *et al.* Influência dos processos de secagem sobre o teor de flavonóides e na atividade antioxidante dos extratos de *Baccharis articulata* (Lam.) Oers., Astearaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.1, p.12-17, 2010.

BORRÁS, C. *et al.* Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. **Free Radical Biology & Medicine**, v.34, n.5, p.546-552, 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**. 5.ed. Brasília: Anvisa. 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira**. Brasília. 2011. 126p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 10, de 9 de março de 2010**. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais. Brasília, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Direção de Administração e Finanças. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**: Rennisus, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. **Manual de Atenção à Mulher no Climatério/Menopausa**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2008. 192p.

BRASIL. **Farmacopeia dos EUA do Brasil**. 1.ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional. 1929. 1149p.

BUDEL, J.M. *et al.* O progresso da pesquisa sobre o gênero *Baccharis*, Asteraceae: I - Estudos botânicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.3, p.268-271, 2005.

BUTTERFIELD, D.A.; DALLE-DONNE, I. Redox proteomics. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.17, n.11. p.1487-1489, 2012.

CAMPOS, F.R. *et al.* *Baccharis* (Asteraceae): chemical constituents and biological activities.

Chemistry & Biodiversity, v.13, p.1-17, 2016.

CARIDDI, L. *et al.* Apoptosis and mutagenicity induction by a characterized aqueous extract of *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) on normal cells. **Food and Chemical Toxicology**, v.50, n.2, p.155-161, 2012.

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

CASADEVALL, V.U. Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo em modelos celulares. Barcelona, Facultat de Farmàcia – Departament de Fisiologia - Universitat de Barcelona, 2009.

CASTRO, H.G.; FERREIRA, F.A. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: Carqueja (*Baccharis genistelloides*)**. Viçosa: Suprema gráfica e editora Ltda, 2000. 102p.

CIRCU, M.L.; AW, T.Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v.48, n.6, p.749-762, 2010.

COTGREAVE, I.A.; GERDES, R.G. Recent trends in glutathione biochemistry-glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation? **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.242, n.1, p.1-9, 1998.

CZERSKA, M. *et al.* Today's oxidative stress markers. **Medycyna Pracy**, v.66, n.3, p.393-405, 2015.

DACIE, J.; LEWIS, S.M. **Practical Haematology**. 8.ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1995.453p.

DALLE-DONNE, I. *et al.* Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, v.329, n.1-2, p.23-38, 2003.

DAVIES, K.J. Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. **Biochimie**, v.83, n.3-4, p.301-310, 2001.

DE LORENZI, D.R.S. *et al.* Fatores associados à qualidade de vida após menopausa. **Revista de Associação Médica Brasileira**, v.52, n.5, p.312-317, 2006.

DE OLIVEIRA, S.Q. *et al.* Antioxidant activity of *Baccharis articulata* extracts: Isolation of a new compound with antioxidant activity. **Free Radical Research**, v.37, n.5, p.555-559, 2003.

DE OLIVEIRA, C.B. *et al.* Phenolic enriched extract of *Baccharis trimera* presents anti-inflammatory and antioxidant activities. **Molecules**, v.17, n.1, p.1113-1123, 2012.

DIAS, L.F.T. *et al.* Atividades antiúlcera e antioxidante *Baccharis trimera* (Less) DC. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.1, p.309-314, 2009.

DORNAS, W.C.A. *et al.* Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.28, n.3, p.241-249, 2007.

DOSHI, S.B.; AGARWAL, A. The role of oxidative stress in menopause. **Journal of Mid-Life Health**, v.4, n.3, p.140-146, 2013.

DURACKOVÁ, Z. Some current insights into oxidative stress. **Physiological Research**, v.59, n.4, p.459-469, 2010.

ERGIN, V.; HARIRY, R.E.; KARASU, C. Carbonyl stress in aging process: role of vitamins and phytochemicals as redox regulators. **Aging and Disease**, v.4, n.5, p.276-294, 2013.

FABRI, R.L. *et al.* Potencial antioxidante e antimicrobiano de espécies da família Asteraceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.2, p.183-189, 2011.

FACHINETTO, J.; TEDESCO, S. Atividade antiproliferativa e mutagênica dos extratos aquosos de *Baccharis trimera* (Less.) AP de Candolle e *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) sobre o sistema teste de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.4, p.360-367, 2009.

FAROUT, L.; FRIGUET, B. Proteasome function in aging and oxidative stress: implications in protein maintenance failure. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.8, n.1-2, p.205-216, 2006.

FEBRASGO. Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia. **Climatério: manual de orientação**. São Paulo: Febrasgo. 2010. 220p.

FERNANDES, C.E. *et al.* I Diretriz Brasileira sobre Prevenção de Doenças Cardiovasculares em Mulheres Climatéricas e a Influência da Terapia de Reposição Hormonal da Sociedade Brasileira de Cardiologia e da Associação Brasileira do Climatério. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.91, n.1, p.1-23, 2008.

FLORA DIGITAL DO RIO GRANDE DO SUL E SANTA CATARINA. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/index.php>. Acesso em: Setembro de 2016.

FLOYD, R.A.; HENSLEY, K. Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. **Neurobiology of Aging**, v.23, n.5, p.795-807, 2002.

FUKAI, T.; FUKAI, M.U. Superoxide Dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.15, n.6, p.1583-1606, 2011.

GAMBERINI, M.T. Inhibition of gastric secretion by a water extract from *Baccharis triptera* Mart. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.86, n.2, p.137-139, 1991.

GENÉ, R.M. *et al.* Anti-inflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*: identification of its active constituents. **Planta Medica**, v.62, n.3, p.232-235, 1996.

GIANNI, P. *et al.* Oxidative stress and the mitochondrial theory of aging in human skeletal muscle. **Experimental Gerontology**, v.39, n.9, p.1391-1400, 2004.

GIL, L. *et al.* Age-associated analysis of oxidative stress parameters in human plasma and erythrocytes. **Free Radical Research**, v.40, n.5, p.495-505, 2006.

GRUNE, T. *et al.* Age-related changes in protein oxidation and proteolysis in mammalian cells. **The Journals of Gerontology: biological sciences and medical sciences**, v.56, n.11, p.459-467, 2001.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutrition Reviews**, v.70, p.257-265, 2012.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radical in Biology and Medicine**. 4.ed. Oxford: Oxford University Press, 2007. 704p.

HARLOW, S.D. *et al.* Executive summary of the stages of reproductive aging workshop + 10: addressing the unfinished agenda of staging reproductive aging. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.97, n.4, p.1159-1168, 2012.

HASLAM, E. Vegetable tannins: lessons of a phytochemical lifetime. **Phytochemistry**, v.68, n.22-24, p.2713-2721, 2007.

HAYES, J.D.; FLANAGAN, J.U.; JOWSEY, I.R. Glutathione transferases. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.45, p.51-88, 2005.

HEIDEN, G.; RIBAS, O.S. *Baccharis umbellata* (Asteraceae, Astereae): a new species endemic to the highest summits of Paraná, Southern Brazil. **Phytotaxa**, v.49, n.1, p.23-28, 2012.

HEIDEN, G.; SCHNEIDER, A.A. *Baccharis*. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=F5151>> Acesso em: Novembro/2016.

HÖHN, A.; KÖNIG, J.; GRUNE, T. Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins. **Journal of Proteomics**, v.30 n.92, p.132-159, 2013.

HORN, R.C. *et al.* Antioxidant Effect of *Physalis Peruviana* Fruit Aqueous Extract. **Journal of Agricultural Science**, vol.7, n.12, p.137-143, 2015.

HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P.; DE FÁTIMA, A. Glutathione e Enzimas Relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v.31, n.5, p.1170-1179, 2008.

INOUE, M. *et al.* Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. **Current Medicinal Chemistry**, v.10, p.2495-2505, 2003.

ISHII, T. *et al.* Oxidative modification of proteasome: identification of an oxidation-sensitive subunit in 26 S proteasome. **Biochemistry**, v.44, n.42, p.13893-13901, 2005.

JENTZSCH, A.M. *et al.* Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. **Free Radical Biology & Medicine**, v.20, n.2, p.251-256, 1996.

KARAM, T.K. *et al.* Carqueja (*Baccharis trimera*): utilização terapêutica e biossíntese. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, n.2, p.280-286, 2013.

KELLER, J.N.; GEE, J.; DING, Q. The proteasome in brain aging. **Ageing Research Reviews**, v.1, n.2, p.279–293, 2002.

KODYDKOVÁ, J. *et al.* Human catalase, its polymorphisms, regulation and changes of its activity in different diseases. **Folia Biologica (Praha)**, v.60, n.4, p.153-167, 2014.

KOLESNIKOVA, L. *et al.* Antioxidant status in peri- and postmenopausal women. **Maturitas**, v.81, n.1, p.83-87, 2015.

KOURY, J.C.; DONANGELO, C.M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Revista de Nutrição**, v.16, n.4, p.433-441, 2003.

KRÜGER, R.L. *et al.* Estresse oxidativo e a função endotelial: efeitos do exercício físico associado à lipemia pós-prandial. **Jornal Vacular Brasileiro**, v.14, n.4, p.328-340, 2015.

LEE, C.H. *et al.* Hormone therapy and risk of venous thromboembolism among postmenopausal women in Taiwan - a 10-year nationwide population-based study. **Circulation Journal**, v.79, n.5, p.1107-1114, 2015.

LEVINE, R.L.; STADTMAN, E.R. **Carbonylated proteins and their implication in physiology and pathology**. In: Dalle-Donne I, Scaloni A, Butterfield DA, editors. Redox proteomics: From protein modifications to cellular dysfunction and diseases. United States of America: Wiley-Interscience. p.123–168, 2006.

LEVINE, R.L.; STADTMAN, E.R. Oxidative modification of proteins during aging. **Experimental Gerontology**, v.36, n.9, p.1495–1502, 2001.

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

LODISH, H. **Molecular Cell Biology**. W.H. Freeman and Company. 5.ed. 2004. 973p.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas**. 2.ed. Nova Odessa: Plantarum. 2008. 544p.

LUPI, E.P.V. *et al.* Tamizaje de la actividad antifúngica de extractos de especies de la flora de Entre Ríos. **Revista Cubana de Farmacia**, v.43, n.4, p.74-84, 2009.

LUSHCHAK, V.I. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. **Journal of Amino Acids**, v.2012, p.1-26, 2012.

LUSHCHAK, V.I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, v.224, p.164-175, 2014.

- MAGDER, S. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? **Critical Care**, v.10, n.1, p.1-8, 2006.
- MADIAN, A.G.; REGNIER, F.E. Proteomic identification of carbonylated proteins and their oxidation sites. **Journal of Proteome Research**, v.9, p.3766-3780, 2010.
- MASSEY, K.A.; NICOLAOU, A. Lipidomics of polyunsaturatedfatty-acid-derived oxygenated metabolites. **Biochemical Society Transactions**, v.39, n.5, p.1240-1246, 2011.
- MAURYA, P.K.; KUMAR, P.; CHANDRA, P. Biomarkers of oxidative stress in erythrocytes as a function of human age. **World Journal of Methodology**, v.5, n.4, p.216-222, 2015.
- MENDES, F.R.; TABACH, R.; CARLINI, E.A. Evaluation of *Baccharis trimera* and *Davilla rugosa* in tests for adaptogen activit. **Phytotherapy Research**, v.21, n.6, p.517-522, 2007.
- MERKER, K.; GRUNE, T. Proteolysis of oxidised proteins and cellular senescence. **Experimental Gerontology**, v.35, n.6-7, p.779-786, 2000.
- MONTEIRO, J.M. *et al.* Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v.28, n.5, p.892-896, 2005.
- MUECK, A.O.; SEEGER, H. Estrogens acting as cardiovascular agents: direct vascular actions. **Current Medicinal Chemistry - Cardiovascular & Hematological Agents**, v.2, n.1, p.35-42, 2004.
- MURADOR, P. DEFFUNE, E. Aspectos estruturais da membrana eritrocitária. **Revista Brasileira de Hematologia e Hematologia**, v.29, n.2, p.168-178, 2007.
- MURPHY, M.P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochemical Journal**, v.417, p.1-13, 2009.
- NAKASUGI, T.; KOMAI, K. Antimutagens in the Brazilian folk medicinal plant carqueja (*Baccharis trimera* less.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, n.7, p.2560–2564, 1998.
- NAMS. Sociedade Norte-Americana de Menopausa. **Guia da Menopausa**. 7.ed. 2013. 87p.
- NASS, L.L. Recursos genéticos vegetais. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos Vegetais e Biotecnologia, 2007
- OGA, S.; CAMARGO, M.M.A.; BATISTUZZO, J.A. **Fundamentos de Toxicologia**. 4.ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2014. 704p.
- OGE, A. *et al.* The effects of estrogen and raloxifene treatment on the antioxidant enzymes and nitrite-nitrate levels in brain cortex of ovariectomized rats. **Neuroscience Letters**, v.338, n.3, p.217-220, 2003.
- OGUNRO, P.S. *et al.* Antioxidant status and reproductive hormones in women during reproductive, perimenopausal and postmenopausal phase of life. **Journal of Medicine and Medical Sciences**, v.43, n.1, p.49-57, 2014.

OLIVEIRA, A.C.P. *et al.* Effect of the extract and fraction of *Baccharis trimera* and *Syzygium cumini* on glycaemia of diabetic and non-diabetic mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.102, n.3, p.465-469, 2005.

OLIVEIRA, S.Q. *et al.* Antioxidant activity of *Baccharis spicata*, *Baccharis trimera* and *Baccharis usterii*. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.23, n.3, p.365-368, 2004.

OLIVEIRA, S.Q. *et al.* Screening of antibacterial activity of South Brazilian *Baccharis* species. **Pharmaceutical Biology**, v.43, n.5, p.434-438, 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Investigaciones sobre la menopausia em los años noventa**. Geneva: Organização Mundial da Saúde, v.866, 1996.

PÁDUA, B.C. *et al.* Protective effect of *Baccharis trimera* extract on acute hepatic injury in a model of inflammation induced by acetaminophen. **Mediators of Inflammation**, v.2014, p.1-14, 2014.

PARDINI, D. Terapia de reposição hormonal na menopausa. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia Metabólica**, v.58, n.2, p.172-181, 2014.

PAUL, E.L. *et al.* Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Baccharis trimera* aqueous extract on induced pleurisy in rats and lymphoproliferation *in vitro*. **Inflammation**, v.32, n.6, p.419-425, 2009.

POLI, M.E.H.; SCHWANKE, C.H.A.; CRUZ, I.B.M. A menopausa na visão gerontológica. **Scientia Medica**, v.20, n.2, p.176-184, 2010.

PRABHU, K.S. *et al.* Characterization of a class alpha glutathione-S-transferase with glutathione peroxidase activity in human liver microsomes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.424, n.1, p.72-80, 2004.

RAHAL, A. *et al.* Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. **BioMed Research International**, v.2014, p.1-19, 2014.

RODRIGUES, C.R.F. *et al.* Genotoxic and antigenotoxic properties of *Baccharis trimera* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.125, n.1, p.97-101, 2009.

ROVER JÚNIOR, L.; HOEHR, N.F.; VELLASCO, A.P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v.24, n.1, p.112-119, 2001.

RUIZ-LARREA, M.B. *et al.* Antioxidant action of estrogens in rat hepatocytes. **Revista Española de Fisiología**, v.53, n.2, p.225-229, 1997.

SAAD, G.A. *et al.* **Fitoterapia Contemporânea - tradição e ciência na prática clínica**. 2.ed. Guanabara Koogan. 2016. 468p.

SALHOTRA, S. *et al.* Influence of menopause on biochemical markers of endothelial dysfunction – A case-control pilot study in North Indian population. **Maturitas**, v.62, n.2, p.166–170, 2009.

SÁNCHEZ-RODRIGUES, M.A. *et al.* Menopause as risk factor for oxidative stress. **Menopause**, v.19, n.3, p.361-367, 2012.

SCHMITZ, W.O. *et al.* Estresse oxidativo em eritrócitos submetidos a 2,2-Azobis amidinopropano (aaph): efeito antioxidante e antihemolítico do chá verde (*Camellia sinensis*). **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v.12, n.3, p.175-179, 2008.

SIES, H.; JONES, D. **Oxidative Stress**. 2.ed, in: FINK, G, Encyclopedia of Stress. Elsevier, Amsterdam, p.45-48, 2007.

SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**, v.4, p.180-183, 2015.

SIGNORELLI, S.S. *et al.* Behaviour of some indicators of oxidative stress in postmenopausal and fertile women. **Maturitas**, v.53, n.1, p.77-82, 2006.

SILVA, M.L.C. *et al.* Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v.31, n.3, p.669-682, 2010.

SILVA, P. **Farmacologia**. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 1352p.

SIMÕES, C.M.O. *et al.* **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**. 5.ed. Porto Alegre: UFRGS. 1998. 173p.

SIMÕES, C.M.O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. 1102p.

SIMÕES-PIRES, C.A. *et al.* Isolation and on-line identification of antioxidant compounds from three *Baccharis* species by HPLC-UVMS/MS with post-column derivatisation. **Phytochemical Analysis**, v.16, n.5, p.307-314, 2005.

SIQUEIRA, N.C.S.; ALICE, C.B.; THIESEN, F.V. Aspectos farmacognósticos e perfil cromatográfico dos constituintes de *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. Compositae. **Caderno de Farmácia**, v.4, n.1-2, p.63-76, 1988.

SOICKE, H.; LENG-PESCHLOW, E. Characterisation of flavonoids from *Baccharis trimera* and their antihepatotoxic properties. **Planta Medica**, v.53, n.1, p.37-39, 1987.

SOUZA, S.P. *et al.* Seleção de extratos brutos de plantas com atividade antiobesidade. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n.4, p.643-648, 2012.

STOLZING, A.; GRUNE, T. The proteasome and its function in the ageing process. **Clinical and Experimental Dermatology**, v.26, n.7, p.566-572, 2001.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

THÉRON, P. *et al.* Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v.3, n.5, p.373-384, 2000.

TOPPO, S. *et al.* Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: variations of a basic scheme. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1790, n.11, p.1486-1500, 2009.

TORRES, C.V. *et al.* Study of antiviral and virucidal activities of aqueous extract of *Baccharis articulata* against Herpes suis virus. **Natural Product Communications**, v.6, n.7, p.993-994, 2011.

UMESH, C.S.Y.; RAMANA, K.V. Regulation of NF- κ B-induced inflammatory signaling by lipid peroxidation-derived aldehydes. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.2013, p.1-11, 2013.

VASCONCELOS, S.M.L. *et al.* Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v.30, n.5, p.1323-1338, 2007.

VERDI, L.G.; BRIGHENTE, I.M.C.; PIZZOLATTI, M.G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v.28, n.1, p.85-94, 2005.

VOSS, P.; SIEMS, W. Clinical oxidation parameters of aging. **Free Radical Research**, v.40, n.12, p.1339-1349, 2006.

YAN, L. Positive oxidative stress in aging and aging-related disease tolerance. **Redox Biology**, v.2, p.165-169, 2014.

YIN, H.; XU, L.; PORTER, N.A. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. **Chemical Reviews**, v.111, n.10, p.5944-5972, 2011.

ZIEGLER, D.M. Role of reversible oxidation-reduction of enzyme thiols-disulfides in metabolic regulation. **Annual Review of Biochemistry**, v.54, p.305-329, 1985.

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Prezada Senhora

Vimos por meio deste convidá-la para participar da Pesquisa Institucional “ENVELHECIMENTO FEMININO”. O projeto de pesquisa **Envelhecimento Feminino - Female Aging Study** - é um projeto da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUÍ) vinculado ao Departamento de Ciências da Vida (DCVida) e constitui-se em um estudo de seguimento, ou seja, está se propondo em acompanhar as mulheres que ingressarem no estudo por um período de 5 anos. Esse projeto tem objetivos: estudar os efeitos do declínio do estrogênio e suas repercussões sobre a saúde da mulher no período do climatério; e, produzir novas tecnologias para a atenção básica visando a redução das doenças crônicas não transmissíveis na busca de uma velhice saudável.

O projeto ENVELHECIMENTO FEMININO visa desenvolver estudos sobre o envelhecimento feminino nas suas diversas dimensões na perspectiva de avanços científicos e tecnológicos que gerem:

- metodologias inovadoras voltadas à atenção integral a saúde da mulher da promoção a reabilitação;
- metodologias inovadoras para atender as demandas nos serviços de saúde com maior eficácia e eficiência, com foco nos problemas de saúde mais prevalentes no processo de envelhecimento feminino;
- tecnologias para a rede assistencial de saúde, sobretudo, para a atenção básica;
- impacto nos serviços de saúde voltados à mulher na perspectiva de acompanhar a senescência e promover uma velhice saudável.

As mulheres que ingressarem no estudo serão submetidas a avaliações sistemáticas para acompanhamento, bem como, poderão participar de subprojetos. Cabe destacar que o projeto terá um único banco de dados, ou seja, todas as informações coletadas pelos projetos e subprojetos serão armazenados em um único banco de dados.

Essa é uma proposta interdisciplinar e tem como prazo de execução cinco (5) anos, realizado de 2014 a 2018, iniciando em janeiro de 2014.

O protocolo de pesquisa propõe estudo exploratório das condições gerais de saúde da mulher, avaliação bioquímica, avaliação nutricional e avaliação uroginecológica. As avaliações serão realizadas de forma individual no domicílio (pré-agendado) e agendadas as avaliações específicas na Unijuí Comunidade.

A participação no projeto não terá nenhum custo para você participante. Os resultados da pesquisa serão mostrados de forma individualizada às participantes, já os resultados gerados pela análise de dados serão divulgados através de publicações em periódicos da área e apresentações de trabalhos em eventos, bem como será produzido um relatório, o qual se constituirá no trabalho de conclusão de curso destas acadêmicas.

As informações fornecidas serão mantidas em anonimato e sua identidade não será revelada em nenhuma circunstância. Você tem a liberdade de retirar o seu consentimento de participar do estudo em qualquer momento que achar oportuno, sem prejuízo, mesmo depois de ter assinado este documento. No caso de haver desistência de sua parte poderá entrar em contato com as pesquisadoras através do endereço deixado neste documento. Caso deseje obter informações adicionais sobre o estudo, a qualquer momento, poderá manter contato com as pesquisadoras.

Destacamos que sua participação não acarretará nenhum prejuízo ou dano pelo fato de colaborar, assim como não terá nenhum ganho ou benefício direto.

Diante do exposto, eu _____, declaro que fui esclarecida sobre o estudo a ser realizado pelos pesquisadores e concordo em participar.

Esse documento possui duas vias, ficando uma com o colaborador e a outra com as pesquisadoras.

Ijuí (RS), _____ de _____ de 2015.

Ass. _____

Sujeito da pesquisa

Ass. _____

Entrevistador

Ass. _____

Coordenadora da pesquisa Evelise Moraes Berlezi

Telefones de contato: (55) 9908 9996 e 3332-0460

Ass. _____

Coordenadora da pesquisa Ligia Beatriz Bento Franz

Telefones de contato: (55) 9971-7156 e 3332-0460

Poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UNIJUÍ. Rua do Comércio 3000, Prédio da Biblioteca, telefone: 3332 0301.

**APÊNDICE B - Variáveis de Interesse do Instrumento de Coleta de Dados
da Pesquisa Estudo do Envelhecimento Feminino**

Nome do Entrevistador:.....

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

Data da entrevista:/...../.....

Nome Completo:

Endereço: Nº Bairro: Área:

Telefone: Idade: Data de nascimento:/...../.....

DADOS SOBRE O CLIMATÉRIO

Sobre o ciclo menstrual:

(1) Regular (2) Irregular (3) Amenorréia (98) Não sabe (99) Não respondeu

Tempo em que os ciclos são irregulares (em anos):

Tempo de amenorreia (há quantos meses não menstrua):

Suspensão induzida da menstruação (considerar uso de anticoncepcional de liberação contínua ou tratamento hormonal):

(1) Sim (2) Não (98) Não sabe (99) Não respondeu

Motivo:.....

Uso de reposição hormonal (natural ou sintética):

(1) Sim (2) Não (98) Não sabe (99) Não respondeu

Tempo de uso de hormônio:.....

Medicações em uso:

	Med. 1	Med. 2	Med. 3	Med. 4	Med. 5
Nome genérico					
Nome comercial					
Concentração					
Tempo de uso					
Onde adquire					
Indicação					
Posologia					
Via de administração					

APÊNDICE C: Instrumento de Coleta de Dados do Grupo Controle

Data: _____

Nome: _____

Idade: _____

Fase do ciclo menstrual:

() folicular - começa no 1º dia da menstruação e dura em média 12 dias

() ovulatória - dura em média 8 dias

() lútea - dura em média 10 dias

Utiliza medicamentos de uso contínuo? () sim () não

Se sim, qual? _____

Faz uso de algum polivitamínico? () sim () não

Se sim, qual? _____

Faz uso de anticoncepcional? () sim () não

Se sim, qual? _____

ANEXO A - Parecer Consubstanciado do CEP da Pesquisa Estudo do Efeito Antioxidante de Diferentes Princípios Ativos



UNIVERSIDADE DE CRUZ
ALTA - UNICRUZ/RS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo do efeito antioxidante de diferentes princípios ativos ¿ PROJETO GUARDA CHUVA

Pesquisador: Roberta Cattaneo Horn

Área Temática: Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.

Versão: 1

CAAE: 15510413.3.0000.5322

Instituição Proponente: Fundação Universidade de Cruz Alta - UNICRUZ/RS

Patrocinador Principal: Fundação Universidade de Cruz Alta - UNICRUZ/RS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 273.167

Data da Relatoria: 15/05/2013

Apresentação do Projeto:

O excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta. Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo. Os antioxidantes produzidos pelo corpo agem enzimaticamente, a exemplo da GPx, CAT e SOD ou, não-enzimaticamente a exemplo de GSH, peptídeos de histidina, proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina), ácido diidrolipóico e CoQH. Além dos antioxidantes produzidos pelo corpo, o organismo utiliza aqueles provenientes da dieta como o α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (provitamina A), ácido ascórbico (vitamina C), e compostos fenólicos onde se destacam os flavonóides e poliflavonóides. Assim, o objetivo deste estudo é avaliar o efeito antioxidante de diferentes princípios, a partir de testes com eritrócitos humanos ("in vitro").

As amostras de sangue são obtidas de doadores randômicos, todos os grupos constituídos de eritrócitos de um mesmo indivíduo.

Endereço: Campus Universitário Ulysses Guimarães - Rodovia Municipal Jacob Della M \grave{e} a, Km 5.6 - Caixa Postal 858
Bairro: Campus Universitário Prédio **CEP:** 98.020-290
UF: RS **Município:** CRUZ ALTA
Telefone: (55)3322-1818 **E-mail:** comitedeetica@unicruz.edu.br



UNIVERSIDADE DE CRUZ
ALTA - UNICRUZ/RS



Continuação do Parecer: 273.167

As amostra de sangue total, de 5 indivíduos voluntários que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), serão coletadas com vacutainers contendo EDTA. O procedimento experimental constará da avaliação basal com técnicas de estresse. Após, os eritrócitos serão expostos ao extrato da planta medicinal e as técnicas de estresse serão repetidas novamente.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar o efeito antioxidante de princípios ativos.

Objetivo Secundário:

Avaliação dos níveis de TBARS; Avaliação dos níveis de proteínas carboniladas; Avaliação dos níveis de GSH (glutathiona)

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Na coleta das amostras o participante pode apresentar algum hematoma da punção venosa, podendo ser necessária uma massagem local com aplicação do medicamento tópico Reparil® Gel fim de eliminar esse transtorno ao participante.

Benefícios:

Diminuição dos níveis de marcadores de estresse oxidativo no grupo tratado com os princípios ativos estudados, evidenciando o efeito antioxidante dos mesmos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo em vitro destinado a testar o efeito antioxidante de princípios ativos extraídos de plantas medicinais.

A amostra será proveniente de 5 doadores randômicos, mas não está claro no projeto se os indivíduos serão saudáveis ou expostos à fatores de risco que elevam o estresse oxidativo como a exposição aos pesticidas.

No projeto consta que na coleta das amostras o participante pode apresentar algum hematoma da punção venosa, podendo ser necessária uma massagem local com aplicação do medicamento tópico Reparil® Gel fim de eliminar esse transtorno ao participante. No entanto, o termo de consentimento sugere outra abordagem se houver hemotoma "Após a coleta pode ocorrer a formação de hematomas na região coletada e neste caso o indivíduo deve fazer compressas com água frio e/ou gelo no local acometido várias vezes por dia." Sugere-se adotar uma melhor definição do procedimento adotado se houver hematoma.

Endereço: Campus Universitário Ulysses Guimarães - Rodovia Municipal Jacob Della Méa, Km 5.6 - Caixa Postal 858
Bairro: Campus Universitário Prédio CEP: 98.020-290
UF: RS Município: CRUZ ALTA
Telefone: (55)3322-1618 E-mail: comitedeetica@unicruz.edu.br



UNIVERSIDADE DE CRUZ
ALTA - UNICRUZ/RS



Continuação do Parecer: 273.167

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados

Recomendações:

Esclarecer no projeto se os indivíduos serão saudáveis ou expostos à fatores de risco que elevam o estresse oxidativo.

Definir qual procedimento será adotado se houver hematoma; aquele que consta no idem riscos do projeto ou aquele que consta no termo de consentimento.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado, visto que trata-se de um estudo em vitro.

No entanto, sugere-se esclarecer no projeto se os indivíduos serão saudáveis ou expostos à fatores de risco que elevam o estresse oxidativo. Além de definir qual procedimento será adotado se houver hematoma; aquele que consta no projeto ou aquele que consta no termo de consentimento.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado

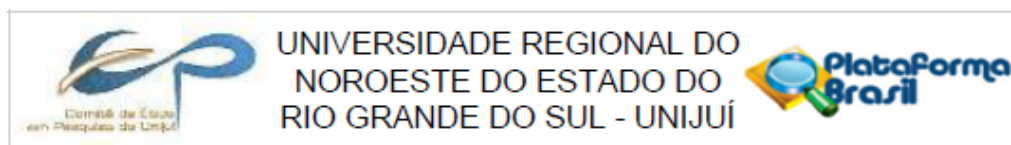
Analisar as recomendações expostas pelo avaliador

CRUZ ALTA, 15 de Maio de 2013

Assinador por:
Adalberto Fernandes Falconi
(Coordenador)

Endereço: Campus Universitário Ulysses Guimarães - Rodovia Municipal Jacob Della Méa, Km 5.6 - Caixa Postal 858
Bairro: Campus Universitário Prédio **CEP:** 98.020-290
UF: RS **Município:** CRUZ ALTA
Telefone: (55)3322-1618 **E-mail:** comitedeetica@unicruz.edu.br

ANEXO B - Parecer Consubstanciado do CEP da Pesquisa Estudo do Envelhecimento Feminino



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DO ENVELHECIMENTO FEMININO

Pesquisador: Evelise Moraes Berlezi

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 37096614.0.0000.5350

Instituição Proponente: Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul - UNIJUÍ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 864.988

Data da Relatoria: 06/11/2014

Apresentação do Projeto:

O projeto de pesquisa Estudo Envelhecimento Feminino - Female Aging Study - é um projeto da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUÍ) vinculado ao Departamento de Ciências da Vida (DCVida).

Esse é um macro projeto que abriga um conjunto de investigações observacionais e experimentais que tem como objetivos:

- estudar os efeitos do declínio do estrogênio e suas repercussões sobre a saúde da mulher no período do climatério;
- produzir novas tecnologias para a atenção básica visando à redução das doenças crônicas não transmissíveis na busca de uma velhice saudável.

Pela complexidade e amplitude do projeto essa é uma proposta interdisciplinar e tem como prazo de execução cinco (5) anos, realizado de 2014 a 2018.

O macro projeto abriga quatro grandes linhas de investigação:

- Manifestações clínicas transitórias e fenômenos atróficos genitourinário decorrentes do declínio de estrogênio;
- Modificações do estado nutricional decorrentes do declínio de estrogênio;
- Farmacologia do envelhecimento;
- Estudos epidemiológicos de doenças crônicas não transmissíveis.

Endereço: Rua do Comércio, 3.000

Bairro: Universtário

CEP: 98.700-000

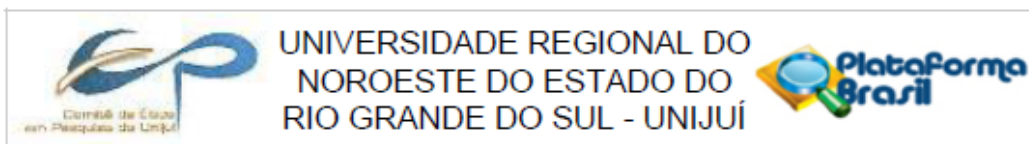
UF: RS

Município: IJUI

Telefone: (55)3332-0301

Fax: (55)3332-0331

E-mail: cep@unijui.edu.br



Continuação do Parecer: 864.988

Cada linha originará investigações observacionais e experimentais. O projeto ora apresentado contempla estudos de cunho observacional os quais serão executados a partir de SUBPROJETOS, que estão vinculados a uma linha de investigação e são oriundos dos objetivos específicos previstos. Os subprojetos são a forma de alimentação continua do estudo da temática da linha, ou seja, são a partir dos subprojetos que efetivamente há o aprofundamento do tema central "ENVELHECIMENTO FEMININO", nas suas quatro abordagens.

Os estudos experimentais também estão vinculados à linha de investigação, contudo estes, individualmente serão projetados e encaminhados para as instancias institucionais de avaliação e deliberação, bem como ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UNIJUÍ.

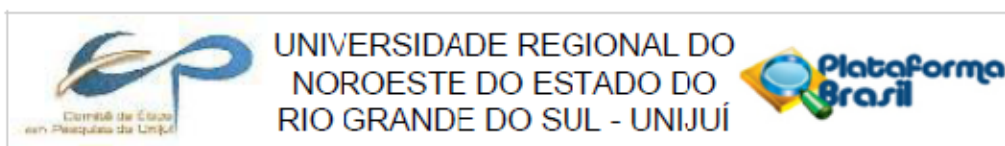
Esse modelo viabiliza a continuidade e o aprofundamento das linhas de investigação, gerando uma grande quantidade de variáveis e densidade de informações, o que permitirá análises de múltiplas condições e poderá pela densidade de produção de conhecimento, subsidiar a proposição de novas políticas de saúde, novos produtos ou novos processos. Os subprojetos serão propostos no decorrer da execução do macro projeto envolvendo: alunos da graduação, através de trabalhos de conclusão de curso e de iniciação científica; alunos da pós-graduação lato sensu em seus trabalhos de conclusão de curso; e alunos do mestrado, pela inserção desses no projeto de pesquisa do orientador; e, pelo próprio pesquisador. A definição dos subprojetos dar-se-á pela análise situacional da população do estudo, com base no diagnóstico realizado na primeira etapa de execução do MACRO PROJETO.

Esse modelo visa desenvolver estudos sobre o envelhecimento feminino nas suas diversas dimensões na perspectiva de avanços científicos e tecnológicos que gerem:

- metodologias inovadoras voltadas à atenção integral a saúde da mulher da promoção a reabilitação;
- metodologias inovadoras para atender as demandas nos serviços de saúde com maior eficácia e eficiência, com foco nos problemas de saúde mais prevalentes no processo de envelhecimento feminino;
- tecnologias para a rede assistencial de saúde, sobretudo, para a atenção básica;
- impacto nos serviços de saúde voltados à mulher na perspectiva de acompanhar a senescência e promover uma velhice saudável.

As mulheres que ingressarem no estudo serão submetidas a avaliações sistemáticas para acompanhamento, bem como, poderão participar de subprojetos. Cabe destacar que o projeto terá um único banco de dados, ou seja, todas as informações coletados pelos projetos e subprojetos serão armazenados em um único banco de dados.

Endereço: Rua do Comércio, 3.000	CEP: 98.700-000
Bairro: Univeristário	
UF: RS	Município: IJUI
Telefone: (55)3332-0301	Fax: (55)3332-0331
	E-mail: cep@unijui.edu.br



Continuação do Parecer: 864.988

Objetivo da Pesquisa:

Geral

Acompanhar mulheres a partir do climatério na perspectiva de evidenciar os efeitos do declínio do estrogênio e suas repercussões sobre a saúde para inferir sobre fatores intervenientes do processo saúde-doença e, desenvolver metodologias inovadoras para atender as demandas deste grupo populacional nos serviços de saúde com foco nos problemas de saúde mais prevalentes no processo de envelhecimento feminino.

Objetivos específicos

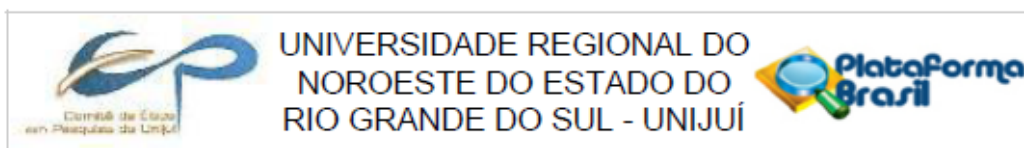
Objetivo 1: acompanhar as condições gerais de saúde de mulheres a partir do climatério residentes no município de Ijuí/RS a partir:

- da identificação das características sócio demográficos;
- de identificação de hábitos de vida e estilo de vida (pelo protocolo de Nahas);
- da verificação de antecedentes pessoais, familiares, menstruais, sexuais e obstétricos;
- da identificação de comportamento preventivo para doenças oncológicas (câncer de colo de útero, útero e mama);
- do levantamento de fatores de risco para o desenvolvimento de doenças;
- da identificação de medicamentos e plantas medicinais utilizados;
- da verificação de antecedentes de transtornos disfóricos durante o período reprodutivo;
- do levantamento de informações acerca de sintomas urinários, infecções ou incontinência;
- da identificação de sinais e sintomas do climatério.

Objetivo 2: Estudar as manifestações clínicas transitórias e fenômenos atróficos genitourinário decorrentes do declínio de estrogênio e suas repercussões na saúde e qualidade de vida a partir:

- do histórico gineco-obstétrico e complicações genitourinárias;
- da referência à sinais e sintomas neurovegetativos;
- da saúde sexual;
- de fatores de risco para incontinência urinária;
- da identificação da pressão perineal;
- da comparação da pressão perineal de mulheres com e sem queixa de perda de urina;
- da identificação do tipo de incontinência das mulheres que auto relatar perda de urina.

Endereço: Rua do Comércio, 3.000	CEP: 98.700-000
Bairro: Univeristário	
UF: RS	Município: IJUI
Telefone: (55)3332-0301	Fax: (55)3332-0331 E-mail: cep@unijui.edu.br



Continuação do Parecer: 864.988

Objetivo 3: Investigar as modificações do estado nutricional decorrentes do declínio de estrogênio a partir:

- da avaliação do estado nutricional das mulheres do estudo, utilizando medidas e classificações antropométricas, de composição corporal, bioquímicas, e de consumo e hábitos alimentares;
- do acompanhamento do estado nutricional das mulheres no período de 5 anos;
- da comparação do estado nutricional por períodos do climatério;
- da identificação de fatores intervenientes do estado nutricional;
- da investigação da alimentação pregressa da população do estudo que possa estabelecer relação com condições de saúde.

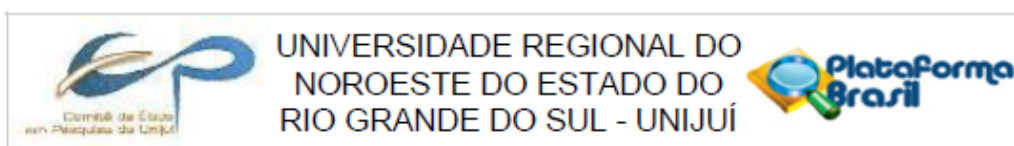
Objetivo 4: Estudar medicamentos, fitoterápicos e plantas medicinais de uso e recomendados utilizados por mulheres no período do climatério a partir:

- da identificação dos medicamentos utilizados e dos eventos adversos em potencial relacionados a estes medicamentos;
- da exploração sobre o conhecimento das mulheres com relação à terapia de reposição hormonal, identificando medos, tabus, relação com doenças e relação com a estética;
- da identificação das mulheres do estudo que fazem uso de terapia de reposição hormonal (TRH);
- da identificação do tipo de reposição hormonal (sintética ou natural);
- da verificação do período de uso da TRH, formas de uso e motivos da continuação ou descontinuação do tratamento;
- da verificação do uso de plantas medicinais e fitoterápicos para diferentes fins;
- da verificação do conhecimento das mulheres sobre as plantas medicinais que utilizam (conhecimento popular e científico).

Objetivo 5: Estudar fatores intervenientes no desenvolvimento de doenças no processo de envelhecimento a partir:

- da identificação de fatores de risco para o desenvolvimento de doenças não transmissíveis;
- da identificação do nível de conhecimento das mulheres da população do estudo a cerca de fatores de risco para doenças crônicas não transmissíveis;
- reconhecer fenótipos de risco para desenvolvimento de doenças não transmissíveis;
- da estratificação de risco cardiovascular da população do estudo.

Endereço: Rua do Comércio, 3.000	CEP: 98.700-000
Bairro: Univeristário	
UF: RS	Município: IJUI
Telefone: (55)3332-0301	Fax: (55)3332-0331 E-mail: cep@unijui.edu.br



Continuação do Parecer: 864.988

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos

Referente aos riscos o presente protocolo assegura que a pesquisa é de baixo risco. Quanto aos equipamentos que serão utilizados para as avaliações específicas estes são vastamente utilizados na prática clínica da fisioterapia, da nutrição, da farmácia e da biologia (análises clínicas, estresse oxidativo) bem como, os pesquisadores têm competência técnica para utilizarem os equipamentos e realizar os procedimentos. Ainda, cabe destacar que há preocupação e medidas preventivas com relação a aspectos infecto-contagiosos. Todos os exames com coleta de material biológico serão realizados dentro dos padrões de segurança tanto para o sujeito que está sendo submetido ao exame como o profissional que está realizando o exame. No exame urofuncional os instrumentos utilizados serão recobertos por preservativos descartáveis e para realizar a avaliação as pesquisadoras utilizarão luvas descartáveis. Também, prevenindo o risco de reações alérgicas será utilizado gel lubrificante a base de água.

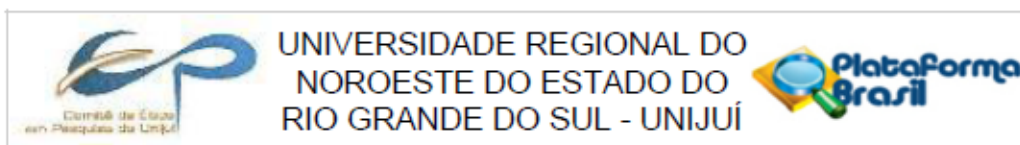
Benefícios

Os resultados das pesquisas produzidas com esta população poderão atender as demandas dos serviços de saúde, especialmente, na atenção primária e secundária. Na linha 1 espera-se produzir metodologias de cuidado para abordar a questão dos sinais, sintomas e quadros clínicos oriundos do hipoestrogenismo na perspectiva da qualidade de vida da mulher no climatério. Na Linha 2 espera-se que a identificação dos fatores que interferem de forma positiva e negativa no estado nutricional da mulher no climatério possam ser a base de construção de cuidado e tratamento que reduzam a repercussão negativa das mudanças de composição corporal que interferem diretamente nas condições de saúde elevando o risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, metabólicas e oncológicas. Na linha 3 a intenção dos pesquisadores é a partir do conhecimento do perfil de usos de medicamentos intervirem para a utilização racional de uso de medicamentos. Também, a partir dos dados observacionais será possível a proposição de estudos experimentais. E a linha 4 tem como principal objetivo estabelecer fenótipos de risco para desenvolvimento de doenças não transmissíveis a partir do estudo de fatores intervenientes do processo saúde –doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O trabalho é introduzido apresentando o conceito clássico de envelhecimento e este conceito é a base teórica para a proposição do presente projeto. Uma das mais importantes teorias biológicas

Endereço:	Rua do Comércio, 3.000	CEP:	98.700-000
Bairro:	Univeristário		
UF:	RS	Município:	IJUI
Telefone:	(55)3332-0301	Fax:	(55)3332-0331
		E-mail:	cep@unijui.edu.br



Continuação do Parecer: 864.988

do envelhecimento é a "Teoria Neuroendócrina", que é uma das teorias genéticas. Estas postulam que toda espécie tem uma programação genética, podendo ser modulada por fatores ambientais, ou seja, o envelhecimento é pré-programado.

A teoria neuroendócrina busca explicar a degeneração funcional associada à idade partindo da hipótese de que o nível de envelhecimento é o resultado do declínio de diversos hormônios do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal que controlam o sistema reprodutor, o metabolismo e outros aspectos do funcionamento normal de um organismo.

A seguir é apresentado o referencial teórico da pesquisa, abordando temas tais como: climatério; estrogênio e as repercussões do hipoestrogenismo; sinais e sintomas do climatério; doenças cardiovasculares, metabólicas e neoplásicas bem como a farmacologia do envelhecimento.

Delineamento da pesquisa

O protocolo de pesquisa "Envelhecimento Feminino" da Universidade Regional do Noroeste do Rio Grande do Sul – UNIJUÍ trata-se de um estudo de seguimento populacional (Coorte) que tem a intenção de acompanhar mulheres no período do climatério na cidade de Ijuí/RS. Esse delineamento possibilitará abrigar estudos observacionais e de intervenção. O período previsto de seguimento é de cinco anos com início das atividades de campo em 2014 e previsão de conclusão 2018.

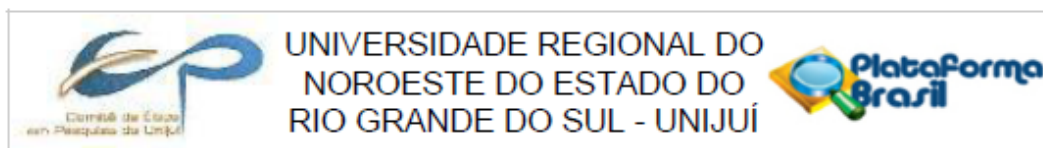
Uma coorte é um grupo de pessoas para as quais a condição de membro é definida de modo permanente, ou o de uma população na qual a condição de membro é determinada totalmente por um só evento definidor e, assim, torna-se permanente, sendo seguidas por um determinado tempo. No presente estudo o evento definidor são mulheres no período do climatério entre 35 e 65 anos de idade, e que estejam nesta faixa etária no ano de 2013, início do seguimento. As mulheres que ingressarem no estudo serão anualmente reavaliadas para que se obtenha um acompanhamento dos efeitos do declínio do estrogênio e as repercussões na saúde.

População do estudo

A população do estudo serão mulheres com idade entre 35 a 65 anos com cadastro ativo nas unidades de Estratégias de Saúde da Família (ESF) da área urbana do município de Ijuí/RS. Em Ijuí, segundo dados do IBGE do censo de 2010, a população feminina na faixa etária do estudo é de 15.475 mulheres.

Crítérios de inclusão

Endereço: Rua do Comércio, 3.000	CEP: 98.700-000
Bairro: Univeristário	
UF: RS	Município: IJUÍ
Telefone: (55)3332-0301	Fax: (55)3332-0331 E-mail: cep@unijui.edu.br



Continuação do Parecer: 864.988

- Mulheres entre 35 e 65 anos de idade;
- Estar nesta faixa de idade em 2014, ano do início do seguimento;
- Capacidade física-funcional e cognitiva preservada;
- Residir em áreas de cobertura das unidades de Estratégias de Saúde da Família da área urbana do município Ijuí;
- Ter cadastro ativo na unidade de saúde;
- Aceitar em participar da pesquisa e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Destaca-se que o município de Ijuí tem atualmente implementado catorze (8) estratégias de saúde da família com previsão de ampliação chegando a cobertura total da população.

Critérios de Exclusão

Serão excluídos do estudo: homens, crianças e mulheres com idade inferior a 35 e superior a 65 anos; mulheres na faixa etária de 35 a 65 anos com a capacidade física-funcional e ou cognitiva comprometida; as mulheres nessa faixa etária que residam fora das áreas de cobertura das unidades de Estratégias de Saúde da Família da área urbana do município Ijuí; as que não tenham cadastro ativo na unidade de saúde e as que não aceitem participar da pesquisa nem assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

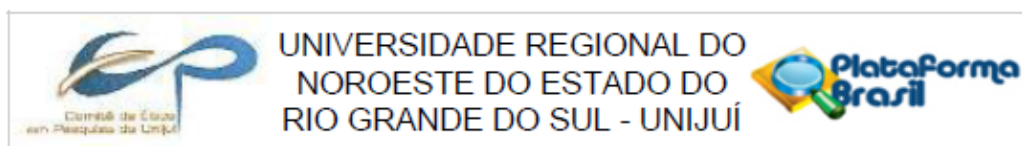
Logística

Para identificar e acessar a população do estudo utilizar-se-á as seguintes estratégias:

1º) Participação da equipe da pesquisa na reunião dos agentes comunitários de saúde (realizadas mensalmente) - no espaço concedido à equipe da pesquisa pela Secretaria Municipal de Saúde (SMS) será apresentado aos agentes comunitários de saúde o projeto. Nessa oportunidade será solicitado aos agentes o levantamento do número de mulheres na faixa etária do estudo residentes na microárea sob sua responsabilidade. Será entregue uma pasta com dados básicos da pesquisa, contato dos pesquisadores e formulário para listar nome, idade, endereço e telefone para contato. Segundo informações, a SMS de Ijuí conta atualmente com 80 agentes de saúde. A devolução das informações deverá ser entregue na reunião do mês subsequente a solicitação.

2º) Definição das unidades de ESF - de posse dos dados a equipe fará o planejamento por onde iniciará o trabalho de campo. Projeta-se que no período de 1 ano seja composta a população do estudo e já no segundo ano inicie a reavaliação.

Endereço:	Rua do Comércio, 3.000	CEP:	98.700-000
Bairro:	Univeristário		
UF:	RS	Município:	IJUI
Telefone:	(55)3332-0301	Fax:	(55)3332-0331
		E-mail:	cep@unijui.edu.br



Continuação do Parecer: 864.988

3º) Acesso as mulheres por visita domiciliar – após o sorteio a equipe de pesquisa, seguindo um planejamento logístico, iniciará as visitas domiciliares. As visitas domiciliares têm os seguintes objetivos: a) Avaliações específicas: serão realizadas avaliação bioquímica, nutricional, avaliação da função sexual, uroginecológica funcional do assoalho pélvico e avaliação da capacidade cardiorrespiratória e condicionamento muscular. Estas avaliações serão feitas por agendamentos. A coleta de material para as análises bioquímicas será realizada na própria unidade de saúde. A avaliação nutricional e uroginecológica e funcional do assoalho pélvico serão realizadas na UNIJUÍ COMUNIDADE. Em todos os casos serão feitas as orientações para os exames durante a visita domiciliar.

Ao ingressar no estudo a mulher passará por uma série de avaliações. As avaliações serão realizadas em ciclos de 1 ano, ou seja, cada participante será reavaliada de um em um ano. Cada bateria de avaliação terá prazo máximo para ser realizado em 3 meses, isso significa que ao ingressar no estudo, da avaliação das condições gerais de saúde a avaliação da função sexual, uroginecológica e funcional do assoalho pélvico não poderá exceder 3 meses, no intuito de garantir análise das condições de saúde em um tempo e espaço definidos

Variáveis de interesse e instrumentos de avaliação

A obtenção das variáveis de interesse será feita a partir da avaliação das condições gerais de saúde e avaliações específicas (avaliação do estado nutricional; avaliação da função sexual, uroginecológica e funcional do assoalho pélvico; avaliação do estado nutricional; e, avaliação da capacidade cardiorrespiratória e de condicionamento muscular).

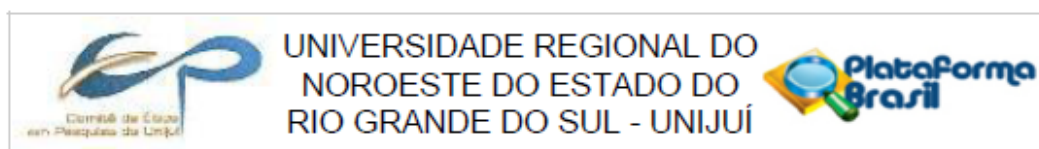
Análise estatística

Os dados obtidos serão analisados por meio do software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) (versão 18.0). Serão utilizadas ferramentas da estatística descritiva e analítica considerando a natureza da variável, quantitativa ou qualitativa. Para a estatística descritiva utilizar-se-á medidas de tendência central, de dispersão e variabilidade; frequência relativa e absoluta.

Para verificar associação entre as variáveis categóricas será utilizado o qui-quadrado. A estimativa de risco será feita pelo cálculo do risco de chance/Odds Ratio e risco relativo. Sendo aceito somente valores igual ou superior a 1,5 para atribuição de risco.

Para a estatística analítica será utilizado o teste de Levene para testar a hipóteses de variâncias dos grupos e para a comparação de médias dos grupos será usado testes de comparação de médias

Endereço: Rua do Comércio, 3.000	
Bairro: Universtário	CEP: 98.700-000
UF: RS	Município: IJUI
Telefone: (55)3332-0301	Fax: (55)3332-0331 E-mail: cep@unijui.edu.br



Continuação do Parecer: 864.988

para variáveis dependentes e independentes, paramétricas e não paramétricas. Para todos os casos será utilizada uma confiabilidade de 95%.

Aspectos éticos

O Estudo foi projetado de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos segundo a Resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS) nº. 466/2012 e será submetido ao Comitê de Ética da UNIJUÍ. Todas as participantes serão esclarecidas sobre o projeto e assinarão um termo de consentimento.

O protocolo proposto não oferece nenhum risco à saúde das mulheres que aceitarem participar do estudo. O principal benefício deste estudo é estudar os efeitos do declínio do estrogênio e suas repercussões sobre a saúde da mulher no período do climatério; e, produzir novas tecnologias para a atenção básica visando a redução das doenças crônicas não transmissíveis na busca de uma velhice saudável.

Os documentos da pesquisa (instrumento de coleta de dados) ficarão sob a guarda das pesquisadoras responsáveis, Professora Evelise Moraes Berlezi e Ligia Beatriz Bento Franz, em local restrito a pesquisadora, por um período mínimo de cinco anos, após serão incinerados.

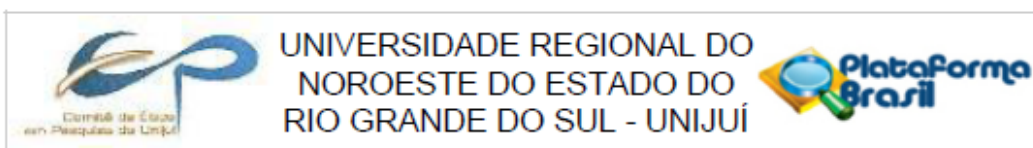
Cada etapa e ano do estudo demandará o retorno individualizado a cada mulher participante do estudo, de forma individualizada, no seu domicílio, na unidade ou local agendado, conforme a disponibilidade de local. Na oportunidade da entrega da avaliação com o parecer qualitativo do mesmo serão realizadas ações de educação, promoção ou prevenção de agravos ou doenças de acordo com o resultado que estará sendo trabalhado e os pesquisadores ficarão a disposição para outros esclarecimentos e informações que se fizerem necessária.

Também a cada etapa e ano será realizado o retorno aos profissionais de saúde da unidade a partir relatórios técnicos os quais serão apresentados em reunião de equipe, a pedido dos pesquisadores ou a qualquer tempo a pedido da própria equipe. Ainda, será repassada a equipe o parecer individualizado da avaliação de cada mulher participante para que possa ser anexado ao prontuário da unidade.

Os documentos da pesquisa e o material biológico ficarão sob a guarda dos pesquisadores por um período de 5 anos após serão incinerados. Destaca-se que o material biológico será armazenado no Laboratório de Análises Clínicas da UNIJUÍ e ficará sob a guarda da pesquisadora Prof Marilei Uecker Pletsch (Farmacêutica/UNIJUÍ).

Produção intelectual a partir do projeto de pesquisa

Endereço: Rua do Comércio, 3.000	CEP: 98.700-000
Bairro: Univeristário	
UF: RS	Município: IJUÍ
Telefone: (55)3332-0301	Fax: (55)3332-0331
	E-mail: oep@unijuí.edu.br



Continuação do Parecer: 864.988

Os resultados da pesquisa serão socializados com a comunidade científica a partir do encaminhamento de papers à periódicos da área de ciências da saúde e afins, livros e capítulos com abordagem acadêmica e/ou técnica. Também, socializar os resultados em espaços científicos: reuniões de pesquisadores afetos ao tema, eventos científicos nacionais e internacionais da área entre outros.

Resultados, produtos, avanços e aplicações esperadas

O intuito de constituir um MACRO PROJETO com grandes linhas de ação é para que o grupo de pesquisa tenha um projeto articulador em que os pesquisadores envolvidos tem como elo um tema de pesquisa que se abre para diferentes abordagens e aprofundamentos. Dessa forma acredita-se que o grupo de pesquisa possa constituir identidade e tornar-se referência no tema.

Os resultados das pesquisas produzidas com esta população poderão atender as demandas dos serviços de saúde, especialmente, na atenção primária e secundária. Na linha 1 espera-se produzir metodologias de cuidado para abordar a questão dos sinais, sintomas e quadros clínicos oriundos do hipoestrogenismo na perspectiva da qualidade de vida da mulher no climatério.

Na Linha 2 espera-se que a identificação dos fatores que interferem de forma positiva e negativa no estado nutricional da mulher no climatério possam ser a base de construção de cuidado e tratamento que reduzam a repercussão negativa das mudanças de composição corporal que interferem diretamente nas condições de saúde elevando o risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, metabólicas e oncológicas.

Na linha 3 a intenção dos pesquisadores é a partir do conhecimento do perfil de usos de medicamentos intervirem para a utilização racional de uso de medicamentos. Também a partir dos dados observacionais será possível a proposição de estudos experimentais.

A linha 4 tem como principal objetivo estabelecer fenótipos de risco para desenvolvimento de doenças não transmissíveis a partir do estudo de fatores intervenientes do processo saúde –doença.

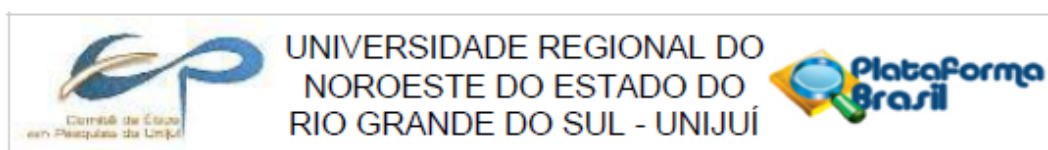
Metas

Ano 2014

- captar 300 mulheres para ingressar no estudo;
- realizar avaliação das condições de saúde e avaliações específicas de todas as mulheres captadas.

Ano 2015

Endereço: Rua do Comércio, 3.000	CEP: 98.700-000
Bairro: Univeristário	
UF: RS	Município: IJUI
Telefone: (55)3332-0301	Fax: (55)3332-0331
	E-mail: cep@unijui.edu.br



Continuação do Parecer: 864.988

- reavaliar todas as mulheres que ingressaram no estudo em 2014;
- ampliar em 30% a captação considerando a meta de 2014;
- iniciar projetos experimentais (ensaios clínicos) constituindo as amostras a partir do banco de dados da pesquisa nas quatro linhas de investigação;
- análise de dados parciais e produções científicas.

Ano 2016

- reavaliar todas as mulheres que ingressaram no estudo em 2014 e 2015;
- ampliar em 30% a captação considerando o alcançado em 2015;
- continuidade de projetos experimentais (ensaios clínicos) constituindo as amostras a partir do banco de dados da pesquisa nas quatro linhas de investigação;
- análise de dados parciais e produções científicas.

Ano 2017

- reavaliar todas as mulheres que ingressaram no estudo em 2014, 2015 e 2016;
- continuidade de projetos experimentais (ensaios clínicos) constituindo as amostras a partir do banco de dados da pesquisa nas quatro linhas de investigação;
- análise de dados parciais e produções científicas.

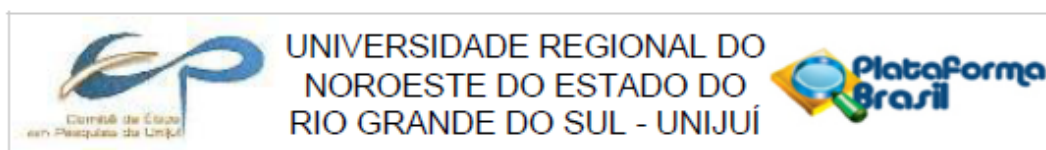
Ano 2018

- reavaliar todas as mulheres que ingressaram no estudo em 2014, 2015 e 2016;
- análise de dados e produções científicas;
- sistematização dos 5 anos de seguimento;
- publicação de livro técnico produzido pela experiência da equipe de pesquisa; planejamento da continuidade do seguimento.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- a) Projeto de Pesquisa.
- b) Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.
- c) Ofício da Secretaria Municipal da Saúde, para a realização da pesquisa o município de Ijuí, assinada pela secretaria de Saúde de Ijuí, Sra Alexandra Letz.
- d) Folha de rosto para pesquisa com seres humanos com assinaturas.
- e) Cronograma.
- g) Orçamento.
- h) Curriculum Vitae dos pesquisadores.

Endereço:	Rua do Comércio, 3.000	CEP:	98.700-000
Bairro:	Univeristário		
UF:	RS	Município:	IJUÍ
Telefone:	(55)3332-0301	Fax:	(55)3332-0331
		E-mail:	cep@unijui.edu.br



Continuação do Parecer: 864.988

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências ou inadequações.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa da UNIJUÍ acompanha o parecer do relator.

IJUI, 10 de Novembro de 2014

Assinado por:
Ângela Patricia Grajales Spilimbergo
 (Coordenador)

Endereço: Rua do Comércio, 3.000
Bairro: Univeristário **CEP:** 98.700-000
UF: RS **Município:** IJUI
Telefone: (55)3332-0301 **Fax:** (55)3332-0331 **E-mail:** cep@unijui.edu.br

ANEXO C: Normas da Revista Menopause

Scope

Menopause is the official journal of The North American Menopause Society (NAMS). A peer-reviewed scientific journal, *Menopause* provides a forum for new research, applied basic science, and clinical guidelines on all aspects of menopause. The scope of the Journal extends beyond gynecology, encompassing multidisciplinary areas that include internal medicine, family practice, medical subspecialties such as cardiology and geriatrics, epidemiology, pathology, physiology, sociology, psychology, anthropology, and pharmacology.

Preparation of Manuscripts

All manuscripts submitted to *Menopause* should adhere to the “Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals”. Manuscripts must be written in English. Authors whose native language is not English should have their manuscripts checked for correct English grammar prior to submission. Upon submission, if the grammar is considered to be unsuitable by the Editor-in-Chief, the paper will be returned to the corresponding author for necessary revisions prior to being sent out for peer review. All text is subject to editorial revision and review. The author should retain a copy of the complete submission for reference.

Brief Reports/Case Reports: Reports should present focused, new clinical or investigational observations in a format of 9–12 double spaced pages of text (including references) and a maximum of two illustrations or tables.

Original Articles: Articles covering both basic science and clinical topics are welcome. In most cases, each article receives at least two editorial peer reviews and one statistical review.

Basic Science Articles: Basic science research papers must include a paragraph at the end of the Discussion section under the sub header *Potential Clinical Value* which clearly discusses the possible clinical implications of your research.

Letters to Editor: Letters to the Editor are encouraged and should be submitted in response to work that has already been published in *Menopause*. All letters must be submitted online through the Menopause Editorial web site and addressed to the Editor-in-Chief. (see instructions for Manuscript Submission). Letters should not exceed 400 words (excluding references, names/addresses). When possible, references should not exceed five, with the related article being one of the five citations. Complete references must be supplied in the

proper format (see below). If the letter is accepted for publication the authors of the article that prompted the letter will be given an opportunity to reply.

Details of Style. Please follow the guidelines set by the *American Medical Association Manual of Style*, 10th edition, Oxford University Press, 2007. The manuscript must include (in the following order): the title page, abstract, text, acknowledgments, references, tables, figure legends, and figures.

The electronic version will be typeset and should not contain any extraneous formatting instructions. For example:

- Use hard carriage returns only at the end of paragraphs and display lines (eg, titles, subheadings)
- Do not use an extra hard return between paragraphs
- Do not use tabs or extra space at the start of a paragraph or for list entries
- Do not indent run over lines in references
- Turn off line spacing
- Turn off hyphenation and justification
- Do not specify page breaks, page numbers, or headers
- Do not specify typeface
- Care should be taken to correctly enter “one” (1) and lower case “el” (l), as well as “zero” (0) and capital “oh” (O).

Please observe the following conventions:

- Use a single hyphen with space before it for a minus sign, use a double hyphen (with space before and after) to indicate a “long dash” in text, use a single hyphen (with no extra space) to indicate a range of numbers (eg, “23-45”).
- Illustrations and tables will be handled conventionally. However, figure and table legends should be included at the end of the electronic file.
- Nonstandard characters (Greek letters, mathematical symbols, etc.) should be coded consistently throughout the text. Please make a list of such characters and provide a listing of the codes used.

Title Page: The title page should contain, in order, the following:

- The paper’s full title
- A running title of no longer than 45 characters and spaces combined
- Author line with the first name, middle initial, last name, credentials (eg, MD, PhD), and affiliation of each author
- Any source(s) of financial support, if none, please state so

- Conflict of interest/financial disclosure, if none please state so
- Disclaimers, if any
- The title page must also include disclosure of funding received for this work from any of the following organizations: National Institutes of Health (NIH); Wellcome Trust; Howard Hughes Medical Institute (HHMI); and other(s).
- Name, address, phone and fax number, and e-mail address of the author to whom reprint requests should be addressed (if reprints will not be available, please state so). Indicate which author should receive correspondence and provide that person's preferred mailing address, telephone and fax numbers, and e-mail address if different from that indicated by the authors for reprint requests.

Structured Abstract: On the next page, provide an abstract of 250 words or less, organized under the following headings: Objective, Methods, Results, and Conclusions. Also provide with the abstract no more than six key words for database searching.

Text: Begin the body of the manuscript on the next page following the abstract. Although not appropriate for some articles, most regular manuscripts should adhere to the following sequence: Introduction, Methods, Results, Discussion, Conclusions, References, and Figure Legends.

Drug Names: Use only generic names when referring to drugs. If a trade name is necessary for clarity, place it in parentheses after the generic name. Do not use registration marks or trademarks.

Terminology: When describing postmenopausal hormone therapy, use the words "estrogen plus progestogen therapy," abbreviated EPT, to describe this combination hormone therapy or "estrogen therapy," abbreviated ET, to describe treatment with this hormone alone. "Hormone therapy," abbreviated HT, should be used as an umbrella term to describe both ET and EPT. Use the word "progestogen" as the umbrella term for progestin and progesterone. Use "progestin" and "progesterone" only for those specific agents. When referring to therapy that does not include hormones, the term "nonhormone therapy" should be used to describe this type of treatment.

Abbreviations: Keep abbreviations to a minimum and define each at its first use. Do not use abbreviations in the abstract. Abbreviate units of measure only when used with numbers, and refer to the AMA Manual of Style for standard scientific abbreviations.

Conflicts of Interest: Authors must state all possible conflicts of interest in the manuscript, including financial, consultant, institutional and other relationships that might lead to bias or a conflict of interest. If there is no conflict of interest, this should also be explicitly stated as

none declared. All sources of funding should be acknowledged in the manuscript. All relevant conflicts of interest and sources of funding should be included on the title page of the manuscript with the heading “Conflicts of Interest and Source of Funding:”. For example: Conflicts of Interest and Source of Funding: A has received honoraria from Company Z. B is currently receiving a grant (#12345) from Organization Y, and is on the speaker’s bureau for Organization X – the CME organizers for Company A. For the remaining authors none were declared.

In addition, each author must complete and submit the journal's copyright transfer agreement, which includes a section on the disclosure of potential conflicts of interest based on the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors, "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (www.icmje.org/update.html).

The copyright transfer agreement form is made available to the submitting author within the Editorial Manager submission process. Co-authors will automatically receive an email with instructions on completing the form upon submission.

References: The number of references should not exceed 75 whenever possible. Accuracy of reference data is the responsibility of the author. Number references in the order of their use in the text; do not alphabetize. Identify references in the text with Arabic superscript numerals. Follow the *Index Medicus* reference style (see “Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals,” *Ann Intern Med* 1988; 108:258-265). Provide article titles and inclusive pages. Refer to the *List of Journals Indexed in Index Medicus* for abbreviations of journal names. List all authors when six or fewer; when seven or more, list only the first three and “et al.” The following are examples of correct format. Refer to the *AMA Manual of Style* for other examples.

Journal Article

1. Halbreich U, Rojansky N, Palter S. Decreased bone mineral density in medicated psychiatric patients. *Psychosom Med* 1995;57:485-491.

Chapter in a Book

2. Byrne JLB. The role of oral contraceptives. In: Wilansky S., Willerson JT, editors. *Heart Disease in Women*. New York, NY: Churchill Livingstone, 2002:122-127.

Book

3. Rock JA, Jones HW III, ed. *TeLinde’s Operative Gynecology*, Ninth Edition. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2003.

Web Site

4. Gapstur SM, Morrow M, Sellers TA. Hormone replacement therapy and risk of breast cancer with a favorable histology. JAMA[serial online].1999;281:2091-2097. Available at: <http://jama.ama-assn.org/issues/v281n22/full/joc90096.html>. Accessed November 15, 1999.
5. The North American Menopause Society. Definitions and statistics. Available at: <http://www.menopause.org/aboutmeno/overview.htm>. Accessed February 15, 2005.

Tables: Tables should be in a separate file from the body of the paper. Tables should be in .doc files only. Tables should not be in excel files. Place explanatory information in footnote. For footnotes, use the following designations: ^{a, b, c, d, e, f}. Do not use numbers or symbols to designate footnotes.

Digital Artwork Guideline Checklist

Here are the basics to have in place before submitting your digital art to [journal title]:

Artwork should be saved as TIFF, EPS, or MS Office (DOC, PPT, XLS) files. High resolution PDF files are also acceptable.

Crop out any white or black space surrounding the image.

Diagrams, drawings, graphs, and other line art must be vector or saved at a resolution of at least 1200 dpi. If created in an MS Office program, send the native (DOC, PPT, XLS) file.

Photographs, radiographs and other halftone images must be saved at a resolution of at least 300 dpi.

Photographs and radiographs with text must be saved as postscript or at a resolution of at least 600 dpi.

Each figure must be saved and submitted as a separate file. Figures should not be embedded in the manuscript text file.

Remember:

Cite figures consecutively in your manuscript.

Number figures in the figure legend in the order in which they are discussed.

Upload figures consecutively to the Editorial Manager web site and enter figure numbers consecutively in the Description field when uploading the files.

ANEXO D: Normas da Revista Maturitas

Maturitas is an international multidisciplinary peer reviewed scientific journal of midlife health and beyond publishing original research, reviews, consensus statements and guidelines. The scope encompasses all aspects of postreproductive health in both genders ranging from basic science to health and social care. Maturitas will publish in the following areas: predictors, effects and management of chronic diseases, sex steroid deficiency in both genders, epidemiology, health and social care, therapeutic advances, complementary and alternative medicines.

Types of Papers

- Original articles: a full-length report of original basic or clinical investigation (2000-3000 words, up to 30 references). A structured abstract of no more than 250 words with the following sections (objectives, study design, main outcome measures, results, conclusions) is required. The rest of the paper should be structured as follows: Introduction, Methods, Results, Discussion, References. Maturitas gives priority to reports of original research that are likely to change clinical practice or thinking about a disease. We offer fast-track peer review and publication of randomized controlled trials that we judge of importance to practice or research (see Fast-track publication). We invite submission of all clinical trials, whether Phase I, II, or III. Submission of randomized controlled trials requires inclusion of a checklist and flowchart in accordance with the CONSORT guidelines and the registration number of the trial and the name of the trial registry. Studies of diagnostic accuracy must be reported according to STARD guidelines. Observational studies (cohort, case-control, or cross-sectional designs) must be reported according to the STROBE statement (see also www.strobe-statement.org).
- Short communications: must not exceed 1,000 words with no more than one table or illustration and five references. An unstructured abstract of no more than 100 words is required. The text should be structured in four parts: Introduction, Methods, Results and Discussion.
- Review articles: a comprehensive review of prior publications relating to an important clinical subject (2000-3000 words and 30-50 references). An unstructured abstract of no more than 250 words is required. The Introduction should indicate why the topic is important and should state the specific objective(s) of the review. The Conclusion should include the clinical implications and observations regarding the need for additional research. Systematic reviews

should follow the PRISMA guidelines. Meta-analysis of observational studies should follow the MOOSE guidelines.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Materials and Methods

The Methods section should describe the research methodology in sufficient detail that others could reasonably be expected to be able to duplicate the work. However, if the methodology has been previously published, the appropriate reference should be cited, and a full description is not required. Methods of statistical analysis should be identified and, when appropriate, the basis for their selection stated. Statistical software programs used should be cited in the text. P values should be expressed to no more than three decimal places. Reports in which statistical difference is lacking must provide some indication of the study's power to detect such differences, and this information must be included in the abstract.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- *Title*. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- *Author names and affiliations*. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- *Corresponding author*. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.
- *Present/permanent address*. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Highlights

Highlights are a short collection of bullet points that convey the core findings of the article. Highlights are optional and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points

(maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view [example Highlights](#) on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult [IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents](#) for further information.

Embedded math equations

If you are submitting an article prepared with Microsoft Word containing embedded math equations then please read this ([related support information](#)).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.

- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the

relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <http://dx.doi.org/10.1029/2001JB000884i>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given. Example: '.... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.