

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ

CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA E EFEITO
GENOPROTETOR DAS CASCAS DA *Poincianella*
bracteosa (TUL.) L.P QUEIROZ EM CÉLULAS
MERISTEMÁTICAS DE *Allium cepa*.**

FRANCISCO DAS CHAGAS PEREIRA CARDOSO

ORIENTADOR(A): PROF. DR. PEDRO MARCOS DE ALMEIDA

Co-ORIENTADOR(A): PROF. DR. SÂMYA DANIELLE LIMA DE FREITAS

Teresina – PI
2025

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**PROSPEÇÃO FITOQUÍMICA E EFEITO
GENOPROTETOR DAS CASCAS DA *Poincianella*
bracteosa (TUL.) L.P QUEIROZ EM CÉLULAS
MERISTEMÁTICAS DE *Allium cepa*.**

FRANCISCO DAS CHAGAS PEREIRA CARDOSO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Piauí, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química – Área de concentração: Química
Orientador(a): Prof. Dr. Pedro Marcos De Almeida.

Teresina – PI

2025

**PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA E EFEITO GENOPROTETOR
DAS CASCAS DA *Poincianella bracteosa* (TUL.) L.P QUEIROZ EM
CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE *Allium cepa*.**

FRANCISCO DAS CHAGAS PEREIRA CARDOSO

Dissertação/Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Piauí, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre/Doutor em Química – Área de concentração: Química. – Linha de pesquisa: Bioprospecção de produtos naturais.

Aprovado em 31 de outubro de 2025.

Membros da Banca:

Prof. Dr. Pedro Marcos de Almeida
(Presidente da Banca – UESPI)

Prof. Dra. Sâmya Danielle Lima de Freitas
(Coorientadora – UFPI)

Prof. Dr. João Sammy Nery de Souza
(Membro Titular – UFPI)

Prof. Dr. Ícaro Fillipe de Araújo Castro
(Membro Titular – IFPI)

Prof(a). Dr. Francisco Artur e Silva Filho
(Membro Titular – UESPI)

Teresina – PI

2025

Dedico:

À Deus pela força espiritual,

Aos meus pais pelo fraterno acolhimento e inspiração,

Aos meus irmãos pelo grande incentivo,

À irmã Celina Paraiso (in memoriam), por ter sido luz aos desfavorecidos.

AGRADECIMENTOS

- ❖ Agradeço à Universidade Estadual do Piauí (UESPI), Universidade Federal do Piauí (UFPI), Instituto Federal de Educação e Tecnologia do Piauí (IFPI) e ao Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás (UFG) pela disponibilidade dos laboratórios para realização das atividades e à Universidade Estadual do Piauí (UESPI) pela bolsa de pesquisa.
- ❖ Agradeço ao meu orientador, Pedro Marcos de Almeida por todos os ensinamentos, dedicação, confiança e amizade durante a realização deste trabalho.
- ❖ À minha coorientadora, Sâmya Danielle Lima de Freitas, pela orientação e apoio para a realização deste trabalho.
- ❖ Agradeço aos colegas do PPGQ e LABGENE que tornaram essa jornada mais leve e especial.
- ❖ Agradeço ao Regino, Conceição, Marcos, Maria, Auricélia, Alexandre, Márcio, Assunção, João Miguel e Gabriel, pelo amor, inspiração, paciência e por estarem comigo em todos os momentos.

“Você não pode esperar construir um mundo melhor sem melhorar os indivíduos. Para esse fim, cada um de nós deve trabalhar para o seu próprio aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, compartilhar uma responsabilidade geral por toda a humanidade”

(Marie Curie)

RESUMO

CARDOSO, F.C.P. **Prospecção fitoquímica e efeito genoprotetor das cascas da *Poincianella bracteosa* (TUL.) L.P Queiroz em células meristemáticas de *Allium cepa* (L.).** 2025. 74 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual do Piauí. Teresina.

Poincianella bracteosa (Fabaceae), conhecida como catingueira, tem uso popular no tratamento de diarreias, hepatite, infecções e enxaqueca. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar o perfil fitoquímico, atividade antioxidante, citogenotóxica e efeito genoprotetor do extrato etanólico (EE) das cascas do caule de *P. bracteosa* em células meristemáticas de *Allium cepa*. A prospecção química qualitativa e cromatografia em camada delgada (CCD) do EE detectaram fenóis, saponinas, alcaloides, flavonoides, taninos pirogálicos e terpenos, enquanto a HPLC-DAD mostrou flavonoides e ácidos fenólicos. A caracterização metabólica por Orbitrap-HRMS ESI (-) do EE sugeriu a presença de compostos evidenciados pela primeira vez na espécie, como o kaempferol, quercertina, isoquerçitrina, isovitexina, ácidos (ursólico, gálico, dicafeoilquínico, elágico), amentoflavona, castalagina e corilagina. O EE demonstrou atividade antioxidante frente ao radical DPPH ($CE_{50} = 27,53 \pm 0,26 \mu\text{g/ml}$) e ABTS ($CE_{50} = 122,81 \pm 2,03 \mu\text{g/ml}$) e o teor de compostos fenólicos foi de 225,53 mg EAG/g. No ensaio *A. cepa*, o EE apresentou citotoxicidade nas duas maiores concentrações (1 e 2 mg/ml), não foi genotóxico em nenhuma das concentrações (0,25; 0,5; 1 e 2 mg/ml) e demonstrou efeito genoprotetor no pré, simultâneo e pós-tratamento com porcentagem de redução variando de 49,79 a 52,28 (pré); 65,17 a 93,70 (simultâneo) e 49,50 a 86,66 (pós). Os resultados mostraram que o EE é fonte importante de compostos antioxidantes com efeito não genotóxico e genoprotetor, sugerindo aplicações terapêuticas, especialmente em doenças relacionadas ao estresse oxidativo.

Palavras-chave: Alterações cromossômicas. Atividade antioxidante. Catingueira. Polifenóis.

ABSTRACT

CARDOSO, F.C.P. Phytochemical prospecting and genoprotective effect of *Poianella bracteosa* (TUL.) L.P Queiroz bark on meristematic cells of *Allium cepa* (L). 2025. 74 p. Dissertation (Master in Chemistry) – State University of Piauí. Teresina.

Poianella bracteosa (Fabaceae), known as catingueira, is commonly used to treat diarrhea, hepatitis, infections, and migraines. This study aimed to characterize the phytochemical profile, antioxidant activity, cytotoxicity, and genoprotective effects of the ethanolic extract (EE) from the stem bark of *P. bracteosa* on meristematic cells of *Allium cepa*. Qualitative chemical prospecting and thin-layer chromatography (TLC) of the EE detected phenols, saponins, alkaloids, flavonoids, pyrogallic tannins, and terpenes, while HPLC-DAD revealed flavonoids and phenolic acids. Metabolic characterization using Orbitrap-HRMS ESI (-) of EE suggested the presence of compounds, such as kaempferol, quercetin, isoquercitrin, isovitexin, acids (ursolic, gallic, dicaffeoyl quinic, and ellagic), amentoflavone, castalagin, and corilagin, which have been evidenced for the first time in this species. EE exhibited antioxidant activity against DPPH ($EC_{50} = 27.53 \pm 0.26 \mu\text{g/ml}$) and ABTS ($EC_{50} = 122.81 \pm 2.03 \mu\text{g/ml}$) radicals, with a phenolic compound content of 225.53 mg EAG/g. In the *A. cepa* assay, EE showed cytotoxicity at the two highest concentrations (1 and 2 mg/ml), was not genotoxic at any of the concentrations (0.25, 0.5, 1, and 2 mg/ml), and demonstrated a genoprotective effect in pre-, simultaneous, and post-treatment, with percentage reduction ranging from 49.79 to 52.28 (pre), 65.17 to 93.70 (simultaneous), and 49.50 to 86.66 (post). The results showed that EE is an important source of antioxidant compounds with non-genotoxic and genoprotective effects, suggesting its therapeutic applications, especially in diseases related to oxidative stress.

Keywords: Chromosomal alterations. Antioxidant activity. Catingueira. Polyphenols.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Folhas e flores da <i>Poincianella bracteosa</i>	20
Figura 2.2: Reação química e mudança de coloração em razão da atividade da substancia antioxidante	23
Figura 2.3: Estruturas do ABTS, suas formas protonada e oxidada.....	23
Figura 2.4: Alterações cromossômicas observadas em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i>	27
Figura 4.1: Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjos de diodos (CLAE-DAD) obtido do extrato etanólico das cascas do caule de <i>P. bracteosa</i>	42
Figura 4.2: Espectros da Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjos de diodos (CLAE-DAD) do extrato etanólico das cascas do caule de <i>P. bracteosa</i>	42
Figura 4.3: Espectro da HRMS ESI dos compostos majoritários do cromatograma obtido do extrato etanólico das cascas da <i>P. bracteosa</i> – LTQ ESI (-)	44
Figura 4.4: Gráfico do diagrama de Van Krevelen que destaca as possíveis classes de metabólitos secundários presentes no extrato etanólico das cascas de <i>P. bracteosa</i>	46
Figura 4.5: Estrutura química dos compostos identificados por HRMS ESI.....	47
Figura 4.6: Alterações cromossômicas observadas pela análise de células meristemáticas de raízes de <i>A. cepa</i>	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1: Atividade antioxidante do extrato etanólico (EE) das cascas do caule da <i>P. bracteosa</i>	39
Tabela 4.2: Classes de metabólitos identificados no extrato etanólico das cascas do caule da <i>P. bracteosa</i> por HPLC-DAD.....	42
Tabela 4.3: Análise do extrato etanólico das cascas do caule da <i>P. bracteosa</i> por ESI (-) -HRMS ESI.....	44
Tabela 4.4: Efeito citotóxico e citoprotetor do extrato etanólico das cascas do caule de <i>P. bracteosa</i> sobre células meristemas de <i>A. cepa</i>	50
Tabela 4.5: Média das alterações cromossômicas em células meristemáticas de <i>A. cepa</i> após exposição ao extrato etanólico das cascas do caule da <i>P. bracteosa</i>	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%RD - Porcentagem de Redução de Danos

UV-VIS - Espectroscopia ultravioleta visível.

ABTS - ácido 2,2'-azino-bis (3-etylbenzotiazolina-6- sulfônico)

AC - Aderência Cromossômica

BN - Broto Nuclear

CAET - Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox®

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

CE₅₀ - Concentração eficaz para inibir 50% do radical DPPH•

CLAE-DAD - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos

CM - C-metáfase

CN - Controle Negativo

CP - Controle Positivo

CS - Controle do Solvente

TCF – Teor de compostos fenólicos

DMSO - Dimetilsulfóxido

DP - Desvio Padrão

DPPH - Radical 2,2 difenil-1-picril-hidrazil

EAG - Equivalente Ao Ácido Gálico

EE - Extrato Etanólico

HRMS ESI - Espectrometria de massas de ionização por eletrospray de alta resolução

RDC - Resolução da Diretoria Colegiada

ANVISA - Agência nacional de vigilância sanitária

IM - Índice Mitótico

MS/CNS - Ministério da Saúde/Conselho Nacional de Saúde

MMS - Metilmelanossulfonato

MN - Micronúcleos

OMS - Organização Mundial de Saúde

PC - Perda Cromossômica

PNAF - Política Nacional de Assistência Farmacêutica

PNUMA - Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente

PT - Ponte Cromossômica

QC - Quebra Cromossômica

ROS - Espécies Reativas De Oxigênio

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	16
1.1 Objetivos	17
1.1.1 Geral	17
1.1.2 Específicos.....	17
CAPÍTULO 2 - REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 Planta medicinal: gênero <i>Poincianella</i>	18
2.2. Metabólitos secundários: estresse oxidativo e atividade antioxidante.	20
2.3 Métodos de identificação e análise de compostos.....	24
2.4 Teste de citogenotoxicidade em <i>A. cepa</i>	25
CAPÍTULO 3 - METODOLOGIA EXPERIMENTAL	28
3.1 Produtos químicos e reagentes	28
3.2 Coleta e identificação da planta	28
3.3 Preparo do extrato	29
3.4 Prospecção Fitoquímica.....	29
3.4.1 Teste para flavonoides	29
3.4.2 Teste para fenóis e taninos	29
3.4.3 Teste para alcaloides	30
3.4.4 Teste para saponinas.....	30
3.5 Cromatografia em camada delgada (CCD)	30
3.6 Teor dos Compostos Fenólicos (TCF).....	30
3.7 Ensaio Antioxidante (<i>in vitro</i>).....	31
3.7.1 DPPH-(2,2-difenil-1-picril-hidrazina)	31
3.7.2 ABTS ⁺ (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)	31
3.8 Caracterização química.....	32
3.8.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD)	32
3.8.2 Espectrometria de Massas de Alta Resolução com Ionização por Eletrospray (HRMS ESI).	33
3.8.3 Diagrama de Van Krevelen	33

3.9 Bioensaio <i>A. cepa</i>	34
3.10 Análise estatística	36
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 Prospecção preliminar do EE da <i>P. bracteosa</i>	37
4.2 Teor dos Compostos Fenólicos (TCF) e Ensaios Antioxidantes (<i>in vitro</i>).	38
4.3 Caracterização química dos compostos	40
4.3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD)	40
4.3.2 Espectrometria de massas de alta resolução com ionização por eletrospray (HRMS ES)	42
4.4 Bioensaio <i>A. cepa</i>	48
CAPÍTULO 5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	55
APÊNDICE A*	72

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre plantas medicinais vem sendo utilizado desde os primórdios da história como fator importante em tratamentos, cura e prevenção de doenças ¹, sendo repassada de forma empírica ao longo das gerações, como resultado da observação humana sobre a influência da flora em enfermidades e uso na alimentação animal ². A Organização Mundial de Saúde (OMS) mostrou que 80% da população utiliza abordagens tradicionais, devido à falta de acesso a unidades básicas de saúde e o baixo poder aquisitivo da população, que tornam o uso das plantas uma importante alternativa ^{3 4}.

O Brasil possui uma grande biodiversidade vegetal, representando aproximadamente 20% da flora mundial e enorme potencial para o uso das plantas com atividade medicinal ⁵. Em 2004, por meio da Resolução MS/CNS nº 338, foi criada a Política Nacional de Assistência Farmacêutica (PNAF), que visa a inclusão e utilização das plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos no sistema de saúde pública do Brasil ⁶. Em 17 de junho de 2016 com o objetivo de orientar a prescrição, a 1^a edição do Memento Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira foi aprovada através da Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - RDC nº 84 com informações de base científica sobre espécies fitoterápicas ^{7 8}. Contudo, ainda há necessidade de garantir maiores informações científicas que comprovem atividades medicinais e uma maior segurança e eficácia dessas plantas, bem como a disseminação e descobertas de novos medicamentos ⁹.

Fabaceae é uma família com mais de 2.834 espécies encontradas por todo o território nacional ¹⁰ com relevância no contexto botânico e na medicina popular tradicional ¹¹. Dentre as espécies, destaca-se *Poincianella bracteosa* (Tul.) L.P. Queiroz., popularmente conhecida como catingueira, catinga de porco ou pau de rato, encontrada no Nordeste brasileiro com estatura média e flores amarelas ¹², sendo utilizada de forma popular no tratamento de diarreia, anemia, hepatite, Infecções ^{13 14} ¹⁵, indigestão, febre e enxaqueca ¹⁶.

Estudos fitoquímicos nas frações acetato de etila, éter e hexânica do extrato etanólico das folhas e extrato aquoso das folhas e cascas de *P. bracteosa* detectaram a presença de compostos fenólicos, flavonoides, saponinas, terpenos, açucares redutores, taninos e alcaloides^{17 18 19}. Além disso, atividade antioxidante foi observada nas frações do extrato etanólico das folhas, sendo a éter com melhor resultado¹⁸. Enquanto, ensaios toxicológicos foram realizados no extrato aquoso das folhas e cascas de *P. bracteosa* nas concentrações de 2, 4, 8 e 16 mg/ml e não apresentaram citogenotoxicidade em células meristemáticas de *Allium cepa* (L.) e em camundongos e ainda mostraram efeito protetor contra danos provocados pelo metilmetanosulfonato (MMS) ou ciclofosfamida^{17 19}. No estudo de¹⁸, foi observado efeito citotóxico, não genotóxico e protetor na fração éter, acetato e hexânica do extrato etanólico das folhas de *P. bracteosa* em *A. cepa*.

Apesar da variedade de atividades terapêuticas empíricas de *P. bracteosa*, estudos fitoquímicos com o intuito de identificar moléculas bioativas e sua ação toxicológica ainda não foram realizados no extrato etanólico das cascas de *P. bracteosa*. A prospecção fitoquímica consiste em caracterizar compostos por testes qualitativos a técnicas cromatográficas, espectroscópicas e espectrométricas^{20 21 22}. Além disso, no uso de plantas medicinais, também deve ser considerado os possíveis efeitos toxicogenéticos, sendo indispensável avaliar concentrações e como os extratos podem interagir com as fibras do fuso mitótico e/ou com o DNA, resultando em alterações aneugênicas e/ou clastogênicas^{23 24}.

O bioensaio *A. cepa* é um dos métodos mais utilizado em testes para investigar os níveis de toxicidade, citogenotoxicidade e antigenotoxicidade de plantas^{25 26 27 28} devido à presença de cromossomos relativamente maiores e em número reduzido ($2n = 16$)²⁹, baixo custo e concordância com outros testes *in vitro* ou *in vivo*^{19 30 31}.

Além disso, é importante explorar a capacidade de extratos vegetais em neutralizar os radicais livres, pois os antioxidantes naturais podem inibir os danos oxidativos e promover benefícios à saúde³². O interesse em identificar compostos antioxidantes decorre de seu potencial quimioprotetor para prevenir danos ao material genético e/ou modular sistemas de reparo de DNA contra eventos genotóxicos e mutagênicos^{24,33,34}. A quimioproteção pode ser desmutagênica ou bioantimutagênica. Substâncias desmutagênicas neutralizam agentes mutagênicos diretamente ou por meio de seus derivados, inativando-os quimicamente no meio extra ou intracelular.

Agentes bioantimutagênicos estimulam o reparo e a replicação do DNA e atuam no nível celular, aumentando a fidelidade da replicação, o reparo sem erros e inibindo sistemas de reparo propensos a erros^{27 31}.

Considerando os resultados promissores obtidos com as folhas de *P. bracteosa*, que demonstraram potencial antioxidante e atividade não citogenotóxica e efeito protetor em determinadas concentrações em *A. cepa* e em camundongos^{17 18 19}, o presente estudo tem como objetivo caracterizar o perfil fitoquímico, atividade antioxidante, citogenotóxica e antigenotóxica do extrato etanólico das cascas do caule dessa espécie.

1.1 Objetivos

1.1.1 Geral

- Realizar a caracterização fitoquímica e citogenotóxica do extrato etanólico (EE) das cascas do caule da *P. bracteosa*.

1.1.2 Específicos

- Realizar a triagem fitoquímica qualitativa do EE das cascas de *P. bracteosa*.
- Determinar o teor de compostos fenólicos do EE das cascas de *P. bracteosa*.
- Quantificar atividade antioxidante do EE das cascas de *P. bracteosa* pelos métodos DPPH e ABTS.
- Caracterizar os compostos do EE das cascas de *P. bracteosa* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD) e pela Espectrometria de Massas de alta resolução com Ionização por Eletrospray (HRMS ESI).
- Avaliar o potencial citogenotóxico e antigenotóxico do EE das cascas de *P. bracteosa*.

Capítulo 2

REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Planta medicinal: gênero *Poincianella*

A OMS considera planta medicinal como todo produto a base de ervas que possui algum tipo de relevância no tratamento de doenças ou atividade farmacológica e sua utilização foi reforçada ao longo dos anos pelo conhecimento repassado entre gerações ³⁵. Os benefícios medicinais relacionam-se com suas atividades anti-inflamatória, antioxidante e bactericida, dentre outras, verificadas popularmente ³⁶.

A busca incessante pela cura de diversas enfermidades aumentou o interesse quanto ao poder medicinal de compostos químicos em diversas espécies de plantas ³⁷. Em meados do século XIX, a população mundial encorajou-se na busca por medicamentos fitoterápicos ao se observar o isolamento dos primeiros compostos de plantas medicinais, como a obtenção da morfina, codeína e papaverina, que são derivados da *Papaver somniferum*³⁸.

A grande biodiversidade de espécies de plantas presente no Brasil aumenta seu potencial para a utilização medicinal e torna essa atividade um hábito para a maioria da população, principalmente aquelas mais vulneráveis economicamente ³⁹. Com a criação da Política Nacional de Assistência Farmacêutica (PNAF), em 2004, esse potencial foi sendo cada vez mais valorizado ⁴⁰. O Nordeste brasileiro apresenta enorme riqueza botânica e conhecimento etnobotânico sobre o uso de sua flora e a Caatinga destaca-se como um dos principais biomas da região ⁴¹. Dentre os usos observados pela população em estudos etnobotânicos da região, pode-se destacar a utilização na cicatrização de feridas, dor, diabetes, colesterol, asma e até verminoses ^{42 43 44}.

A Família Fabaceae é uma das mais relevantes e ocupa o terceiro lugar em riqueza de espécies mundialmente ⁴⁵. No Brasil, é encontrada por todo o território nacional com cerca de 2.834 representantes e é o grupo mais numeroso da Caatinga e floresta Amazônica ^{10 46}, com relevância econômica na fabricação de corantes,

inseticidas e forragens ⁴⁷. A família é organizada nas subfamílias Cercidoideae, Detarioideae, Duparquetioideae, Dialioideae, Caesalpinoideae e Papilonoideae, amplamente utilizadas na medicina popular tradicional, com a presença de constituintes como alcaloides, flavonoides, saponinas e ácidos fenólicos ^{48 49}, que são responsáveis pela atividade anti-inflamatória, antioxidante, anticarcinogênica e antiproliferativa de suas espécies ⁵⁰.

Poincianella é um gênero que pertence à família Fabaceae, subfamília Caesalpinoideae e apresenta sinonímia *Caesalpinia* ⁵¹ ⁵¹. O gênero é representado por mais de 500 espécies espalhadas mundialmente em locais com altas temperaturas e umidade ao longo do ano ou até em áreas com predominância de um clima com temperaturas médias que alternam com verões quentes e úmidos e invernos mais frios durante o ano ⁵³.

Diversas espécies do gênero *Poincianella* são amplamente reconhecidas na medicina popular no tratamento de uma variedade de doenças, incluindo gripe, pneumonia e inflamações ⁵⁴. O uso terapêutico dessas plantas está diretamente associado à presença de compostos bioativos concentrados em diferentes partes do vegetal, como a casca do caule, folhas e frutos ^{51 55 56}.

Pertencente à família Fabaceae e anteriormente classificada como *Caesalpinia bracteosa*, a *P. bracteosa* é conhecida popularmente como catingueira, estaladeira, mané-ventura, pau-de-bica, catinga de porco ou pau de rato ¹⁶, podendo ser encontrada em diversos estados do Nordeste brasileiro, como Maranhão, Piauí, Paraíba, Bahia e Ceará, além de Goiás, Mato Grosso e Tocantins ^{16 12}.

Morfologicamente, a planta apresenta porte médio, com cerca de 3 a 10 m de altura, tronco lenhoso, flores amareladas (Figura 2.1) em formato de cachos, vagem com aproximadamente 7 a 10 sementes, número ímpar de folíolos e casca amarronzada que é apreciada como estimulante sexual quando embebidas em cachaças ^{12 15 16}. A espécie demonstra adaptação ao clima seco, perdendo as folhas e conseguindo se sobressair na competição por luz, além de ser utilizada na alimentação de ruminantes ^{57 58}.



Figura 2.1: Folhas e flores da *Poincianella bracteosa*¹⁶.

Na medicina popular tradicional, cascas e folhas da *P. bracteosa* têm seu uso ligado a ações terapêuticas contra inflamações na mucosa gástrica, diarreia, infecções renais e intestinais^{14 15 59}, indigestão, febre, enxaqueca e no auxílio em processo de cura de ferimentos¹⁶. Além disso, foi observado seu uso na eliminação de gases, inflamação no fígado e anemia¹³. Estudos realizados com as cascas e folhas da espécie detectaram a presença de metabólitos secundários que podem estar relacionados com sua promissora atividade medicinal e antioxidante^{17 18 19}. Compostos fenólicos, flavonoides, saponinas e terpenos foram identificados nas frações acetato de etila, éter e hexânica do extrato etanólico das flores¹⁸, açúcares redutores, taninos e alcaloides no extrato aquoso da casca e das flores, demonstrando a presença de uma diversidade de compostos na espécie^{17 19}.

2.2. Metabólitos secundários: estresse oxidativo e atividade antioxidante.

Metabólitos secundários são compostos com baixo peso molecular e a sua produção está relacionada a proteção e adaptação a estresses bióticos e abióticos, com papel importante nas características medicinais e nutricionais das plantas⁶⁰. O

metabolismo secundário difere-se do primário para o desenvolvimento de vegetais, já que moléculas primárias como açucares redutores, lipídios e aminoácidos são cruciais em processos vitais de qualquer espécie e os secundários depende do ambiente em que estão inseridas e sua relação com o meio ⁶¹. A concentração de metabólitos secundários em plantas pode variar de acordo com a espécie, local, órgão coletado, temperatura, estresse hídrico e nutricional, tornando necessário analisar diferentes parâmetros para a validação de determinadas substâncias em espécies ⁶².

Os metabólitos secundários podem ser divididos em compostos fenólicos, nitrogenados e terpenos, distinguindo-se de acordo com as suas características químicas e biossíntese ⁶³. Os fenólicos possuem uma ou mais hidroxilas ligadas a um anel aromático que auxilia na sua capacidade de atuação como agente antioxidante ⁶⁴. Os fenólicos são obtidos, em sua maioria, a partir da rota metabólica da via do ácido chiquímico e parte do ácido malônico, produzindo moléculas como cumarinas, ligninas, flavonoides, ácidos fenólicos e taninos ⁶⁵, que podem atuar como atrativos a polinizadores e na defesa contra ervas daninhas parasitas ^{66 67}.

Compostos nitrogenados são moléculas que tem como característica a presença de um ou mais átomos de nitrogênio ⁶⁸ e dentre eles, os alcaloides são o grupo mais significativo, possuindo um anel heterocíclico e potencial atividade neuroprotetora ⁶⁹, anti-inflamatória e antiploriferativa ⁷⁰. A rota de biossíntese de alcaloides, assim como os compostos nitrogenados, pode ser obtida tanto a partir de aminoácidos aromáticos, quanto aminoácidos alifáticos ⁶².

Os terpenos também atuam na defesa e atração de polinizadores ⁷¹ e demonstram atividade antibacteriana e anticâncer ⁷². Suas principais rotas de biossíntese são via do ácido melavonato e via metileritrol-4 fosfato ⁷³, utilizado para a formação do isopreno, que representa a unidade básica dessa classe, formada por cinco átomos de carbono em que a sua junção pode formar monoterpenos, diterpenos, triterpenos, entre outros ⁶².

Ácidos fenólicos, flavonoides e taninos possuem ampla disseminação no gênero *Poincianella* e foram detectados nas folhas e cascas da *P. pluviosa* ^{74 75 76}, folhas, frutos e cascas da *P. pyramidalis*, o que destaca o potencial medicinal promissor de suas espécies ⁵⁵. Testes fitoquímicos no extrato aquoso de cascas e

folhas e etanólico das folhas da *P. bracteosa* também identificaram essas classes de compostos na espécie, além de detectar a presença de terpenos e alcaloides ^{17 18 19}.

Os radicais livres são formados em processos biológicos e caracterizados pela presença de um número ímpar de elétrons na camada de valência ⁷⁷. As espécies reativas de oxigênio (EROs) são um grupo de moléculas oxigenadas altamente reativas que exercem funções importantes no corpo humano e originam-se através da respiração celular e do metabolismo aeróbico, além da exposição solar ^{78 79}. Em excesso, os radicais e espécies reativas podem causar malefícios devido ao desequilíbrio com os níveis de antioxidantes presentes no organismo gerado pelo estresse oxidativo ⁸⁰. Além disso, esse desequilíbrio pode ocasionar danos oxidativos ao DNA através da peroxidação lipídica na membrana plasmática e formação de alterações cromossômicas, mutações, ou até a morte celular ⁸¹.

Compostos com atividade antioxidante podem ser endógenos ou exógenos e são capazes de inibir processos que envolvem a geração de radicais livres e espécies reativas, eliminando-os, através de mecanismos como a doação de prótons de hidrogênio ou transferências de elétrons ⁸². Vários métodos são utilizados na avaliação da atividade antioxidante de extratos de plantas, como os ensaios com o radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazina) e ABTS (2,2'-azinobis(3 etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) que são frequentemente utilizados ²⁴.

O método DPPH determina a capacidade de compostos em reduzir o radical DDPH ao verificar a diminuição da coloração roxa com banda de absorção máxima em 517 nm para amarelo pálido da hidrazina na solução com o antioxidante testado ⁸³. O mecanismo de ação dos antioxidantes no radical DPPH está relacionado com as doações de elétrons e átomos de hidrogênio ⁸⁴ e os ácidos fenólicos e flavonoides são importantes classes de antioxidantes naturais que podem auxiliar na redução desse radical ao apresentar hidroxilos que podem fazer essa doação ⁸⁵. A figura 2.2 mostra o mecanismo de reação de redução do radical DPPH.

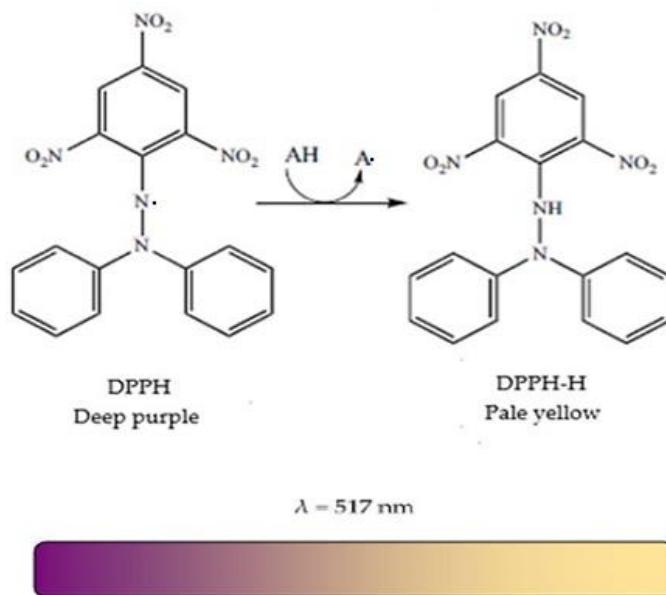


Figura 2.2 Reação química e mudança de coloração em razão da atividade da substância antioxidante⁸³.

O ABTS é utilizado como método de avaliação da atividade antioxidante de compostos ao observar a alteração na coloração verde escura e decaimento da absorbância máxima da solução contendo o radical, parâmetros considerados na redução do radical ABTS, que foi inicialmente preparado para a avaliação^{86 87}. O Mecanismo de ação (Figura 2.3) dos seus antioxidantes está relacionado com a transferência de átomos de hidrogênio e principalmente de elétrons na reação com compostos redutores⁸⁸.

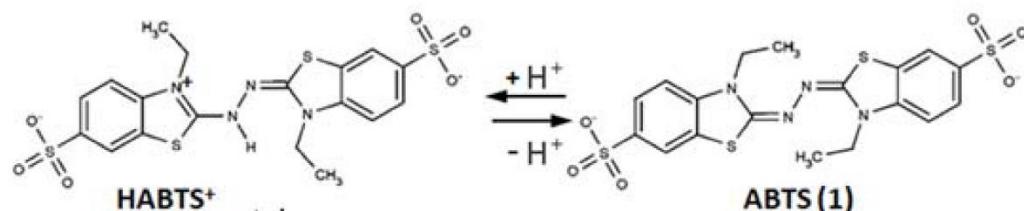


Figura 2.3 Estruturas do ABTS, suas formas protonada e oxidada⁸⁸

A eficiência e funcionalidade dos métodos DPPH e ABTS favorecem sua larga disseminação e utilização na avaliação antioxidante de extratos de plantas⁸⁸. Além desses, também se torna importante a verificação sobre a quantidade de compostos fenólicos na validação de ações antirradiculares, pois estes apresentam estruturas específicas, como anel aromático unido a uma ou mais hidroxilas, que podem colaborar com essa atividade⁸⁹.

2.3 Métodos de identificação e análise de compostos

Diferentes métodos são utilizados para a identificação, análise e quantificação de compostos que podem estar relacionados com as atividades biológicas de extratos, variando de testes qualitativos, cromatográficos, espectroscópicos ou espectrométricos^{20 21 22}.

A triagem fitoquímica preliminar qualitativa é o primeiro passo na elucidação das possíveis classes de compostos presente em extratos de plantas medicinais e suas possíveis atividades, direcionando a posteriores técnicas de identificação mais precisas^{90 91}. Os testes fitoquímicos são práticos e de baixo custo, obtendo resultados a partir de mudanças de coloração ou formação de precipitado em reações químicas com reagentes selecionados, devendo ser repetidos mais de uma vez para confirmação dos resultados, uma vez que diferentes solventes podem obter resultados distintos⁹².

Técnicas cromatográficas utilizam-se do mecanismo de separação de compostos de uma mistura ou extrato através da interação desses analitos com a fase móvel e a fase estacionária⁹³. A cromatografia em camada delgada (CCD) tem o emprego importante na identificação inicial de compostos, ao utilizar o mecanismo de adsorção, adicionando a mistura em uma placa cromatográfica, frequentemente de gel de sílica, eluída em um solvente ou uma mistura de solventes por capilaridade. As placas são reveladas após a corrida cromatográfica, o que permite identificar os compostos que tiveram maior afinidade com a fase móvel ou estacionária, principalmente por análise do tempo de retenção obtido^{94 95}.

Técnicas mais precisas são realizadas na análise de compostos de produtos naturais e a cromatografia líquida de alta eficiência possui ampla utilização devido ao seu menor tempo de separação e de solvente utilizado, maior rendimento e pureza dos compostos⁹⁶. O mecanismo da análise baseia-se na separação dos compostos pela interação com a fase móvel líquida e a fase estacionária sólida compacta, necessitando de uma bomba de pressão para que a corrida ocorra de forma eficiente⁹⁷. Diversos tipos de detectores são utilizados para identificar os compostos separados e os detectores UV são comumente empregados⁹⁸.

A espectroscopia no ultravioleta e visível também pode ser realizada como análise química de substâncias ao considerar a excitação de elétrons do estado fundamental para o estado excitado na interação da energia com a matéria ⁹⁹. A técnica baseia-se na absorção de energia na faixa de comprimento de onda de 190 a 800 nm, que no caso de moléculas, produzem espectros compostos de uma banda larga próximo ao comprimento de onda de transição principal, relacionando o espectro de absorção e a concentração da substância de acordo com a lei de Lambert-Beer ^{100 101}.

A espectrometria de massas é uma técnica de análise química precisa muito utilizada para a elucidação de compostos em misturas complexas, que utiliza como mecanismo o processo de ionização da mistura em fase gasosa aplicando sobre ela um campo elétrico ou magnético, onde os íons são separados no analisador de massa de acordo com suas relações *massa-carga* (*m/z*) ¹⁰². Os componentes básicos utilizados nessa técnica como a fonte de íons, o analisador de massas e o detector de íons são de extrema importância para uma análise precisa ¹⁰³ e a espectrometria de massas de alta resolução (*HRMS ESI*) demonstra o aumento da sensibilidade e precisão da técnica como característica, ao considerar as massas exatas de compostos que distinguem de compostos de casas decimais próximas ^{104 105}.

2.4 Teste de citogenotoxicidade em *A. cepa*

O bioensaio *A. cepa*, conhecido popularmente como o teste da cebola, possui ampla utilização na avaliação da citogenotoxicidade de extratos de plantas medicinais, amostras químicas e danos ambientais, devido a presença de cromossomo maiores e em menor número ($2n = 16$), alta sensibilidade, baixo custo e correlação confiável com testes *in vitro* e *in vivo*, sem a necessidade do sacrifício de animais ^{23 29}. O teste avalia a citotoxicidade (índice mitótico) e a capacidade de compostos em induzir o aumento do número de alterações cromossômicas em células meristemáticas de *A. cepa* (genotoxicidade) ²⁴. Além disso, o bioensaio *A. cepa* também pode ser utilizado para avaliar atividade genoprotetora de compostos, que podem atuar como desmutagênicos ou bioantimutagênicos ¹⁰⁶.

Os desmutagênicos atuam principalmente por adsorção e previnem a ação genotóxica de compostos no meio extracelular, já os compostos bioantimutagênicos atuam no meio intracelular estimulando o reparo de danos ao DNA causados por agentes genotóxicos ³¹. Em estudos do efeito protetor das frações do extrato etanólico das folhas, extrato aquoso das folhas e cascas da *P. bracteosa* foi evidenciada ação desmutagênica e bioanimutagênica ao identificar que a média total de alterações cromossômicas dos tratamentos diferiu estatisticamente do controle positivo nos ensaios pré, simultâneo e pós-tratamento, demonstrando o potencial efeito genoprotetor da espécie ^{17 19 18}.

Diferentes alterações cromossômicas podem ser investigadas. A formação de micronúcleos, pequenos corpos extranucleares, morfologicamente semelhantes ao núcleo principal, pode ser de origem aneugênica (perdas) e/ou clastogênica (fragmentos) que podem ser originados a partir de brotos nucleares e em excesso podem ser eliminados como minicélulas ¹⁰⁷. Aderências cromossômicas são alterações que sinalizam alto nível de toxicidade, sendo irreversíveis e capazes de gerar a formação de novas alterações durante o ciclo celular, como pontes e quebras, além de possível morte celular^{108 109}. A C-metáfase é uma alteração aneugenica relacionada com a inativação das fibras do fuso e parada do ciclo celular ¹⁰⁹. Metáfases poliploides são originadas de falhas na formação do fuso mitótico e bloqueio da citocinese, proporcionando defeito no desenvolvimento de células filhas¹¹⁰ e a distribuição desigual gerada pelo mau funcionamento do fuso mitótico leva a formação de anáfases multipolares ¹⁰⁸.

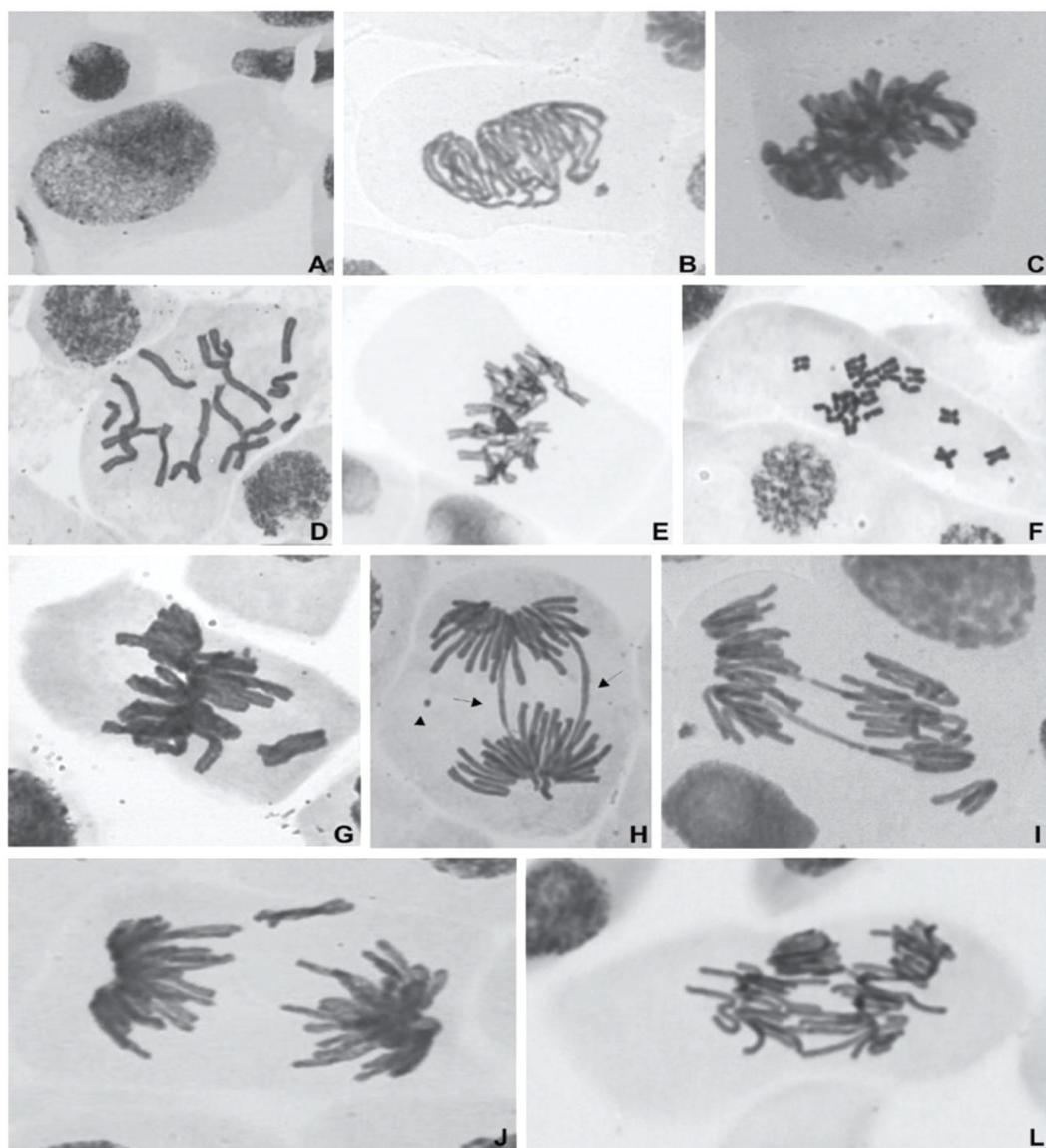


Figura 2.4. Danos genotóxicos observados em células meristemáticas de *Allium cepa*.

- (A). Núcleo intrafásico poliploidizado; (B). Prófase com perda de material genético; (C). Aderência cromossômica; (D-F). C-Metáfase; (G, I, J). Perdas cromossômicas; (H). Pontes cromossômicas (seta) e fragmento cromossômico (ponta de seta); (L). Anáfase multipolar ¹¹¹.

Capítulo 3

METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.1 Produtos químicos e reagentes

Os reagentes químicos usados neste estudo incluíram 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) (CAS No.: 1898-66-4), ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS) (CAS No.: A3219), dimetilsulfóxido (DMSO) (CAS No.: 67-8-65), reagente de Folin-Ciocalteu (CAS No.: 47641), ácido gálico (CAS No.: 149-91-7), Trolox (CAS No.: 53188-07-01), queracetina (CAS No.: 117-39-5) e metanossulfonato de metila (MMS) (CAS No.: 66-27-3) adquiridos da Sigma Chemical Co. Os solventes: álcool metílico (código 18714), álcool etílico (CAS 14731), hexano (CAS 21787), clorofórmio (CAS 60READIN001671), acetato de etila (CAS 141-78-6), reagente de Schiff (CAS P.01.0009.021.00.81) e carmim acético (CAS P.01.0060.000.00.75) foram adquiridos da Laboratory Dynamics. Carbonato de sódio (Na₂CO₃) (CAS V001137), persulfato de potássio (K₂S₂O₈) (CAS 7778-80-5), sulfato cérico [Ce(SO₄)₂] (CAS 13590-82-4), ácido ascórbico (CAS 50-81-7), ácido acético (CAS 60REAVET000866) adquiridos da Vetec. Todos os produtos químicos empregados neste estudo eram de grau analítico e utilizados de acordo com as instruções do fabricante.

3.2 Coleta e identificação da planta

As cascas do caule da *P. bracteosa* foram coletadas em outubro de 2023 na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), na cidade de Teresina-PI (coordenadas: latitude 5°02'14.1"s e longitude 42°47'57.3"w). A identificação da espécie foi realizada pelo botânico Francisco Soares Santos Filho e a exsicata foi depositada no Herbário Afrânio Gomes Fernandes da UESPI com número de voucher HAF 03635. O material foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio genético e do conhecimento Tradicional Associado (SisGen) com

o número de cadastro A1D255B.

3.3 Preparo do extrato

As cascas do caule da *P. bracteosa* foram higienizadas, secas em temperatura ambiente por 14 dias e trituradas em moinho de facas industrial, o que resultou em 496,27 g de material seco. O pó fino das cascas foi submetido ao processo de extração em etanol PA (Dinâmica) por seis vezes consecutivas e em recipiente fechado por um período de 72 h. O extrato etanólico (EE) foi filtrado e concentrado em evaporador rotatório (Fisatom, 550) a 40°C e, em seguida, liofilizado (Thermo, modulyod-115), obtendo o rendimento de 4,8% (23,70 g). O material foi armazenado a 4°C para posterior análise.²⁴

3.4 Prospecção Fitoquímica

A prospecção fitoquímica das cascas do EE foi realizada em triplicatas como teste preliminar para a detecção das principais classes de metabólitos secundários, como flavonoides, alcaloides, saponinas, fenóis e taninos⁹⁰. As análises das amostras foram realizadas no Laboratório GERATEC da Universidade Estadual (UESPI).

3.4.1 Teste para flavonoides

Adcionaram-se 5 gotas de HCl (6M) e raspas de magnésio a 3 ml da solução etanólica do EE. Após o fim da efervescência, a presença de flavonoides foi observada com uma coloração rósea.

3.4.2 Teste para fenóis e taninos

Adcionaram-se 3 gotas de solução aquosa de FeCl_3 1% a 3 ml da solução etanólica do EE. A tonalidade entre azul e vermelho indica a presença de fenóis, quando o teste branco não apresentar essas colorações. Já um precipitado verde-acastanhado sinaliza a detecção de taninos catéquicos e azul-preto de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis).

3.4.3 Teste para alcaloides

Adicionaram-se 15 gotas de NaOH (1 M), 2 ml de água destilada e 2 ml de clorofórmio a 3 ml da solução etanólica do EE. Posteriormente, retirou-se a água destilada da solução e foram colocadas 15 gotas de HCl concentrado. Retirou-se o clorofórmio e 3 gotas de reagente de Mayer foram adicionadas. A formação de um precipitado floculado indicou alcaloides.

3.4.4 Teste para saponinas

Adicionaram-se 2 ml de clorofórmio e 3 ml de água destilada a 3 ml da solução etanólica do EE e agitou-se vigorosamente por 2 min a suspensão em um tubo fechado. O surgimento de camada de espuma por mais de 30 min. foi sinal positivo para saponinas.

3.5 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Na cromatografia em camada delgada (CCD), 0,01 g da amostra seguida por diluição em 1 ml de metanol. Como fase estacionária, foram utilizadas placas cromatográficas preparadas por aplicação manual da suspensão de gel de sílica 60 G (Macherey-Nagel) e na fase móvel foram utilizados eluentes nas seguintes proporções: Hexano/acetato de etila (8:2) e clorofórmio/metanol (9:1). Foram aplicados 20 μ L da amostra do EE em cada placa e após a eluição em cuba cromatográfica, as placas foram reveladas com solução de sulfato cérico seguida de aquecimento em chapa a 100°C ¹¹².

3.6 Teor dos Compostos Fenólicos (TCF)

As amostras foram solubilizadas em água destilada na concentração de 1000 μ g/ml e foi retirada uma alíquota de 0,5 ml e transferida para tubos de ensaio, adicionados 8 mL de água destilada e 0,5 ml do reagente Folin Ciocalteau 20% (v/v). Em seguida, a solução foi homogeneizada em agitador vortex e após 3 min., acrescido

1 ml de solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 20% (m:v). Após 1 h em banho-maria a 37°C foram realizadas as leituras das densidades óticas em espectrofotômetro a 720 nm^{113 114}.

Utilizou-se como padrão de referência o ácido gálico (Sigma®) para construção da curva de calibração ($y = 4,609 x - 0,0065$; $R^2 = 0,9997$). Em seguida, realizou-se o cálculo do teor de fenólicos totais, expresso em mg EAG (equivalente ao ácido gálico)/g de amostra. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.7 Ensaio Antioxidante (*in vitro*)

3.7.1 DPPH·(2,2-difenil-1-picril-hidrazina)

Para realização das análises, adicionou-se 1,5 ml da solução etanólica do radical DPPH· (6×10^{-5} M) e uma alíquota de 0,5 ml do EE contendo concentrações seriadas. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis (517 nm), após 30 min. do início da reação. As análises foram feitas em triplicata acompanhadas de um controle negativo (sem antioxidante) e dois controles positivos (ácido ascórbico e Trolox®, natural e sintético, respectivamente). A diminuição na leitura da densidade ótica das amostras foi correlacionada com o controle, estabelecendo-se a porcentagem de descoloração da amostra (inibição do radical DPPH·) conforme formula a seguir^{115 116 117}.

$$\% \text{ de inibição do radical DPPH·} = \left[\frac{\text{ABScontrole} - \text{ABSamostra}}{\text{ABScontrole}} \right] \times 100$$

ABS - Absorbância

Adicionalmente, ao percentual de inibição, foi também calculada a concentração eficaz para inibir 50% do radical DPPH· (CE₅₀).

3.7.2 ABTS⁺ (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

O radical ABTS⁺⁺ foi gerado a partir da reação de 7 mM de ABTS com 2,45 mM de persulfato de potássio, sendo reservado à temperatura ambiente e na ausência de luz, por 12-16 h. Transcorrido esse período, a solução foi diluída em etanol PA até obter-se uma solução com absorbância de 0,70 ($\pm 0,05$)¹¹⁸. Adicionaram-se 40 μL das

amostras diluídas (em etanol) a 1960 µL da solução contendo o radical, determinando-se a absorbância em espectrofotômetro a 734 nm, após 30 min. do início da reação^{119 120}.

A diminuição na leitura da densidade ótica das amostras foi relacionada com o controle, estabelecendo-se a porcentagem de descoloração da amostra (inibição do radical ABTS^{•+}) conforme fórmula a seguir. Todas as leituras foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em CAET (Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox[®] - mM de trolox por grama de amostra).

$$\% \text{ de inibição do radical ABTS}^{•+} = \left[\frac{(ABS_{\text{controle}} - ABS_{\text{amostra}})}{ABS_{\text{controle}}} \right] \times 100$$

ABS - Absorbância

Adicionalmente ao porcentual de inibição, foi também calculada a concentração eficaz para inibir 50% do radical ABTS^{•+} (CE₅₀).

3.8 Caracterização química

3.8.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD)

A análise da CLAE-DAD foi realizada em temperatura ambiente^{121 122}, com adaptações e usando um cromatógrafo analítico Shimadzu modelo LC-20A, controlador CBM-20A, detector UV-visível com arranjo de diodos (DAD), modelo SPD-M20A, desgaseificador DGU-20A3, software de soluções CL (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) e coluna Macherey-Nagel Nucleodur[®] 100-5 C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm).

Uma amostra de 1,5 mg do EE foi filtrada em cartucho de extração em fase sólida Chromabond[®] C18-EC da Macherey-Nagel e disco de filtro de 0,45 µm. Esse é um processo em que a amostra é submetida, chamado de “clean-up”, no qual o cartucho é previamente ativado com metanol e água 95:5.

A eluição foi realizada com método gradiente de 5-100% em 60 min, e a fase móvel da bomba +(A) foi a água + acetonitrila (B), iniciando com 5% de acetonitrila e 95% de água que foram bombeadas a uma vazão de 1,0 ml/min, injeção de 30 µL das amostras na concentração de 1,0 mg/ml e temperatura do forno da coluna de 40 °C. Os cromatogramas foram monitorados a 254 nm.

3.8.2 Espectrometria de Massas de Alta Resolução com Ionização por Eletrospray (HRMS ESI).

O EE das cascas de *P. bracteosa*, na concentração de 200 µg/ml, foi analisado em um espectrômetro de massas de alta resolução Q Exactive Orbitrap MS, utilizando ionização por electrospray no modo negativo (ESI (-)). As análises foram realizadas por infusão direta, sem etapa de separação cromatográfica prévia, empregando o modo de aquisição automática de massas (auto MS). Os íons mais abundantes identificados no espectro de massas foram fragmentados utilizando energias de colisão de 20, 25 e 30 eV. As condições gerais da análise, bem como os parâmetros utilizados na aquisição dos espectros, foram os seguintes: tensão de pulverização de 3 kV; temperatura capilar de 275°C; Lente S 100; o gás auxiliar foi definido como 2 e o gás de bainha como 0 para todas as amostras. A resolução do equipamento foi fixada em 140.000 (FWHM em *m/z* 200).

Os experimentos de varredura total (MS) abrangeram uma faixa de *m/z* entre 100 e 1100, e a identificação estrutural foi baseada nos padrões de fragmentação MSⁿ e na intensidade dos íons. Para a anotação estrutural dos principais metabólitos, dados de espectrometria de massas em tandem (MSⁿ) foram comparados com bibliotecas espectrais de acesso público. A atribuição das fórmulas moleculares foi realizada com o auxílio do software XcaliburTM²⁴.

3.8.3 Diagrama de Van Krevelen

O diagrama de Van Krevelen é uma ferramenta quimioinformática construída a partir das razões atômicas hidrogênio/carbono (H/C) e oxigênio/carbono (O/C), calculadas com base nas fórmulas moleculares atribuídas aos compostos detectados por espectrometria de massas de alta resolução (MS1). Essas fórmulas foram obtidas a partir dos valores de *m/z* fornecidos pelo equipamento Orbitrap MS e atribuídas automaticamente pelo software XCalibur, utilizando um erro máximo de 2 ppm. Ao plotar as razões H/C (eixo Y) e O/C (eixo X) em um gráfico bidimensional, é possível

visualizar padrões de distribuição característicos que permitem a identificação de classes de metabólitos secundários.

Por exemplo, flavonoides geralmente apresentam H/C entre 0,6–1,7 e O/C entre 0,13–0,75 enquanto os ácidos fenólicos situam-se em faixas de H/C de 0,8–1,5 e O/C de 0,2–0,5. Os taninos apresentam baixa razão H/C (0,5–0,9) devido à sua alta densidade de anéis aromáticos e duplas ligações, o que reduz a proporção de hidrogênios na molécula. Ao mesmo tempo, sua razão O/C é moderada a alta (0,3–0,5), refletindo a presença de múltiplos grupos hidroxila e, em alguns casos, grupos éster ou ácido carboxílico, que conferem um alto grau de oxigenação. Já as saponinas possuem valores elevados de H/C (1,4–1,7) porque são compostos predominantemente alifáticos, com esqueletos triterpênicos ou esteroidais saturados, ricos em hidrogênios. Sua razão O/C é moderada a alta (0,07–0,52) em função da presença de várias unidades de açúcar (glicosídeos) ligadas ao núcleo aglicônico, o que aumenta significativamente a quantidade de oxigênios na estrutura.

Dessa forma, o diagrama de Van Krevelen permite a anotação rápida e visual de compostos com base apenas na fórmula molecular, sendo especialmente útil em análises metabolômicas não direcionadas para inferir classes químicas em nível 3, mesmo na ausência de dados de fragmentação.

3.9 Bioensaio *A. cepa*

Os testes de avaliação da citogenotoxicidade e efeito genoprotetor nas células meristemáticas de *A. cepa* foram realizados conforme metodologias descritas em estudos anteriores^{18 27}. Sementes de *A. cepa* foram germinadas com água destilada em placas de Petri em incubadora (BOD SL - 224®) com fotoperíodo de 12 h e temperatura de 25°C por quatro dias. Após a germinação, as sementes com raízes entre 1 a 2 cm foram submetidas a diferentes tratamentos.

Na avaliação citogenotóxica, 30 sementes com radículas por placa de Petri foram transferidas para o controle negativo (CN) (Dimetilsulfóxido - DMSO 1% em água destilada) e controle positivo MMS (Metilmetanosulfonato - MMS, 10 µg/ml dissolvido em DMSO 1%) por 48 h. As raízes também foram colocadas nas concentrações de 0,25; 0,5; 1 e 2 mg/ml do EE das cascas da *P. bracteosa* dissolvidas em DMSO 1% por 48 h. Um estudo toxicológico preliminar (tamanho médio da raiz)

foi realizado para selecionar as concentrações a serem utilizadas nas análises citogenotóxicas. Trinta raízes de *A. cepa* foram utilizadas para cada controle e EE (0,25; 0,5; 1 e 2 mg/ml). Os resultados demonstraram que as quatro concentrações não apresentaram efeito tóxico em comparação ao controle negativo (DMSO 1%) (dados não apresentados). Com base nesses resultados, as quatro concentrações foram selecionadas para a análise citogenotóxica por não apresentarem efeitos fitotóxicos que pudessem inibir a progressão do ciclo celular. Além disso, as menores concentrações foram pré-selecionadas com base em estudo anterior do próprio grupo de pesquisa com as frações éter, acetato de etila e hexânica do extrato etanólico das folhas de *P. bracteosa*¹⁸.

No ensaio genoprotetor, o MMS foi utilizado em três protocolos: pré-tratamento para avaliar ação desmutagênica; simultâneo para avaliar tanto atividade desmutagênica quanto bio-antimutagênica; e pós-tratamento para o bio-antimutagênico¹⁸. O MMS (Metilmetanosulfonato) foi o agente responsável pela formação de danos ao DNA e indução de alterações cromossômicas como quebras, micronúcleos, brotos nucleares, pontes cromossômicas e/ou perdas cromossômicas²⁴. No pré-tratamento, as sementes foram transferidas para as concentrações (0,25; 0,5; 1 e 2 mg/ml) do EE por 24 h e em seguida transferidas para o MMS por mais 24 h. No simultâneo, as sementes permaneceram em DMSO 1% por 24 h e, em seguida, foram transferidas para soluções contendo simultaneamente o EE (0,25; 0,5; 1 e 2 mg/ml) e o MMS. No pós-tratamento, as sementes foram colocadas em MMS por 24 h e, posteriormente, transferidas para as concentrações do EE por mais 24 h.

Após submeter-se a todos os tratamentos, as raízes foram fixadas em Carnoy (3 MeOH:1 CH₃COOH) por 6-8 h e estocadas a -20°C até o momento de preparo das lâminas. Para a confecção das lâminas, as raízes foram lavadas três vezes em água destilada por 5 min cada e hidrolisadas a 60°C por 8 min em HCl 1N. Depois da hidrólise, as raízes foram novamente lavadas em água destilada e transferidas para frascos de vidro âmbar, contendo o Reativo de Schiff, permanecendo em local escuro, por 2 h. Após esse período, as raízes foram lavadas até a total retirada do reativo, transferidas para lâminas e esmagadas em uma gota de carmim acético a 2% e montadas com Entellan®¹²³.

A citogenotoxicidade e genoproteção foram avaliadas pela contagem de 5.000 células meristemáticas por tratamento (500 células/lâmina, com um total de 10

lâminas analisadas por tratamento) em microscópio de luz com aumento de 400x. O experimento foi realizado em triplicata.

Para cada tratamento e controle, foram avaliados o índice mitótico (IM, citotoxicidade) e a média total de alterações cromossômicas (genotoxicidade), que incluem alterações celulares resultantes de efeitos aneugênicos (como C-metáfase, aderências cromossômicas, perdas cromossômicas, anáfases multipolares e metáfases poliploides) e clastogênicos (fragmentos de cromossomos na metáfase ou anáfase e pontes cromossômicas). Os micronúcleos podem surgir de efeitos aneugênicos e clastogênicos ¹²⁴.

Para determinar o índice mitótico, o número de células nas diferentes fases da mitose (prófase, metáfase, anáfase e telófase) foi dividido pelo número total de células e multiplicado por 100. Para determinar o total de alterações cromossômicas, como proposto por ¹²⁴, dividiu-se o número total de alterações pelo número total de células.

A fórmula de ¹²⁵ foi utilizada para avaliar o efeito genoprotetor, na qual a porcentagem de redução de danos (%RD) para cada tratamento com o EE foi calculada da seguinte forma:

$$\%RD = \left[\frac{a-b}{a-c} \right] \times 100$$

Onde: “a” representa a média das alterações cromossômicas do controle positivo; “b” a média das alterações cromossômicas em cada tratamento e “c” a média das alterações cromossômicas no controle negativo.

3.10 Análise estatística

Atividade antioxidante, o teor de fenóis totais e o bioensaio *A. cepa* foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com o teste “a posteriori” de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$), no programa BioEstat 5.3, para realizar a comparação entre as médias dos controles e tratamentos.

Capítulo 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Prospecção preliminar do EE da *P. bracteosa*.

Na análise fitoquímica preliminar do EE das cascas de *P. bracteosa* foram detectados fenóis, saponinas, alcaloides, flavonoides e taninos pirogálicos de acordo com a coloração apresentada e/ou formação de precipitado em cada uma das reações realizadas. Na CCD do EE com hexano - acetato de etila (8:2) e clorofórmio - metanol (9:1), utilizados como sistemas de eluição e sulfato cérico como revelador, foram observadas manchas nas colorações azul e roxo sugerindo a presença de compostos pertencentes a classe dos terpenos ¹¹².

Resultados similares detectaram a presença de taninos, alcaloides e flavonoides no extrato aquoso das folhas e cascas e no extrato etanólico das raízes da *P. Bracteosa* ^{12 17 19}. ¹⁸ Demonstraram a presença de compostos da classe dos fenóis, saponinas, flavonoides, terpenos, depsídeos e depsidonas no extrato etanólico e na fração hexânica, éter e acetato de etila das folhas de *P. bracteosa*, contribuindo para a caracterização química da espécie. Em testes com outras espécimes do gênero foi identificado a presença de ácidos fenólicos, taninos, flavonoides e polifenóis em folhas e cascas de *P. pluviosa*, frutos da *P. microphylla*, assim como em extratos obtidos com todas as partes da *P. Pyramidalis* ^{51 52 55 56 76}. Diferenças entre os tipos de metabólitos presentes podem ocorrer de acordo com a espécie, forma de extração, fatores geográficos, idade e parte coletada e corrobora com a diversidade de constituintes encontrados ¹²⁶.

A variedade de compostos identificados deve ser considerada na elucidação das possíveis atividades medicinais e a detecção de compostos fenólicos e flavonoides no EE pode indicar atividade antirradicalar, como verificado na fração éter do extrato etanólico das folhas da *P. bracteosa* ¹⁸ e antiinflamatória, também

observada na fração acetato de etila da casca da *P. Pyramidalis*^{127 128}. Além disso, a possível atividade antimicrobiana dos flavonoides enriquece o poder medicinal das cascas¹²⁹.

Os taninos são constituintes que também podem conter capacidade antiinflamatória¹⁴ e antioxidante verificada através do estudo com o extrato metanólico das folhas de *P. pyramidalis*¹³⁰. Compostos da classe das saponinas possuem propriedades fungicidas, expectorante e antiviral¹³¹, tal como os alcaloides que podem servir como agentes anticonvulsivantes¹³². A detecção de terpenos no EE pode ser um indício de atividade antileishimanal devido, principalmente, a comprovada ação do ácido ursólico¹³³.

4.2 Teor dos Compostos Fenólicos (TCF) e Ensaios Antioxidantes (*in vitro*).

O TCF do EE foi determinado pelo método Folin-Ciocalteu e os dados de absorbância das amostras demonstraram valor de 225,53 mg EAG/g (Tabela 4.1). Os ensaios antioxidantes exibiram resultados na eliminação do radical DPPH de CE₅₀ de 27,53 µg/ml e no radical ABTS com valores expressos tanto em CE₅₀ (122,81 µg/ml) quanto em CAET (4370 mM Trolox/g) (Tabela 4.1). Este último resultado indica que, quanto maior o valor de TEAC, maior a capacidade antioxidante da amostra.

Tabela 4.1. Atividade antioxidante do extrato etanólico (EE) das cascas do caule da *P. bracteosa*.

	TCF (mg EAG/g)	DPPH CE ₅₀ (µg/ml)	ABTS CE ₅₀ (µg/ml)	ABTS - CAET mM Trolox/g
EE	225,53 ± 1,03	27,53 ± 0,26 ^b	122,81 ± 2,03 ^{ab}	4.370 ± 238,96
Ácido Ascórbico	-	22,72 ± 0,13	98,33 ± 0,58	-
Trolox	-	14,92 ± 0,41	127,21 ± 0,70	-

TCF: Teor de compostos fenólicos totais expressos em mg de equivalente de ácido gálico (EAG) por g de extrato de *P. bracteosa*. CE₅₀: concentração eficaz para inibir 50% do radical DPPH[•] ou do ABTS^{•+}. CAET: Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (mM de Trolox por g de amostra) no ensaio ABTS. Os valores foram expressos como média ± DP (desvio padrão). Letra “a” indica diferença estatística como o ácido ascórbico ($p < 0,01$) e “b” diferença estatística com o trolox ($p < 0,05$).

Avaliação da atividade antioxidante determinou a capacidade dos compostos presentes no EE de inibir radicais livres, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e o emprego de mais de um método foi necessário devido à pluralidade de metabólitos secundários e seus diferentes mecanismos de ação ¹³⁴⁻²³. O teor de compostos fenólicos (TCF) do EE está relacionado ao seu potencial na eliminação de espécies reativas, facilitado por estruturas de anel benzênico ligado a substituintes hidroxilas que favorecem a estabilização da carga negativa ao doar átomos de hidrogênio ou eletros para a molécula ¹³⁵.

O teor de fenólicos do EE das cascas (225,53 mg GAE/g) foi maior que a fração acetato de etila (114,74 mg GAE/g) e Hexânica (9,12 mg GAE/g) e menor que a fração éter (441,23 mg GAE/g) do EE das folhas da mesma espécie ¹⁸. O teor desses compostos esteve ligado a um maior desempenho antirradicalar em estudos das frações do extrato etanólico da *P. bracteosa* ¹⁸, da fração acetato de etila das partes aéreas da *Helianthemum cinereum* ¹³⁶, da casca interna da *P. pyramidalis* e na análise antioxidante do mel de *Codonopsis pilosula* ¹³⁷.

O resultado do DPPH das cascas do EE ($CE_{50} = 27,53 \mu\text{g/ml}$) não teve diferença significativa com o padrão ácido ascórbico ($22,72 \mu\text{g/ml}$) e mostrou resultados similares ao da fração éter nas folhas ($CE_{50} = 25,06 \mu\text{g/ml}$) da *P. bracteosa* ¹⁸ e com a fração acetato de etila das cascas da *P. pyramidalis* ($CE_{50} = 22,94 \mu\text{g/ml}$), demonstrando atividade antioxidante satisfatória ¹³⁸. Segundo ¹³⁹, valores de CE_{50} abaixo de 50 $\mu\text{g/ml}$ são de compostos com alta atividade antioxidante e o valor obtido no ensaio DPPH demonstrou promissor potencial do EE.

O valor do $CE_{50} = 122,81 \mu\text{g/ml}$ do EE no ABTS, apesar de ser considerado indicativo de pouca atividade (100 $\mu\text{g/ml}$ - 200 $\mu\text{g/ml}$), exibiu valor de CE_{50} menor do que o Trolox, (127,21 $\mu\text{g/ml}$), demonstrando um dado positivo em comparação com o antioxidante padrão ¹³⁹. O ensaio ABTS com as frações do extrato etanólico das folhas exibiu valores de TEAC (capacidade antioxidante equivalente ao Trolox) de 336,10 mM de Trolox/g na fração hexânica; 4280,6 mM de Trolox/g na fração acetato de etila e 7061,57 mM de Trolox/g na fração éter ¹⁸ e no presente estudo, os valores de TEAC do EE das cascas foram de 4370 mM Trolox/g, que ficaram abaixo da fração éter e acima da fração hexânica e acetato etila.

Metabólitos identificados no EE, principalmente da classe dos ácidos fenólicos e flavonoides, podem ter contribuído para a neutralização das espécies reativas do

DPPH e ABTS, ao apresentar características estruturais importantes para essa atividade, como a presença de hidroxilas ligadas ao anel aromático, facilitando a neutralização e ação antioxidantante frente a esses radicais ¹¹⁷. Dentre esses compostos, o ácido gálico contém evidenciada ação antirradicalar e utilização contra doenças ocasionadas pelo desequilíbrio dessas espécies ^{140 141}, juntamente com a amentoflavona, que demonstrou notável inibição *in vitro* de radicais DPPH, ABTS, superóxido e hidroxila ¹⁴². Além disso, a presença da quercertina e kaempferol, que são comprovados antioxidantes ^{143 144}, também podem explicar a ação do EE.

4.3 Caracterização química dos compostos

4.3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD)

Análise por CLAE-DAD realizada em 254 nm permitiu a detecção de picos de média e alta intensidade com tempos de retenção (min) de 2,75; 8,87; 10,31; 13,26; 13,71; 15,48; 18,38; 20,12 e 22,16 (Figuras 4.1 e 4.2), que sugerem a presença de ácidos fenólicos, esteroides e flavonoides no EE por comparação com dados da literatura dos comprimentos de onda característicos (Tabela 4.2).

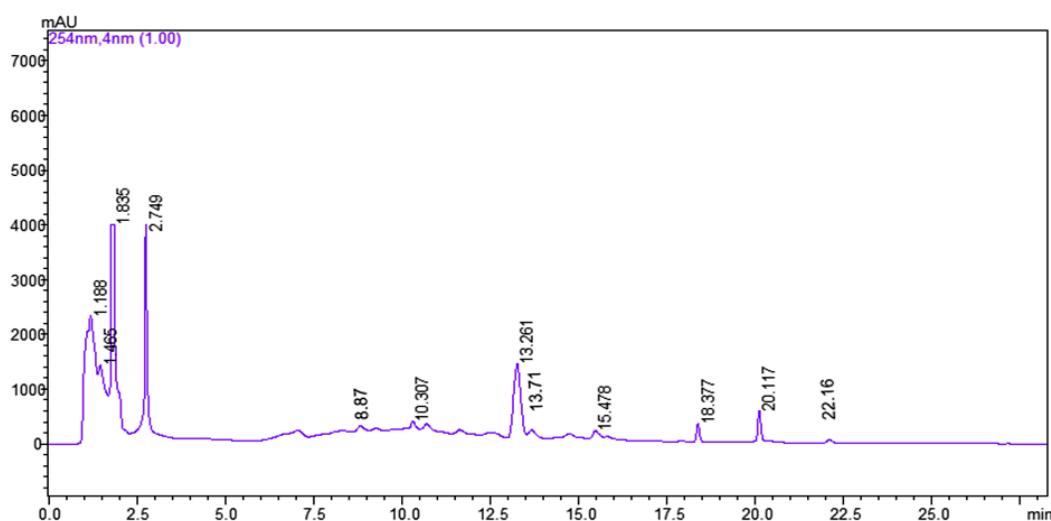


Figura 4.1: Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjos de diodos (CLAE-DAD) obtido do extrato etanólico das cascas do caule de *P. bracteosa*.

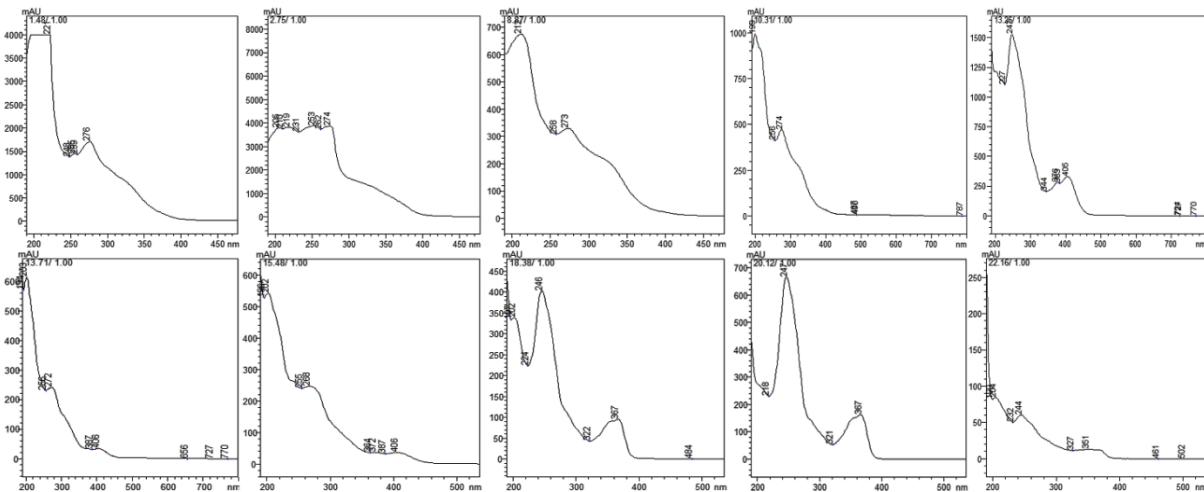


Figura 4.2: Espectros da Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjos de diodos (CLAE-DAD) do extrato etanólico das cascas do caule de *P. bracteosa*.

Tabela 4.2: Classes de metabólitos identificados no extrato etanólico das cascas do caule da *P. bracteosa* por HPLC-DAD.

TR (min)	λ max	Classe Composto	Referencia
2,75	205/219	Esteroides	145
	253/274	Flavonoides	146
8,87	212	Esteroides	145
	258/273	Flavonoides	147
10,31	199/256	Ácidos fenólicos	148
	274	Flavonoides	149
13,26	227/247	Ácidos fenólicos	150
	344/405	Flavonoides	151
13,71	203/256	Ácidos fenólicos	148
	272/387	Flavonoides	147
15,48	202/255	Ácidos fenólicos	145
	268/364	Flavonoides	152
18,38	20/2/224	Ácidos fenólicos	153

	246	Flavonoides	154
	322/367	Flavonoides	155
	218/247	Ácidos fenólicos	150
20,12	321/367	Flavonoides	149
	204/244	Ácidos fenólicos	150
22,16	327/351	Flavonoides	154

O espectro UV de moléculas corresponde a uma ampla faixa de comprimento de onda com bandas que podem auxiliar na identificação de substâncias que absorvem nessa região, por apresentarem diferentes intervalos obtidos entre os níveis energéticos de transição ¹⁰⁰. A presença de duas bandas típicas com comprimento de onda máximo entre 240-285 nm e 300-550 nm confirmou a presença de compostos da classe dos flavonoides, verificados através da análise dos espectros UV dos tempos de retenção dos compostos obtidos por CLAE-DAD ^{154 156}. Metabólitos da classe dos esteroides e ácidos fenólicos também foram sugeridos no EE por CLAE-DAD ao demonstrarem padrão espectral característico entre 206-220 nm e 220-240 nm, respectivamente, após a incidência da luz UV ¹⁴⁵.

4.3.2 Espectrometria de massas de alta resolução com ionização por eletrospray (HRMS ESI)

O perfil metabólico do EE das cascas de *P. bracteosa* foi estabelecido a partir de dados espectrais adquiridos por espectrometria de massas de alta resolução por ionização por electrospray (Orbitrap HRMS ESI) em uma intensidade absoluta de 3E8. A análise abrangente dos dados no modo negativo ([M-H]⁻) permitiu sugerir, com base nos padrões de fragmentação espectral a presença de compostos da classe dos ácidos fenólicos como o ácido gálico, ácido dicacafeoilquínico e ácido elágico. Da classe dos flavonoides, foi possível identificar amentoflavona, isovitexina, isoquercitrina, e os glicosídeos de quercetina e kaempferol. Taninos como a

castalagina e corilagina e o terpenoide ácido ursólico também foram anotados (Figura 4.3, Tabela 4.3).

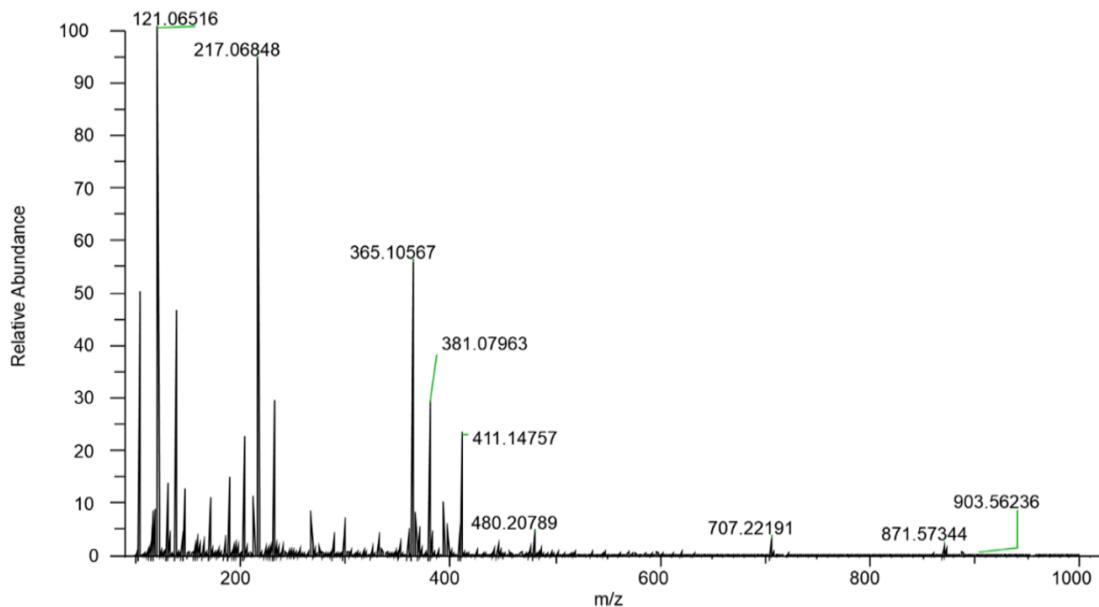


Figura 4.3: Espectro da *HRMS ESI* dos compostos majoritários do cromatograma obtido do extrato etanólico das cascas da *P. bracteosa* – LTQ ESI (-).

Tabela 4.3: Análise do extrato etanólico das cascas do caule da *P. bracteosa* por ESI (-)-*HRMS ESI*.

Composto	Massa	[M-H] ⁻	Fórmula Molecular	Íons de produto (m/z)
Kaempferol	286.0477	285	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285/257/229/153
Quercetina	302.0426	301	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301/273/257/151
Isoquerçitrina	464.0954	463	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463/301/179/151
Isovitetina	432.1056	431	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431/311/341/269
Ácido ursólico	456.3603	455	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	455/439/411/393/203/189
Ácido gálico	170.0215	169	C ₇ H ₆ O ₅	169/125/93/85
Ácido dicafeoilquínico	516.1267	515	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	191/173/127/85
Ácido elágico	302.0062	301	C ₁₄ H ₆ O ₈	301/283/257/229
Amentoflavona	538.0899	537	C ₃₀ H ₁₈ O ₁₀	537/375/257
Castalagina	934.0712	933	C ₄₁ H ₂₆ O ₂₆	933/301/275/249

Corilagina	634.0806	633	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₈	633/301/275/249
-------------------	----------	-----	---	-----------------

A atribuição de classes de metabólitos secundários também foi realizada com o auxílio do diagrama de Van Krevelen, que permitiu caracterizar classes de metabólitos secundários com base nas razões O/C e H/C das fórmulas moleculares extraídas dos dados de espectrometria de massas de alta resolução ¹⁵⁷.

Polifenóis, como flavonoides e ácidos fenólicos, apresentam baixa razão H/C devido à sua estrutura aromática, enquanto taninos, com estruturas mais complexas, exibem variações nas razões O/C e H/C conforme seu grau de polimerização e número de grupos fenólicos. Por outro lado, moléculas de estrutura alifática como terpenoides e esteroides são encontradas em uma região de altos valores de razão H/C e baixa razão O/C. Entretanto, seus derivados glicosilados como saponinas podem ser encontrados em região de alto valor de O/C e H/C devido às unidades de açúcar presentes na molécula.

Na Figura 4.4, foi possível destacar algumas classes de metabólitos secundários, como terpenos, taninos, ácidos fenólicos e flavonoides presentes no extrato etanólico das cascas de *P. bracteosa*. Os resultados obtidos a partir da análise do diagrama corroboram com a triagem fitoquímica realizada por meio dos testes colorimétricos e cromatográficos, reforçando a aplicação destas ferramentas para uma caracterização mais abrangente dos extratos fitoquímicos.

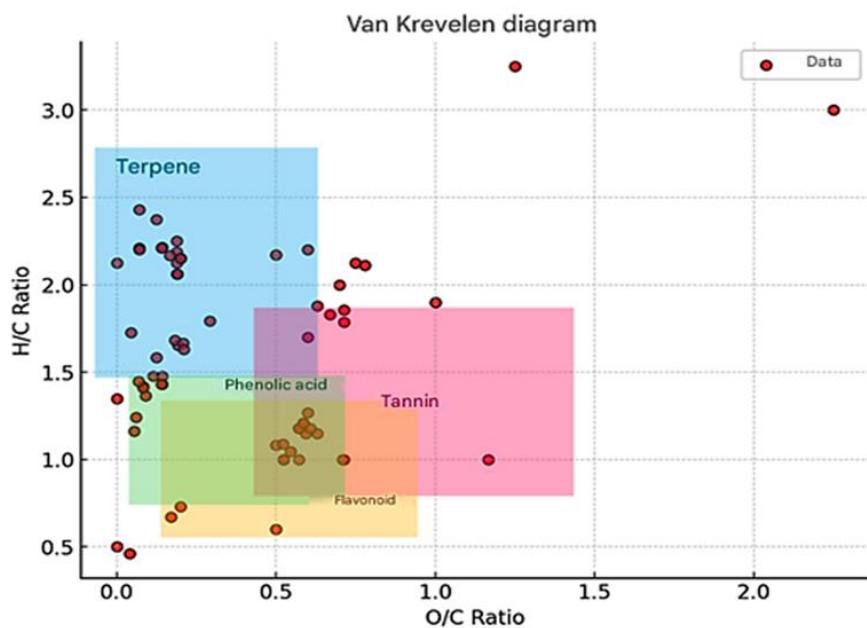


Figura 4.4: Gráfico do diagrama de Van Krevelen que destaca as possíveis classes de metabólitos secundários presentes no extrato etanólico das cascas de *P. bracteosa*.

Os compostos identificados por HRMS ESI e diagrama de Van Kravelen (Figura 4.5) pertencem às classes de ácidos fenólicos, flavonoides, taninos e terpenoides, o que evidencia promissora atuação do EE em diversas atividades biológicas. Dentre esses, a amentoflavona, que também foi identificada no extrato etanólico dos frutos da *P. ferrea*¹⁵⁸, exibe possível ação anti-inflamatória, neuroprotetora e demonstrou citotoxicidade em células monocíticas de leucemia humana, quando isolada do extrato metanólico da raiz da *Prismatomeris glabra*^{159 160}. A queracetina, kaempferol e isovitexina são compostos que apresentaram resultados satisfatórios na ação protetiva contra a inflamação gástrica induzida por *Helicobacter pylori*, inflamações na pele e em possível atuação quimioterápica contra o melanoma, sugerindo possível atuação do EE nessas atividades, ao também relatar a presença desses compostos¹⁶¹
 162 163 164 165 166.

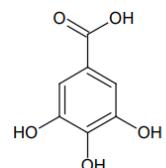
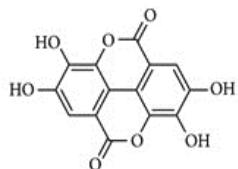
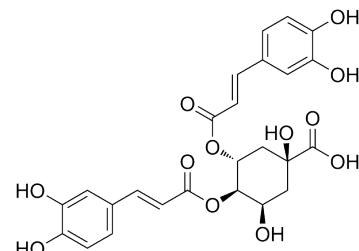
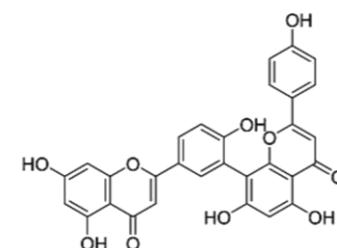
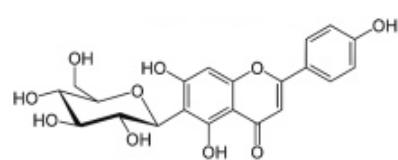
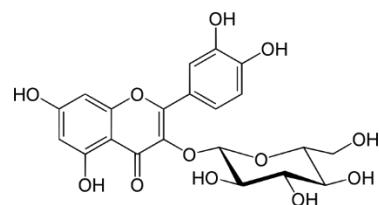
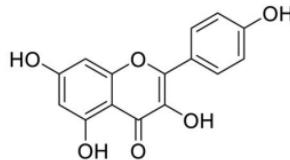
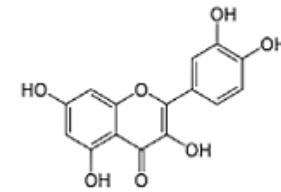
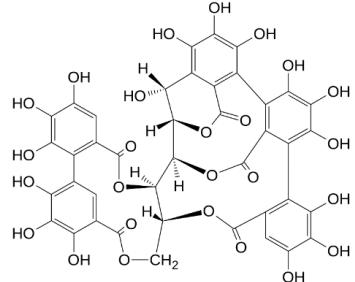
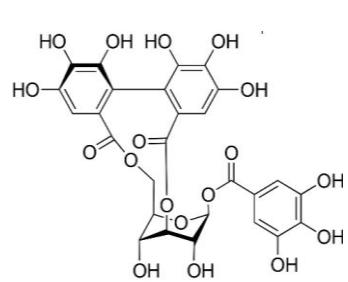
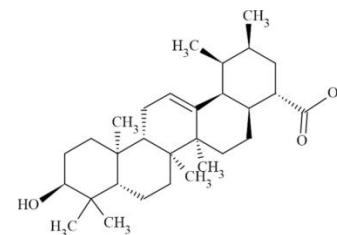
Ácido gálico ¹⁶⁷Ácido elágico ¹⁶⁸Ácido dicafeoilquínico ¹⁶⁹Amentoflavanona ¹⁷⁰Isovitexina ¹⁷¹Isoquercitrina ¹⁷²Kaempferol ¹⁷³Quercetina ¹⁷⁴Castalagina ¹⁷⁵Corilagina ¹⁷⁶Ácido ursólico ²⁴

Figura 4.5: Estrutura química dos compostos identificados por HRMS ESI.

A caracterização de ácidos fenólicos, flavonoides, triterpenos e taninos por espectrometria de massas em tandem (MS/MS) baseia-se em padrões de fragmentação e na intensidade dos íons produtos formados. Flavonoides como kaempferol e quercetina são distinguidos por clivagens retro-Diels–Alder e perdas sucessivas de CO/CO₂, enquanto seus derivados glicosilados (por exemplo, isoquericitrina) apresentam uma perda neutra adicional de 162 Da, característica de uma unidade de hexose. Por outro lado, flavonas C-glicosiladas, como a isovitexina, exibem clivagens cruzadas da glicose com perdas neutras de 120 e 90 Da, permitindo diferenciá-las dos O-glicosídeos. O ácido ursólico, um triterpeno pentacíclico, apresenta fragmentos típicos de desidratação e descarboxilação sequenciais (*m/z* 439, 411, 393), associados à sua estrutura alicíclica rígida. Ácidos fenólicos simples, como ácido gálico e ácido dicafeoilquínico, geram perdas neutras simples (CO₂, H₂O), enquanto o ácido elágico produz íons característicos em *m/z* 301 e 283. Compostos mais complexos, como biflavonoides (amentoflavona) e elagitaninos (castalagina e corilagina), são reconhecidos por íons precursores de alto peso molecular e pela produção recorrente de *m/z* 301, refletindo a liberação de unidades elágicas ou HHDP (hexahidroxidifenil)^{177 178}.

Compostos do EE como a castalagina e isoquericitrina também foram detectados nas folhas da *P. pluviosa*, com propriedades anti-inflamatórias^{76 179 180}, tal como a corilagina, alvo potencial preventivo de hepatotoxicidade induzida por paracetamol, que apresentou ação cicatrizante e foi detectada no extrato hidroalcoólico da casca do caule da mesma espécie^{74 181}. O ácido elágico do EE também foi identificado na fração metanólica do extrato aquoso de frutos da *P. mycrofila*, exibindo atividade antimicrobiana *in vitro* contra cepas de *H. pylori*^{51 182} e antimalária *in vitro* ao ser extraída das folhas da *P. pluviosa*⁷⁶.

Metabólitos como o ácido gálico e elágico no EE foram determinantes na atividade antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana do extrato hidrometanólico da vagem da *P. cacalaco*, sendo também constituintes predominantes da fração acetato de etila das cascas da *P. pyramidalis*^{138 183}. O ácido quínico foi identificado na fração metanólica do extrato aquoso de frutos da *P. mycrofila* e contribuiu para a ação anti-inflamatória *in vivo* da fração acetato de etila do extrato etanólico de frutos da *Myrciaria glazioviana* e potencialmente o EE pode apresentar essas características devido à presença de seu derivado^{51 184}.

Maiores níveis de ácido ursólico estiveram vinculados a maior atividade antioxidante do extrato da casca de cultivares de maçã no estudo de ¹⁸⁵, assim como ação significativa contra radicais DPPH e atividade contra cepas bacterianas ao ser obtido do extrato etanólico das partes aéreas de *Sambucus australis* ¹⁸⁶. Além disso, de forma sinérgica com outros constituintes do extrato etanólico bruto e frações das folhas de *Elsholtzia ciliata*, demonstrou potencial anticâncer ao apresentar citotoxicidade contra linhagens de células epiteliais de câncer de pulmão¹⁸⁷.

O ácido gálico, quínico e elágico, amentoflavona, corilagina e castalagina já foram identificados no extrato etanólico das folhas da *P. bracteosa* ¹⁸⁸. No entanto, os demais compostos como kaempferol, quercetina, isoquercitrina, isovitexina e ácido ursólico estão sendo caracterizados pela primeira vez na espécie.

4.4 Bioensaio *A. cepa*

Para verificar ação do EE nas fibras do fuso e/ou no DNA, o bioensaio *A. cepa* foi utilizado no presente estudo por ser amplamente empregado em testes de citogenotoxicidade e quimioproteção de extratos de plantas medicinais ^{26 189 28}.

O resultado demonstrou citotoxicidade nas células meristemáticas de *A. cepa* apenas nas duas maiores concentrações (1 e 2 mg/ml), verificada pela redução significativa do índice mitótico (IM) e das prófases em relação ao controle negativo (CN). Por outro lado, o efeito citoprotetor não foi observado nos tratamentos pré, simultâneo e pós em nenhuma concentração analisada, pois não houve aumento significativo do IM em relação ao MMS (Tabela 4.4).

Tabela 4.4: Efeito citotóxico e citoprotetor do extrato etanólico das cascas do caule de *P. bracteosa* sobre células meristemas de *A. cepa*.

Tratamento (mg/ml)	Índice mitótico (%) (Média ± DP)	Fases da mitose (%) (Média ± DP)			
		Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase
DMSO 1%	21,90 ± 3,15	18,98 ± 3,96	1,06 ± 0,53	0,45 ± 0,44	1,41 ± 0,94
MMS	16,12 ± 5,38*	13,71 ± 4,51*	1,22 ± 0,59	0,41 ± 0,38	0,79 ± 0,64
Citotoxicidade					
0,25	20,96 ± 3,64	18,24 ± 3,92	0,89 ± 0,33	0,43 ± 0,25	1,23 ± 1,12
0,5	17,36 ± 4,22	14,35 ± 4,41	1,29 ± 0,80	0,35 ± 0,22	1,37 ± 0,70
1	13,81 ± 5,78**	12,04 ± 5,74*	0,73 ± 0,94	0,12 ± 0,23	0,92 ± 0,96
2	13,64 ± 2,66**	11,42 ± 2,10**	0,82 ± 0,61	0,46 ± 0,52	0,94 ± 0,50
Citoprotetor					
<i>Pré-tratamento</i>					
0,25	14,40 ± 4,88	12,06 ± 4,19	1,04 ± 0,64	0,60 ± 0,33	0,69 ± 0,37
0,5	13,26 ± 3,68	11,14 ± 3,73	0,96 ± 0,62	0,52 ± 0,50	0,64 ± 0,44
1	20,47 ± 2,97	17,78 ± 3,03	1,11 ± 0,49	0,77 ± 0,57	0,81 ± 0,77
2	16,38 ± 3,94	13,77 ± 3,58	1,16 ± 0,65	0,62 ± 0,56	0,82 ± 0,45
<i>Tratamento simultâneo</i>					
0,25	15,58 ± 2,88	13,92 ± 2,76	0,78 ± 0,40	0,55 ± 0,45	0,33 ± 0,33
0,5	15,22 ± 3,22	12,77 ± 3,63	1,06 ± 0,46	0,40 ± 0,27	1,00 ± 0,77
1	18,12 ± 5,52	16,83 ± 4,75	0,68 ± 0,70	0,26 ± 0,42	0,35 ± 0,34
2	13,22 ± 6,60	12,68 ± 6,30	0,10 ± 0,28	0,02 ± 0,07	0,42 ± 0,59
<i>Pós-tratamento</i>					
0,25	16,83 ± 2,32	14,04 ± 2,65	1,02 ± 0,49	0,78 ± 0,35	0,99 ± 0,39
0,5	16,76 ± 3,09	14,22 ± 3,00	0,86 ± 0,42	0,70 ± 0,59	0,98 ± 0,68
1	17,38 ± 5,23	14,79 ± 4,68	0,68 ± 0,48	0,71 ± 0,38	1,19 ± 0,57
2	16,85 ± 4,37	15,99 ± 4,04	0,39 ± 0,60	0,17 ± 0,22	0,29 ± 0,39

Controle negativo: DMSO 1%. DP: Desvio padrão. *Comparado estatisticamente com o DMSO 1% para avaliar a citotoxicidade. #Comparado estatisticamente com o controle positivo (10 µg/ml de Metilmetanosulfonato - MMS) para avaliar o efeito citoprotetor. **/Significativo pelo teste de Kruskal-Wallis com teste Student-Newman-Keuls a posteriori (#/*p<0,05; **/*p<0,01). Os resultados referem-se à análise de 5.000 células por tratamento.

O efeito não citotóxico do EE (0,25 e 0,5 mg/ml) demonstrou que os compostos presentes não interferiram na síntese do DNA, fase G2 e/ou nas fases da divisão mitótica^{23 190}. Enquanto a citotoxicidade nas maiores concentrações (1 e 2 mg/ml) podem estar relacionadas com a redução significativa das prófases nas células de *A. cepa*, indicando que os compostos presentes interferiram na progressão do ciclo celular¹⁰⁶. Resultado citotóxico também foi obtido nas frações (hexânica, acetato de etila e éter) do extrato etanólico das folhas da mesma espécie, atribuído principalmente a presença de terpenos¹⁸, que também foram detectados e possivelmente podem ter causado o mesmo efeito no EE das cascas. No extrato aquoso das folhas e cascas de *P. bracteosa* essa classe não foi detectada e não houve citotoxicidade^{17 19}, o que reforça a possível ação desses compostos.

A ação citotóxica de triterpenoides pode estar associada a presença de uma estrutura com substituintes 1,2,3-tri-hidroxi do seu anel A e grupos tóxicos que danificam o material genético da célula através do aumento dos níveis de radicais livres, que prejudicam a progressão do ciclo celular^{24 191}. Atividade antiploriferativa desses compostos foi observada em diferentes testes *in vitro* e dentre esses, o ácido ursólico apresentou citotoxicidade contra células do câncer do pulmão e *A. cepa*^{192 193 194 195} e a sua identificação por *HRMS ESI* pode corroborar com a elucidação da atividade do EE.

O EE não foi genotóxico em nenhuma das concentrações testadas (Tabela 4.5), pois não houve diferença significativa na média total de alterações cromossômicas e alterações individuais (micronúcleo; broto nuclear; quebra cromossômica; aderência cromossômica (aderência); metáfase C; perda cromossômica; anáfase com ponte cromossômica) (Figura 4.6) em comparação com aquelas no controle negativo, evidenciando efeitos aneugênicos e/ou clastogênicos não significativos. Possivelmente, os compostos presentes, principalmente da classe dos fenólicos e flavonoides, não interfiram nos processos de condensação da cromatina, polimerização das fibras do fuso e/ou segregação mitótica e/ou quebras, e ao auxiliar na redução de radicais livres e espécies reativas de oxigênio, evitaram a formação de alterações cromossômicas provocadas pelo estresse oxidativo^{23 28 196}.

Tabela 4.5. Média das alterações cromossômicas em células meristemáticas de *A. cepa* após exposição ao extrato etanólico das cascas do caule da *P. bracteosa*.

Tratamento (mg/ml)	Alterações cromossômicas (Média ± DP)							Média total de AC (Média ± DP)	%RD
	MN	BN	QC	AC	CM	PC	PT		
DMSO 1%	3,09 ± 1,72	1,06 ± 1,08	0,49 ± 0,75	0,47 ± 0,73	0,13 ± 0,35	ND	0,24 ± 0,45	5,48 ± 3,24	-
MMS I	15,18 ± 3,80**	7,31 ± 3,46**	2,68 ± 3,41*	1,69 ± 1,92	0,60 ± 1,05	0,13 ± 0,35	0,12 ± 0,34	28,43 ± 5,57**	-
Genotóxico									
0,25	2,80 ± 1,83	3,18 ± 3,50	0,24 ± 0,44	0,38 ± 1,06	0,22 ± 0,41	0,11 ± 0,31	0,11 ± 0,32	7,04 ± 4,29	-
0,5	2,18 ± 1,30	3,78 ± 2,24	0,33 ± 0,64	0,48 ± 0,90	0,24 ± 0,45	0,12 ± 0,34	0,21 ± 0,60	7,46 ± 1,83	-
1	3,86 ± 2,48	3,87 ± 2,10	0,23 ± 0,43	0,46 ± 0,85	ND	ND	0,23 ± 0,43	8,90 ± 3,61	-
2	3,18 ± 1,79	3,73 ± 1,99	0,57 ± 0,97	0,45 ± 0,98	0,68 ± 0,80	0,11 ± 0,31	0,45 ± 0,69	9,28 ± 3,31	-
Genoprotetor									
Pré-tratamento									
0,25	5,58 ± 1,88##	7,27 ± 4,69	1,22 ± 1,36	1,05 ± 1,26	0,82 ± 1,04	0,12 ± 0,35	0,73 ± 1,02	17,00 ± 3,00#	49,79
0,5	4,32 ± 2,05##	9,06 ± 6,83	0,97 ± 1,40	0,71 ± 0,85	0,55 ± 1,04	0,23 ± 0,42	0,73 ± 1,39	16,68 ± 5,29#	51,22
1	5,42 ± 4,08##	6,59 ± 5,01	0,75 ± 0,70	0,49 ± 0,75	0,24 ± 0,44	0,74 ± 0,88	0,87 ± 1,45	15,09 ± 8,08##	58,12
2	4,94 ± 2,81##	8,49 ± 7,54	0,71 ± 1,03	0,70 ± 0,96	0,34 ± 0,68	0,46 ± 0,68	0,68 ± 0,92	16,43 ± 7,46#	52,28
Tratamento simultâneo									
0,25	7,30 ± 2,14##	3,77 ± 1,15	0,80 ± 0,88	0,66 ± 0,99	0,13 ± 0,33	0,14 ± 0,38	0,27 ± 0,46	13,47 ± 4,22##	65,17
0,5	6,54 ± 2,68##	4,07 ± 1,31	0,48 ± 0,52	0,36 ± 0,70	0,61 ± 1,02	0,12 ± 0,35	0,49 ± 0,74	12,79 ± 2,66##	68,16
1	6,30 ± 1,76##	2,89 ± 1,65##	0,48 ± 0,74	0,47 ± 0,69	0,59 ± 0,86	ND	0,25 ± 0,46	10,98 ± 3,15##	76,02
2	3,27 ± 1,08##	3,40 ± 1,39	0,13 ± 0,35	0,13 ± 0,35	ND	ND	ND	6,93 ± 1,69 ##	93,70
Pós- Tratamento									
0,25	8,05 ± 4,01##	4,18 ± 2,21	1,81 ± 1,77	1,34 ± 1,48	0,13 ± 0,35	0,12 ± 0,34	1,44 ± 1,37	17,07 ± 8,11#	49,50
0,5	5,92 ± 3,30##	5,60 ± 1,99	1,08 ± 1,31	0,24 ± 0,45	0,24 ± 0,45	0,23 ± 0,43	0,84 ± 1,19	14,28 ± 6,62#	61,66
1	4,64 ± 1,32##	2,24 ± 1,97##	0,83 ± 0,93	0,24 ± 0,44	ND	ND	0,59 ± 0,71	8,54 ± 2,53##	86,66

2	4,05 ± 1,38##	4,40 ± 2,70	0,62 ± 0,74	0,37 ± 0,74	ND	ND	0,37 ± 0,74	9,81 ± 3,62##	81,13
---	---------------	-------------	-------------	-------------	----	----	-------------	---------------	-------

Controle negativo: DMSO 1% DP: Desvio padrão. *Comparado estatisticamente com o controle negativo (DMSO 1%) para avaliar genotoxicidade. #Comparado estatisticamente com o controle positivo (10 µg/ml de Metilmetanosulfonato - MMS) para avaliar o efeito genoprotetor. ##Significativo pelo teste de Kruskal-Wallis com teste Student-Newman-Keuls a posteriori (#"p < 0,05; ##/"p < 0,01). Os resultados referem-se à análise de 5.000 células por tratamento. MN: Micronúcleo. BN: Broto nuclear. QC: Quebra cromossômica. AC: Aderência cromossômica. CM: C-metáfase. PC: Perda cromossômica. PT: Ponte cromossômica. ND (Não detectado). %RD: Porcentagem de redução de danos.

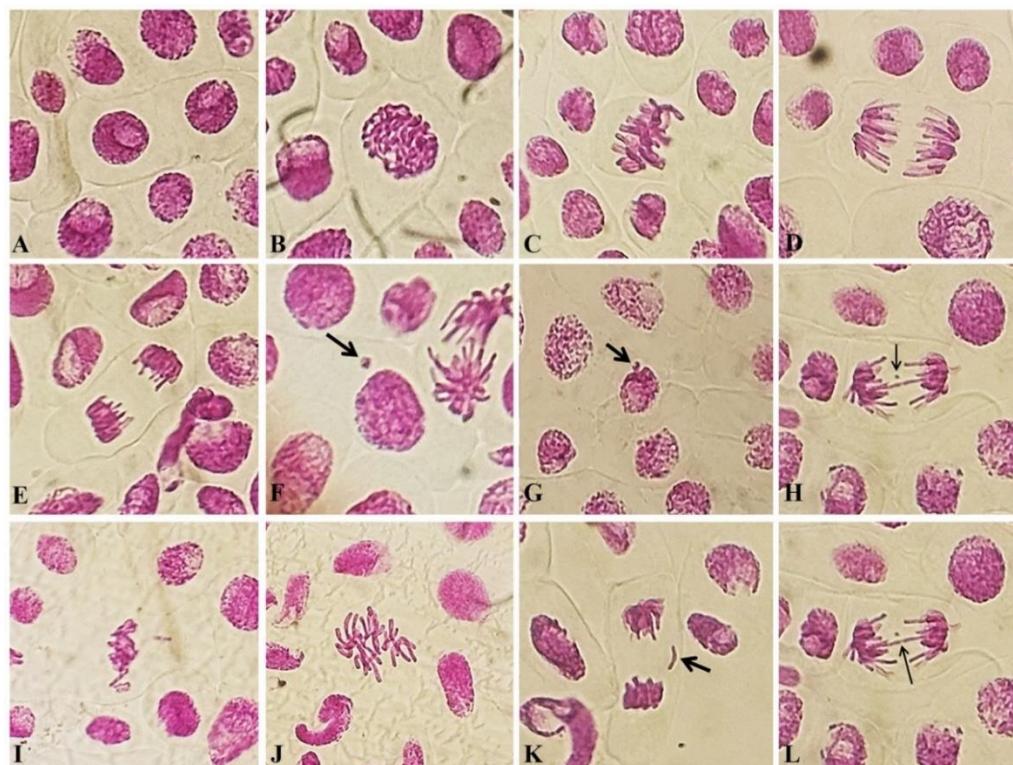


Figura 4.6: Alterações cromossômicas observadas pela análise de células meristemáticas de raízes de *A. cepa*. A: interfase normal; B: prófase normal; C: metáfase normal; D: anáfase normal; E: telófase normal; F: micronúcleo (seta); G: brotamento nuclear (seta); H: quebra cromossômica (seta); I: aderência cromossômica (aderência); J: C-metáfase; K: Perda cromossômica; L: anáfase com ponte cromossômica.

Nas frações do extrato etanólico das folhas e no extrato aquoso das folhas ou cascas, a *P. bracteosa* também não demonstrou genotoxicidade em células de *A. cepa* e em células sanguíneas de camundongos^{17 18 19}, reforçando ações positivas na relação entre as atividades dos metabolitos presentes e a não alteração na estrutura do DNA e/ou fibras do fuso.

O ensaio *A. cepa* também é realizado para avaliação do efeito genoprotetor de extratos de produtos naturais nos protocolos pré, simultâneo e pós-tratamento³¹. O efeito citoprotetor do EE das cascas não foi observado em nenhum dos protocolos analisados. Resultado similar foi encontrado nas frações do extrato etanólico das folhas, o que reforça que os compostos presentes podem ter contribuído sinergicamente e/ou individualmente com MMS para a diminuição do IM¹⁸, principalmente pela ação dos terpenos encontrados no EE das cascas e frações. No entanto, o extrato aquoso das cascas e folhas apresentaram efeito citoprotetor^{17 19}, o que poderia ser explicado pela não detecção de terpenos.

O MMS é utilizado como controle positivo eficaz em ensaios de avaliação de genotoxicidade em *A. cepa* e possui capacidade de alquilação e metilação ao transferir um ou mais átomos de carbono para as bases nitrogenadas, ocasionando quebras nas fitas duplas de DNA e diminuição de enzimas antioxidantes como a glutationa-S transferase, que auxiliam na neutralização e regulam radicais livres e espécies reativas de oxigênio^{106 197}. O MMS também pode atuar diretamente na formação de espécies reativas, causando apoptose e danos a célula provocados pelo estresse oxidativo¹⁹⁸.

O EE demonstrou efeito genoprotetor no tratamento pré, simultâneo e pós, com redução significativa na média total de alterações cromossômicas em relação ao MMS, com %RD variando de 49,79 a 52,28 (pré); 65,17 a 93,70 (simultâneo) e 49,50 a 86,66 (pós), ocasionado principalmente pela redução de micronúcleos e/ou brotos nucelares (Tabela 4.5). O simultâneo o que apresentou o melhor resultado em relação a %RD em três das quatro concentrações analisadas. Além disso, verificou-se no simultâneo uma relação direta da concentração com a %RD, com destaque para a maior concentração (2 mg/ml) com 93,70%. Este resultado, pode estar relacionado com a maior quantidade de compostos antioxidantes com o aumento das concentrações.

Resultado similar no pré e pós foi observado nas três menores concentrações (0,25; 0,5 e 1 mg/ml). No pré-tratamento, os metabólitos do EE podem ter contribuído para o bloqueio ou inativação do MMS no meio extracelular ou intracelular e na diminuição do número de alterações cromossômicas, caracterizando ação desmutagênica. No simultâneo, os compostos desmutagênicos e bioantimutagênicos do EE podem ter interagido com o MMS ao inativá-lo ou mesmo agir no reparo de danos. No pós, os compostos do EE, possivelmente, atuaram contribuído nos mecanismos de reparo da célula aos danos causados pelo MMS, através de ação bioantimutagênica^{18 106}.

O alto teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante do EE podem ser indícios da antigenotoxicidade, uma vez que os metabólitos secundários detectados podem estar contribuindo na modulação das enzimas antioxidantes endógenas, que auxiliam no controle oxidativo e/ou na capacidade direta dos compostos em neutralizar radicais livres e espécies reativas de oxigênio produzidos pela ação do MMS, diminuindo as alterações cromossômicas provocadas por esse processo³¹. A quercetina, flavonoide identificado no EE, possui importante atividade antigenotóxica ao atuar na proteção de danos induzidos pela atuação do MMS, principalmente na eliminação de radicais livres e ROS e na estimulação de enzimas de reparo, devido a sua estrutura fenólica¹⁹⁹.

Outros estudos também mostraram relação de compostos antioxidantes, como a quercetina e o kaempferol no extrato etanólico de própolis e de *Baccharis dranunculifolia*²⁰⁰ e flavonoides e taninos no extrato etanólico das folhas de *Jatropha mollissima* e no extrato aquoso de *Erythrina velutina*^{106 201}, com a neutralização da ação tóxica do MMS em células de *A. cepa*. Ressalta-se também que os compostos podem ter atuado de forma individual e/ou sinérgica na modulação dos danos provocados pelo MMS, como observado nos estudos com o kaempferol e outro flavonoides, taninos e ácidos fenólicos contra a mitomicina C, que também é um agente alquilante^{33,34 202 203}.

Capítulo 5

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A caracterização química do extrato etanólico das cascas da *P. bracteosa* mostrou a presença de compostos evidenciados pela primeira vez na espécie, como os flavonoides, Kaempferol, quercetina, isoquercitrina, isovitexina e o terpenoide, ácido ursólico, além de compostos já detectados anteriormente, como o ácido gálico, quílico e elágico, saponinas, alcaloides, amentoflavona e os taninos corilagina e castalagina, com diferentes atividades bioativas, que estão relacionadas ao teor de compostos fenólicos e ao seu poder antioxidante (DPPH e ABTS).

O EE reduziu o índice mitótico apenas nas maiores concentrações (1 e 2 mg/ml) de *A. cepa*, não foi genotóxico em nenhuma concentração. O EE não mostrou efeito citoprotetor e teve ação genoprotetora no pré, simultâneo e pós-tratamento em todas as concentrações, ocasionada principalmente pela ação antioxidante. Os resultados deste estudo demonstram que *P. bracteosa* é uma fonte promissora de compostos com propriedades antioxidantes e quimioprotetoras. No entanto, existem limitações quanto à variabilidade dos compostos fitoquímicos no EE, que podem atuar por diferentes vias, dificultando a compreensão de como atuam em análises toxicológicas. Dada a importância do EE e de seus fitoquímicos, estudos futuros podem investigar esses compostos isolados em diferentes bioensaios para expandir nossa compreensão de sua interação com o DNA na quimioprevenção. Isso incentivará novas abordagens para a utilização adequada do extrato da casca de *P. bracteosa*.

REFERÊNCIAS

1. MATOS, R. C. DE. et al. Evidence for the efficacy of anti-inflammatory plants used in Brazilian traditional medicine with ethnopharmacological relevance. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 329, p. 118137, jul. 2024.
2. SILVA, W. A. et al. Main chemical constituents and pharmacological activities of Dimorphandra spp. **Brazilian Journal of Biology**, v. 85, 2025.
3. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE- **OMS**. *Legal Status of Traditional Medicine and Complementary/Alternative Medicine: A Worldwide Review.*; 2001.
4. SERAN, S. et al. Augmentation of betacyanin and quercetin in hybrid callus: Comprehensive assessment of biosynthesized silver nanoparticles for their potent biological activities, advanced *in silico* interactions, and rigorous toxicological evaluation. **Industrial Crops and Products**, v. 227, p. 120824, maio 2025.
5. MEIRELES, R. DE N. et al. Relationships Between the Use of Medicinal Plants and Animals and Sociodemographic Factors in Brazil: a Systematic Review. **Human Ecology**, v. 52, n. 6, p. 1217–1237, 8 dez. 2024.
6. BRASIL. **Conselho Nacional de Saúde**. Resolução n. 338, de 06 de Maio de 2004. Aprova a Política Nacional de Assistência Farmacêutica.; 2004.
7. ANVISA. Memento Fitoterápico da Farmacopéia Brasileira. 1º edição ed. Brasília, Brasil: 2016
8. AZEVEDO, D. Q. DE et al. Implantação de uma farmácia viva no município de Itajubá-MG. **Revista de administração Faces Journal**, v. 23, n. 04, p. 440–461, out. 2024.
9. CHEROBIN, F. et al. Medicinal plants and public health policies: new perspectives on old practices. **Physis**, v. 32, n. 3, 2022.
10. SOUSA, N. F. DE et al. In Silico and In Vitro Studies of Terpenes from the Fabaceae Family Using the Phenotypic Screening Model against the SARS-CoV-2 Virus. **Pharmaceutics**, v. 16, n. 7, p. 912, 9 jul. 2024.
11. MORANTE-CARRIEL, J. et al. Therapeutic Potential of Prenylated Flavonoids of the Fabaceae Family in Medicinal Chemistry: An Updated Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 23, p. 13036, 4 dez. 2024.
12. CRUZ, R. C. D. DA et al. Bioatividade da raiz de Poincianella bracteosa (Tul.) L.P. Queiroz (Fabaceae) sobre larvas do Aedes aegypti (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). **Brazilian Journal of Biosciences**, v. 13, n. 1679–2343, p. 259–264, out. 2015.

13. CASTRO, A. S.; CAVALCANTE, A. Flores da caatinga = Caatinga flowers. Campina Grande-PB: **Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação–Instituto Nacional do Semiárido.**, 2011.
14. MONTEIRO, J. M. et al. Does total tannin content explain the use value of spontaneous medicinal plants from the Brazilian semi-arid region? **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 2, p. 116–123, 2014.
15. CASTRO, K. N. DE C. et al. Ethnobotanical and ethnoveterinary study of medicinal plants used in the municipality of Bom Princípio do Piau, Piau, Brazil. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 10, n. 23, p. 318–330, 17 jun. 2016.
16. CORADIN, L.; CAMILLO, J.; PAREYN, F. G. C. Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial Plantas para o Futuro - Região Centro-Oeste. Brasília: **Ministério do meio Ambiente.**, 2018.
17. COUTO, A. C. F. et al. Antimutagenic activity and identification of antioxidant compounds in the plant *Poincianella bracteosa* (Fabaceae). **Rev. Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol.)**. ISSN, v. 67, n. 6, p. 0–000, 2019.
18. FREIRE, J. DOS S. et al. Phytochemical and antioxidant characterization, cytogenotoxicity and antigenotoxicity of the fractions of the ethanolic extract of in *Poincianella bracteosa* (Tul.) L.P. Queiroz. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues**, v. 83, n. 23–24, p. 730–747, 16 dez. 2020.
19. PEREIRA, M. L. et al. Evaluation of effects of *Poincianella bracteosa* (Tul.) L.P. Queiroz leaves in *Allium cepa* and *Mus musculus*. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 95, n. 6, p. 464–473, 17 ago. 2020.
20. SILVA, A. G. A. et al. Chemical composition and photoprotective and antiradical activities of the branches of *platonia insignis* (clusiaceae). **Quimica Nova**, v. 44, n. 8, p. 954–962, 2021.
21. MARINHO, T. A. et al. Phytochemical characterization, and antioxidant and antibacterial activities of the hydroethanolic extract of *anadenanthera peregrina* stem bark. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, 2022.
22. WOŁOSIAK, R. et al. Verification of the conditions for determination of antioxidant activity by abts and dpph assays—a practical approach. **Molecules**, v. 27, n. 1, 1 jan. 2022.
23. SOUSA, H. G. et al. Phytochemical screening, phenolic and flavonoid contents, antioxidant and cytogenotoxicity activities of *Combretum leprosum* Mart. (Combretaceae). **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues**, v. 84, n. 10, p. 399–417, 2021.
24. SALES, P. P. et al. Phytochemical characterization, isolation, antioxidant and cytogenotoxic activity of leaves of *Heliotropium elongatum* (Lehm) I.M. Johnst. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 86, n. 23, p. 871–897, 2 dez. 2023.

25. SANTOS, P. N. DOS et al. Análise do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico do extrato hidroalcóolico das folhas da *Morus nigra* L. Através do bioensaio *Allium cepa*. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 4, p. e132942968, 22 mar. 2020.
26. DIAS, M. S. et al. Cytogenotoxicity and protective effect of piperine and capsaicin on meristematic cells of *Allium cepa* l. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, 2021.
27. JUNIOR, E. P. D. V. et al. Protective effect of kavain in meristematic cells of *Allium cepa* L. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 94, n. 2, 2022.
28. LOPES, K. S. et al. Identification of bioactive compounds and cytogenotoxicity of the essential oil from the leaves of *Croton heliotropiifolius* Kunth. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 85, n. 24, p. 1002–1018, 17 dez. 2022.
29. LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, jul. 2009.
30. EREN, Y.; ÖZATA, A. Determination of mutagenic and cytotoxic effects of *Limonium globuliferum* aqueous extracts by *Allium*, Ames, and MTT tests. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 1, p. 51–59, jan. 2014.
31. FEDEL-MIYASATO, L. E. S. et al. Antigenotoxic and antimutagenic effects of *Schinus terebinthifolius* Raddi in *Allium cepa* and Swiss mice: **A comparative study**. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 2, p. 3411–3425, 2014.
32. YOUSEFBEYK, F. et al. Phytochemical analysis, antioxidant, antibacterial, and cytotoxic activities of leaves and roots of *Rubus hyrcanus* Juz. **European Food Research and Technology**, v. 248, n. 1, p. 141–152, 26 jan. 2022.
33. DORMOUSOGLOU, M. et al. Phytochemical Analysis and Genotoxicological Evaluation of Prickly Pear Peel Extracts. **Plants**, v. 12, n. 7, p. 1537, 3 abr. 2023.
34. DORMOUSOGLOU, M. et al. Beneficial properties of *Drimia numidica* leaf methanolic extract against the cytogenotoxic effects of mitomycin C on human lymphocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 173, p. 113626, mar. 2023.
35. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE- **OMS**. Diretrizes Geras Para Metodologias Sobre Pesquisa e Avaliação de Medicina Tradicional.; 2000.
36. VAOU, N. et al. Towards Advances in Medicinal Plant Antimicrobial Activity: A Review Study on Challenges and Future Perspectives. **Microorganisms**, v. 9, n. 10, p. 2041, 27 set. 2021.
37. PEDROSO R. S et al. Plantas medicinais: uma abordagem sobre o uso seguro e racional. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**. 2021;31(2).

38. DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4–29, out. 2016.
39. BRAGA, F. C. Paving New Roads Towards Biodiversity-Based Drug Development in Brazil: Lessons from the Past and Future Perspectives. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 31, n. 5, p. 505–518, 17 set. 2021.
40. PIRES G. B et al . Análise da atuação do Conselho Nacional de Saúde na Política Nacional de Assistência Farmacêutica. **Saúde em Debate**, v.49. P.144.2025
41. CERQUEIRA, T. M. G. et al. The Use of Medicinal Plants in Maceió, Northeastern Brazil: An Ethnobotanical Survey. **Medicines**, v. 7, n. 2, p. 7, 21 jan. 2020.
42. FERREIRA, E. DA C. et al. Local Knowledge and Use of Medicinal Plants in a Rural Community in the Agreste of Paraíba, Northeast Brazil. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2021, p. 1–16, 29 dez. 2021.
43. BEZERRA, J. J. L.; PINHEIRO, A. A. V.; BARRETO, E. DE O. Medicinal plants used in the treatment of asthma in different regions of Brazil: A comprehensive review of ethnomedicinal evidence, preclinical pharmacology and clinical trials. **Phytomedicine Plus**, v. 2, n. 4, p. 100376, nov. 2022.
44. KUHN AGNES, K. N. et al. Ethnobotanical knowledge on native Brazilian medicinal plants traditionally used as anthelmintic agents – A review. **Experimental Parasitology**, v. 249, p. 108531, jun. 2023.
45. GRYGIER, A. et al. Seven underutilized species of the Fabaceae family with high potential for industrial application as alternative sources of oil and lipophilic bioactive compounds. **Industrial Crops and Products**, v. 186, p. 115251, out. 2022.
46. ZAPPI, D. C. et al. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p. 1085–1113, 2015.
47. ASFAW, M. M.; ABEBE, F. B. Traditional Medicinal Plant Species Belonging to Fabaceae Family in Ethiopia: A Systematic Review. **International Journal of Plant Biology**, v. 12, n. 1, p. 8473, 5 jan. 2022.
48. MAROYI, A. Medicinal Uses of the Fabaceae Family in Zimbabwe: A Review. **Plants**, v. 12, n. 6, p. 1255, 10 mar. 2023.
49. CRUZ, M. F. DA et al. The subfamily Cercidoideae (Fabaceae Lindl.) in the Chapada do Araripe, Northeast Brazil. **Phytotaxa**, v. 640, n. 1, p. 27–38, 7 mar. 2024.
50. USMAN, M. et al. Exploring the Phytochemicals and Anti-Cancer Potential of the Members of Fabaceae Family: A Comprehensive Review. **Molecules**, v. 27, n. 12, p. 3863, 16 jun. 2022.
51. SILVA, L. N. et al. Hydrolyzable tannins from Poincianella (Caesalpinia) microphylla fruits: Metabolite profiling and anti-Trichomonas vaginalis activity. **Food Research International**, v. 134, p. 109236, ago. 2020.

52. SOUSA, L. M. S. DE. et al. *Poincianella pyramidalis* (Tul) L.P. Queiroz: A review on traditional uses, phytochemistry and biological-pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 264, p. 113181, jan. 2021.
53. ZANIN, J. L. B. et al. The Genus *Caesalpinia* L. (Caesalpiniaceae): Phytochemical and Pharmacological Characteristics. **Molecules**, v. 17, n. 7, p. 7887–7902, 29 jun. 2012.
54. SILVA, K. S. DA et al. Phytotherapeutic properties of the *Caesalpinia* genus present in the Caatinga biome. **Scientific Electronic Archives**, v. 14, n. 6, 5 jul. 2021.
55. CHAVES, T. P. et al. Phytochemical characterization and mutagenicity, cytotoxicity, antimicrobial and modulatory activities of *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz. **Natural Product Research**, v. 34, n. 23, p. 3382–3387, 1 dez. 2020.
56. GUIDI, A. C. et al. Stem bark extract of *Poincianella pluviosa* incorporated in polymer film: Evaluation of wound healing and anti-staphylococcal activities. **Injury**, v. 51, n. 4, p. 840–849, abr. 2020.
57. FERRAZ, J. S. F. et al. Estrutura do componente arbustivo-arbóreo da vegetação em duas áreas de caatinga, no município de Floresta, Pernambuco. **Revista Árvore**, v. 38, n. 6, p. 1055–1064, dez. 2014.
58. OLIVEIRA, L. P. DE et al. Chemical characteristics, degradation kinetics and gas production of arboreal species for ruminants. **REVISTA CIÊNCIA AGRONÔMICA**, v. 51, n. 3, 2020.
59. BAPTISTEL, A. C. et al. Plantas medicinais utilizadas na Comunidade Santo Antônio, Currais, Sul do Piauí: um enfoque etnobotânico. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, n. 2 suppl 1, p. 406–425, 2014.
60. ANJALI et al. Role of plant secondary metabolites in defence and transcriptional regulation in response to biotic stress. **Plant Stress**, v. 8, p. 100154, jun. 2023.
61. SALAM, U. et al. Plant Metabolomics: An Overview of the Role of Primary and Secondary Metabolites against Different Environmental Stress Factors. **Life**, v. 13, n. 3, p. 706, 6 mar. 2023.
62. BORGES, L. P.; AMORIM, V. A. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS SECONDARY PLANT METABOLITES. **Revista Agrotecnologia, Ipameri**, n. 11, p. 54–67, 2020.
63. KETEHOULI, T. et al. Secondary metabolites in plant-microbe interactions. **Journal of Applied Microbiology**, v. 136, n. 6, 2 jun. 2025.
64. CHEN, N. et al. Potential application of phenolic compounds with different structural complexity in maize starch-based film. **Food Structure**, v. 36, p. 100318, abr. 2023.
65. KUMAR, K. et al. An Overview of Plant Phenolics and Their Involvement in Abiotic Stress Tolerance. **Stresses**, v. 3, n. 3, p. 570–585, 8 ago. 2023.

66. OGUTCEN, E. et al. Chemical Basis of Floral Color Signals in Gesneriaceae: The Effect of Alternative Anthocyanin Pathways. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, 14 dez. 2020.
67. EL-MERGAWI, R.; EL-DABAA, M.; ELKHAWAGA, F. The metabolic profiles of phenolic acids and aromatic amino acids in the *Orobanche crenata* parasite and its host faba bean at different infestation stages. **Phytoparasitica**, v. 52, n. 5, p. 94, 30 nov. 2024.
68. RANNER, J. L. et al. Primary and Secondary Metabolites in *Lotus japonicus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 71, n. 30, p. 11277–11303, 2 ago. 2023.
69. REZAUL ISLAM, MD. et al. Alkaloids as drug leads in Alzheimer's treatment: Mechanistic and therapeutic insights. **Brain Research**, v. 1834, p. 148886, jul. 2024.
70. XUE, X. et al. Metabolomics and transcriptomics analyses for characterizing the alkaloid metabolism of Chinese jujube and sour jujube fruits. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, 18 set. 2023.
71. WEI, J. et al. Biosynthesis and the Transcriptional Regulation of Terpenoids in Tea Plants (*Camellia sinensis*). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 8, p. 6937, 8 abr. 2023.
72. FAN, M. et al. Application of Terpenoid Compounds in Food and Pharmaceutical Products. **Fermentation**, v. 9, n. 2, p. 119, 26 jan. 2023.
73. ZHAN, X.; QIAN, Y.; MAO, B. Metabolic Profiling of Terpene Diversity and the Response of Prenylsynthase-Terpene Synthase Genes during Biotic and Abiotic Stresses in *Dendrobium catenatum*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 12, p. 6398, 7 jun. 2022.
74. BUENO, F. G. et al. Hydrolyzable tannins from hydroalcoholic extract from *Poincianella pluviosa* stem bark and its wound-healing properties: Phytochemical investigations and influence on in vitro cell physiology of human keratinocytes and dermal fibroblasts. **Fitoterapia**, v. 99, p. 252–260, dez. 2014.
75. BUENO, F. G. et al. Enhanced Cutaneous Wound Healing In Vivo by Standardized Crude Extract of *Poincianella pluviosa*. **PLOS ONE**, v. 11, n. 3, p. e0149223, 3 mar. 2016.
76. SOUZA, J. et al. Leaves from the Tree *Poincianella pluviosa* as a Renewable Source of Antiplasmodial Compounds against Chloroquine-Resistant *Plasmodium falciparum*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2018.
77. TUMILAAR, S. G. et al. A Comprehensive Review of Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants: Overview, Clinical Applications, Global Perspectives, Future Directions, and Mechanisms of Antioxidant Activity of Flavonoid Compounds. **Journal of Chemistry**, v. 2024, p. 1–21, 31 maio 2024.
78. LI, X. et al. Anticancer therapeutic effect of ginsenosides through mediating reactive oxygen species. **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, 26 jul. 2023.

79. NUNES, I. J. et al. Exploring the structure-activity relationship (SAR) of Schiff bases as effective compounds in scavenging free radicals. **Journal of Molecular Structure**, v. 1315, p. 138729, nov. 2024.
80. VELLOSA, J. C. R. et al. ESTRESSE OXIDATIVO: UMA INTRODUÇÃO AO ESTADO DA ARTE / OXIDATIVE STRESS: AN INTRODUCTION TO THE STATE OF ART. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 10152–10168, 2021.
81. BLAGOV, A. V. et al. Potential use of antioxidants for the treatment of chronic inflammatory diseases. **Frontiers in Pharmacology**, v. 15, 16 maio 2024.
82. SOUZA, L. M. V. et al. Treinamento intervalado de alta intensidade e estresse oxidativo: uma breve apresentação. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, p. e741986478, 31 jul. 2020.
83. MUNTEANU, I. G.; APETREI, C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 7, p. 3380, 25 mar. 2021.
84. GULCIN, İ.; ALWASEL, S. H. DPPH Radical Scavenging Assay. **Processes**, v. 11, n. 8, p. 2248, 26 jul. 2023.
85. HASSANPOUR, S. H.; DOROUDI, A. Review of the antioxidant potential of flavonoids as a subgroup of polyphenols and partial substitute for synthetic antioxidants. **Avicenna Journal of PhytomedicineMashhad University of Medical Sciences**, 1 jan. 2023.
86. CANO, A. et al. ABTS/TAC Methodology: Main Milestones and Recent Applications. **Processes**, v. 11, n. 1, p. 185, 6 jan. 2023.
87. EL OMARI, N. et al. Fenchone and camphor: Main natural compounds from *Lavandula stoechas* L., expediting multiple in vitro biological activities. **Helion**, v. 9, n. 11, p. e21222, nov. 2023.
88. ILYASOV, I. R. et al. ABTS/PP Decolorization Assay of Antioxidant Capacity Reaction Pathways. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3, p. 1131, 8 fev. 2020.
89. CAVALCANTE, M. DE A.; BORGES, W. L.; SOUZA, T. M. DE. Compostos fenólicos a partir de vegetais: uma revisão sobre os métodos de quantificação e avaliação das propriedades antioxidante e antimicrobiana. **Peer Review**, v. 6, n. 10, p. 66–89, 9 maio 2024.
90. MATOS, F. J. DE A. Introdução a fitoquímica experimental. FORTALEZA: UFC, 2009. v. 03
91. BELEW, A. A.; HANA, G. M.; MESHESHA, D. S. Preliminary Phytochemical Screening, Isolation, Characterization, Structural Elucidation and Antibacterial Activities of Leaves Extracts *Rhus vulgaris* (Kimmo). **Oriental Journal of Physical Sciences**, v. 9, n. 2, p. 118–130, 10 dez. 2024.

92. MAHESHWARAN, L. et al. Phytochemical Testing Methodologies and Principles for Preliminary Screening/ Qualitative Testing. **Asian Plant Research Journal**, v. 12, n. 5, p. 11–38, 19 ago. 2024.
93. AVRĂMIA, I.; OROIAN, M.-A.; OIȚĂ, R.-C. A review of current trends of vitamin identification and quantification by chromatography from food samples. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 131, p. 106244, jul. 2024.
94. CUSTODIO-MENDOZA, J. A. et al. Advances in Chromatographic Analysis of Phenolic Phytochemicals in Foods: Bridging Gaps and Exploring New Horizons. **Foods**, v. 13, n. 14, p. 2268, 18 jul. 2024.
95. MISS. PAYAL BADHE; DR. VIJAYA BARGE. A Review on High Performance Thin Layer Chromatography. **International Journal of Scientific Research in Science and Technology**, p. 445–455, 7 fev. 2024.
96. SUSANTI, I. et al. Separation Methods of Phenolic Compounds from Plant Extract as Antioxidant Agents Candidate. **Plants**, v. 13, n. 7, p. 965, 27 mar. 2024.
97. BUDETIĆ, M. et al. Review of Characteristics and Analytical Methods for Determination of Thiabendazole. **Molecules**, v. 28, n. 9, p. 3926, 6 de maio, 2023.
98. DEBNATH, S. et al. Advances in chromatography: contemporary techniques and applications. **Essential Chem**, v. 2, n. 1, p. 1–27, 31 dez. 2025.
99. PANDISELVAM, R. et al. Contemporary Developments and Emerging Trends in the Application of Spectroscopy Techniques: A Particular Reference to Coconut (*Cocos nucifera* L.). **Molecules**, v. 27, n. 10, p. 3250, 19 maio 2022.
100. PAVIA, D. L. et al. Introdução à Espectroscopia: Tradução da 4a edição norte-americana. **Cengage Learning** ed. São Paulo: 2010, 2010. v. 1
101. GUO, Y. et al. Advances on Water Quality Detection by UV-vis Spectroscopy. **Applied Sciences**, v. 10, n. 19, p. 6874, 30 set. 2020.
102. MA, X. Recent Advances in Mass Spectrometry-Based Structural Elucidation Techniques. **Molecules**, v. 27, n. 19, p. 6466, 30 set. 2022.
103. DEMICHEVA, E. et al. Advances in Mass Spectrometry-Based Blood Metabolomics Profiling for Non-Cancer Diseases: A Comprehensive Review. **Metabolites**, v. 14, n. 1, p. 54, 14 jan. 2024.
104. DAVID SMITH et al. Breathborne Biomarkers and the Human Volatilome. **Elsevier**, 2020.
105. MALM, L. et al. Quantification Approaches in Non-Target LC/ESI/HRMS Analysis: An Interlaboratory Comparison. **Analytical Chemistry**, v. 96, n. 41, p. 16215–16226, 15 out. 2024.
106. ARAÚJO, J. R. DA S. et al. Phytochemical prospecting, isolation, and protective effect of the ethanolic extract of the leaves of *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. **Journal**

of Toxicology and Environmental Health, Part A, v. 84, n. 18, p. 743–760, 17 set. 2021.

107. LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Allium cepa test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71–81, jul. 2009.
108. LEME, D. M.; ANGELIS, D. DE F. DE; MARIN-MORALES, M. A. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of Allium cepa root cells. **Aquatic Toxicology**, v. 88, n. 4, p. 214–219, 30 jul. 2008.
109. MAZZEO, D. E. C.; FERNANDES, T. C. C.; MARIN-MORALES, M. A. Cellular damages in the Allium cepa test system, caused by BTEX mixture prior and after biodegradation process. **Chemosphere**, v. 85, n. 1, p. 13–18, 2011.
110. FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent- Trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 6, p. 1680–1686, set. 2009.
111. VENTURA-CAMARGO, B. DE C. et al. The use of the Cytogenetic to Identify Mechanisms of Action of an Azo Dye in Allium Cepa Meristematic Cells. **Journal of Environmental & Analytical Toxicology**, v. 01, n. 02, 2011.
112. CHAVES, M. H. Análise de extratos de plantas por CCD: Uma metodologia aplicada à disciplina “química orgânica” - Analysis of extracts of plants by tlc: a methodology applied in the “organic chemistry”. **QUÍMICA NOVA**, v. 20, n. 5, p. 560–562, 1997.
113. SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I.—The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 10, n. 1, p. 63–68, 2 jan. 1959.
114. ROCHA, T. S. DA et al. Vitamin C and Phenolic Antioxidants of Jua (*Ziziphus joazeiro* M.) Pulp: A Rich Underexplored Brazilian Source of Ellagic Acid Recovered by Aqueous Ultrasound-Assisted Extraction. **Molecules**, v. 27, n. 3, p. 627, 19 jan. 2022.
115. BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.
116. VIEIRA, L. M. et al. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de polpas de frutos tropicais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 3, p. 888–897, 9 set. 2011.
117. DIAS, W. L. F. et al. Cytogenotoxic effect, phytochemical screening and antioxidant potential of *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill leaves. **South African Journal of Botany**, v. 123, p. 30–35, jul. 2019.

118. RUFINO, M. DO S. M. et al. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH Introdução. Fortaleza: **Embrapa**, 2007.
119. RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, maio 1999.
120. LIMA, A. DE. Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo, e identificação dos compostos fenólicos presentes no Pequi (Caryocar brasiliense, Camb.). **São Paulo: Universidade de São Paulo**, 23 abr. 2008.
121. ALVES, P. E S. et al. The Free Radical Scavenging Property of the Leaves, Branches, and Roots of Mansoa hirsuta DC: In Vitro Assessment, 3D Pharmacophore, and Molecular Docking Study. **Molecules**, v. 27, n. 18, p. 6016, 15 set. 2022.
122. OLIVEIRA, M. D. A. et al. Anthelmintic Potential of Conjugated Long-Chain Fatty Acids Isolated from the Bioluminescent Mushroom *Neonothopanus gardneri*. **Journal of Natural Products**, v. 88, n. 2, p. 255–261, 28 fev. 2025.
123. ALMEIDA, P. M. et al. Genotoxic potential of leaf extracts of *Jatropha gossypiifolia* L. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 1, 5 fev. 2016.
124. FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent—Trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 6, p. 1680–1686, set. 2009.
125. WATERS, M. D. et al. Antimutagenicity profiles for some model compounds. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 238, n. 1, p. 57–85, jan. 1990.
126. BORGES, C. V. et al. Medicinal plants: Influence of environmental factors on the content of secondary metabolites. Em: Medicinal Plants and Environmental Challenges. **Springer International Publishing**, 2017. p. 259–277.
127. MORAES, G. V. et al. Potencial antioxidante dos flavonoides e aplicações terapêuticas. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 14, p. e238111436225, 25 out. 2022.
128. JESUS, A. et al. Phenolics as Active Ingredients in Skincare Products: A Myth or Reality? **Molecules**, 2025.
129. WENG, Z. et al. Antimicrobial activities of lavandulylated flavonoids in *Sophora flavences* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* via membrane disruption. **Journal of Advanced Research**, v. 57, p. 197–212, 1 mar. 2024.
130. MELO, J. G. DE et al. Antiproliferative Activity, Antioxidant Capacity and Tannin Content in Plants of Semi-Arid Northeastern Brazil. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 8534–8542, 24 nov. 2010.

131. SÁNCHEZ, C. L.; DE JESÚS, F.; CRUZ, P. Las saponinas y su uso farmacéutico. **Revista Del Centro de Graduados e Investigación**, v. 37, n. 0185–6294, p. 120–126, 2022.
132. CHAVARRO, C. F. G. et al. Amaryllidaceae: fuente potencial de alcaloides. Actividades biológicas y farmacológicas. **Ciencia y Agricultura**, v. 17, n. 3, p. 78–94, 28 ago. 2020.
133. BILBAO-RAMOS, P. et al. Evaluating the Potential of Ursolic Acid as Bioproduct for Cutaneous and Visceral Leishmaniasis. **Molecules**, v. 25, n. 6, p. 1394, 19 mar. 2020.
134. ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Quim. Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202–2210, 2010.
135. JAŚKIEWICZ, K.; SZCZĘSNA, T.; JACHUŁA, J. How Phenolic Compounds Profile and Antioxidant Activity Depend on Botanical Origin of Honey—A Case of Polish Varietal Honeys. **Molecules**, v. 30, n. 2, p. 360, 17 jan. 2025.
136. BERTELLA, A. et al. Phytochemical Study and In Vitro Antioxidant Activity of *Helianthemum cinereum* Along with Antitumor Activity of the Isolated trans-Tiliroside and Luteolin 4'-O-β-Xyloside. **Molecules**, v. 29, n. 24, p. 5935, 16 dez. 2024.
137. QI, N. et al. Phenolic Acid and Flavonoid Content Analysis with Antioxidant Activity Assessment in Chinese *C. pi.* Shen Honey. **Molecules**, v. 30, n. 2, p. 370, 17 jan. 2025.
138. MORAES, S. Z. DA C. DE et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effect of *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 254, p. 112563, maio 2020.
139. REYNERTSON, K. A.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Potencial antioxidante de Sete Frutos Mirtáceos. **Ethnobotany Research and Applications**, v. 3, p. 25–35, 2005.
140. RAFIEE, S. A.; FARHOOSH, R.; SHARIF, A. Antioxidant Activity of Gallic Acid as Affected by an Extra Carboxyl Group than Pyrogallol in Various Oxidative Environments. **European Journal of Lipid Science and Technology**, p. 1800319, 25 set. 2018.
141. YANG, Y. et al. Photo-assisted Zn-air battery promoted self-powered sensor for selective and sensitive detection of antioxidant gallic acid based on Z-scheme nanoarchitectonics with heterojunction AgBr/CuBi₂O₄. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 393, p. 134302, out. 2023.
142. BAJPAI, V. K. et al. Antioxidant and antimicrobial efficacy of a biflavonoid, amentoflavone from *Nandina domestica* in vitro and in minced chicken meat and apple juice food models. **Food Chemistry**, v. 271, p. 239–247, jan. 2019.

143. SIMUNKOVA, M. et al. Antioxidant vs. Prooxidant Properties of the Flavonoid, Kaempferol, in the Presence of Cu (II) Ions: A ROS-Scavenging Activity, Fenton Reaction and DNA Damage Study. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 4, p. 1619, 5 fev. 2021.
144. COLINO, C. I. et al. A comparative study of liposomes and chitosomes for topical quercetin antioxidant therapy. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 68, p. 103094, fev. 2022.
145. GUSMÃO, D. E. et al. Avaliação do Efeito do Extrato Etanólico de *Piper umbellatum* L. no Controle Alternativo de *Rhizoctonia solani* e *Macrophomina phaseolina*. **Ensaio e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde**, v. 24, n. 5- esp., p. 516–522, 18 fev. 2021.
146. SILVA, D. F. DA et al. Caracterização química e estudo biomonitorado de extratos de *Polygala boliviensis* A.W. Benn (Polygalaceae). **Revista RG News**, v. 8, n. 2, p. 32–43, 2022.
147. TSIMOGIANNIS, D. et al. Characterization of Flavonoid Subgroups and Hydroxy Substitution by HPLC-MS/MS. **Molecules**, v. 12, n. 3, p. 593–606, 2007.
148. ANDRADE, C. R. B. DE et al. Correlação entre composição química de folhas de *Zanthoxylum caribaeum* Lam (Rutaceae) e atividade antioxidante. **Revista RG News**, v. 8, n. 2, p. 69–80, 2022.
149. BAKOUR, M. et al. Antioxidant content and identification of phenolic/flavonoid compounds in the pollen of fourteen plants using HPLC-DAD. **Journal of Apicultural Research**, v. 59, n. 1, p. 35–41, 1 jan. 2020.
150. FRANCO, D. M. et al. Seasonal variation in allelopathic potential of the leaves of *Copaifera langsdorffii* Desf. *Acta Botanica Brasilica*, v. 30, n. 2, p. 157–165, 15 mar. 2016.
151. PEREIRA, I. DE S. P.; VEGA, M. R. Flavonoids in the *Annona* genus: Chromatographic and Spectral Methods of Analysis - A Review. **Revista Virtual de Química**, v. 14, n. 5, p. 778–789, 2022.
152. GAZAFROUDI, K. N. et al. From Stem to Spectrum: Phytochemical Characterization of Five *Equisetum* Species and Evaluation of Their Antioxidant Potential. **Molecules**, v. 29, n. 12, p. 2821, 13 jun. 2024.
153. CHATZITZIKA, C. et al. HPLC Analysis of Phenolic Compounds and Flavonoids with Overlapping Peaks. **Food technology and biotechnology**, v. 58, n. 1, p. 12–19, 2020.
154. SANTI, M. M. et al. Determinação do perfil fitoquímico de extrato com atividade antioxidante da espécie medicinal *Cordia verbenacea* DC. por HPLC-DAD. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, n. 2, p. 256–261, jun. 2014.
155. FILHO, A. C. P. DE M. Avaliação fitoquímica e atividades biológicas do extrato do exocarpo do fruto de *Protium spruceanum*. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 10, n. 1, p. 034–043, 1 mar. 2022.

156. SYARIFAH, A. L.; RETNOWATI, R. Characterization of Secondary Metabolites Profile of Flavonoid from Salam Leaves (*Eugenia polyantha*) Using TLC and UV-Spectrophotometry. **Pharmaceutical Sciences and Research (PSR)**, v. 6, n. 3, p. 155–163, 2019.
157. LIMA, N. M. et al. From MS1 to Structure: A Van Krevelen? DBE? Aromaticity-Based Framework for Annotating Specialized Metabolites via High-Resolution Mass Spectrometry. **RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY**, v. 39, 2025.
158. MAGALHÃES, I. L. et al. Chemical Constituents from *Caesalpinia ferrea*: Identification and ¹H and ¹³C Resonance Assignment. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 05, n. 10, p. 688–694, 2014.
159. CAO, Q. et al. Amentoflavone protects dopaminergic neurons in MPTP-induced Parkinson's disease model mice through PI3K/Akt and ERK signaling pathways. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 319, p. 80–90, mar. 2017.
160. ALKADI, K. A. A. et al. In Vitro Cytotoxicity and Anti-inflammatory Cytokinine Activity Study of Three Isolated Novel Compounds of *Prismatomeris glabra*. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 13, n. 1, p. 116–122, jan. 2021.
161. ZHANG, S. et al. Quercetin from *Polygonum capitatum* Protects against Gastric Inflammation and Apoptosis Associated with *Helicobacter pylori* Infection by Affecting the Levels of p38MAPK, BCL-2 and BAX. **Molecules**, v. 22, n. 5, p. 744, 6 maio 2017.
162. KIM, S.-H. et al. Antitumor and apoptotic effects of quercetin on human melanoma cells involving JNK/P38 MAPK signaling activation. **European Journal of Pharmacology**, v. 860, p. 172568, out. 2019.
163. SUN, X. et al. Isovitolxin alleviates acute gouty arthritis in rats by inhibiting inflammation via the TLR4/MyD88/NF- κ B pathway. **Pharmaceutical Biology**, v. 59, n. 1, p. 1324–1331, 28 jan. 2021.
164. ZHANG, Y. et al. Isovitolxin Inhibits Ginkgolic Acids-Induced Inflammation Through Downregulating SHP2 Activation. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, 11 ago. 2021.
165. NASANBAT, B. et al. Kaempferol therapy improved MC903 induced-atopic dermatitis in a mouse by suppressing TSLP, oxidative stress, and type 2 inflammation. **Journal of Dermatological Science**, v. 111, n. 3, p. 93–100, set. 2023.
166. WANG, R. et al. Kaempferol promotes non-small cell lung cancer cell autophagy via restricting Met pathway. **Phytomedicine**, v. 121, p. 155090, dez. 2023.
167. MAMAT, N. et al. Gallic Acid and Methyl Gallate Enhance Antiproliferative Effect of Cisplatin on Cervical Cancer (HeLa) Cells. **Sains Malaysiana**, v. 49, n. 5, p. 1107–1114, 31 maio 2020.
168. LIN, I.-C. et al. Absorption and Metabolism of Urolithin A and Ellagic Acid in Mice and Their Cytotoxicity in Human Colorectal Cancer Cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2023, n. 1, 5 jan. 2023.

169. PIMPLEY, V. et al. The chemistry of chlorogenic acid from green coffee and its role in attenuation of obesity and diabetes. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 50, n. 10, p. 969–978, 2 nov. 2020.
170. LINDEN, M. et al. Effects of flavonoids on membrane adaptation of food-associated bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1865, n. 4, p. 184137, abr. 2023.
171. PAL, S. et al. Adiponectin receptors by increasing mitochondrial biogenesis and respiration promote osteoblast differentiation: Discovery of isovitexin as a new class of small molecule adiponectin receptor modulator with potential osteoanabolic function. **European Journal of Pharmacology**, v. 913, p. 174634, dez. 2021.
172. VALENTOVÁ, K. et al. Isoquercitrin: Pharmacology, toxicology, and metabolism. **Food and Chemical Toxicology**, v. 68, p. 267–282, jun. 2014.
173. LANG, T.-Q. et al. Characterization of chemical components with diuretic potential from *Pyrrosia petiolosa*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 23, n. 8, p. 764–771, 3 ago. 2021.
174. KANDEMIR, K. et al. Recent advances on the improvement of quercetin bioavailability. **Trends in Food Science & Technology**, v. 119, p. 192–200, jan. 2022.
175. ORABI, M. A. A. et al. Two new C-glycosidic ellagitannins and accompanying tannins from *Lawsonia inermis* leaves and their cytotoxic effects. **Fitoterapia**, v. 153, p. 104925, set. 2021.
176. ORABI, M. A. A. et al. Nutritional, Antioxidant, Antimicrobial, and Anticholinesterase Properties of *Phyllanthus emblica*: A Study Supported by Spectroscopic and Computational Investigations. **Metabolites**, v. 13, n. 9, p. 1013, 14 set. 2023.
177. CHANG, Z. et al. A Comprehensive Review of the Structure Elucidation of Tannins from *Terminalia* Linn. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, p. 1–26, 15 nov. 2019.
178. SANTOS, G. F. DOS. et al. Mass spectrometry-based untargeted metabolomics approaches for comprehensive structural annotation of bioactive metabolites from bushy cashew (*Anacardium humile*) fruits. **South African Journal of Botany**, v. 163, p. 121–134, dez. 2023.
179. JUNIOR, A. G. et al. Nitric oxide and K_{ir} 6.1 potassium channel mediate isoquercitrin-induced endothelium-dependent and independent vasodilation in the mesenteric arterial bed of rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 788, p. 328–334, out. 2016.
180. PIAZZA, S. et al. Ellagitannins from *Castanea sativa* Mill. Leaf Extracts Impair *H. pylori* Viability and Infection-Induced Inflammation in Human Gastric Epithelial Cells. **Nutrients**, v. 15, n. 6, p. 1504, 21 mar. 2023.

181. LIU, F.-C. et al. Corilagin reduces acetaminophen-induced hepatotoxicity through MAPK and NF-κB signaling pathway in a mouse model. **American Journal of Translational Research**, v. 12, n. 9, p. 5597–5607, 2020.
182. DE, R. et al. Antimicrobial activity of ellagic acid against Helicobacter pylori isolates from India and during infections in mice. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 6, p. 1595–1603, 1 jun. 2018.
183. VELOZ-GARCÍA, R. et al. Antimicrobial activities of cascalote (Caesalpinia cacalaco) phenolics-containing extract against fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. **Industrial Crops and Products**, v. 31, n. 1, p. 134–138, jan. 2010.
184. PEREIRA, M. T. M. et al. The in vivo anti-inflammatory potential of Myrciaria glazioviana fruits and its chemical profile using mass spectrometry. **Food Bioscience**, v. 38, p. 100777, dez. 2020.
185. ODUN-AYO, F.; CHETTY, K.; REDDY, L. Determination of the ursolic and oleanolic acids content with the antioxidant capacity in apple peel extract of various cultivars. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, 2022.
186. NASCIMENTO, P. DO et al. Antibacterial and Antioxidant Activities of Ursolic Acid and Derivatives. **Molecules**, v. 19, n. 1, p. 1317–1327, 21 jan. 2022.
187. ZHANG, Q. et al. Pharmacognostic Study on *Elsholtzia ciliata* (Thumb.) Hyl: Anatomy, Phytochemistry and Pharmacological Activities. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 11, p. 1152, 12 nov. 2021.
188. FREIRE, J. DOS S. Perfil fitoquímico, atividade antioxidante e citogenotoxicidade da catingueira (*Poincianella bracteosa* (Tul.) L.P. Queiroz). **Teresina-Programa de Pós-Graduação em Química- Universidade Estadual do Piauí.**, 2020.
189. JUNIOR, E. P. D. VALE et al. Protective effect of kavain in meristematic cells of *Allium cepa* L. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 94, n. 2, 2022.
190. BIANCHI, J.; CASIMIRO FERNANDES, T. C.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of mitotic and chromosomal abnormalities on *Allium cepa* cells by pesticides imidacloprid and sulfentrazone and the mixture of them. **Chemosphere**, v. 144, p. 475–483, fev. 2016.
191. KUCK, K. et al. Terpenoids from Myrrh and Their Cytotoxic Activity against HeLa Cells. **Molecules**, v. 28, n. 4, p. 1637, 8 fev. 2023.
192. MARTÍN-CORDERO, C. et al. Cytotoxic Triterpenoids from *Erica andevalensis*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 56, n. 1–2, p. 45–48, 1 fev. 2001.
193. DEVAPPA, R. K.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. *Jatropha* Diterpenes: a Review. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, n. 3, p. 301–322, 28 mar. 2011.
194. KORNEL, A.; NADILE, M.; TSIANI, E. Evidence of the Beneficial Effects of Ursolic Acid against Lung Cancer. **Molecules**, v. 27, n. 21, p. 7466, 2 nov. 2022.

195. PANDA, S. S.; THANGARAJU, M.; LOKESHWAR, B. L. Ursolic Acid Analogs as Potential Therapeutics for Cancer. **Molecules**, v. 27, n. 24, p. 8981, 16 dez. 2022.
196. ÇAVUŞOĞLU, D. et al. Mitigative effect of green tea extract against mercury (II) chloride toxicity in *Allium cepa* L. model. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 19, p. 27862–27874, 4 abr. 2022.
197. CHATTERJEE, N.; WALKER, G. C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 58, n. 5, p. 235–263, 9 jun. 2017.
198. FELICIDADE, I. et al. Mutagenic and antimutagenic effects of aqueous extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) on meristematic cells of *Allium cepa*. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 4, p. 9986–9996, 2014.
199. BARCELOS, G. R. M. et al. Evaluation of Antigenotoxic Effects of Plant Flavonoids Quercetin and Rutin on <scp>HepG2</scp> Cells. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 9, p. 1381–1388, 24 set. 2011.
200. ROBERTO, M. M. et al. Antigenotoxicity and antimutagenicity of ethanolic extracts of Brazilian green propolis and its main botanical source determined by the *Allium cepa* test system. **Genetics and Molecular Biology**, v. 39, n. 2, p. 257–269, 24 de maio, 2016.
201. SILVA, D. S. B. S. et al. Investigation of protective effects of *Erythrina velutina* extract against MMS induced damages in the root meristem cells of *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 2, p. 273–278, mar. 2013.
202. DORMOUSOGLOU, M. et al. Investigation of the Genotoxic, Antigenotoxic and Antioxidant Profile of Different Extracts from *Equisetum arvense* L. **Antioxidants**, v. 11, n. 7, p. 1393, 18 jul. 2022.
203. STAVROPOULOU, L. S. et al. Phytochemical Profile and Evaluation of the Antioxidant, Cyto-Genotoxic, and Antigenotoxic Potential of *Salvia verticillata* Hydromethanolic Extract. **Plants**, v. 13, n. 5, p. 731, 5 mar. 2024.

Apêndice A*

HRMS-ESI

APÊNDICE A – Espectros ESI(-) obtidos para o extrato etanólico das cascas do caule da *P. bracteosa*.

