

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ**

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**PERFIL FITOQUÍMICO, ATIVIDADE  
ANTIOXIDANTE E CITOGENOTOXICIDADE DA  
CATINGUEIRA (*Poincianella bracteosa* (Tul.) L.P.  
Queiroz)**

**JAMILSON DOS SANTOS FREIRE**

**ORIENTADOR(A): PROF. DRA FRANCIELLE ALLINE MARTINS**

**COORIENTADOR(A): PROF. DRA SÂMYA DANIELLE LIMA DE FREITAS**

Teresina – PI  
2020

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ**

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**PERFIL FITOQUÍMICO, ATIVIDADE  
ANTIOXIDANTE E CITOGENOTOXICIDADE DA  
CATINGUEIRA (*Poincianella bracteosa* (Tul.) L.P.  
Queiroz)**

**JAMILSON DOS SANTOS FREIRE**

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: Síntese Orgânica e Prospecção Fitoquímica  
Orientadora: Prof(a). Dr(a). Francielle Aline Martins  
Coorientadora: Prof(a). Dr(a). Sâmya Danielle Lima de Freitas

Teresina – PI

2020

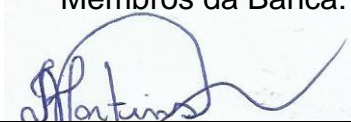
**PERFIL FITOQUÍMICO, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E  
CITOGENOTOXICIDADE DA CATINGUEIRA (*Poincianella bracteosa*  
(Tul.) L.P. Queiroz)**

**JAMILSON DOS SANTOS FREIRE**

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: Síntese Orgânica e Prospecção Fitoquímica

Aprovado em 14 de outubro de 2020.

Membros da Banca:



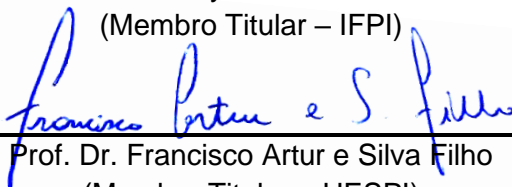
---

Profa. Dra. Francielle Aline Martins  
(Presidente da Banca – UESPI)



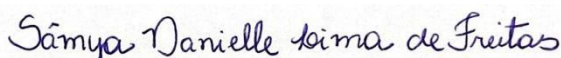
---

Prof. Dr. Jurandy do Nascimento Silva  
(Membro Titular – IFPI)



---

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



---

Profa. Dra. Sâmia Danielle Lima de Freitas  
(Membro Titular – UFPI)

---

Profa. Dra. Valdiléia Teixeira Uchôa  
(Membro Suplente – UESPI)

Teresina – PI

2020

*Dedico este trabalho a minha  
família, que muito me apoiou e  
incentivou a realizá-lo*

## AGRADECIMENTOS

---

- ❖ A Deus por todas as oportunidades concedidas, pela saúde, sabedoria e paciência que me fizeram chegar até aqui.
- ❖ A minha querida família, pelo apoio, carinho e incentivo durante essa árdua caminhada.
- ❖ A Universidade Estadual do Piauí pelo o financiamento da bolsa de estudos.
- ❖ A minha orientadora, Profa Dra. Francielle Aline Martins, pela orientação, entusiasmo, amizade, incentivo e pelos valiosos conhecimentos transmitidos ao longo do mestrado.
- ❖ A minha coorientadora, Dr.<sup>a</sup> Sâmia Danielle Lima de Freitas, quero agradecer por ter aceitado o convite em fazer parte deste trabalho e reconhecimento com gratidão a confiança depositada em mim desde o início, mas também a sua orientação e carinho.
- ❖ Ao técnico Jurandy do Nascimento Silva – Instituto Federal do Piauí campus zona sul, Laboratório de análise de Alimento, pela colaboração na realização dos experimentos de atividade antioxidante e fenólicos totais.
- ❖ Ao Prof Dr. Joaquim Soares da Costa Júnior e a MS<sup>a</sup> Maria das Dores – Instituto Federal do Piauí, Laboratório de Química Orgânica e Produtos Naturais, colaboração nas análises de HPLC.
- ❖ Aos colegas e amigos do laboratório de produtos naturais da Universidade Federal do Piauí (LPN/UFPI), pela amizade, auxílio nos experimentos e ótima convivência, em especial a Andréa, Rodrigo Araújo, João Paulo, Evaldo, Renato, Lildes, Rodrigo Santiago e Joshua.
- ❖ Aos meus amigos (a) da turma de mestrado em Química pelo companheirismo, pelas vivências partilhadas e amizade ao longo destes anos, e pelos momentos de descontração que tornaram a caminhada mais divertida, são eles (a) e Amanda, Andressa, Francisco de Assis, Julielson, Palloma, Tatiana, Francisco Leonardo, Regiane, Maria, Patrícia e Renata.
- ❖ A turma do Labgene (UESPI), principalmente a Bianca Cristina dos Santos Fernandes, Erasmo Pereira do Vale Júnior, Júlia Adelaide Cardeal da Silva, que ajudaram na montagem do experimento.
- ❖ As instituições de Ensino UESPI, UFPI e IFPI por colaborarem com seus laboratórios para a realização desta pesquisa.

*“Cada pessoa deve trabalhar para o seu  
aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da  
responsabilidade coletiva por toda a humanidade.”*

*(Marie Curie)*

## RESUMO

FREIRE, J. S. **PERFIL FITOQUÍMICO, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CITOGENOTOXICIDADE DA CATINGUEIRA (*Poincianella bracteosa* (Tul.) L.P. Queiroz)**. 2020. 98 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual do Piauí. Teresina.

*Poincianella bracteosa* (Tul.) L. P. Queiroz, conhecida como catingueira, é uma espécie amplamente usada para o tratamento de infecções renais, hipertensão, cólica intestinal e anemia. O Avaliar o perfil fitoquímico, atividade antioxidante, citogenotoxicidade e antigenotoxicidade da catingueira (*P. bracteosa*). A espectroscopia de infravermelho revelou bandas características de grupo O-H no EE e frações polares (FE e FA), indicando a presença de compostos hidroxilados na Catingueira. Foi observado grupos metila (CH<sub>3</sub>) e metileno (CH<sub>2</sub>), sugerindo a presença de cadeia alifática em FH. Na verificação dos perfis cromatográficos por CLAE-DAD nas frações FE e FA, foi possível registrar a presença de duas classes de metabólitos secundários, taninos hidrolisáveis (elagitaninos e galotaninos) e flavonoides. A análise por ESI-IT/MS<sup>n</sup> permitiu a identificação 7 compostos fenólicos: ácido gálico, ácido quínico, elágico, amentoflavona, corilagina, ácido chebulático e castalagina. FE teve maior teor de fenólicos totais (441,23 ± 1,82 mg EAG/g), enquanto FH registrou maior conteúdo de flavonoides totais (84,77 ± 4,34 mg EQ/g). Maior atividade antioxidante foi observada na FE (CE<sub>50</sub> 25,06 ± 0,1 µg/mL). Efeito citotóxico foi observado para todas as frações no ensaio *A. cepa*. No ensaio de antigenotoxicidade, observou-se o efeito protetor da FE e FA que atuaram modulando a ação mutagênica do MMS inibindo principalmente a ocorrência micronúcleos. FE foi considerada a mais promissora, pois não foi genotóxica, apresentou atividade protetora contra aos danos induzidos pelo MMS e ainda apresentou atividade citotóxica. Este é primeiro relato de identificação de compostos fenólicos na espécie *P. bracteosa*.

**Palavras-chave:** Catingueira, Compostos fenólicos, Efeito protetor; Mutagênese; Plantas Medicinais

## ABSTRACT

FREIRE, J.S. **PHYTOCHEMICAL PROFILE, ANTIOXIDANT ACTIVITY AND CYTOGENOTOXICITY OF CATINGUEIRA (*Poincianella bracteosa* (Tul.) L.P. Queiroz). 2020. 98 p.** Dissertation (Master in Chemistry) - State University of Piauí. Teresina.

*Poincianella bracteosa* (Tul.) L. P. Queiroz, known as catingueira, is a species widely used to treat kidney infections, hypertension, intestinal colic and anemia. O Assess the phytochemical profile, antioxidant activity and cytogenotoxicity of catingueira (*Poincianella bracteosa*). Infrared spectroscopy revealed characteristic bands of group O-H in EE and polar fractions (EF and AF), indicating the presence of hydroxylated compounds in Catingueira. Methyl (CH<sub>3</sub>) and methylene (CH<sub>2</sub>) groups were observed, suggesting the presence of an aliphatic chain in HF. In the verification of the chromatographic profiles by CLAE-DAD in the EF and AF fractions, it was possible to register the presence of two classes of secondary metabolites, hydrolyzable tannins (ellagitanins and galotanins) and flavonoids. The analysis by ESI-IT / MS<sup>n</sup> allowed the identification of 7 phenolic compounds: gallic acid, quinic acid, ellagic acid, amentoflavone, corilagine, chebulatic acid and castalagine. EF had a higher content of total phenolics (441.23 ± 1.82 mg EAG / g), while HF registered a higher content of total flavonoids (87.77 ± 4.34 mg EQ / g). Greater antioxidant activity was observed in EF (EC<sub>50</sub> 25.06 ± 0.1 µg / mL). Cytotoxic effect was observed for all fractions in the *A. cepa* assay. In the antigenotoxicity test, the protective effect of EF and AF that acted by modulating the mutagenic action of MMS was observed, mainly inhibiting the occurrence of micronuclei. EF was considered to be the most promising, as it was not genotoxic, had protective activity against the damage induced by MMS and also presented cytotoxic activity. This is the first report of identification of phenolic compounds in the species *P. bracteosa*.

**Keywords:** Catingueira; *Poincianella bracteosa*, phenolic compounds, Protective effect; Mutagenesis



## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 2.1.</b>	<i>Poincianella bracteosa</i> : (2.1a) Fotografia da Árvore; (2.1b) folhas e (2.1c) flores .....	23
<b>Figura 2.2.</b>	Reações de biossintéticas de formação de ácido arselínico e florocetofenona por condensação de acetilSCoA e malonilSCoA.....	28
<b>Figura 2.3.</b>	Reação de oxirredução entre DPPH e Quercetina.....	31
<b>Figura 2.4.</b>	Redução do radical ABTS <sup>•+</sup> por um antioxidante.....	32
<b>Figura 2.5.</b>	Equipamento de Spectrum 100 FT-IR da marca Perkin Elmer .....	33
<b>Figura 2.6.</b>	Esquema de Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD).....	34
<b>Figura 2.7.</b>	Representação esquemática de uma fonte ESI operada em positivo modo de íon .....	36
<b>Figura 3.1.</b>	Fluxograma da partição líquido-líquido do extrato EE das folhas de <i>P. bracteosa</i> .....	39
<b>Figura 3.2.</b>	Reação de redução do reagente Folin-Ciocalteu pelo ácido gálico ...	43
<b>Figura 3.3.</b>	Curva padrão de ácido gálico.....	44
<b>Figura 3.4.</b>	Formação do complexo Quercetina-Al, em solução metanólica de alumínio.....	44
<b>Figura 3.5.</b>	Curva padrão de quercetina.....	45
<b>Figura 4.1.</b>	Espectro de FTIR de <i>P. bracteosa</i> . a) Extrato etanólico (EE); b) Fração Hexânica (FH); c) Fração Acetanólica (FA) e d) Fração etérea (FE)....	51
<b>Figura 4.2.</b>	Cromatograma do EE de <i>P. bracteosa</i> obtido através de análise exploratório. a) com HCN/H <sub>2</sub> O; b) com MeOH/H <sub>2</sub> O, as letras em negrito indicam os compostos majoritários analisados a posteriori .....	53
<b>Figura 4.3.</b>	Espectros no ultravioleta dos compostos majoritários observados no cromatograma obtido através da análise exploratório de MeOH/H <sub>2</sub> O do EE das folhas de <i>P. bracteosa</i> .....	54
<b>Figura 4.4.</b>	Cromatograma das frações <i>P. bracteosa</i> obtido através de análise exploratório com MeOH/H <sub>2</sub> O. a) Fração etérea (FE); b) Fração acetanólica (FA), as letras em negrito indicam os compostos majoritários analisados a posteriori.....	55
<b>Figura 4.5.</b>	Espectros no ultravioleta dos compostos majoritários do cromatograma obtido através da análise exploratório de MeOH/H <sub>2</sub> O da FE de <i>P. bracteosa</i> .....	56
<b>Figura 4.6.</b>	Espectros no ultravioleta dos compostos majoritários do cromatograma obtido através da análise exploratório de MeOH/H <sub>2</sub> O da FA de <i>P. bracteosa</i> .....	57

<b>Figura 4.7.</b>	Perfil químico do EE das folhas de <i>P. bracteosa</i> obtido por ESI-IT/MS <sup>n</sup> .....	58
<b>Figura 4.8.</b>	Estruturas dos constituintes químicos identificados no EE das folhas de <i>P. bracteosa</i> por ESI-IT/MS <sup>n</sup> .....	59
<b>Figura 4.9.</b>	a) Espectro MS do íon de $m/z$ 169 (Ácido gálico) e b) Proposta de fragmentação do ácido gálico $m/z$ 169 [M-H] <sup>-</sup> .....	60
<b>Figura 4.10.</b>	a) Espectro MS <sup>2</sup> do íon $m/z$ 191 (ácido quínico) e b) Proposta de fragmentação do ácido quínico $m/z$ 191 [M-H] <sup>-</sup> .....	62
<b>Figura 4.11.</b>	a) Espectro MS <sup>2</sup> do íon $m/z$ 301 (ácido elágico) e b) Proposta de fragmentação do ácido elágico $m/z$ 301 [M-H] <sup>-</sup> .....	63
<b>Figura 4.12.</b>	a) Espectro MS <sup>2</sup> do íon $m/z$ 537 (amentoflavona) e b) Proposta de fragmentação da amentoflavona $m/z$ 537 [M-H] <sup>-</sup> .....	64
<b>Figura 4.13.</b>	a) Espectro MS <sup>2</sup> do íon $m/z$ 633 (Corilagina) e b) Proposta de fragmentação da corilagina $m/z$ 633 [M-H] <sup>-</sup> .....	65
<b>Figura 4.14.</b>	a) Espectro MS <sup>2</sup> do íon $m/z$ 953 (ácido chebulático) e b) Proposta de fragmentação do ácido chebulático $m/z$ 953 [M-H] <sup>-</sup> .....	67
<b>Figura 4.15.</b>	a) Espectro MS <sup>2</sup> do íon $m/z$ 965 (Castalagina) e b) Proposta de fragmentação da corilagina $m/z$ 965 [M-H] <sup>-</sup> .....	68

## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 2.1.</b>	Principais terpenos encontrados nas plantas.....	25
<b>Tabela 4.1.</b>	Identificação por espectrometria de massas constituintes químicos do extrato, fração, e substância isolada das folhas de <i>Poincianella bracteosa</i> .....	61
<b>Tabela 4.2.</b>	Resultado da prospecção fitoquímica das frações hexânica (FH), etérea (FE) e acetanólica (FA) de folhas de <i>P. bracteosa</i> .....	69
<b>Tabela 4.3.</b>	Teor de compostos fenólicos e flavonoides totais das frações hexânica (FH), etérea (FE) e acetanólica (FA) de folhas de <i>P. bracteosa</i> .....	70
<b>Tabela 4.4.</b>	Atividade antioxidante das frações hexânica (FH), etérea (FE) e acetanólica (FA) das folhas de <i>P. bracteosa</i> .....	72
<b>Tabela 4.5.</b>	Média do índice, média das alterações cromossômicas e porcentagem de redução de danos (%RD) nas células meristemáticas de <i>A. cepa</i> para avaliar mutagenicidade e antimutagenicidade (pré, simultâneo e pós-tratamento) após exposição à FH e aos controles .....	75
<b>Tabela 4.6.</b>	Média do índice, média das alterações cromossômicas e porcentagem de redução de danos (%RD) nas células meristemáticas de <i>A. cepa</i> para avaliar mutagenicidade e antimutagenicidade (pré, simultâneo e pós-tratamento) após exposição à FE e aos controles .....	76
<b>Tabela 4.7.</b>	Média do índice, média das alterações cromossômicas e porcentagem de redução de danos (%RD) nas células meristemáticas de <i>A. cepa</i> para avaliar mutagenicidade e antimutagenicidade (pré, simultâneo e pós-tratamento) após exposição à FA e aos controles .....	77
<b>Tabela 4.8.</b>	Média dos tipos de alterações cromossômicas em células meristemáticas de <i>A. cepa</i> para avaliar mutagenicidade e antimutagenicidade (pré, simultâneo e pós-tratamento) após exposição à fração hexânica (FH) das folhas de <i>P. bracteosa</i> e aos controles ....	78
<b>Tabela 4.9.</b>	Média dos tipos de alterações cromossômicas em células meristemáticas de <i>A. cepa</i> para avaliar mutagenicidade e antimutagenicidade (pré, simultâneo e pós-tratamento) após exposição à fração etérea (FE) das folhas de <i>P. bracteosa</i> e aos controles.....	79
<b>Tabela 4.10.</b>	Média dos tipos de alterações cromossômicas em células meristemáticas de <i>A. cepa</i> para avaliar mutagenicidade e antimutagenicidade (pré, simultâneo e pós-tratamento) após exposição à fração acetanólica (FA) das folhas de <i>P. bracteosa</i> e aos controles.	80

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

---

**%RD** – Percentagem de redução de danos

**Abs** – Absorbância

**ABTS** – 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

**AC** – Aderência cromossômica

**AM** – Anáfase multipolar

**BN** – Broto nuclear

**CB** – Célula binucleada

**CE<sub>50</sub>** – Concentração efetiva necessário para reduzir a concentração inicial em 50%

**CLAE-DAD** – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de arranjo de diodos

**Cm** – C-metáfase

**CN** – Controle negativo

**CP** – Célula poliploides

**CP** – Controle positivo

**DMSO** – Dimetilsulfóxido

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico

**DP** – Desvio padrão

**DPPH** – 2,2-difinil-1-picril-hidrazil

**EAG** – Equivalente grama de ácido gálico

**EE** – Extrato etanólico

**EMBRAPA** – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

**Eq** – Equivalente grama

**ESI** – Ionização por eletrospray

**ESI – ITMS** - Eletrospray ionization ion trap mass spectrometry

**FA** – Fração acetanólica

**FE** – Fração etérea

**FH** – Fração hexânica

**FTIR**– Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

**IM** – índice mitótico

**IT** – Ion trap

**LABGENE** – Laboratório de Genética

**LAPETRO** – Laboratório de Petróleo

**LPN** – Laboratório de Produtos Naturais

***m/z*** – Relação massa/carga

**MMS** – Metilmetanossulfonato

**MN** – Micronúcleo

**OMS** – Organização mundial da saúde

**PC** – Ponte cromossômica

**PT** – Ponte cromossômica

**QC** – Quebra cromossômica

**TCF** – Teor de compostos flavonoides

**TCP** – Teor de compostos fenólico

**TEAC** – Capacidade antioxidante equivalente ao trolox

**UV-Vis** – Ultravioleta visível

## SUMÁRIO

---

<b>CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....</b>	<b>177</b>
1.1 Introdução .....	17
1.2	
Objetivos.....	<b>Erro!</b>
<b>Indicador não definido..</b>	<b>18</b>
1.2.1 Gerais .....	18
1.2.2 Específicos .....	18
<b>CAPÍTULO 2 – REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>20</b>
2.1 Plantas medicinais .....	20
2.2 Família Fabaceae.....	21
2.3 Gênero <i>Poincianella</i> .....	22
2.3.1 <i>Espécie Poincianella bracteosa</i> .....	22
2.4 Detecção de fitoquímicos .....	24
2.4.1 Terpenos .....	25
2.4.2 Compostos fenólicos .....	26
2.4.3 Compostos contendo nitrogênio (N) e enxofre (S) .....	29
2.5 Atividade Antioxidante .....	30
2.5.1 Método DPPH.....	30
2.5.2 Método ABTS .....	31
2.6 Caracterização da estrutura molecular.....	32
2.6.1 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) .....	32
2.6.2 Cromatográfica Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD).....	33
2.6.3 Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray (ESI-IT- MS <sup>n</sup> ).....	35
2.7 Atividade biológica – <i>Allium cepa</i> .....	36
<b>CAPÍTULO 3 – METODOLOGIA EXPERIMENTAL .....</b>	<b>38</b>
3.1 Coleta do material vegetal.....	38
3.2 Preparo e fracionamento do EE das folhas de <i>P. bracteosa</i> .....	38
3.3 Análise Espectroscópica de Infravermelho.....	39
3.3.1 Caracterização do EE e frações das folhas de <i>P. bracteosa</i> .....	39

3.4	Análise cromatográfica (CLAE-DAD) .....	40
3.4.1	Análise do EE das folhas de <i>P. bracteosa</i> .....	40
3.5	Análise por ESI-IT/MS <sup>n</sup> do EE das folhas de <i>P. bracteosa</i> .....	40
3.6	Prospecção Fitoquímica das frações .....	41
3.6.1	Teste para flavonoides .....	41
3.6.2	Teste para fenóis e taninos .....	41
3.6.3	Teste para saponinas .....	41
3.6.4	Teste para alcaloides .....	42
3.6.5	Teste para flavonóis, flavonas, xantonas .....	42
3.6.6	Teste para catequinas .....	42
3.6.7	Teste para terpenos .....	42
3.6.8	Teste para depsídeos/depsidonas.....	42
3.7	Teor de Compostos Fenólicos (TCF) .....	43
3.8	Teor de Flavonoides Totais (TFT) .....	44
3.9	Atividade Antioxidante .....	45
3.10	Atividade Biológica – Bioensaio <i>Allium cepa</i> .....	47
3.11	Análise Estatística .....	48
<b>CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>		<b>50</b>
4.1	Rendimento do EE e frações das folhas de <i>P. bracteosa</i> .....	50
4.2	Análise espectroscópica de Infravermelho .....	50
4.2.1	Caracterização do EE e frações das folhas de <i>P. bracteosa</i> .....	50
4.3	Análise de perfis cromatográficos (CLAE-DAD) .....	52
4.3.1	Análise dos perfis cromatográficos do EE e frações das folhas de <i>P. bracteosa</i> .....	52
4.4	Análise por ESI-IT-MS <sup>n</sup> do EE das folhas de <i>P. bracteosa</i> .....	61
4.5	Prospecção Fitoquímica .....	73
4.6	Teor de Compostos Fenólicos (TCF) .....	74
4.7	Teor de Flavonoides Totais (TFT) .....	75
4.8	Atividade Antioxidante .....	75
4.9	Atividade Biológica – <i>Allium cepa</i> .....	77
<b>CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>		<b>89</b>
<b>CAPÍTULO 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>		<b>91</b>

# Capítulo 1

## INTRODUÇÃO

---

### 1.1 Introdução

As plantas medicinais são as principais fontes de medicamentos tradicionais com uma grande variedade de moléculas bioativas, que são eficazes para aliviar ou erradicar infecções e doenças como neurodegenerativas crônicas, diabetes e câncer que afetam a população <sup>1</sup>. A eficácia depende do uso de parte adequada da planta e de suas atividades farmacológicas que, por sua vez, dependem da presença, quantidade e natureza do metabólito secundário presente nas espécies vegetais <sup>2</sup>.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca 80% da população de países em desenvolvimento utiliza-se de práticas tradicionais na atenção primária à saúde e, desse total, 85% fazem uso de plantas medicinais <sup>3,4</sup>. No Brasil, diferentes fatores têm contribuído para o uso de plantas medicinais, tais como o alto custo de medicamentos alopáticos, o difícil acesso da maioria da população a assistência médica, a carência de recursos dos órgãos públicos e a tendência dos consumidores em utilizar preferencialmente produtos de origem natural <sup>5,6</sup>.

Dentre as diversas plantas de uso medicinal pela população, destaca-se a *Poincianella bracteosa* (Tul.) L.P. Queiroz (Fabaceae), conhecida popularmente como catingueira, pau-de-rato, catinga-de-porco, estaladeira, mané-ventura, pau-de-bica e catingueira-preta <sup>7,8</sup>.

*P. bracteosa* é uma espécie endêmica do Brasil, encontrada nos Biomas Caatinga e Cerrado, disseminada nas regiões Norte (Tocantins), Nordeste (Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Piauí) e Centro-oeste (Goiás, Mato Grosso) <sup>7</sup>. Na medicina tradicional, as folhas e cascas são usadas no tratamento de infecções renais e catarrais, hipertensão, cólica intestinal, diarreias, gases, hepatite e anemia <sup>9–11</sup>. As cascas são utilizadas como cicatrizante, indigestão, enxaqueca, febre, estimulante de apetite, antiagregante plaquetário <sup>7</sup>. As flores são empregadas para tratar resfriado, gripe, doenças hepáticas, gastrite e flatulência <sup>12</sup>. Na forma de chá



ou garrafadas, as cascas e frutos são utilizados no tratamento de bronquite, inflamação da próstata, flatulência, má digestão e infecção intestinal <sup>13</sup>.

Um dos principais problemas associado ao consumo de plantas medicinais é a percepção da população que os produtos naturais ou fitoterápicos são inócuos, excluindo a possibilidade de uma reação adversa ou efeito tóxico. Toda planta apresenta alguma toxicidade em determinada dosagem, que através do contato, inalação ou ingestão pode acarretar danos à saúde, tanto as pessoas como para os animais. A utilização de bioensaio para monitoramento da bioatividade de extrato, frações e compostos isolados de plantas tem sido frequentemente incorporada à pesquisa fitoquímica <sup>14</sup>.

Dentre os diversos protocolos de estudos, o teste de *Allium cepa* é um excelente bioindicador para avaliar níveis de toxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de plantas medicinais, devido ao seu baixo custo, confiabilidade e concordância com outros testes de genotoxicidade, auxiliando os estudos de prevenção de danos à saúde humana <sup>15</sup>. Assim, o objetivo deste estudo foi realizar a caracterização fitoquímica, citogenotoxicidade e antigenotoxicidade da espécie de *P. bracteosa*.

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 Gerais

Avaliar o perfil fitoquímico, atividade antioxidante, citogenotoxicidade e antigenotoxicidade da catingueira (*Poincianella bracteosa*).

### 1.2.2 Objetivos específicos

- ✓ Determinar o perfil químico do extrato etanólico de *P. bracteosa* através da utilização de técnicas instrumentais analíticas: IV, HPLC e ESI-IT/MS<sup>n</sup>;
- ✓ Identificar os principais compostos presentes no extrato etanólico das folhas de *P. bracteosa* por espectrometria de massas com ionização por electrospray e inserção direta em espectrômetro de massas com analisador tipo armadilha de íons (ESI-IT/MS<sup>n</sup>);

- ✓ Traçar o perfil químico das frações FE e FA por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD)
- ✓ Determinar o teor total de compostos fenólicos e flavonoides das frações hexânica (FH), etérea (FE) e acetanólica (FA) do extrato etanólico das folhas de *P. bracteosa*;
- ✓ Investigar a atividade antioxidante da FH, FE e FA pelos métodos DPPH e ABTS;
- ✓ Verificar os grupos funcionais presentes nas frações FH, FE e FA por espectroscopia de infravermelho;
- ✓ Avaliar o potencial citogenotóxico e antigenotóxico da FH, FE e FA nas concentrações (2; 4; 8 e 16 mg/mL).

# Capítulo 2

## REFERENCIAL TEÓRICO

---

### 2.1 Plantas Medicinais

A utilização de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade <sup>16</sup>. Estudos relatam que, desde 3000 a.C., os sumérios na Mesopotâmia detinham receitas e referências a vários medicamentos de ervas registradas em tabuinhas de argila gravadas com estilete em escrita cuneiforme. Também existem relatos do uso de plantas medicinais em quase todas as civilizações. Os egípcios, por exemplo, usavam técnicas para embalsamar mortos desde 2300 a.C <sup>17</sup>.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca 80% da população de países em desenvolvimento utiliza-se de práticas tradicionais na atenção primária à saúde e, desse total, 85% fazem uso de plantas medicinais <sup>3,4</sup>. O Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, estimada em cerca de 20% do número total de espécies do planeta. Esse imenso patrimônio genético, já escasso nos países desenvolvidos, tem na atualidade valor econômico-estratégico inestimável em várias atividades, mas é no campo do desenvolvimento de novos medicamentos onde reside sua maior potencialidade <sup>18</sup>. De acordo com a Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde (ABIFISA), o mercado de fitoterápicos movimenta cerca de US\$ 20 bilhões todos os anos e está em ascensão, principalmente pelo interesse das pessoas por mais qualidade de vida <sup>19</sup>.

Devido ao desenvolvimento de efeitos adversos e resistência microbiana aos fármacos sintetizados quimicamente, as pessoas se voltaram para o uso de produtos naturais. Isso promoveu a descoberta de milhares de fitoquímicos, presente nas plantas, como alternativas seguras e amplamente eficazes com menos efeitos adversos. Esses fitoquímicos apresentam uma grande variedade estrutural e são

responsáveis pelas atividades biológicas das plantas como atividade anticâncer, antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, analgésica e cicatrizante <sup>20,21</sup>.

A cultura do uso de plantas e de outras fontes naturais com propriedade terapêuticas vem sendo cada vez mais valorizada, e isso tem proporcionado uma crescente validação científica das propriedades farmacológicas de espécies vegetais, desenvolvimento de novos métodos analíticos para o controle de qualidade, difusão de novas formas de preparações e administração das drogas vegetais e produtos fitoterápicos. Esses avanços são facilmente compreensíveis quando se analisa a quantidade de medicamento obtidos direta ou indiretamente de produtos naturais <sup>22</sup>.

No Brasil, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, propagadas por gerações através do conhecimento empírico. Muitas vezes essas plantas são, inclusive, empregadas para fins medicinais diferentes daqueles utilizados pelos indígenas <sup>23</sup>. Essa falta de informação também está presente entre os profissionais de saúde, fazendo com que os mesmos não estimulem o uso de plantas medicinais e não tenham conhecimento para esclarecer as dúvidas da população, sobre o uso correto das plantas medicinais e fitoterápicos <sup>24</sup>. Em razão disso, os estudos científicos envolvendo produtos naturais estão, cada vez mais, englobando áreas interdisciplinares e mostram uma tendência evolutiva em termos tecnológicos que poderá levar a uma redução drástica do diferencial observado na relação número de vegetais existentes/espécies estudadas <sup>25</sup>.

## 2.2 Família Fabaceae

A Fabaceae ou Leguminosae é a terceira maior família entre as angiospermas, depois das Orchidaceae e Asteraceae, composta por 751 gêneros e cerca de 19.500 espécies de árvores, arbustos, trepadeiras e ervas em todo o mundo <sup>26</sup>. É a segunda maior família de plantas medicinais, contendo mais de 490 espécies utilizadas como medicina tradicional <sup>27</sup>. A família Fabaceae também é dividida em seis subfamílias Caesalpinioideae, Cercidoideae, Detarioideae, Dialioideae, Duparquetioideae e Papilionoideae <sup>28</sup>.

As espécies desta família também são usadas na síntese com uma grande variedade de produtos naturais incluindo sabores, venenos, corantes, cola natural e

para fixação de nitrogênio no solo, convertendo o nitrogênio atmosférico em compostos nitrogenados úteis, usados para o crescimento das plantas. Isso é feito pelas bactérias do gênero *Rhizobium* presente nos nódulos radiculares das leguminosas <sup>29</sup>.

## 2.3 Gênero *Poincianella*

*Poincianella* pertencente à subfamília Caesalpinioideae e consiste em mais de 500 espécies distribuídas em todo o mundo. A maioria das espécies desse gênero são endêmicas. *Poincianella* sp é um gênero pantropical de espécies lenhosas na África, Ásia e América <sup>30</sup>. As espécies desse gênero apresentam como árvores, arbustos, e lianas, geralmente com espinhos, troncos lenhosos e as folhas são alternadas, compostas, pari a imparipinadas ou bipinadas <sup>31</sup>. As flores são vistosas, os frutos do tipo legume e as plantas são facilmente propagadas por sementes.

Apresentam elevado valor socioeconômico devido seu emprego como plantas ornamentais, hortícolas, plantas medicinais ou produtora de madeira. Além disso, também contribui para a biodiversidade das florestas onde cresce, ajudando a proteger o solo e fornecer cobertura para a vida selvagem <sup>30</sup>.

Estudos anteriores mostraram que as espécies desse gênero exibiam uma ampla gama de atividades farmacológicas, como atividades anticâncer, antiinflamatória, antipirética, antimicrobiana, antioxidante, antipirética, antiproliferativa, citotóxica, antiviral, antimalárica, antirreumática, antiulcerosa e antidiabética. A investigação química revela a presença de triterpenóides, diterpenos, flavonóides, esteroides e compostos fenólicos nesse gênero <sup>32</sup>.

### 2.3.1 *Poincianella bracteosa*

*Poincianella bracteosa* é conhecida popularmente como catingueira, pau-de-rato, catinga-de-porco, estaladeira, mané-ventura, pau-de-bica e catingueira-preta, havendo sinônimo botânicos *Caesalpinia bracteosa* <sup>7,8</sup>. Trata-se de uma espécie endêmica do Brasil, encontrada nos Biomas Caatinga e Cerrado, disseminada nas regiões Norte (Tocantins), Nordeste (Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Piauí) e Centro-oeste (Goiás, Mato Grosso) <sup>7</sup>.

Morfologicamente é caracterizada como uma planta de médio porte, podendo alcançar entre 3-10 metros de altura (Figura 2.1a), possui tronco de coloração

acinzentado e abundância em lenticelas esbranquiçadas <sup>33</sup>. As folhas (Figura 2.1b) são bipinadas com 5-11 folíolos alternados, e quando novas, elas têm coloração levemente rosada <sup>34</sup>. Essa espécie contém flores (Figura 2.1c) que emitem odor adocicado, possui pétalas amarelas com pontuações avermelhadas dispostas em racinos curtos <sup>9</sup>. O fruto do tipo vagem, achatada com ápice agudo, deiscente, de 8-11 cm de comprimento e cerca de 2 cm de largura, de cor castanho claro, contém de 5-7 sementes quiescentes <sup>8</sup>.



Fonte: RCPOL <sup>35</sup>

**Figura 2.1** – *Poincianella bracteosa*: (2.1a) Fotografia da Árvore; (2.1b) folhas e (2.1c) flores

Na medicina tradicional, as folhas e cascas de *P. bracteosa* são usadas no tratamento de infecções renais e catarrais, hipertensão, cólica intestinal, diarreias, gases, hepatite e anemia <sup>9,11,33</sup>. As cascas são utilizadas como cicatrizante, enxaqueca, febre, estimulante de apetite e antiagregante plaquetário <sup>7</sup>. Enquanto as flores, empregada para tratar resfriado, gripe, doenças hepáticas, gastrite,

verminoses e flatulência <sup>12</sup>. Na forma de chá ou garrafadas, as cascas e frutos são utilizados no tratamento de bronquite, inflamação da próstata, flatulência, má digestão e infecção intestinal <sup>13</sup>.

Estudos fitoquímicos têm revelado a presença de alcaloides, flavonóis, flavanonóis, flavanonas, taninos condensados, triterpenos e xantonas nas raízes de *P. bracteosa* <sup>36</sup>. Nas cascas, a presença de açúcares redutores e taninos hidrolisados foi detectada <sup>37</sup> enquanto nas folhas observou a presença alcaloides, açúcares redutores e taninos <sup>11,38</sup>.

## 2.4 Detecção de fitoquímicos

As plantas produzem uma grande quantidade de componente orgânicos divididos em metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários são moléculas que desempenham funções essenciais nos organismos vegetais, tais como: fotossíntese, respiração e transporte de soluto. São elas os açúcares, aminoácidos, lipídios, proteínas e os ácidos nucleicos <sup>39</sup>.

Os metabólitos secundários atuam na adaptação das plantas aos seus ambientes como defesa contra microrganismos, parasitas, proteção contra herbívoros e apresentam grande importância ecológica, uma vez que podem atuar na atração de polinizados <sup>40</sup>. Também representam uma fonte de substâncias farmacologicamente ativas empregadas como medicamentos, cosméticos, inseticidas e corantes. Além disso, apresentam distribuição restrita tanto dentro da planta quanto entre diferentes espécies da família <sup>41</sup>. Alguns exemplos de metabólitos secundários são os compostos fenólicos, terpenoides e alcaloides.

A triagem fitoquímica de uma espécie vegetal se mostra muito importante, principalmente quando se objetiva caracterizar a presença de uma ou mais classes de metabólitos secundários que podem ser responsáveis pelas ações farmacológicas da espécie em estudo. Metabólitos secundários nas plantas podem ser divididos em três grupos distintos quimicamente: terpenos, compostos fenólicos e componentes contendo nitrogênio (N) e enxofre (S) <sup>42</sup>.

Os métodos para detecção de classe dos metabólitos secundários variam desde testes qualitativos a técnicas cromatográficas, espectroscópicas e espectrométricas capazes de identificar e quantificar os compostos presentes numa espécie vegetal <sup>43</sup>.

### 2.4.1 Terpenos

Os terpenos são compostos orgânicos derivados de unidades isoprenos de cinco carbonos ( $C_5H_8$ ) formadas e modificadas de diferentes maneiras. Com base no número de unidades de isopreno em uma molécula, os terpenos podem ser classificados como mono- ( $C_{10}$ ), sesqui- ( $C_{15}$ ), di- ( $C_{20}$ ) e triterpenos ( $C_{30}$ ) (Tabela 2.1). Monoterpenos e a maioria dos sesquiterpenos são compostos voláteis e são componentes primários de óleos essenciais. Os diterpenos apresentam baixa volatilidade, altos pontos de ebulição e são considerados resinas. Os triterpenos são geralmente sólidos de alto ponto de fusão <sup>44</sup>.

**Tabela 2.1** - Principais terpenos encontrado nas plantas

Isoprenos	Átomos de carbonos	Nome	Exemplo
1	5	isopreno	Cadeia lateral das citocininas
2	10	monoterpenos	Limoneno, geraniol
3	15	sesquiterpenos	Artemisinina, humuleno
4	20	diterpenos	Salvipisona, giberelina
6	30	triterpenos	Escaleno, cortisona

Fonte: PRAKASH <sup>44</sup>

As principais propriedade farmacológicas associadas a esses compostos incluem atividades antimicrobiana, antifúngica, antiviral, anti-hiperglicêmica, analgésica, antiinflamatória e antiparasitária <sup>45</sup>. Fisiologicamente, terpenos funcionam principalmente como quimioatraentes ou quimiorrepelentes e são os grandes responsáveis pela fragrância característica de muitas plantas <sup>46</sup>.

O teste mais comumente usado para a identificação dos terpenos é a reação de Liebermann-Burchard. Essa reação consiste no tratamento da amostra com anidrido acético na presença de ácido acético e algumas gotas de ácido sulfúrico. Ocorre, assim, a desidratação seguida de oxidação do sistema de anéis do ciclopentanoperidrofenantreno dando formação a um esteroide aromático que é evidenciado pelo aparecimento de uma coloração azul esverdeada <sup>47</sup>.

Dentro do grupo dos terpenos, as saponinas são uma classe importante de triterpenos que nas plantas desempenham um importante papel na defesa contra



insetos e microrganismos <sup>48</sup>. A detecção de saponinas, em geral ocorre quando emprega-se o teste de formação de espuma, que consiste na diluição da amostra em metanol na presença de ácido inorgânico diluído (por exemplo, HCl) <sup>49</sup>.

### **2.4.2 Compostos fenólicos**

Compostos fenólicos são substâncias que possuem pelo menos um anel aromático no qual ao menos um hidrogênio é substituído por um agrupamento hidroxila. A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras que tem importante papel na prevenção de doenças como diabetes, cardíacas, artrite, aterosclerose e câncer <sup>50</sup>. Esses compostos estão amplamente distribuídos no reino vegetal, englobando desde estruturas simples, como ácido gálico, vanilina e ácido ferúlico, até polifenólicas como flavonoides, antraquinonas e polímeros derivados desses vários grupos (taninos) <sup>51</sup>.

Em geral os compostos fenólicos são detectados pela ação de oxidantes, tais como o cloreto de férrico ( $\text{FeCl}_3$ ), que os oxidam em substâncias coradas. O desenvolvimento de coloração azul ou verde-azulada desses produtos de oxidação confirma sua presença em extrato hidroalcoólico do material vegetal fresco ou seco <sup>52</sup>.

#### **a) Flavonoides**

Os flavonoides representam um dos grupos de fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos naturais. A estrutura básica dos flavonoides é constituída de quinze átomos de carbono arranjados em três anéis ( $\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$ ), sendo dois anéis benzeno (A e B) e um pirano (cadeia heterocíclica C) acoplada ao anel A <sup>53</sup>.

Os flavonoides estão associados a um amplo espectro de efeitos promotores de saúde e são um componente indispensável em uma variedade de aplicações farmacêuticas, medicinais e cosméticas. Isto é devido às suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimutagênicas e anticarcinogênicas <sup>54</sup>.

Para a caracterização de flavonoides alguns ensaios se mostraram eficazes como um estágio preliminar de análise. As cores obtidas nos ensaios variam conforme o núcleo, o número e a disposição dos substituintes hidroxilados <sup>49</sup>. A reação mais comum é a de cianidina, Shinoda ou hidrogenação, que se baseia na redução dos flavonoides de coloração amarela em compostos de cor vermelhada ou,

no caso dos antociânicos, azulada. A redução efetua-se na presença de magnésio metálico como agente redutor e ácido clorídrico para tornar o meio ácido <sup>55</sup>.

Os flavonoides podem ser classificados de acordo com a origem biossintética. Algumas classes, por exemplo chalconas, flavanonas, flavonas, isoflavonas, são intermediários na biossíntese, bem como produtos finais que podem se acumular nos tecidos vegetais. Outras classes são conhecidas apenas como produtos finais da biossíntese, por exemplo antocianinas, proantocianidinas, flavonas e flavonóis <sup>54</sup>. Duas classes adicionais de flavonoides são aquelas em que a cadeia lateral de 2-fenil da flavanona isomeriza para a posição 3, dando origem a isoflavonas e isoflavonoides relacionados <sup>56</sup>.

As catequinas são um grupo de compostos polifenólicos pertencentes à classe de flavonoides presentes em altas concentrações em uma variedade de frutas, vegetais e bebidas à base de plantas. Estruturalmente são caracterizadas por apresentarem dois anéis de benzeno e um heterociclo de di-hidropirano com um grupo hidroxila na posição 3 <sup>57</sup>. A sua detecção ocorre através na reação com ácido sulfúrico concentrado, que na presença de água podem produzir uma solução fortemente amarelada<sup>49</sup>.

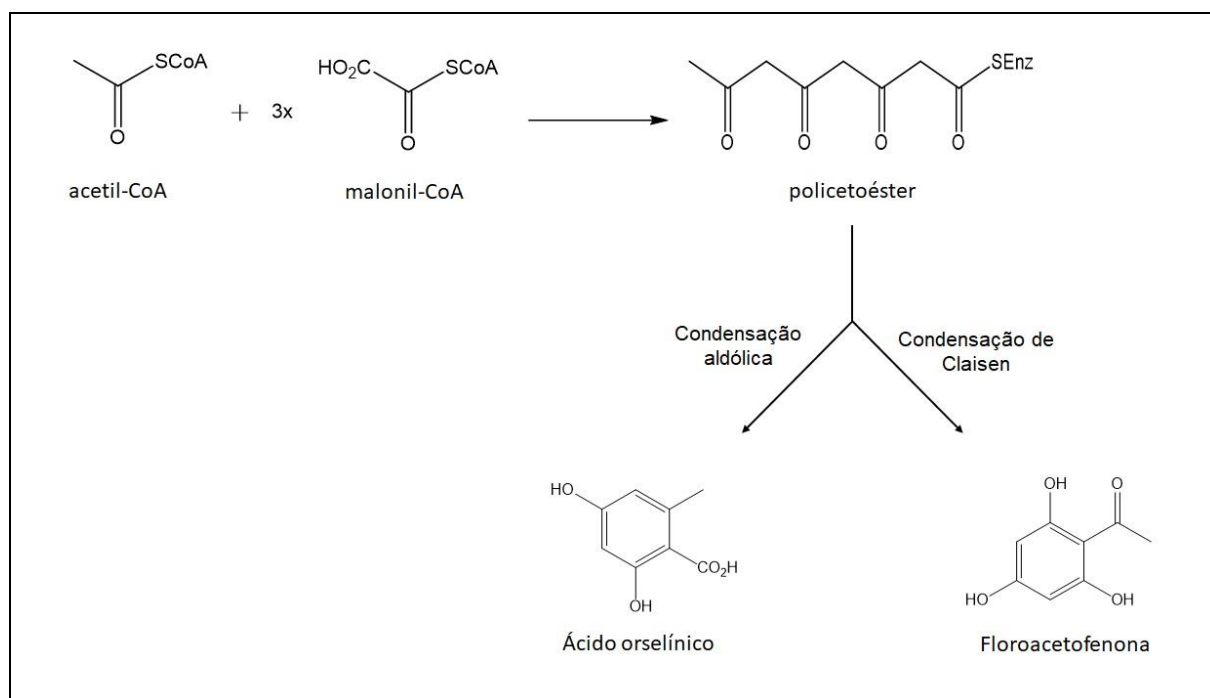
#### b) Fenóis e Taninos

Taninos são compostos polifenólicos distribuídos nas plantas, alimentos e bebidas. Segundo sua estrutura esses polifenólicos são classificados em dois grandes grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Taninos hidrolisáveis (ou galotaninos e elagitaninos) são caracterizados por um poliol central, geralmente  $\beta$ -D-glicose, cujas funções hidroxilas são esterificadas como o ácido gálico. Taninos condensados, ou proantocianidinas, são oligômeros e polímeros formado pela condensação de duas ou mais unidades flavan-3,4-diol e flavan-3,4-diol <sup>58</sup>.

Os métodos detecção dos taninos envolve as reações de coloração ou precipitação. Taninos hidrolisáveis e condensados podem ser diferenciados através da reação de Stiasny (HCl concentrado e formol), ocorrendo precipitação destes últimos; no sobrenadante, pode-se detectar a presença dos taninos hidrolisáveis através, por exemplo, da reação com cloreto de férrico, com desenvolvimento de cor azul <sup>49</sup>.

#### c) Depsídeos e depsidonas

Esses metabólitos fazem parte dos compostos fenólicos, ocorrendo em líquens, fungos e vegetais superiores. O ácido orselínico é a unidade fundamental na biossíntese de depsídeos e depsidonas. O processo biossintético inicia-se com a condensação de 1 mol de acetilSCoA e 1 mol de malonilSCoA <sup>59</sup>. A acetoacetilSCoA, resultante desta união, pode condensar com duas outras moléculas de malonilSCoA em etapas sucessivas, formando um policetídeo de 8 carbonos (Figura 2.2). Este último pode ser ciclizado através de dois processos distintos: um deles por condensação aldólica produzindo ácido orselínico, e o outro por condensação tipo Claisen, produzindo floroacetofenona <sup>60</sup>.



Fonte: DEWICK <sup>61</sup>

**Figura 2.2** – Reações de Biossíntese e de formação de ácido orselínico e floroacetofenona por condensação de acetilSCoA e malonilSCoA

Muitos depsídeos/depsidonas apresentam grande potencial farmacológico, possuindo atividades importantes, entre as quais antioxidante, antimicrobiana, citotóxica, antitumoral, antimicobacteriana, anti-inflamatória, analgésica e antiviral <sup>62</sup>.

Para detecção da presença de depsídeos e depsidonas, a amostra deve ser dissolvida em éter etílico, acrescentado metanol e FeCl<sub>3</sub> a 1 %. O aparecimento de coloração verde, azul ou cinza, indica a presença desses compostos <sup>63</sup>.

### 2.4.3 Compostos contendo nitrogênio (N) e enxofre (S)

#### a) Alcaloides

São compostos orgânicos cíclicos que possuem pelo menos um átomo de nitrogênio no seu anel, e são encontrados predominantemente nas angiospermas. Esses compostos naturais têm muitas estruturas e, portanto, são altamente variáveis. Devido a isso, são divididos em vários grupos grandes, como pirrolidina, piridina, quinolina, isoquinolina, indol e quinazolina <sup>64</sup>.

Os compostos com enxofre são derivados de aminoácidos. Existe duas classes de compostos contendo átomos de enxofre de importância biológica: glicosilados e aliina. Os glicosilados apresentam uma unidade de açúcar ligada a uma aglicon. A alicina (dialiltiosulfinato) é o composto volátil derivado da aliina, organossulfurado, pró-oxidante imediatamente produzido após a ruptura dos tecidos do alho (*Allium sativum* L.) <sup>65</sup>. As técnicas cromatográficas são as mais utilizadas para análise de compostos com enxofre <sup>49</sup>.

Embora a maioria dos alcaloides seja farmacologicamente ativa ou venenosa em altas doses, existem alguns alcaloides nos alimentos que costumam ser consumidos diariamente. Cafeína, teobromina e teofilina são os "alcaloides purínicos" mais comumente conhecidos, que são encontrados principalmente no café, cacau feijão e folhas de chá <sup>66</sup>.

Tendo em vista a heterogeneidade química e a sua grande quantidade, os alcaloides não podem ser identificados em extrato vegetais com apenas um único critério cromatográfico. Normalmente, os métodos de detecção são precedidos de extração e consistem em reações de precipitação com reativos específicos. A maioria dos alcaloides precipitam em soluções neutras ou levemente ácidas pelos reagentes de Mayer (solução de iodeto de potássio e cloreto de mercúrio), Wagner ou Bouchardat (solução de iodo e iodeto de potássio) e Dragendorff (solução de iodeto de potássio e subnitrato de bismuto) <sup>49</sup>.

## 2.5 Atividade Antioxidante

As células produzem constantemente radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs) como parte do processo metabólico. Essas espécies reativas são geralmente neutralizadas pelos sistemas antioxidantes presentes nos organismos.

Desta forma, o estado de estresse oxidativo pode resultar tanto de um aumento na produção de EROs, quanto da redução da capacidade antioxidante celular que pode levar ao aparecimento de doenças como doenças cardíacas, Parkinson e câncer <sup>67</sup>.

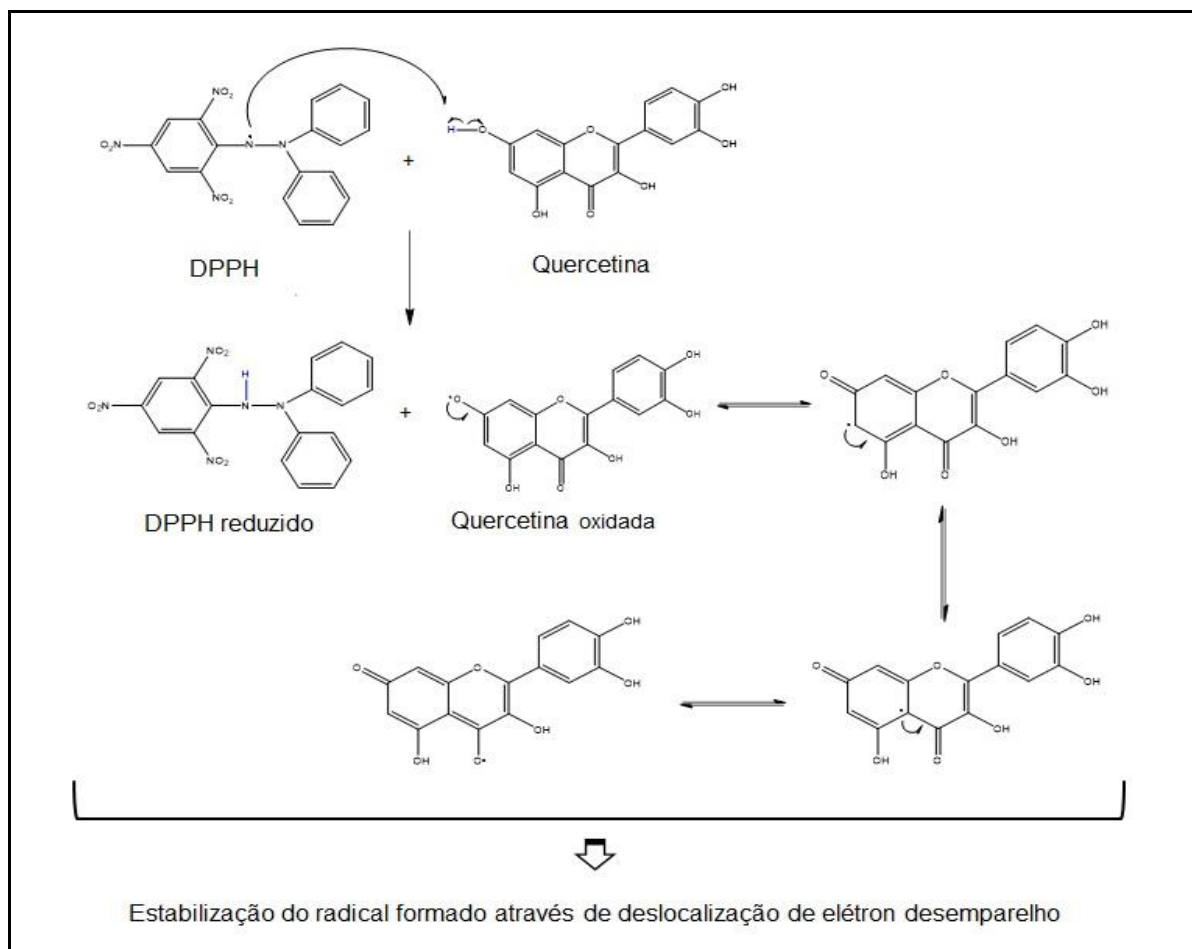
Uma dieta rica em leguminosas de frutas e vegetais, reduz significativamente o risco do desenvolvimento dessas doenças <sup>52</sup>. Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrências natural, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por suas propriedades redutoras e inibição da peroxidação lipídica. Vários tipos de antioxidantes estão presentes nas plantas, como os de natureza hidrofílicas e lipofílicas <sup>68</sup>.

Uma combinação de métodos deve ser utilizada para avaliar a atividade antioxidante dos produtos naturais, assim é possível contemplar toda a diversidade de polaridade existente nos metabólitos secundários das plantas. Os métodos atualmente empregados podem ser classificados em duas categorias que são: transferência de átomos de hidrogênio e transferências de elétrons <sup>69</sup>.

Dentre os métodos baseados na transferência de átomos de hidrogênio podemos destacar a redução do radical DPPH•.

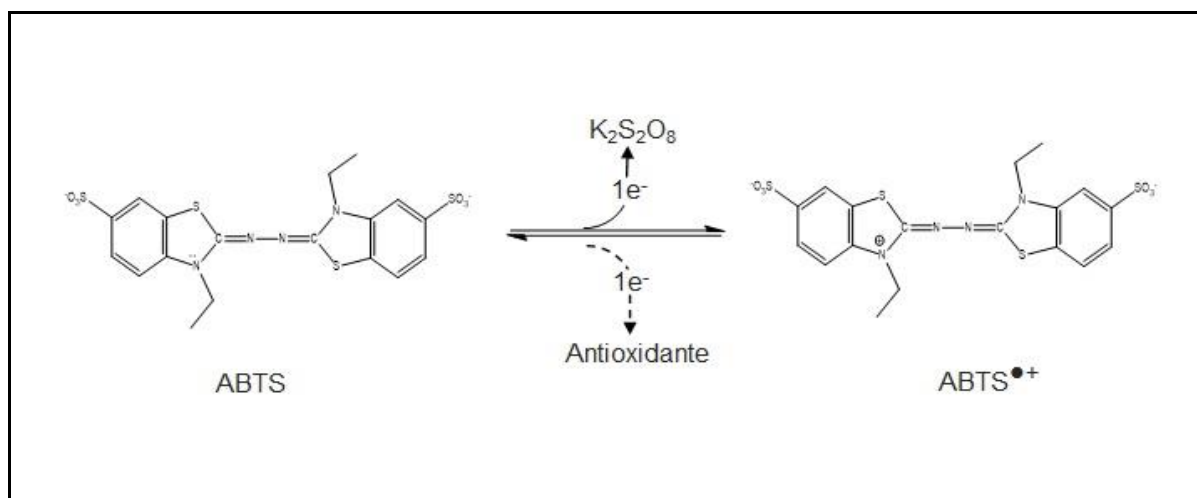
### **2.5.1 Método DPPH**

Redução do radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilidrazil): este método se baseia numa análise qualitativa e quantitativa do grau de atividade antioxidante e na habilidade das substâncias atuarem como sequestradora ou capturadoras de radicais livres <sup>70</sup>. A molécula de DPPH• é um radical livre em virtude da deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula. Esse desemparelhamento confere uma coloração roxa para a solução do radical, caracterizada por uma banda de absorção em cerca de 517 nm <sup>71</sup>. Quando em contato com substância que age como doadora de átomos de hidrogênio, o DPPH é reduzido a hidrazina com mudança simultânea na coloração de violeta a amarelo pálido (Figura 2.3).

Fonte: TSIMOGIANNIS <sup>72</sup>**Figura 2.3** – Reação de oxirredução entre DPPH e Quercetina

### 2.5.2 Método de ABTS

O método ABTS representa o grupo dos métodos que ocorre por transferência de elétrons. Esse método é baseado na habilidade dos antioxidantes em doar elétrons para o radical ABTS<sup>•+</sup>. Este radical de coloração azul esverdeado deve ser gerado por meio de reação do ABTS com persulfato de potássio que possui absorção máxima em 734 nm. O radical ABTS é produzido a partir do ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfônico <sup>73</sup>. Em contato com uma solução desse radical, os antioxidantes promovem a redução do cátion ABTS a ABTS provocando uma perda de coloração no meio reacional (Figura 2.4). Apresenta excelente estabilidade, sendo um dos métodos mais rápidos de atividade antioxidante, reprodutível e oferecer uma boa solubilidade em meios orgânicos e aquoso, permitindo análise de compostos tanto de natureza lipofílica como hidrofílica <sup>74</sup>.

Fonte: VENKATACHALAM <sup>75</sup>**Figura 2.4** – Redução do radical ABTS<sup>•+</sup> por um antioxidante

## 2.6 Caracterização da estrutura molecular

### 2.6.1 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia na região do infravermelho é um tipo de espectroscopia de absorção que usa a região do infravermelho no espectro eletromagnético. A região infravermelha do espectro eletromagnético se estende de 14.000 a 50 cm<sup>-1</sup> e é dividida em três áreas: o infravermelho distante de 400 a 50 cm<sup>-1</sup>; região infravermelha do meio de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup>, que é uma região bastante interessante do espectro para o estudo de compostos orgânicos, porque as bandas de absorção são devidas à vibração de um determinado agrupamento funcional <sup>76</sup>.

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica de caracterização fitoquímica mais usada para a análise de compostos bioativos presente nos extratos vegetais <sup>77</sup>. A popularidade dessa técnica é devido à velocidade de análise, facilidade de preparação das amostras, pouca quantidade de amostra e não requer uso de solventes o que é mais econômico. A espectroscopia no infravermelho médio tem sido comumente utilizada para a identificação estrutural ou determinação qualitativa da “impressão digital” de compostos orgânicos, porque alguns grupos de átomos exibem frequências de absorção de vibração características nesta região infravermelha do espectro eletromagnético <sup>78</sup>.

A localização exata das bandas correspondentes depende da influência do restante da molécula. As frequências de absorção no infravermelho médio, características dos grupos funcionais, são uma ferramenta útil e valiosa para a análise qualitativa e contribuem para a elucidação estrutural total das moléculas estudadas. Além disso, a espectroscopia no infravermelho médio é passível de aplicações de análises quantitativas, porque as intensidades das bandas no espectro são proporcionais à concentração de seus respectivos grupos funcionais <sup>79</sup>. A Figura 2.5 exibe o equipamento utilizado para análises de infravermelho.



Fonte: PERKINELMER <sup>80</sup>

**Figura 2.5** – Equipamento de Spectrum 100 FT-IR da marca Perkin Elmer

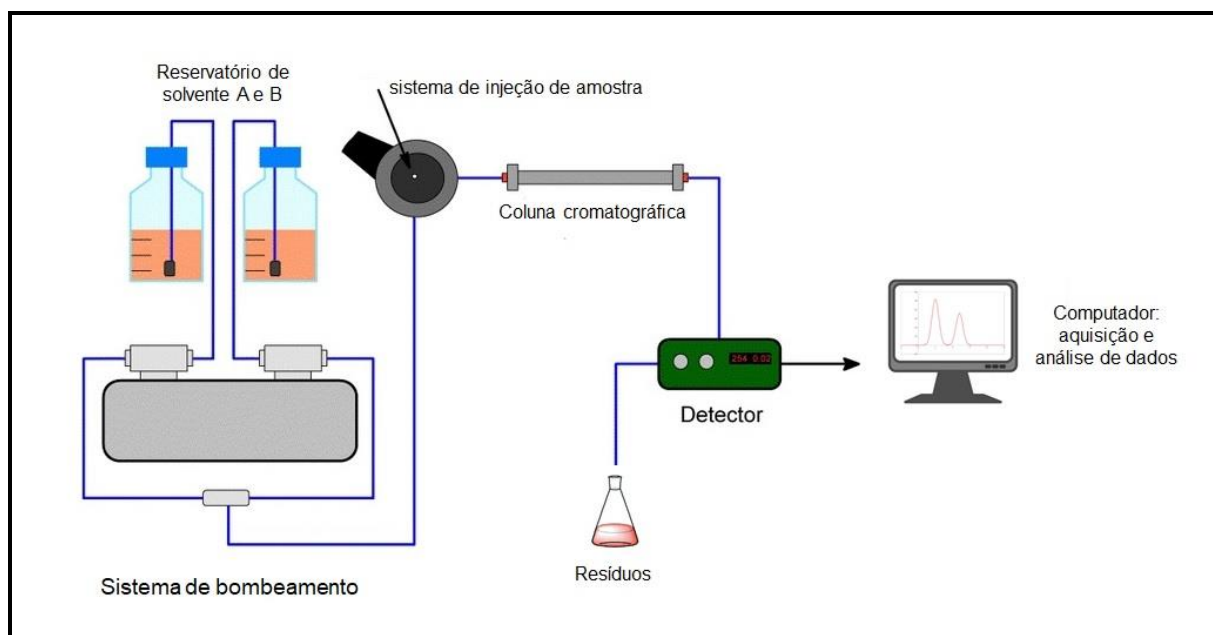
### **2.6.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD)**

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é reconhecida desde o início dos anos 80 como a técnica mais versátil para a separação eficiente de produtos naturais diretamente em misturas brutas, sem a necessidade de preparação complexas de amostras <sup>81</sup>. A CLAE se desenvolveu ao longo dos anos em termos de conveniência, velocidade, escolha das fases estacionárias da coluna, alta sensibilidade, aplicabilidade a uma ampla variedade de matrizes de amostras e



capacidade de hifenizar o método cromatográfico em detectores espectroscópicos<sup>82,83</sup>.

Entre as diferentes fases estacionárias (fase normal e reversa) mais utilizadas em CLAE, a cromatografia em fase reversa é a técnica de separação mais usada para isolamento e quantificação dos componentes de uma mistura devido à sua ampla gama de aplicações (Figura 2.6)<sup>84</sup>.



Fonte: BOLIGON<sup>85</sup>

**Figura 2.6** – Esquema de Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD)

Estima-se que mais de 65% de todas as separações por CLAE são realizadas no modo de fase reversa. As razões para isso incluem a simplicidade, versatilidade, uso de fases móveis de menor custo por ter água, possibilidade de empregar a eluição por gradiente e finalidade do método de fase reversa, pois ele é capaz de lidar com compostos de polaridade e massa molecular diversas como, por exemplo, para identificação dos metabólitos secundários presentes nos extratos de plantas medicinais<sup>86</sup>.

Com a expansão no uso de fitoterápicos em todo o mundo, seu controle de qualidade tem sido uma preocupação importante tanto para as autoridades de saúde quanto para o público. Entre uma variedade de métodos de controle de qualidade, a CLAE ganhou popularidade entre várias técnicas analíticas como a principal escolha para o estudo de impressões digitais no controle de qualidade de plantas herbáceas

### **2.6.3 Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray (ESI-IT/MS<sup>n</sup>)**

A Espectrometria de massas (EM) é comumente considerada como uma técnica instrumental para a separação de espécies eletricamente carregadas na fase gasosa, conforme a sua razão massa/carga ( $m/z$ )<sup>88</sup>. Trata-se de uma ferramenta poderosa e versátil, pois fornece informações qualitativas e quantitativas sobre a composição elementar, isotópica e molecular de amostras orgânicas e inorgânicas. Além disso, as amostras podem ser analisadas a partir do gás, líquido ou estado sólido, e as massas que podem ser estudadas variam de únicos átomos (vários Daltons) a proteínas (mais de 300.000 Daltons)<sup>89</sup>.

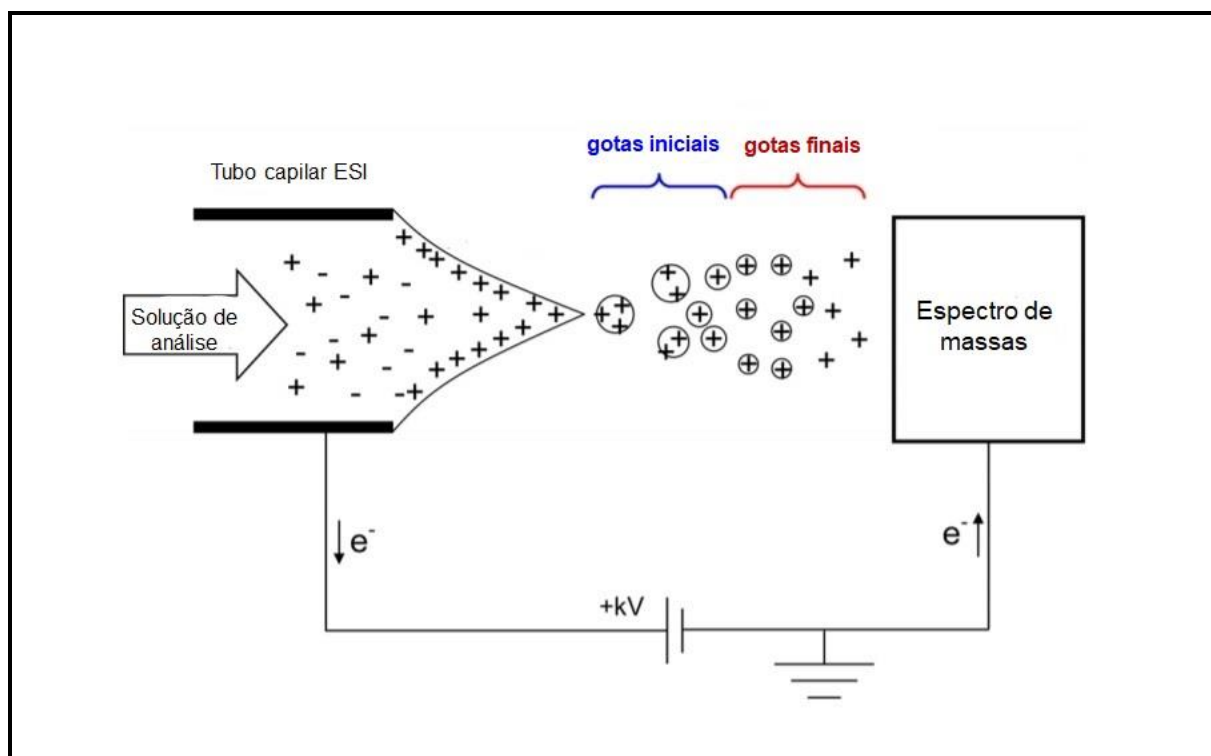
Para que a análise por EM seja aplicada é necessário a remoção ou adição de um próton em uma molécula neutra a fim de produzir íons que o equipamento será capaz de detectar. Os íons detectados podem corresponder às moléculas originais, seus fragmentos ou outras espécies formadas durante o processo de ionização<sup>90</sup>. O EM permite a identificação direta de moléculas com base na razão massa/carga, bem como nos padrões de fragmentação. Assim, as análises realizadas nos espectrômetros de massas podem ser feitas no modo de íons positivos ou negativos<sup>91</sup>.

Integrados aos avanços na Espectrometria de massas (EM) estão os desenvolvimentos na tecnologia de ionização, que está em constante evolução por causa da variedade de amostras que podem ser ionizadas, aprimoramentos na instrumentação e otimização na evolução de novas técnicas para ionizar analitos de interesse<sup>92</sup>.

A Ionização pelo processo de Electrospray (ESI) foi desenvolvida inicialmente por Malcolm Dole em 1968, e aplicada a produção de íons biomoleculares na fase gasosa pelo químico John Bennett Fenn<sup>93,94</sup>. Esse processo surgiu para atender a necessidade de analisar quantitativamente as macromoléculas biológicas, pois já estava claro que em muitos subcampos da bioquímica (por exemplo, proteômica) não se podia avançar sem a análise molecular quantitativa. Fato esse constatado pelo emprego de técnicas clássicas como ionização por elétrons (EI), onde somente moléculas voláteis e termo estáveis poderiam ser ionizadas<sup>88</sup>.

A fonte ESI (Figura 2.7) tem a capacidade de ionizar moléculas de variada massa molecular, polares e de grande complexidade, tais como proteínas e ácidos

nucléicos. Além disso, a baixa energia fornecida no processo de ionização por ESI faz com que os íons formados sofram pouca fragmentação, produzindo espectros menos complexos, facilitando a identificação das diversas classes presentes <sup>95</sup>.



Fonte: KONEMANN <sup>96</sup>

**Figura 2.7** - Representação esquemática de uma fonte ESI operada em positivo modo de íon

## 2.7 Atividade Biológica – *Allium cepa*

Bioensaios com vegetais superiores apresentam características que os tornam excelentes modelos genéticos para avaliação de poluentes ambientais e potencial mutagênicos de agente químicos <sup>97</sup>. Os bioensaios são utilizados como indicadores de efeitos citogenéticos e mutagênicos produzidos por substâncias presentes nos produtos naturais, principalmente extratos vegetais e seus derivados <sup>98</sup>.

Existe vários indicadores biológicos de citogenotoxicidade de extrato de plantas medicinais, dentre eles podemos citar o sistema *A. cepa* que é um excelente bioindicador para avaliar diversos parâmetros genéticos, como mutações e aberrações cromossômicas, pois possui grandes cromossomos em números reduzidos ( $2n=16$ ), facilitando a visualização das alterações citogenéticas. Essas

alterações observadas durante o ciclo celular podem ser classificadas como genotóxica e mutagênicas, por meio das anormalidades cromossômicas e formação de micronúcleos (MNs), respectivamente <sup>99</sup>.

As vantagens de se utilizar o sistema *A. cepa* estar no seu baixo custo, confiabilidade, sensibilidade, boa correlação com outros sistemas teste de mamíferos e que o processo de divisão celular de suas raízes assemelha-se em muito ao processo de divisão celular humano. Além disso, é um bioensaio validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP), visto como instrumento de extrema eficiência para monitoramento *in situ* da genotoxicidade de substâncias químicas <sup>100</sup>.

Nesse contexto, dada à importância da *P. bracteosa* no cenário das plantas medicinais brasileiras e os escassos estudos científicos acerca de sua composição fitoquímica e atividade biológica é que o objetivo deste estudo foi realizar a caracterização fitoquímica, citogenotóxica e avaliar potencial antioxidativo do extrato etanólico e das frações hexânica, etérea e acetanólica das folhas da espécie.

# Capítulo 3

## METODOLOGIA EXPERIMENTAL

---

### 3.1 Coleta do material vegetal

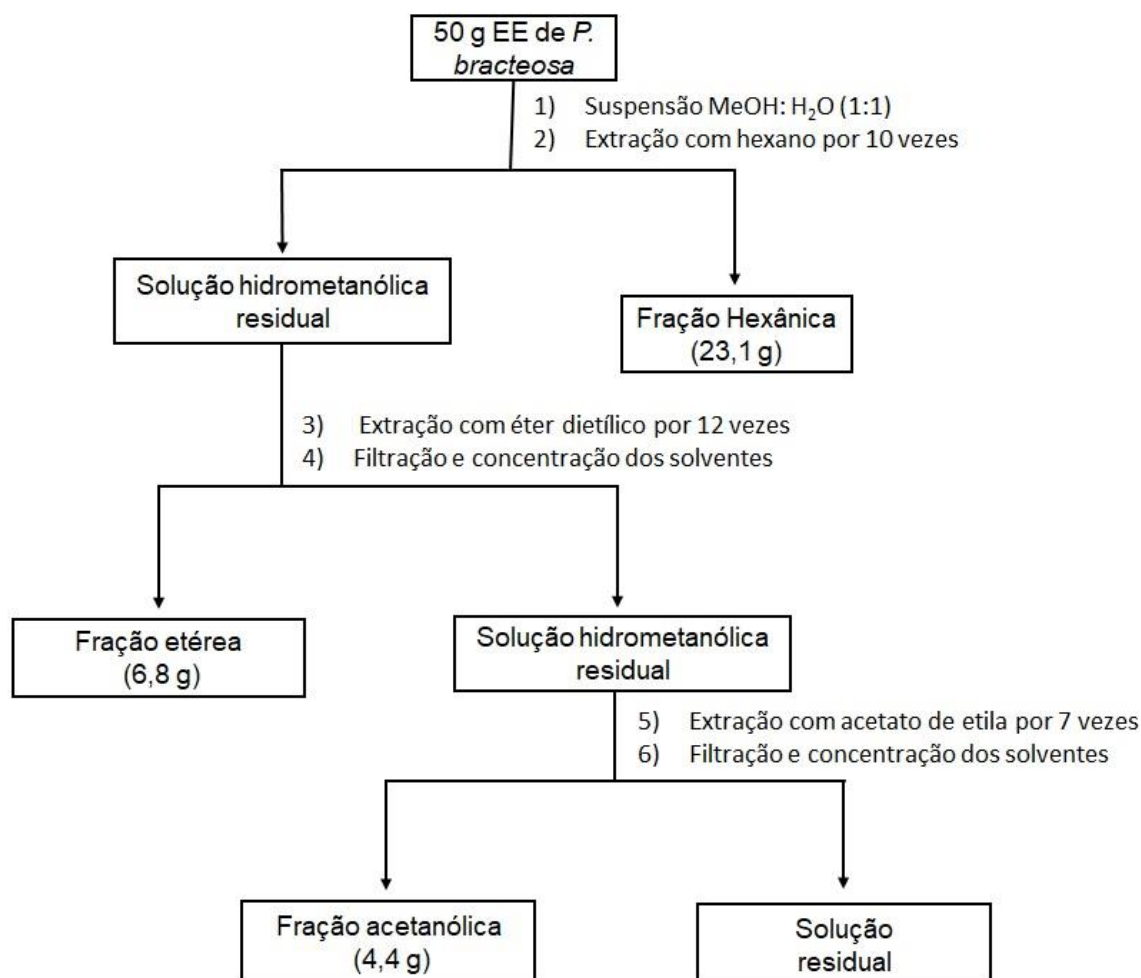
Após cadastro no SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado) sob o número sob o A17B921, folhas de *P. bracteosa* foram coletadas na Empresa Brasileira de Agropecuária (Embrapa - Meio Norte) em Teresina (PI). A amostra foi identificada pelo botânico e professor Dr. Francisco Soares Santos Filho da Universidade Estadual do Piauí (UESPI) e a exsiccata foi depositada no Herbário Afrânio Gomes Fernandes UESPI sob o número de voucher HAF 03635. Sementes de *A. cepa* (cv. Vale Ouro IPA – 11) foram adquiridas comercialmente junto ao Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), Recife, Brasil.

### 3.2 Preparação e fracionamento do extrato etanólico das folhas de *P. bracteosa*

O material vegetal foi higienizado e seco em estufa à 45 °C por cinco dias e triturado em liquidificador doméstico até a obtenção de 1000 g do pó fino. No Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal Piauí (LPN/UFPI), as folhas pulverizadas foram submetidas ao processo de maceração a frio com o solvente orgânico álcool etílico 99,5% (Dinâmica) mantendo-as em recipiente fechado e em contato com o líquido extrator por um período de 72 hs para a liberação de metabólitos secundários do material vegetal. O extrato etanólico (EE) foi filtrado e seco a 40 °C em evaporador rotativo (Fisatom, 550) e, em seguida, liofilizado (Thermo, modulyod-115).

O EE foi fracionado por partição líquido-líquido com solventes de polaridades crescentes: 1 L de hexano (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>), 1,2 L de éter dietílico (C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O) e 0,7 L de acetato de etila (C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>). A partição foi realizada a partir de 50 g do EE diluído em uma solução hidrometanólica a 50%, a fim de obter as frações hexânica (FH: 23,1 g),

etérea (FE: 6,8 g) e acetanólica (FA: 4,4 g). O fluxograma a seguir ilustra o procedimento de preparo das frações (Figura 3.1).



**Figura 3.1** - Fluxograma da partição líquido-líquido do extrato EE das folhas de *P. bracteosa*

### 3.3 Análise Espectroscópica de Infravermelho

#### 3.3.1 Caracterização do EE e frações das folhas de *P. bracteosa*

O EE das folhas de *P. bracteosa* foi analisado através da técnica de Espectroscopia por Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), usando o Spectrum 100 FT-IR da marca Perkin Elmer do Laboratório de Petróleo da Universidade Federal do Piauí (LAPETRO/UFPI). O extrato EE, FH e FE foram aplicados diretamente no cristal do equipamento e as leituras foram realizadas na faixa de 650 a 4000 cm<sup>-1</sup>, enquanto a fração sólida (FA) foi comprimida com brometo de potássio (KBr) para posterior análise de determinação do infravermelho.

### 3.4 Análise cromatográfica (CLAE-DAD)

#### 3.4.1 Análise do EE e frações das folhas de *P. bracteosa*

A análise CLAE-DAD (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de arranjo de diodos) foi realizada a temperatura ambiente usando um cromatógrafo Shimadzu com módulo de comunicação CBM-20A, duas bombas LC20AD e injetor com loop de 20 µL, do Laboratório de Química Orgânica – Produtos Naturais do Instituto Federal do Piauí.

Uma amostra do EE, FE e FA, 10 mg, das folhas de *P. bracteosa* foi solubilizada em 10 mL de solução MeOH (95%) e submetido ao processo de *clean-up* em cartucho Chromabond® C18 (previamente ativado com CH<sub>3</sub>OH), fase estacionária coluna C18 fase reversa (250 x 4,6 mm, tamanho de partícula 5 µm), marca Macherey-Nagel e filtrada com membrana Millipore® (0,2 µm), o forno foi aquecido a 40 °C e taxa de fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, utilizando um cromatógrafo e detector UV-visível com arranjo de diodos modelo SPD-M20A ajustado para 200-800 nm.

Para obtenção do perfil químico de *P. bracteosa* foi utilizado dois sistemas gradiente exploratório para melhor resolução dos cromatogramas, sendo MeOH/H<sub>2</sub>O (95:05 v/v) à (0:100 v/v) para sistema 1 e MeCN/H<sub>2</sub>O (95:05 v/v) à (0:100 v/v) para o sistema 2.

### 3.5 Análise por ESI-IT/MS<sup>n</sup> do EE das folhas de *P. bracteosa*

Para a análise com ESI-IT/MS<sup>n</sup>, 5 mg do EE das folhas de *P. bracteosa* foi dissolvido em 10 mL MeOH e levado ao banho ultrassom durante 5 min. Posteriormente, a amostra foi filtrada em membrana de nylon (diâmetro de 47 mm e poro 0,22 µm, Chromafil® Xtra) e uma alíquota de 20 µL foi injetada diretamente no sistema ESI-IT-MS<sup>n</sup>.

A infusão do fluxo da amostra foi realizada em um analisador do tipo armadilha de íons (ITMS, AmaZon X, Bruker Daltonics) acoplado com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI), em modo negativo no Espectrômetro do (LPN/UFPI).

Utilizou-se uma temperatura de 220 °C, voltagem de capilar 4,5 kV, fluxo do gás de secagem (N<sub>2</sub>) 5,0 L.min<sup>-1</sup>, pressão de nebulização 8,0 psi e fluxo da seringa

3,0  $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ . A análise completa de varredura foi registrada na faixa de  $m/z$  de 100 a 1500. As fragmentações em estádios múltiplos ( $\text{MS}^n$ ) dos espectros foram realizadas utilizando o método de ionização por eletrospray (ESI) em uma interface do tipo ion trap (IT). O tratamento dos espectros de massas foi realizado no *software* Compass 1.3 Data Analysis (versão 4.0, Bruker Daltonics).

### 3.6 Prospecção fitoquímica

As frações FH, FE e FA das folhas de *P. bracteosa* foram submetidas a testes químicos qualitativos para prospecção fitoquímica e identificação das classes de metabólitos secundários da planta no Laboratório de Química Orgânica - Produtos Naturais do Instituto Federal do Piauí, conforme os procedimentos descritos por <sup>63</sup>.

#### 3.6.1 Teste para flavonoides

Uma amostra de 1,0 mg das frações foliares (FH, FE e FA) foi dissolvida em 10 mL de metanol (P.A). Posteriormente, 5 gotas de HCl 6M e raspas de Magnésio foram adicionados à solução. O surgimento de uma coloração rósea sugere a presença de flavonoides.

#### 3.6.2 Teste para fenóis e taninos

Uma amostra de 2,0 mg das frações foliares (FH, FE e FA) foi dissolvida em 5 mL de metanol (P.A). Em seguida, foram adicionadas 2 gotas de solução aquosa de  $\text{FeCl}_3$  1% à solução. A coloração inicial entre azul e vermelho indicou a presença de fenóis. Já um precipitado de tonalidade verde-acastanhado ou azul-preto, confirma presença de taninos.

#### 3.6.3 Teste para saponinas

Uma amostra de 5 mg das frações foliares (FH, FE e FA) foi diluída com metanol (P.A) até um volume final de 20 mL. A suspensão foi agitada em tubo fechado durante 2 min. A formação de uma camada de espuma estável foi o indicativo da presença de saponinas.



### **3.6.4 Teste para alcaloides**

10 mg das frações foliares (FH, FE e FA) foram solubilizadas em 5 mL de solução HCl a 5%. Logo após, foram divididas em três porções iguais, nas quais acrescentou-se gotas de reagentes Bouchardat, Dragendorff, Bertrand e Mayer. A ocorrência de precipitado laranja-avermelhado (Bouchardat), vermelho tijolo (Dragendorff), branco-amarelo (Bertrand e Mayer) indicaram a presença de alcaloides.

### **3.6.5 Teste para flavonóis, flavonas, xantonas**

Uma amostra 3 mg das frações foliares (FH, FE e FA) foi solubilizada em 4 mL de metanol (P.A). Três gotas de hidróxido de sódio (NaOH) a 10% foi adicionada à solução. A formação de coloração amarela indicou presença flavonóis, flavonas e xantonas.

### **3.6.6 Teste para catequinas**

Uma amostra 10 mg de frações foliares (FH, FE e FA) foi dissolvida em 3 mL de metanol (P.A). Posteriormente, foi adicionado 1 mL de solução aquosa de vanilina a 1% e 1 mL de HCl 6 M. O surgimento de uma coloração vermelha intensa indicou presença de catequinas.

### **3.6.7 Teste para terpenos**

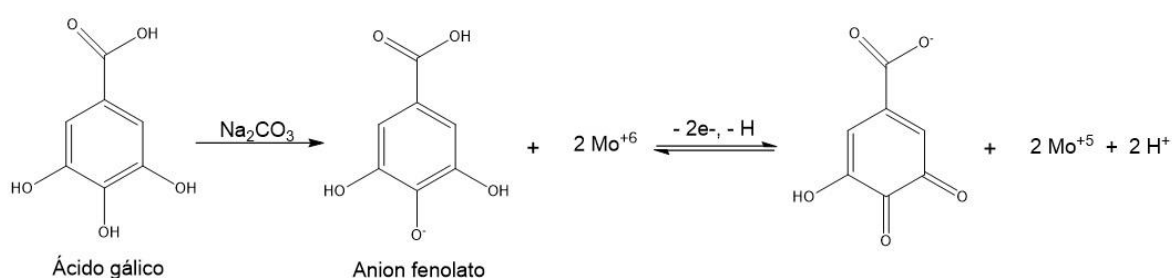
Uma amostra de 5 mg das frações foliares (FH, FE e FA) foi misturada com 2 mL de  $\text{CHCl}_3$  e 3 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 6 N. A aparência de cor marrom avermelhada na face interna indicou a presença de terpenos.

### **3.6.8 Teste para depsídeos/depsidonas**

Uma amostra de 2 mg das frações foliares (FH, FE e FA) foi dissolvida em 5 mL de éter etílico. Acrescentou-se 3 mL de metanol (P.A) seguida de 3 gotas da solução de  $\text{FeCl}_3$  a 1 %. O aparecimento de coloração verde, azul ou cinza, indicou a presença de depsídeos/ depsidonas.

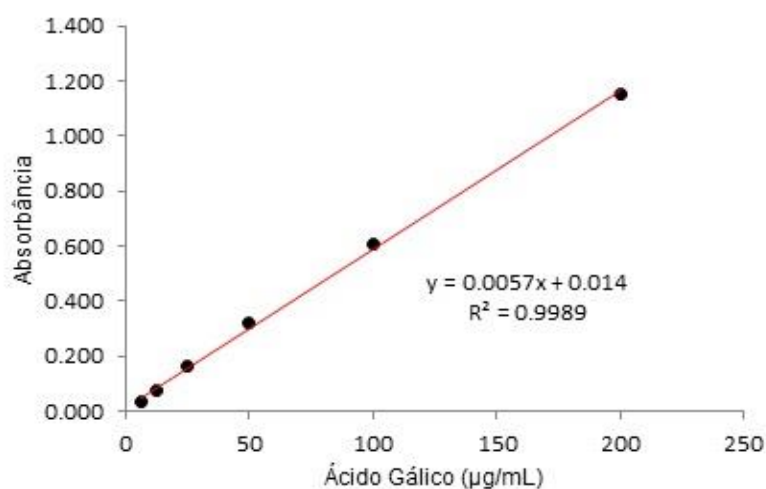
### 3.7 Teor de Compostos Fenólicos (TCF)

O método de TCF baseado no reagente Folin-Ciocalteu, constituído por uma mistura dos ácidos fosfomolibídico ( $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ ) e fosfotungstico ( $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ ), consiste numa solução de cor amarela que em meio básico provoca desprotonação dos compostos fenólicos, gerando ânions fenolatos. Em seguida, ocorre uma reação de oxirredução entre o ânion gerado e o reagente de Folin, no qual o molibdênio sofre redução, ocasionando a mudança de cor do meio reacional de amarela para azul e o composto fenólico é oxidado <sup>101</sup>, como pode ser observado na Figura 3.2.



**Figura 3.2**– Reação de redução do reagente Folin-Ciocalteu pelo ácido gálico <sup>102</sup>

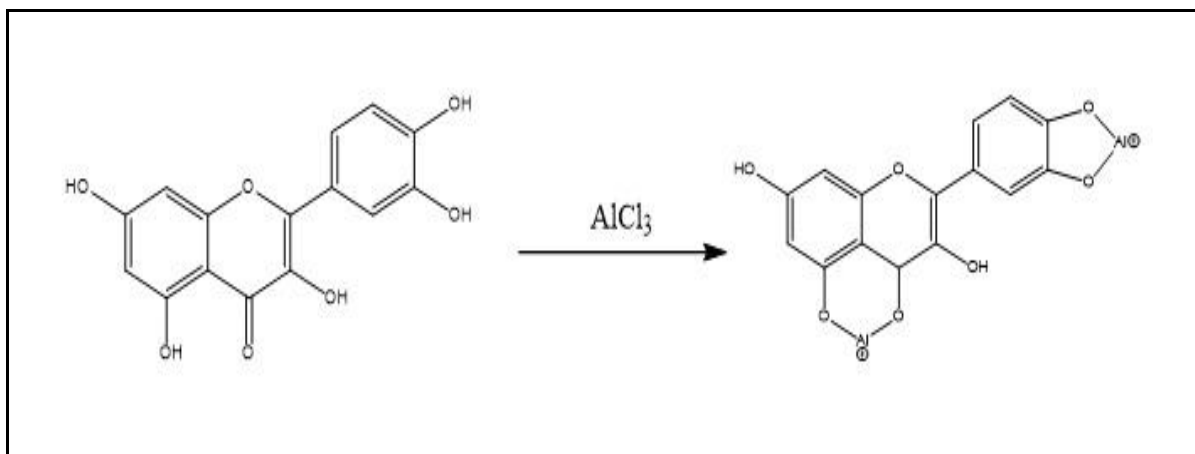
A determinação do teor de compostos fenólicos (TCF) das frações (FH, FE e FA) de *P. bracteosa* foi realizado no Laboratório de Análise de Alimento do Instituto Federal do Piauí, e seguiu a metodologia proposta por <sup>103</sup>. As amostras foram solubilizadas em solução aquosa de dimetilsulfóxido (DMSO 5%) a uma concentração de 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Das soluções preparadas, foram retiradas uma alíquota de 0,5 mL e transferidas para tubos de ensaio, adicionados 8 mL de água destilada e 0,5 mL do reagente Folin Ciocalteu 20% (v:v). Após 3 min, foi acrescentado 1 mL de solução de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) a 20% (m:v) e a preparação foi colocada em banho maria a 37°C por 1 hs. As amostras foram analisadas em triplicata quanto a absorbância em espectrofotômetro (Coleman 33D) à 720 nm. Uma curva de calibração foi construída com solução padrão de ácido gálico (6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$ ) e os resultados expressos em mg equivalente de ácido gálico por g (mg EAG/g) de amostra (Figura 3.3).



**Figura 3.3** – Curva padrão de ácido gálico

### 3.8 Teor de Flavonoides Totais (TFT)

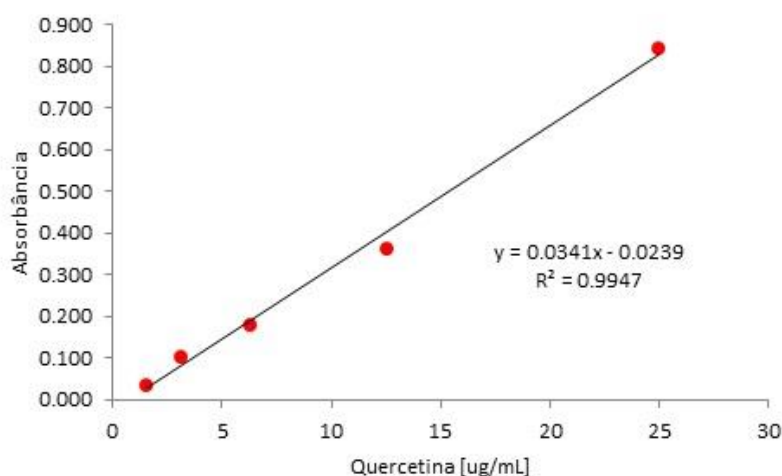
O método espectrofotométrico baseado na complexação do cloreto de alumínio é um dos procedimentos mais comumente usados para a chamada determinação de flavonóides totais, pois o conteúdo destes compostos é considerado um parâmetro importante para avaliar amostras de alimentos ou plantas medicinais. Nesse método ocorre a formação de um complexo de coloração amarela (Figura 3.4), cuja a intensidade é proporcional a concentração de flavonoides, entre o íon alumínio ( $\text{Al}^{3+}$ ) e os grupos carbonila e hidroxila de flavonoides presentes nas amostras <sup>104</sup>.



**Figura 3.4** – Formação do complexo Quercetina-Al, em solução metanólica de alumínio <sup>104</sup>

O teor de flavonoides totais (TFT) foi determinado e estimado segundo o método descrito por <sup>105</sup> no Laboratório de Análise de Alimento do Instituto Federal do Piauí. Para realização deste teste, as frações (FH, FE e FA) foram solubilizadas em metanol (P.A) para uma concentração de 1000 µg/mL. Alíquotas de 0,5 mL de cada fração foram adicionadas a um volume igual de solução metanólica e cloreto de alumínio 5% (AlCl<sub>3</sub>). Após 15 min de incubação à temperatura ambiente, realizou-se a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro (Coleman 33D) a 420 nm. Uma curva de calibração foi construída com solução padrão de quercetina (1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25 e 50 µg/mL) e os resultados foram expressos em mg equivalente de quercetina por grama de extrato seco (mg EQ/g) (Figura 3.5).

Com base nos dados obtidos a partir das absorbâncias foi possível calcular a regressão linear da curva padrão de quercetina obtendo-se assim a equação da reta ( $y = 0,0341x - 0,0239$ ,  $r = 0,9947$ ) e a partir desta foram calculados os teores (mg EQ/g) de flavonoides totais em cada fração.



**Figura 3.5** – Curva padrão de quercetina

### 3.9 Atividade Antioxidante

#### a) Captura do radical DPPH•

A atividade de captura de radical 2,2-difinil-1-picril-hidrazil (DPPH•) nas frações (FH, FE e FA) em estudo foi determinada pelo método de <sup>71</sup>. As amostras foram solubilizadas em DMSO 2% nas concentrações 4,68; 9,37; 18,75; 37,5 e 75

µg/mL. Adicionou-se 1,5 mL da solução etanólica do radical DPPH• ( $6 \times 10^{-5}$  M) a uma alíquota de 0,5 mL das frações nas diferentes concentrações. As misturas foram agitadas e mantidas em repouso por 30 min no escuro. Posteriormente, a leitura de absorbância das frações ( $Abs_{amostra}$ ) foi realizada a 517 nm com um espectrofotômetro (Coleman 33D), e comparada ao controle negativo ( $Abs_{controle}$ ). Ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo. Para cada amostra, foi determinada porcentagem de inibição (%I) do radical DPPH• da seguinte forma:

$$\%I = \left[ \frac{Abs_{controle} - Abs_{amostra}}{Abs_{controle}} \right] \times 100$$

A atividade de eliminação foi expressa como concentração efetiva para inibição de 50% do radical DPPH• ( $CE_{50}$ ) em mg/mL.

#### **b) Capacidade antioxidante pelo método de ABTS**

O método ABTS [2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] foi baseado na metodologia descrita por <sup>73</sup> com algumas modificações. O radical ABTS<sup>•+</sup> foi preparado a partir de volumes iguais das soluções estoque de ABTS (7 mM) e persulfato de potássio (2,45 mM), a solução resultante foi mantida à temperatura ambiente e na ausência de luz por 16 hs.

Posteriormente a solução foi diluída em etanol P. A até obter uma solução com absorbância 0,70 ( $\pm 0,01$ ) no comprimento de onda 734 nm. Uma alíquota (40 µL) das frações (FH, FE e FA) foi misturada com 1960 µL da solução contendo o radical, determinando-se a absorbância em espectrofotômetro (Coleman 33D) a 734 nm, após 30 min de reação. O antioxidante sintético Trolox análogo da vitamina E, foi utilizado como solução padrão para construção da curva de calibração:

$$y = 0,6244x + 0,0353 \quad \text{e} \quad R^2 = 0,9989$$

Assim, os resultados foram expressos como capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC).

### 3.10 Atividade Biológica - Bioensaio *Allium cepa*

Os testes com *A. cepa* para as frações FH, FE e FA das folhas de *P. bracteosa* foram realizados de acordo com o protocolo delineado por Mauro et al. (2014). O metilmetanossulfonato (MMS; Sigma-Aldrich; CAS 66-27-3) foi utilizado para induzir danos ao DNA em células meristemáticas de *A. cepa*. O MMS é um agente alquilante com atividade direta, induzindo danos como quebra de DNA, pontes e perda de cromossomos, que também são expressos como micronúcleos<sup>38,106</sup>.

Após germinação de sementes de *A. cepa* em água destilada, as raízes medindo 1 cm de comprimento foram expostas a diferentes tratamentos e protocolos para avaliar a citogenotoxicidade e antigenotoxicidade. Para avaliar a citogenotoxicidade, as sementes foram transferidas para o controle negativo (CN; Dimetilsulfóxido - DMSO 2%), controle positivo (CP = 10 mg / mL de MMS solubilizado em DMSO 1%) e concentrações de 2, 4, 8 e 16 mg / mL de FH, FE e FA em pratos separados para cada controle e concentração por 48 hs.

Para verificar a antigenotoxicidade, três protocolos foram conduzidos usando o agente indutor de danos no DNA, o MMS. Os seguintes protocolos foram realizados: pré-tratamento que avalia ação desmutagênica; tratamento simultâneo para avaliar tanto atividade desmutagênica quanto atividade bio-antimutagênica; e pós-tratamento que avalia o potencial bio-antimutagênico<sup>107</sup>.

No pré-tratamento, as sementes foram transferidas para as quatro diferentes concentrações de cada fração (2, 4, 8 e 16 mg/mL) de FH, FE e FA por 24 hs e em seguida transferidas para o MMS por mais 24 hs. No tratamento simultâneo, as sementes permaneceram em água destiladas por 24 hs e em seguida, transferidas para soluções contendo simultaneamente cada fração (FH, FE e FA) nas concentrações 2, 4, 8 e 16 mg/mL e o MMS. No pós-tratamento, as sementes foram colocadas em MMS por 24 hs e, posteriormente transferidas para as preparações com cada fração foliar (FH, FE e FA) nas concentrações 2, 4, 8 e 16 mg/mL por mais 24 hs.

Após realização dos tratamentos, as raízes foram fixadas em metanol/ácido acético (3:1, v/v) por um período 6-8 hs, à temperatura ambiente, e armazenadas a -20 °C, até o momento de preparação das lâminas.

Para a confecção das lâminas, as raízes foram lavadas três vezes em água destilada, de 5 min. cada, e hidrolisadas em HCl 1N por 10 min a 60°C e em seguida submetidas a coloração por Reativo de Schiff durante 2 hs em frasco escuro. Em seguida, as pontas das raízes foram lavadas até a remoção completa do reagente, transferidas para lâminas, esmagadas com uma gota de carmina acética a 2% e montadas com Entellan® (Merck Millipore; CAS 107-96-0) <sup>108</sup>.

O índice mitótico (IM) indica citotoxicidade e alterações cromossômicas, o que reflete a genotoxicidade. Para determinar o IM, o número de células em diferentes fases da mitose foi dividido pelo número total de células. Para alterações cromossômicas, o número de alterações foi dividido pelo número total de células. Marcamos 5.000 células meristemáticas em dez lâminas / tratamento usando microscopia óptica com aumento de 400x (Olympus CX 21, Zhejiang, China). As alterações cromossômicas incluíram alterações resultantes da atividade aneugênica (por exemplo, C-metáfase (Cm), metáfase com aderência cromossômica (AC), perdas cromossômicas (PC), anáfase multipolares (AM), células binucleadas (CB) e metáfases poliplóides (CP) ou efeitos clastogênicos (por exemplo, quebra cromossômica (QC) na metáfase ou anáfase e pontes cromossômicas (PT). Micronúcleos (MN) podem surgir de efeitos aneugênicos ou clastogênicos <sup>109</sup>.

Na atividade antimutagênica foi avaliada a porcentagem de redução de danos (% DR). A% DR foi calculada para cada tratamento usando a fórmula:

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

onde: a = número de células danificadas no CP, b = número de células danificadas em cada tratamento, c = número de células danificadas no CN <sup>110</sup>.

### 3.11 Análise Estatística

Os resultados apresentados na triagem fitoquímica correspondem à média de três repetições (n=3) ± desvio padrão da média. A atividade antioxidante, o teor de fenóis e flavonoides totais foram determinados utilizando-se o programa GraphPad Prism 6.0®. As comparações de média no ensaio do DPPH e no

bioensaio A. cepa foram realizadas pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do Teste de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ) usando o software BioEstat 5.3<sup>®</sup> 111.



# Capítulo 4

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

### 4.1 Rendimento do EE e frações das folhas de *P. bracteosa*

A maceração de 1000 g das folhas secas de *P. bracteosa* forneceu 103,3 g de extrato bruto concentrado, representando um rendimento de 10,33%. A partição líquido-líquido de 50 g do extrato bruto forneceu 23,1 g de FH, 6,8 g FE e 4,4 g FA, representando um rendimento de 46,2%, 13,6% e 8,8%, respectivamente.

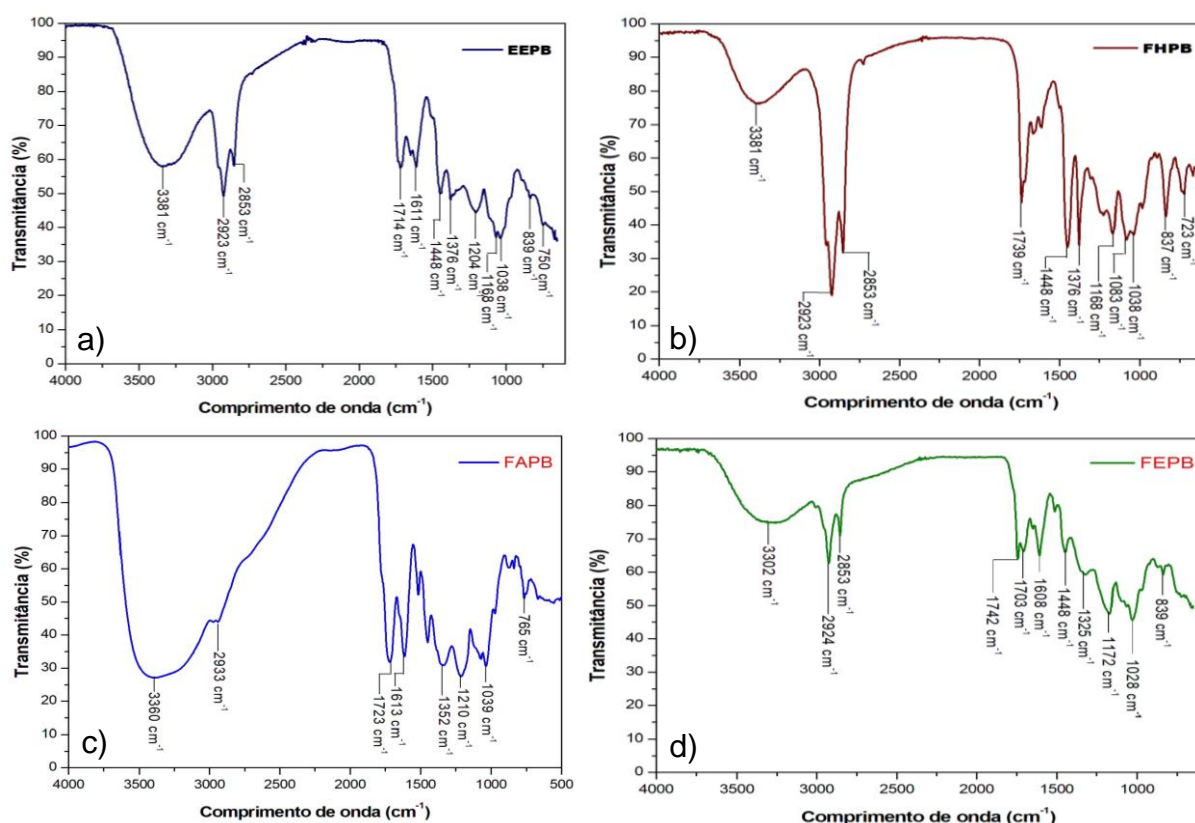
### 4.2 Análise espectroscópica de Infravermelho

#### 4.2.1 Caracterização do extrato EE e frações das folhas de *P. bracteosa*

A análise do espectro de FTIR do EE de *P. bracteosa* apresentou uma banda intensa e larga em  $3381\text{ cm}^{-1}$  que é característica de estiramento de ligações O-H, indicando a presença de compostos hidroxilados (Figura 4.1a).

Os compostos fenólicos possuem um ou mais grupos de hidroxilas ligadas ao benzeno, sendo a estrutura do fenol a base para todos os compostos fenólicos <sup>52</sup>. Além disso, foi observado bandas intensas na região de  $2923$  e  $2853\text{ cm}^{-1}$  típicas de estiramentos de ligações C-H sugerindo a presença de uma cadeia longa hidrocarbonada. Observou-se ainda em  $1714\text{ cm}^{-1}$  a presença de uma banda intensa correspondente a vibração da ligação C=O, típica de carbonila de cetona que, juntamente com a absorção em  $1611\text{ cm}^{-1}$  para o estiramentos das ligações C=C conjugada, o que permite propor a presença de ésteres de ácidos graxos de cadeia longa ou estruturas triterpênicas <sup>112</sup>.

As bandas vibracionais  $1376$  e  $1448\text{ cm}^{-1}$  de dobramento  $\text{CH}_3$  foram registradas com baixa intensidade. Essas bandas mostraram concordância com os resultados obtidos por <sup>113</sup> ao analisar extrato do fruto de *P. ferrea*. As bandas observadas de  $1204$  a  $1038\text{ cm}^{-1}$ , são estiramentos vibracionais do grupo C-O dos álcoois e fenóis <sup>114</sup>.



**Figura 4.1** – Espectro de FTIR de *P. bracteosa*. a) Extrato etanólico (EE); b) Fração Hexânica (FH); c) Fração Acetanólica (FA) e d) Fração etérea (FE)

O espectro de FTIR da FH (Figura 4.1b) apresentou uma banda em aproximadamente 3381 cm<sup>-1</sup> característica do grupo O-H, essa banda foi menos intensa quando comparada ao espectro do EE das folhas de *P. bracteosa* (Figura 4.1a). As bandas em 2923 e 2853 cm<sup>-1</sup> são características de deformações axiais dos grupos metila (CH<sub>3</sub>) e metileno (CH<sub>2</sub>) indicando a presença de estrutura química de cadeia alifática nessa fração <sup>115</sup>. O aparecimento de anéis aromáticos (estiramento, C=C) foi caracterizada pela banda em 1448 cm<sup>-1</sup> <sup>116</sup>. A banda de estiramento do grupo carbonílico (C=O) em 1739 cm<sup>-1</sup> pressupõe a presença de éster e aldeído <sup>117</sup>.

A FA mostrou a presença de uma intensa banda em 3360 cm<sup>-1</sup> devido a presença de grupo –OH que, juntamente com a banda intensa em 1210 e 1039 cm<sup>-1</sup>, sugerem a presença de estruturas polihidroxiladas (Figura 4.1c) <sup>118</sup>. Além disso, foi observado uma banda de absorção em 2933 cm<sup>-1</sup> correspondente ao estiramento de ligação C–H e de bandas em 1723 e 1613 cm<sup>-1</sup> correspondentes a carbonila de cetona e carbonila conjugada, respectivamente <sup>119,120</sup>.

FE apresentou um perfil semelhante ao EE de *P. bracteosa*, indicando que nessas amostras há uma composição semelhante em termos de classes de metabólitos secundários (Figura 4.1d).

Os diversos grupos funcionais observados nas frações FH, FE e FA de *P. bracteosa* refletiram as composições químicas, especialmente os compostos polifenólicos, ésteres, cetonas e álcoois, responsáveis por diversas propriedades medicinais e atividades biológicas.

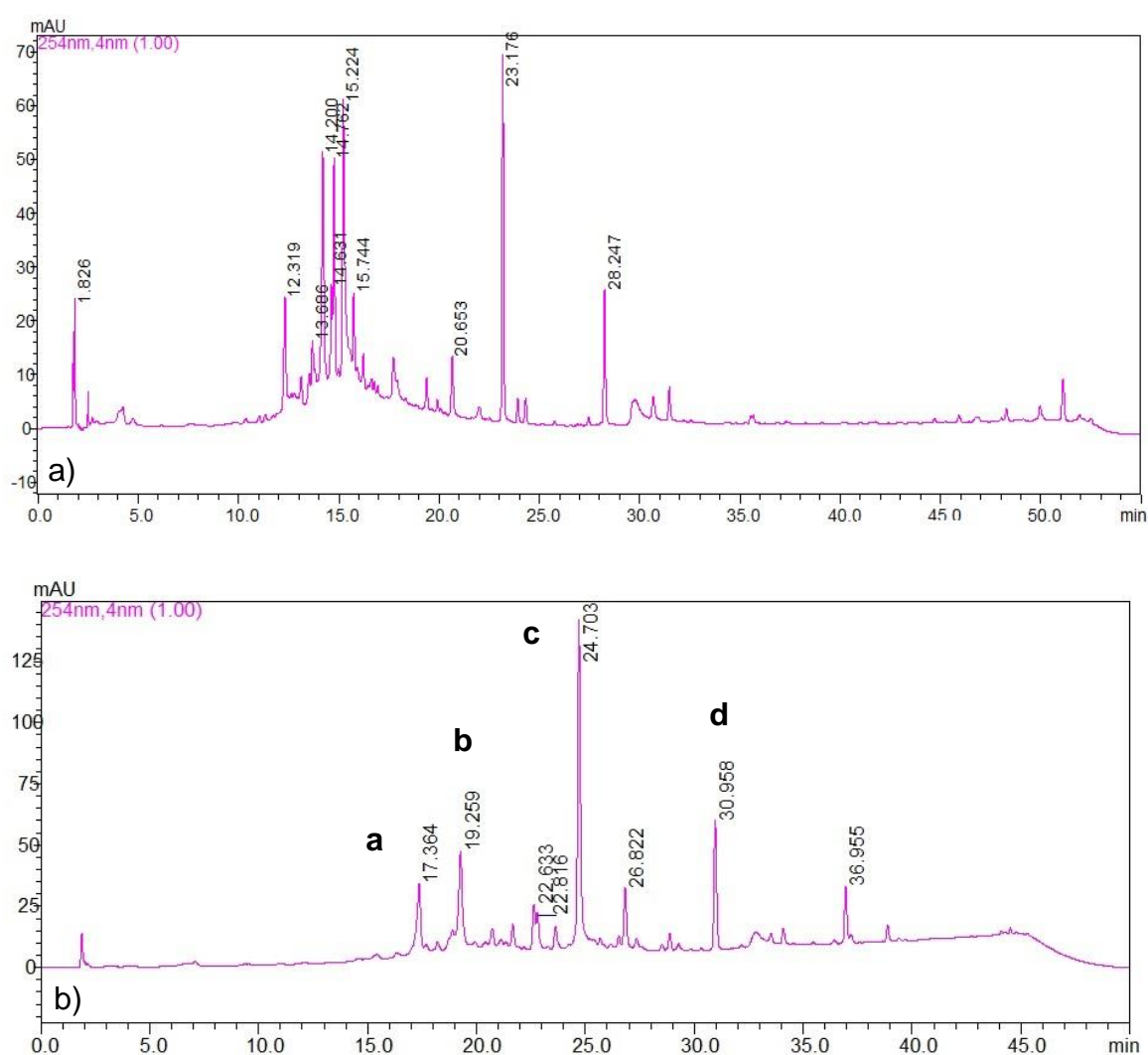
A presença de compostos com grupos funcionais hidroxila (-OH) e carbonila (C=O) é parte integrante da maioria dos polifenóis e flavonoides responsáveis pelas atividades antioxidantes desses compostos, pois apresentam a capacidade de eliminar radicais livres <sup>1</sup>. Os resultados das atividades antioxidantes pelos métodos de DPPH e ABTS, teor de total de fenólicos e flavonoides das frações estudadas mostraram concordância com essas informações.

### **4.3 Análise de perfis cromatográficos (CLAE-DAD)**

#### **4.3.1 Análise do perfil cromatográfico do EE e frações das folhas de *P. bracteosa***

A avaliação do perfil cromatográfico do EE das folhas de *P. bracteosa*, obtido em análise de CLAE-DAD, consistiu em traçar o perfil químico do extrato etanólico estudado empregando a comparação dos picos do cromatograma obtido e seus respectivos espectros de UV com espectros de absorção UV das principais classes de metabólitos secundários de plantas encontrados na literatura.

A realização de um gradiente exploratório com MeOH/H<sub>2</sub>O e HCN/H<sub>2</sub>O possibilitou observar a complexidade da amostra, e a escolha da fase móvel mais eficiente para esta separação (Figura 4.2a,b). Observou-se uma melhor resolução dos picos cromatográficos quando o EE foi eluído pelo sistema MeOH/H<sub>2</sub>O e a identificação de quatro picos intensos, com tempo de retenção de 17,36; 19,26; 24,70 e 30,96 minutos (Figura 4.2b).

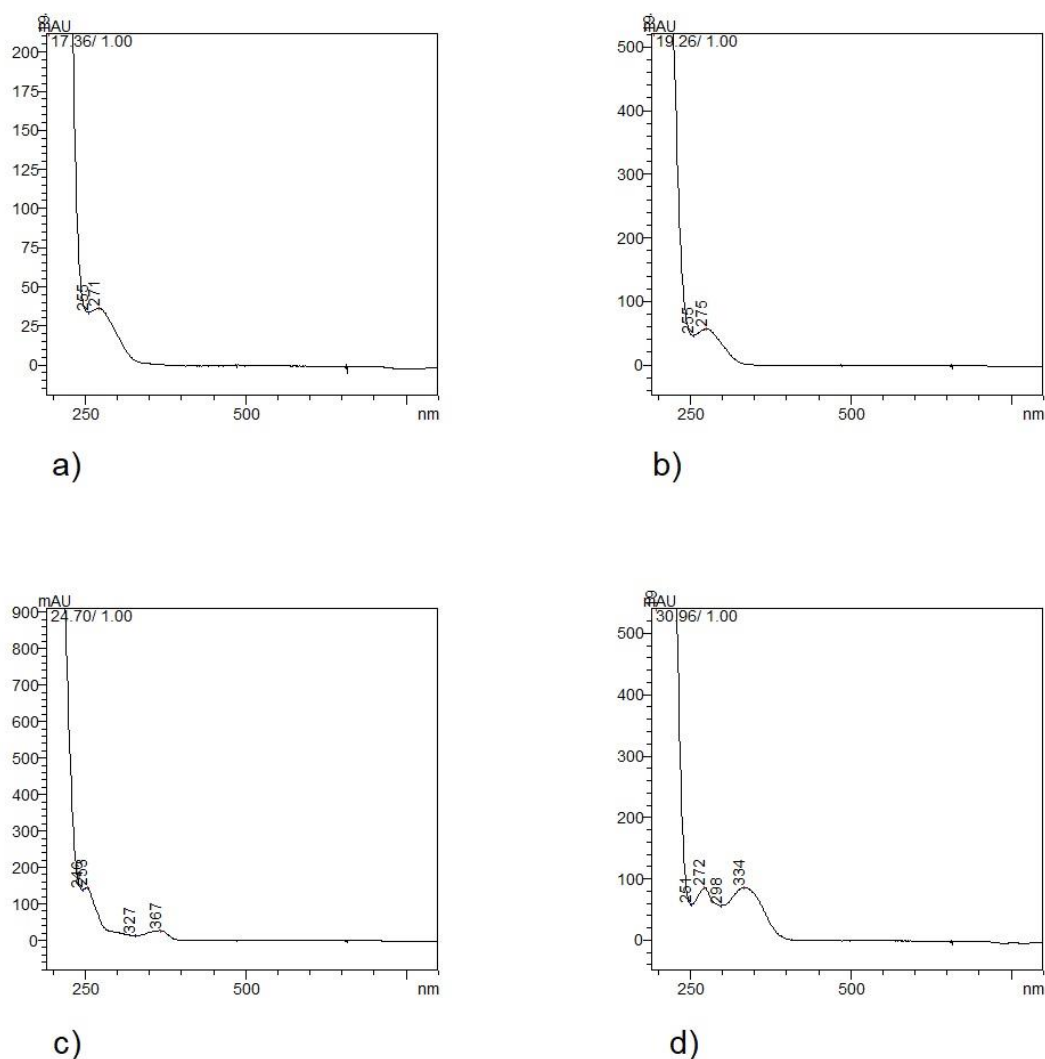


**Figura 4.2** – Cromatograma do EE de *P. bracteosa* obtido através de análise exploratório: a) com HCN/H<sub>2</sub>O; b) com MeOH/H<sub>2</sub>O, as letras em negrito indicam os compostos majoritários analisados a posteriori.

A análise dos espectros de absorção no ultravioleta forneceu informações importantes para sinalizar quais compostos constituem o EE de *P. bracteosa*. Os compostos com tempo de retenção em 17,36 e 19,26 min, apresentaram espectros UV com máximo de absorção entre 271-275 nm (Figura 4.3a,b), característico da classe de compostos fenólicos como, por exemplo, o ácido gálico que apresenta um único pico de absorção em 271 nm. Derivados de ácido gálico apresentam um único pico de absorção referente ao sistema benzílico, com máximo na região do UV variando entre 260-280 nm <sup>121</sup>.

Os compostos com tempo de retenção em 24,70 min apresentaram espectros de UV com dois máximos de absorções entre 255 e 367 nm (Figura 4.3c), indicando

a presença de taninos. Os perfis típicos de elagitanino apresentam dois UV máximos absorções em cerca de 220 nm e 270-280 nm <sup>122</sup>. As diferenças encontradas nos espectros de UV entre os indivíduos elagitaninos são causados por diferentes números de ligações C–C entre grupos galoiil nas moléculas <sup>123</sup>.

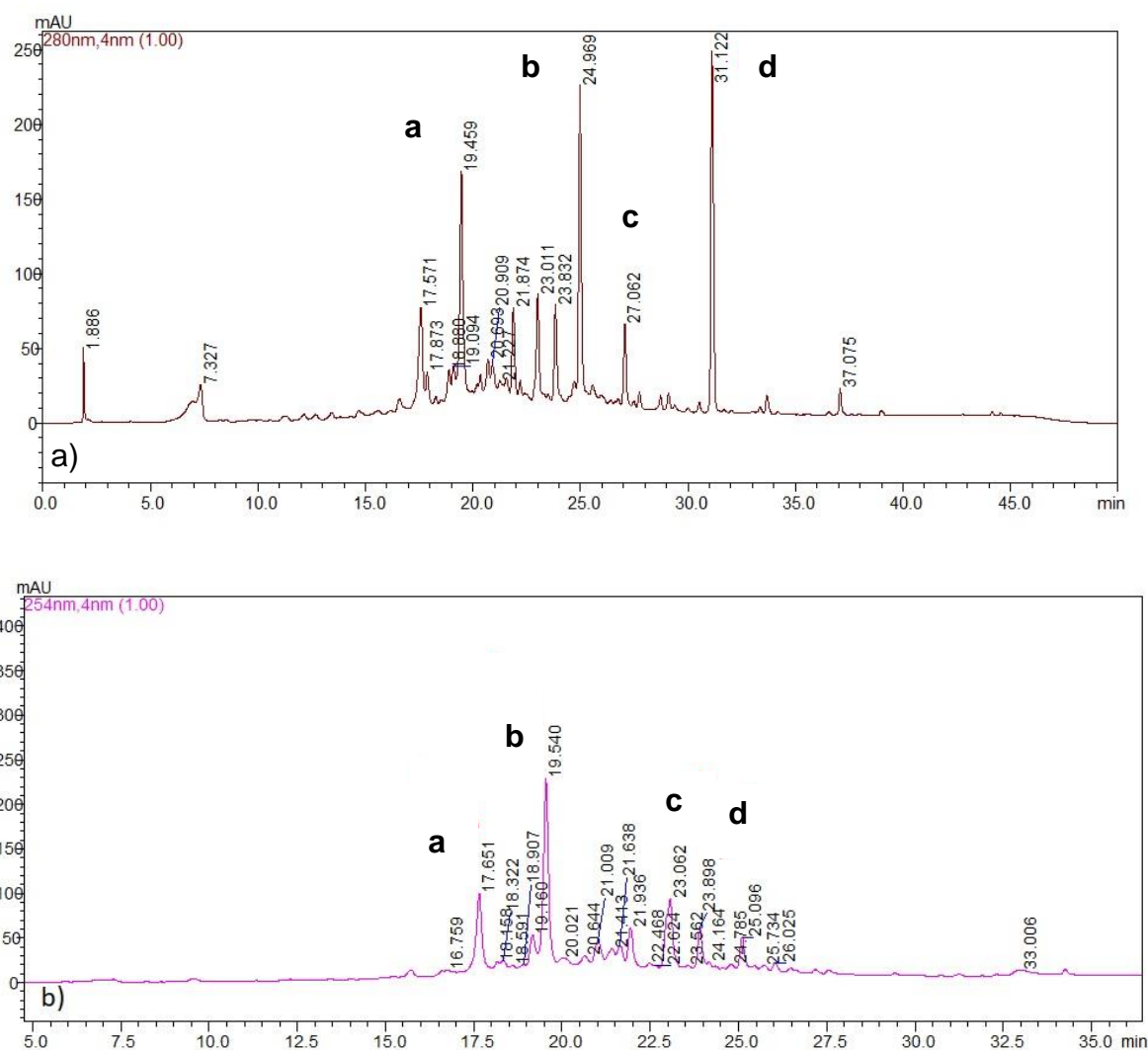


**Figura 4.3** - Espectros no ultravioleta dos compostos majoritários observados no cromatograma obtido através da análise exploratório de MeOH/H<sub>2</sub>O do EE das folhas de *P. bracteosa*.

Os flavonoides possuem espectros de absorção característicos no ultravioleta, determinado pelo núcleo benzopirona, com dois máximo de absorção: um ocorrendo entre 240-285 nm (pico II) e outro entre 300-400 nm (pico I) <sup>124</sup>. Os compostos com tempo de retenção em 30,96 min apresentaram espectros UV com dois máximos de absorção entre 272 e 334 nm indicando a presença de flavonoides

(Figura 4.3d). A amentoflavona, por exemplo, é um bioflavonoide caracterizado por dois máximos em 268 e 334 nm <sup>125</sup>.

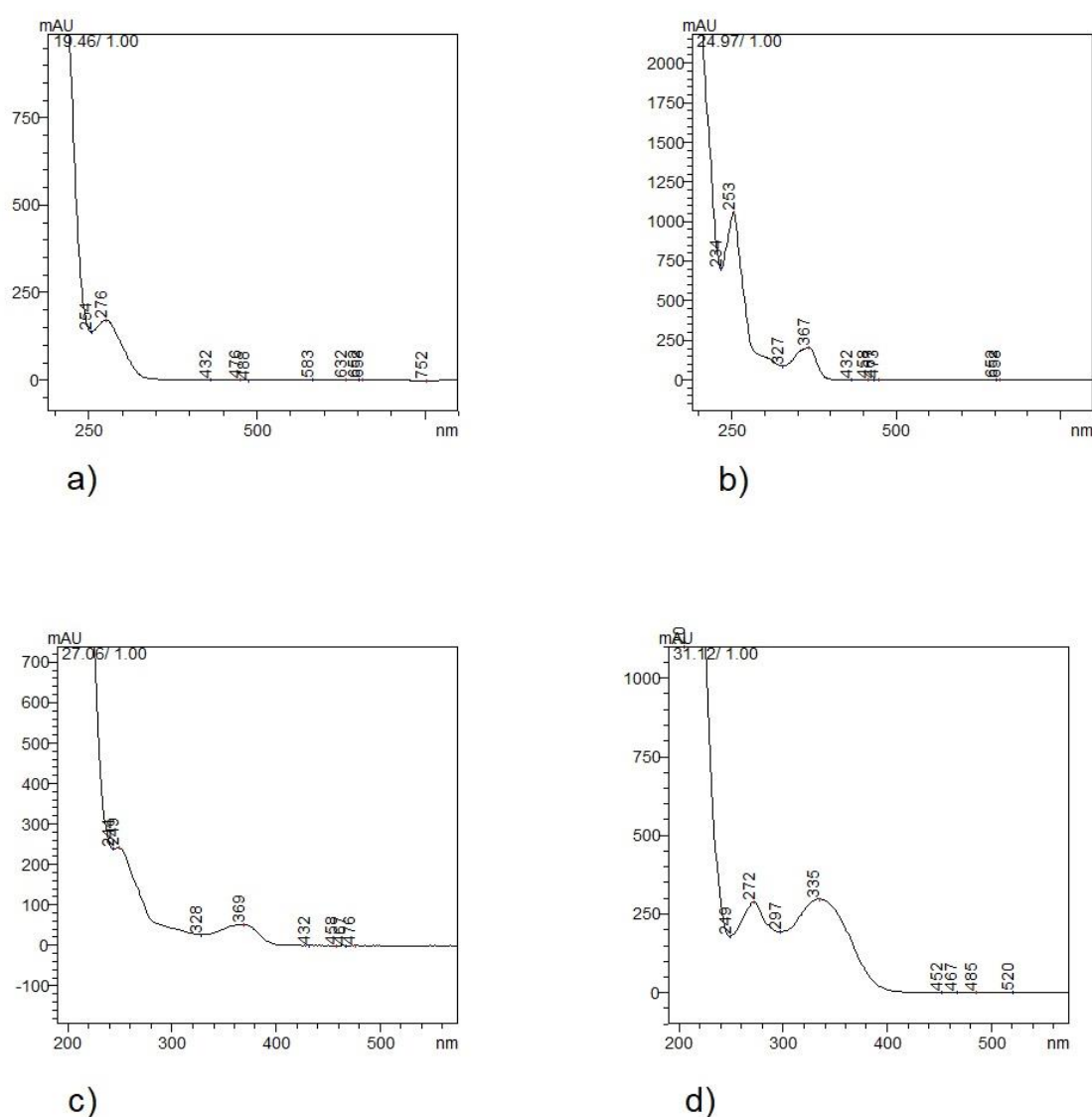
A partir dos perfis cromatográficos das frações FE e FA de *P. bracteosa* e dos espectros de UV de cada pico do cromatograma, foi possível observar quatro picos de compostos majoritários em cada uma das frações (Figura 4.4).



**Figura 4.4** – Cromatograma das frações *P. bracteosa* obtido através de análise exploratório com MeOH/H<sub>2</sub>O. a) Fração etérea (FE); b) Fração acetanólica (FA), as letras em negrito indicam os compostos majoritários analisados a posteriori.

Comparando o cromatograma do EE e das frações (FE e FA), foi possível observar que a FE concentrou a maior parte das substâncias presentes no extrato, enquanto a FA concentrou as substâncias que eluíram no tempo de retenção entre 21-25 minutos (Figura 4.4).

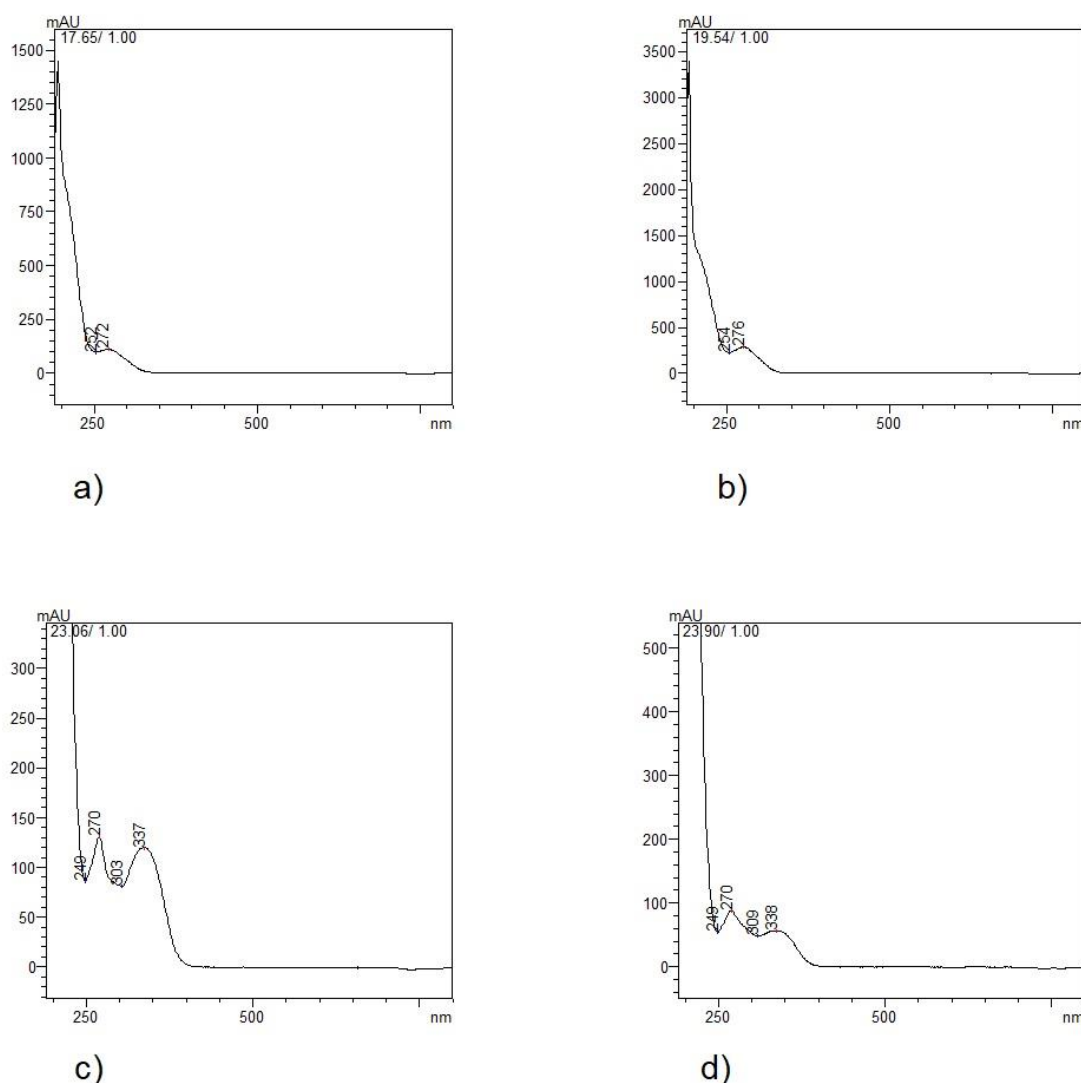
Os compostos de FE com tempo de retenção em 19,46 min, apresentaram espectros UV com máximo em 276 nm indicando a presença de taninos do tipo galotaninos (Figura 4.5a). Os galotaninos tem muitos derivados de galoilos complexo que apresentam espectros de UV com absorção máxima em 278-280 nm <sup>31</sup>. Os picos com tempo de retenção 24,97, 26,06 e 31,12 min apresentaram espectros UV com dois máximos de absorção no UV entre 243-272 e 335-369, sugerindo a presença da classe de flavonoides (Figuras 4.5b,c,d). A quercetina, por exemplo, é um flavonoide que apresenta máximo de absorção no UV em 223, 267 e 357 <sup>122</sup>.



**Figura 4.5** - Espectros no ultravioleta dos compostos majoritários do cromatograma obtido através da análise exploratório de MeOH/H<sub>2</sub>O da FE de *P. bracteosa*.

Os compostos de FA com tempo de retenção entre 17,65 e 19,54 min apresentaram espectros UV com máximo de absorção entre 232-239 nm

característicos de compostos da classe dos taninos <sup>126</sup> (Figura 4.6a,b). Os picos com tempo de retenção de 23,06 e 23,90 min apresentaram espectros UV semelhantes, com máximos de absorção em 270 e 337-338 nm, sugerindo compostos da mesma classe como, por exemplo, os flavonoides que absorvem nessa região (Figura 4.6c,d). Os espectros UV apresentados para o EE das folhas de *P. bracteosa*, são os mesmos para a FA com tempo de retenção correspondentes, isto é, mostra uma semelhança das classes de metabólitos encontrados nessas amostras.



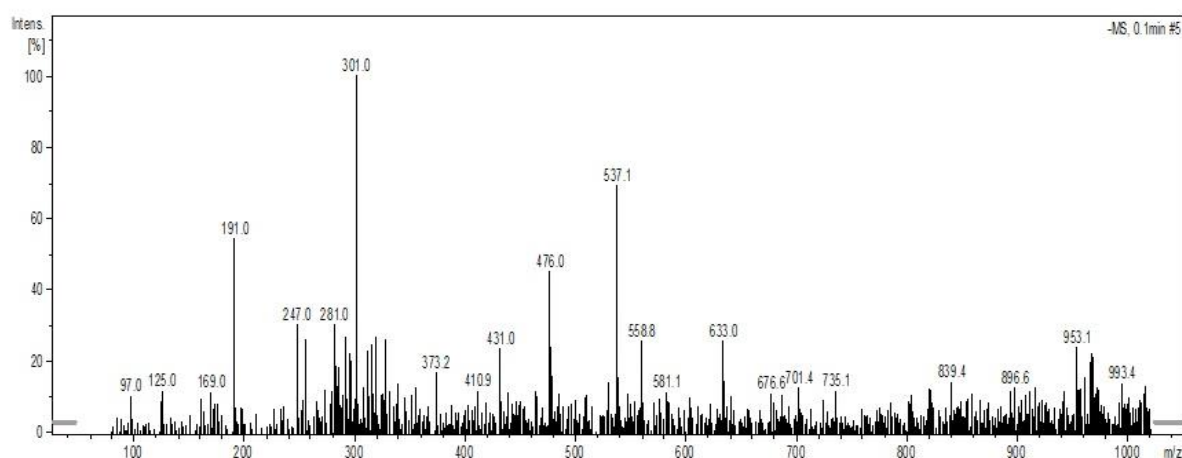
**Figura 4.6** - Espectros no ultravioleta dos compostos majoritários do cromatograma obtido através da análise exploratório de MeOH/H<sub>2</sub>O da FA de *P. bracteosa*.

#### 4.4 Análise por ESI-IT/MS<sup>n</sup> do EE das folhas de *P. bracteosa*

A identificação por ESI-IT/MS<sup>n</sup> dos compostos do EE das folhas de *P. bracteosa*, no modo negativo, foi obtida com base no comportamento espectral de

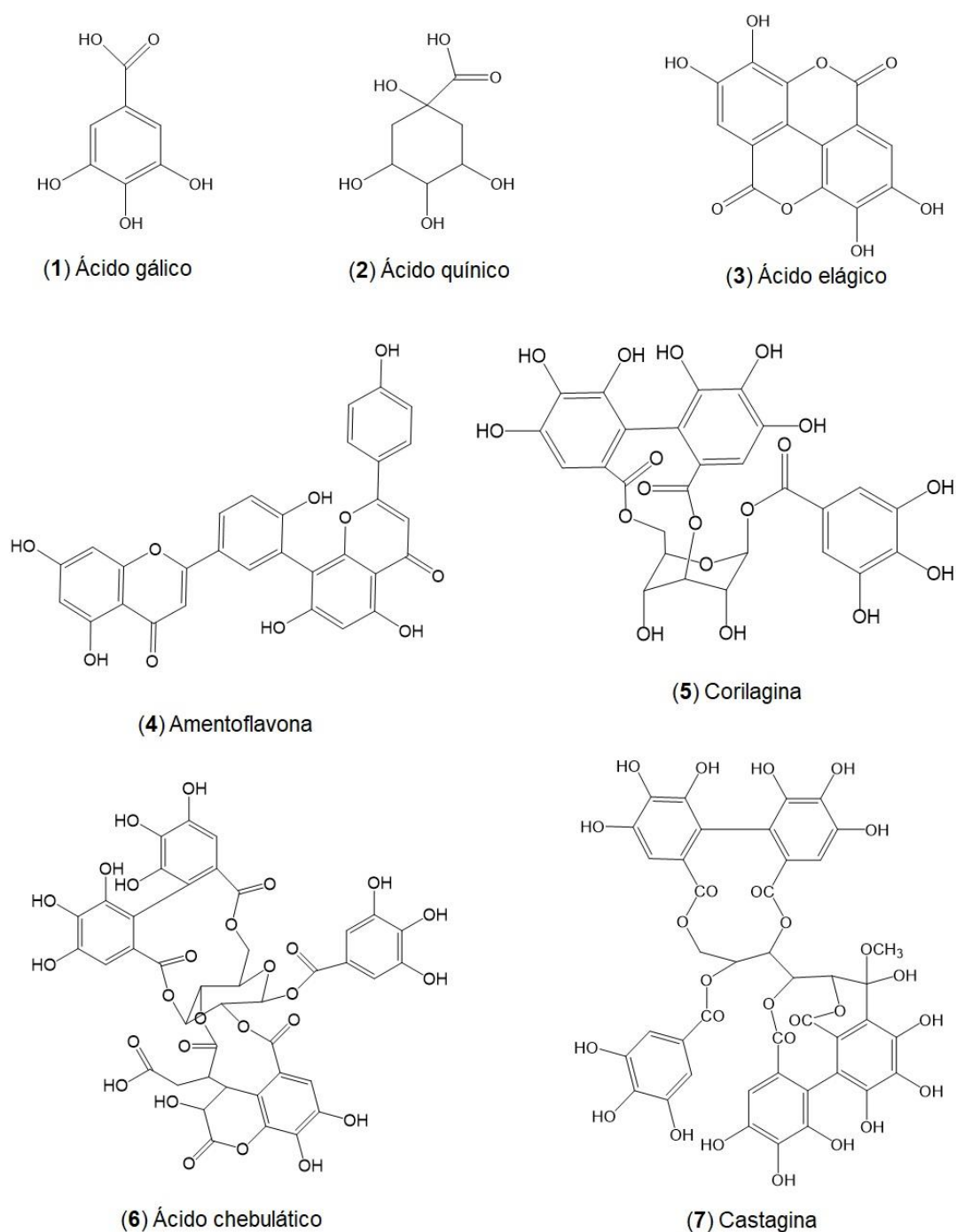


massa das fragmentações em experimentos de  $MS^n$ , pela seleção e fragmentação do íon precursor e comparações com a literatura. A investigação química desse extrato, permitiu a identificação dos compostos 1-7 (Figura 4.7).



**Figura 4.7** – Perfil químico do EE das folhas de *P. bracteosa* obtido por ESI-IT/ $MS^n$

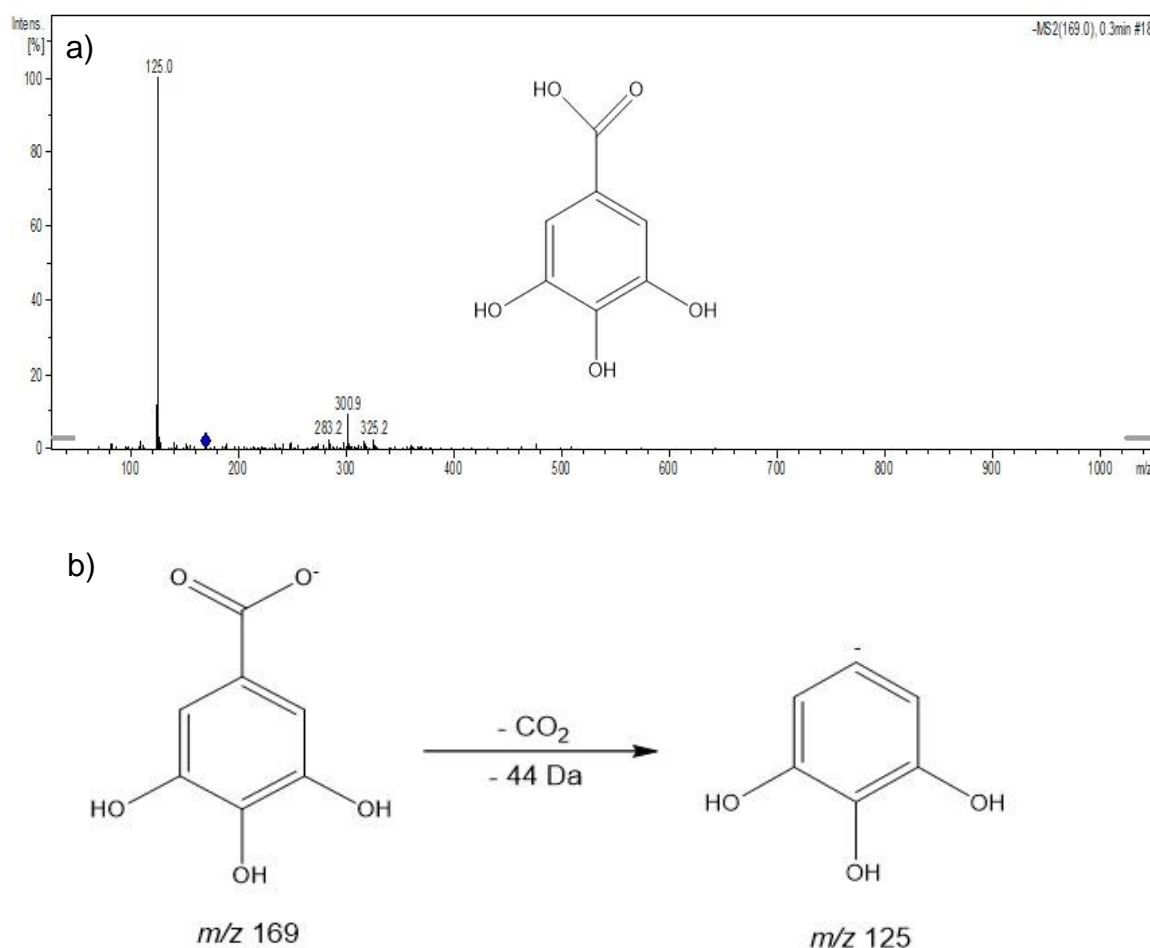
A análise por ESI-IT/ $MS^n$  possibilitou a identificação de sete compostos: ácido gálico, ácido quínico, ácido elágico, amentoflavona, corilagina, ácido chebulático e castalagina (Figura 4.8).



**Figura 4.8** – Estruturas dos constituintes químicos identificados no EE das folhas de *P. bracteosa* por ESI-IT/MS<sup>n</sup>

A fragmentação do íon precursor  $m/z$  169 levou a formação do pico base  $m/z$  125  $[M-44-H]^-$  no seu espectro MS<sup>2</sup>, que é resultante da perda de CO<sub>2</sub> sendo então identificado como ácido gálico (composto 1) (Figura 4.9 e Tabela 4.1). Esse composto foi anteriormente isolado no extrato acetanólico das folhas de *P.*

*mimosoides* (Fabaceae) <sup>127</sup>. O ácido está sendo relatado pela primeira vez na espécie *P. bracteosa*.



**Figura 4.9** – a) Espectro MS do íon de  $m/z$  169 (Ácido gálico) e b) Proposta de fragmentação do ácido gálico  $m/z$  169  $[M-H]^-$  <sup>128</sup>

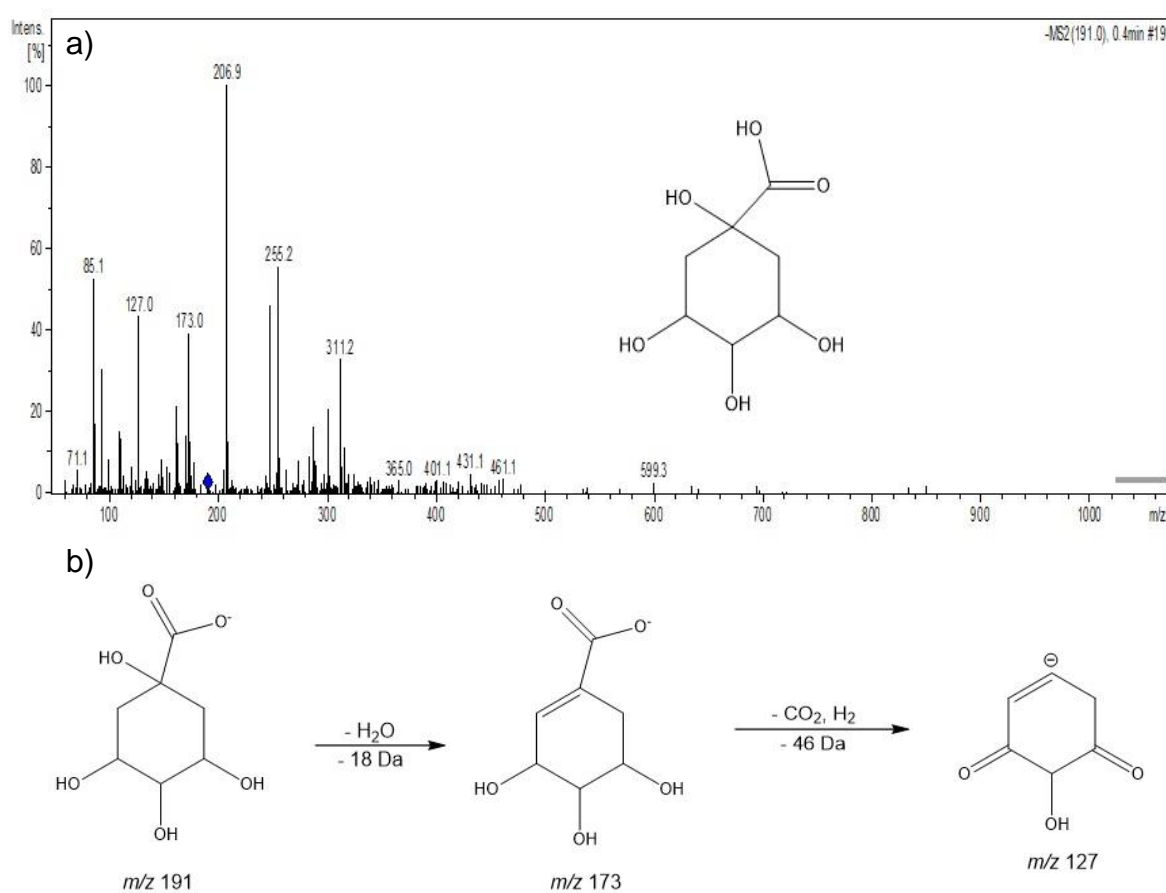
O ácido gálico é um composto fenólico com potenciais efeitos preventivos e terapêutico em muitas doenças onde o estresse oxidativo está presente, incluindo doenças cardiovasculares, câncer, distúrbios degenerativos e envelhecimento <sup>129</sup>. Esse composto foi encontrado em outras espécies do gênero *Poincianella* *sp* incluindo, *P. cacalaco*, *P. benthamiana*, *P. pyramidalis* e *P. ferrea* <sup>32</sup>

**Tabela 4.1** Identificação por espectrometria de massas dos constituintes químicos do EE das folhas de *Poincianella bracteosa*

Nº	Constituinte químico	Fórmula molecular	Massa molecular	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	MS/MS (Intensidade relativa)
1	Ácido gálico	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	170	169	MS <sup>2</sup> [169]: 125 (100),
2	Ácido quínico	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	192	191	MS <sup>2</sup> [191]: 173 (39), 127 (43)
3	Ácido elágico	C <sub>14</sub> H <sub>6</sub> O <sub>8</sub>	302	301	MS <sup>2</sup> [301]: 284 (66), 257 (100), 229 (95) MS <sup>3</sup> [257]: 229, 185
4	Amentoflavona	C <sub>30</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	538	537	MS <sup>2</sup> [537]: 443 (55), 417 (8), 399 (14), 375 (100) MS <sup>3</sup> [443]: 399
5	Corilagina	C <sub>27</sub> H <sub>22</sub> O <sub>18</sub>	634	633	MS <sup>2</sup> [633]: 463 (7), 301 (100) MS <sup>3</sup> [301]: 284, 257, 229, 185
6	Ácido chebulático	C <sub>41</sub> H <sub>30</sub> O <sub>27</sub>	954	953	MS <sup>2</sup> [953]: 633 (17), 463 (40), 301 (100) MS <sup>3</sup> [935]: 463, 301
7	Castalagina	C <sub>42</sub> H <sub>30</sub> O <sub>27</sub>	966	965	MS <sup>2</sup> [965]: 933 (100), 915 (9), 463 (10), 301 (28) MS <sup>3</sup> [933]: 301

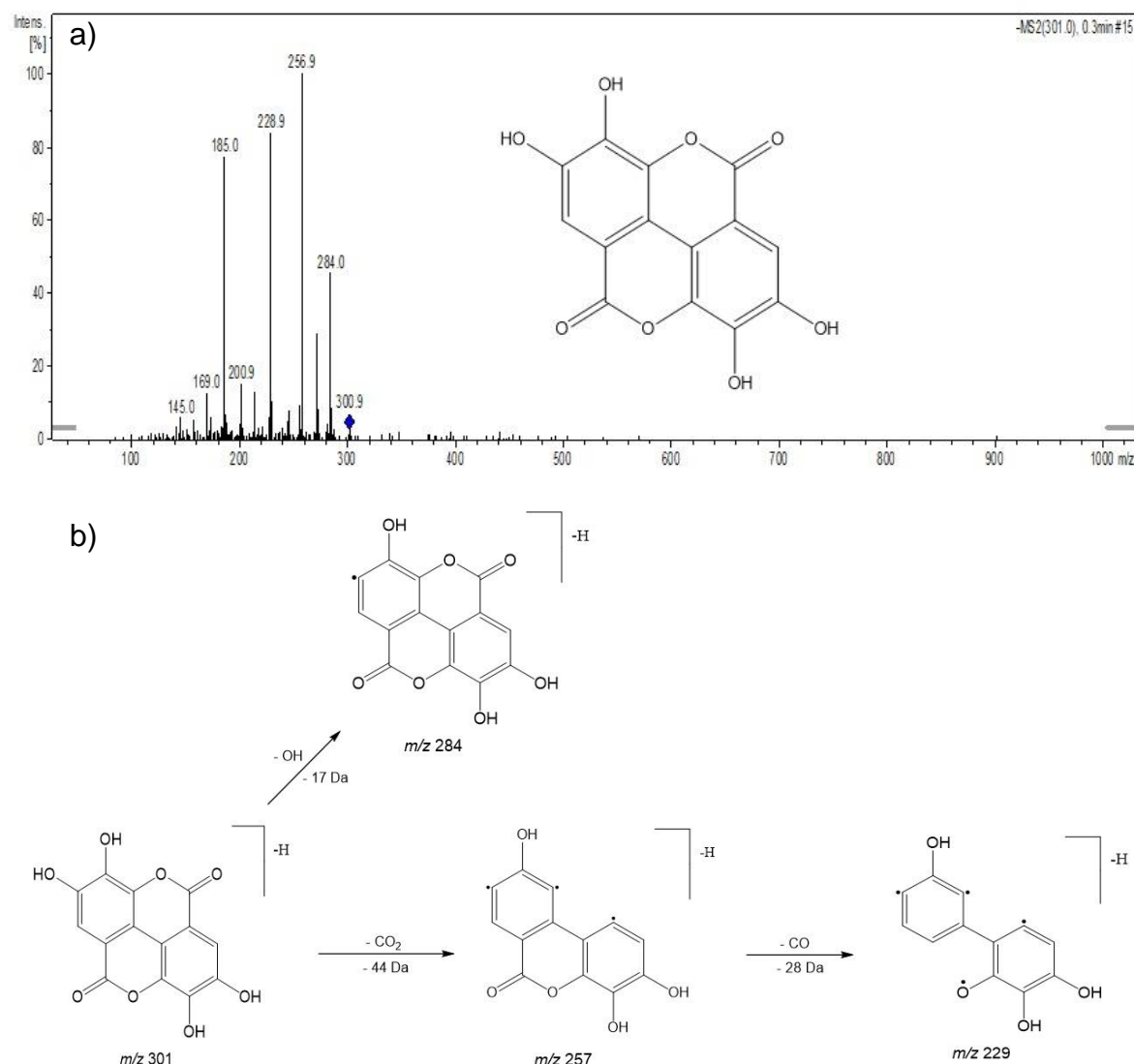
O composto 2 identificado como ácido quínico apresentou um íon  $m/z$  191 [M-H]<sup>-</sup> e o seu espectro MS<sup>2</sup> (exibiu íons fragmentos  $m/z$  173 [M-H-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup> e 127 [M-H-H<sub>2</sub>O-CO<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>]<sup>-</sup>, conforme a proposta de fragmentação Figura 4.10 e Tabela 4.1) <sup>128</sup>. Esse composto também foi identificado no extrato aquoso dos frutos de *P. microphilla* (Fabaceae) <sup>130</sup>. Na espécie *P. bracteosa* está sendo relatado pela primeira vez.

O ácido quínico é um ácido ciclo-hexano-carboxílico que funciona como precursor na síntese de vários compostos fenólicos existentes em plantas e microorganismos. Além disso, apresenta atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiano, anticardiovascular e hepatoprotetora <sup>131</sup>.



**Figura 4.10** – a) Espectro MS<sup>2</sup> do íon  $m/z$  191 (ácido quínico) e b) Proposta de fragmentação do ácido quínico  $m/z$  191  $[M-H]^{-132}$

O pico da molécula desprotonada  $[M-H]^{-}$  em 301  $m/z$  (Figura 4.7) foi atribuído ao composto 3 (Figura 4.8). Seu espectro de MS<sup>2</sup> gerou íons fragmentos em  $m/z$  284, 257 e 229, consistindo na identificação do ácido elágico (Figura 4.11, Tabela 4.1) <sup>132</sup>. Este composto é um polifenólico de ocorrência natural encontrado em muitos frutos (framboesa, morango, uva, manga e goiaba), bebidas e extratos vegetais nas formas de taninos hidrolisáveis chamados elagitaninos <sup>31,133</sup>.

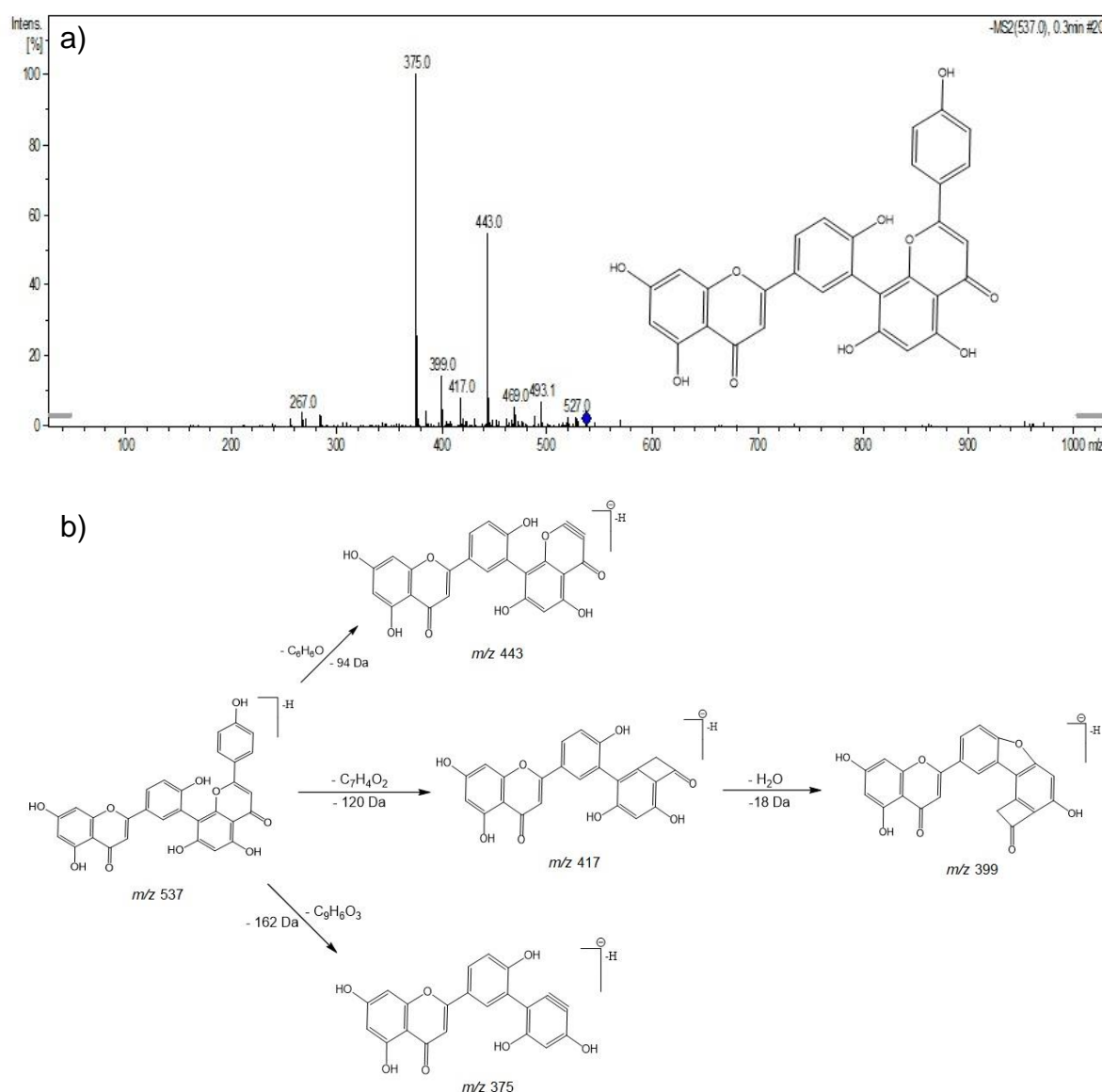


**Figura 4.11** – a) Espectro MS<sup>2</sup> do íon  $m/z$  301 (ácido elágico) e b) Proposta de fragmentação do ácido elágico  $m/z$  301  $[M-H]^{-132}$

Estudos recentes mostraram a presença do ácido elágico no extrato aquoso das folhas e frutos nas espécies *P. microphylla* e *P. pluviosa* (Fabaceae) <sup>130,134</sup>. Na espécie *P. bracteosa*, este estudo é o primeiro a relatar sua identificação.

Investigando o possível mecanismo de antiproliferação e pró-apoptose desse elagitanino, estudo <sup>135</sup> avaliou a distribuição do ciclo celular de células de glioma humano (U251 MG) por citometria de fluxo na presença e ausência de ácido elágico, e constatou que houve diminuição na porcentagem de células na fase G0 / G1. Isso sugeriu que esse composto induz a parada do ciclo celular na fase S em células de glioblastoma.

O composto 4 identificado como amentoflavona foi caracterizado pelo íon  $m/z$  537  $[M-H]^-$  (Figura 4.8). No espectro  $MS^2$  esse íon molecular forneceu íons fragmentos em  $m/z$  443  $[M-H-C_6H_6O]^-$ , 417  $[M-H-C_7H_4O_2]^-$ , 399  $[M-H-C_7H_6O_3]^-$  e 375  $[M-H-C_9H_6O_3]^-$ , em concordância com o mecanismo de fragmentação proposto por <sup>136</sup> (Figura 4.12 e Tabela 4.1). A espécie *P. ferrea* (Fabaceae) foi a primeira do gênero *Poincianella* sp que registrou isolamento desse bioflavonoide <sup>137</sup>. A amentoflavona está sendo descrita pela primeira vez na espécie *P. bracteosa*.



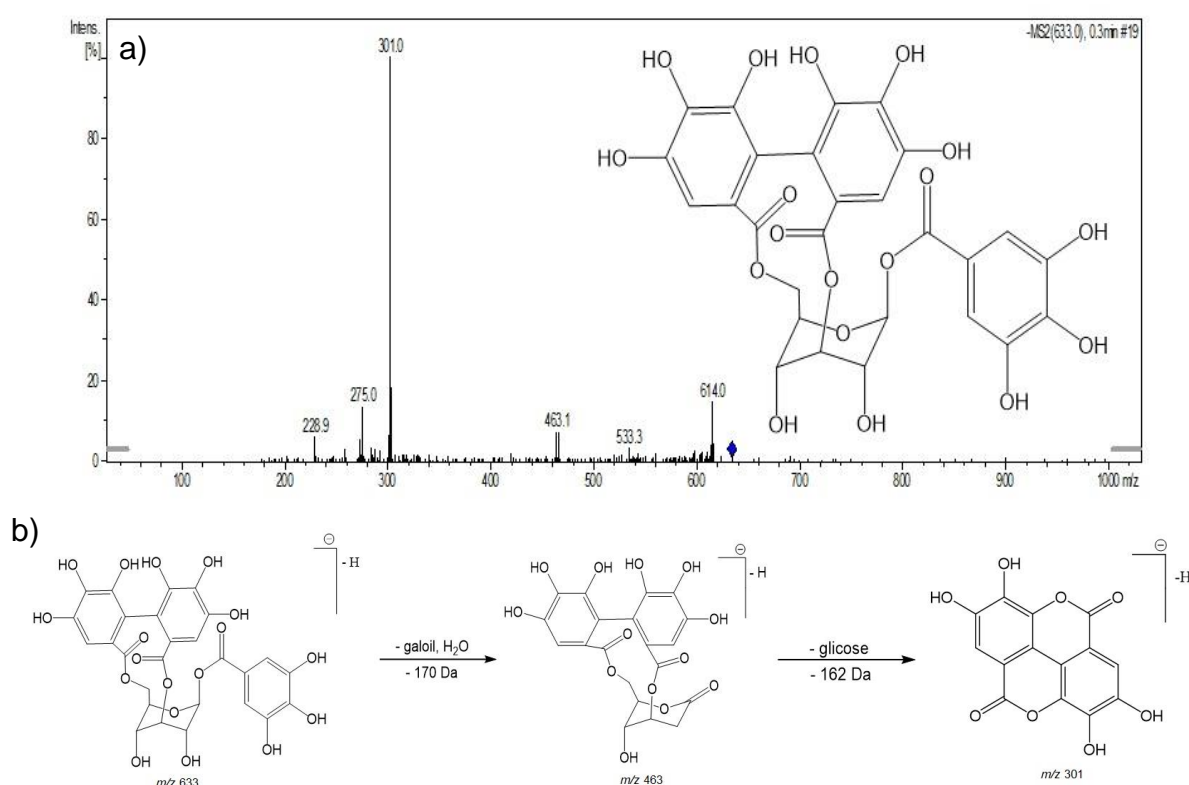
**Figura 4.12** – a) Espectro  $MS^2$  do íon  $m/z$  537 (amentoflavona) e b) Proposta de fragmentação da amentoflavona  $m/z$  537  $[M-H]^-$  <sup>136</sup>.

Amentoflavona é um tipo de bioflavonoide e importante constituinte de diferentes famílias plantas medicinais como Phyllanthaceae, Euphorbiaceae,

Liliaceae, Malpighiaceae e Fabaceae<sup>137,138</sup>. As principais propriedades farmacológicas atribuídas para esse bioflavonoide são anti-inflamatória, alérgica, anticâncer, bem como uma atividade antimicrobiana *in vitro* (antibacteriano e antifúngico) contra diversos agentes patogênicos linhagens de fungos<sup>139</sup>.

Esse bioflavonoide tem fortes atividades citotóxicas contra as linhagens de células cancerígenas humanas MCF-7 (mama) e HeLa (cervical), que ocorre através da ativação de hPPAR $\gamma$  (Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama), promove a proliferação celular descontrolada e disseminação da célula<sup>140</sup>.

A fragmentação do íon  $m/z$  633 do composto 5 resultou no espectro de segunda ordem ( $MS^2$ ) que forneceu os íons produtos  $m/z$  463  $[M-H-galoil-H_2O]^-$  e 301  $[M-H-galoil-H_2O-glicose]^-$ , caracterizando a presença do elagitanino Corilagina<sup>122,141</sup> (Figura 4.13 e Tabela 4.1). Foi identificado pela primeira vez em 1951 na espécie *Poincianella coriaria* (Fabaceae), é comumente encontrado em plantas da família Combretaceae e Euphobiaceae<sup>142</sup>. Na espécie *P. bracteosa*, esse elagitanino está sendo identificado pela primeira vez.



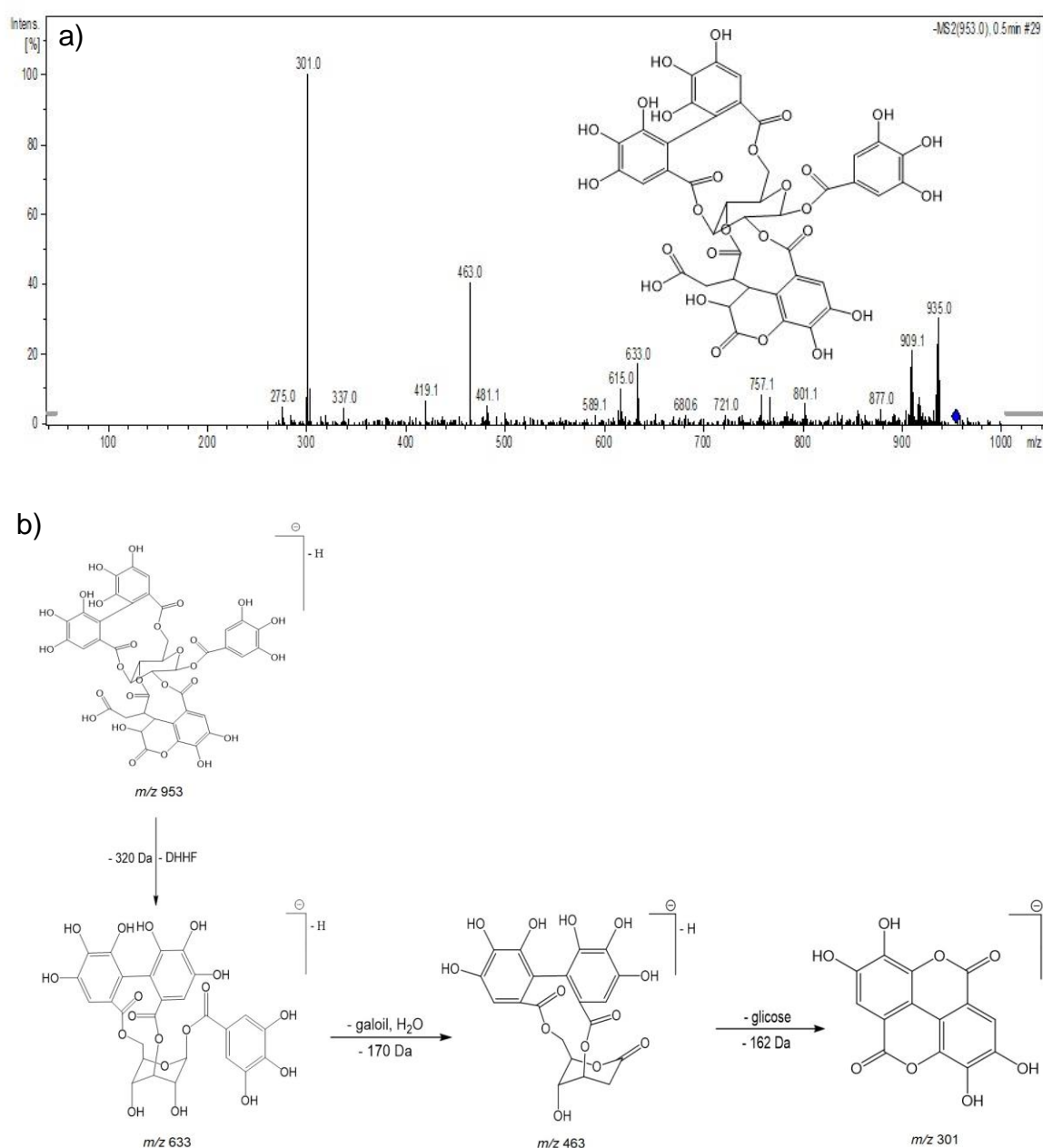
**Figura 4.13** – a) Espectro  $MS^2$  do íon  $m/z$  633 (Corilagina) e b) Proposta de fragmentação da corilagina  $m/z$  633  $[M-H]^-$ <sup>143</sup>



A Corilagina, pertencente a classe dos taninos, é o principal componente ativo de plantas etnofarmacológicas como *J. curcas* L. (Euphobiaceae), *P. emblica* L. (Phyllanthaceae) e *Zanthoxylum piperitum* L. (Rutaceae) <sup>144</sup>. Algumas das atividades farmacológicas descritas para esse composto são antiaterogênicos, hepatoprotetora, antioxidante e antitumoral <sup>145</sup>.

O composto 6 apresentou pico da molécula desprotonada  $[M-H]^-$  em  $m/z$  953 (Figura 4.8). No seu espectro  $MS^2$  observou-se íons fragmentos em  $m/z$  633  $[M-H-DHHDF]^-$ , 463  $[M-H-DHHDF-170]^-$  e 301, o qual foi identificado como ácido chebulático <sup>141</sup> (Figura 4.14, Tabela 4.1). Esse composto ocorre comumente nas plantas pertencentes à família Leguminosae, Fabaceae, Combretaceae, Euphorbiaceae e Anacardiaceae <sup>142</sup>. Na espécie *P. bracteosa*, é o primeiro relato de identificação do ácido chebulático.

Estudos mostram que o ácido chebulático isolado do extrato etanólico dos frutos de *Terminalia chebula* Retzius (Combretaceae) tem duplo efeito inibitório contra as enzimas ciclooxigenases (COX) e lipoxigenases (LOX), envolvidas em vários distúrbios inflamatórios e alérgico, potente atividade antioxidante diante dos testes de DPPH e ABTS. No ensaio de fragmentação de DNA, esse estudo ainda revelou que o ácido chebulático induz apoptose de células COLO-205 (linhagem de células tumorais humanas) <sup>146</sup>.

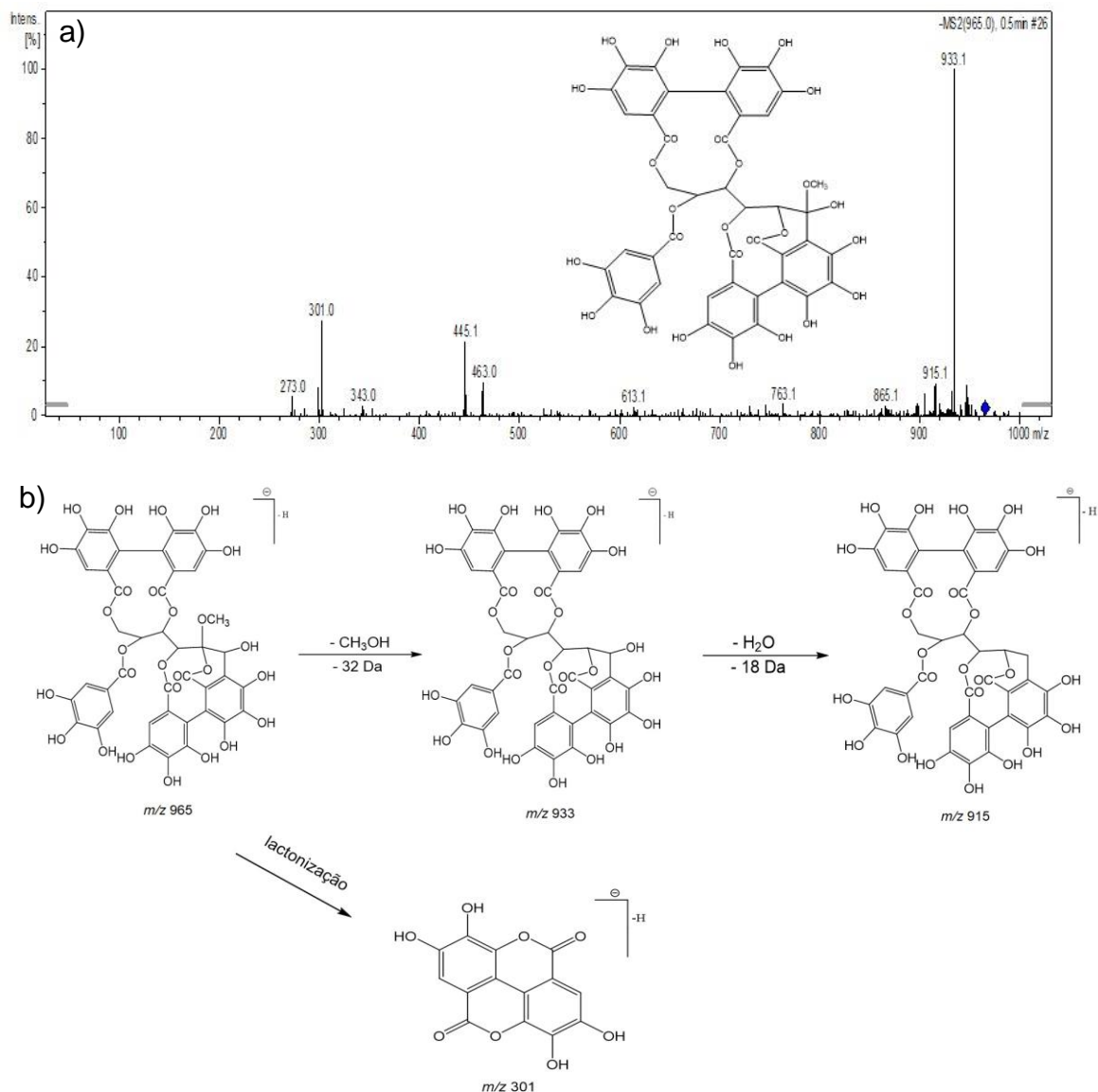


**Figura 4.14** – a) Espectro MS<sup>2</sup> do íon  $m/z$  953 (ácido chebulático) e b) Proposta de fragmentação do ácido chebulático  $m/z$  953  $[M-H]^{-143}$

A fragmentação do íon de  $m/z$  965 (composto 7) resultou no espectro de segunda ordem que mostrou os íons produtos em  $m/z$  933  $[M-H-CH_3OH]^{-}$ , 915  $[M-H-CH_3OH-H_2O]^{-}$ , 631  $[M-H-DHHDF]^{-}$  e 301, que pode ser proveniente da reação de lactonização com formação do ácido elágico, caracterizando a presença do elagitanino castalagina (Figura 4.15 e 4.28, Tabela 4.1) <sup>31,147</sup>.

A espécie *P. ferrea* (Fabaceae) registrou identificação desse elagitanino, que é normalmente encontrado em plantas das famílias Lythraceae, Myrtaceae,

Combretaceae, Melastomataceae e Punicaceae<sup>31,148</sup>. Esse é o primeiro relato de castalagina da espécie *P. bracteosa*.



**Figura 4.15** – a) Espectro MS<sup>2</sup> do íon  $m/z$  965 (Castalagina) e b) Proposta de fragmentação da corilagina  $m/z$  965  $[\text{M}-\text{H}]^-$ <sup>31</sup>

Estudo recente mostrou que a castalagina isolada de *Syzygium samarangense* (Myrtaceae) tem ação na inibição da DNA topoisomerase II- $\alpha$  humana. A inibição dessa atividade catalítica é uma das principais ações de vários agentes antitumorais com estruturas químicas diversas; a topoisomerase II do DNA agora é reconhecida como um alvo importante para o desenvolvimento de agentes citotóxicos com potencial antitumoral<sup>149</sup>.

## 4.5 Prospecção fitoquímica

As folhas de *P. bracteosa* são amplamente utilizadas de maneira empírica para fins terapêuticos. Como faltam informações científicas e estudos toxicogenéticos dessa espécie, buscou-se realizar a prospecção fitoquímica, a partir de reações colorimétricas e/ou de precipitação, para a identificação das principais classes de compostos bioativos nas frações FH, FE e FA do extrato etanólico das folhas de *P. bracteosa*.

Na prospecção fitoquímica de FH, FE e FA foram detectados a presença de flavonoides e terpenos. Além disso, FH apresentou depsídeos e depsidonas, enquanto na FE e FA foram detectados fenóis e saponinas (Tabela 4.2).

**Tabela 4.2** – Resultado da prospecção fitoquímica das frações hexânica (FH), etérea (FE) e acetanólica (FA) de folhas de *P. bracteosa*

Classe de metabólitos	Frações		
	FH	FE	FA
Flavonoides	+	+	+
Fenóis	-	+	+
Taninos	-	-	-
Saponinas	-	+	+
Alcaloides	-	-	-
Flavonóis, flavonas e xantonas	-	-	-
Catequinas	-	-	-
Terpenos	+	+	+
Depsídeos/ depsidonas	+	-	-

(+) positivo e (-) negativo.

Estudos fitoquímicos em extratos de *Poincianella* sp. demonstraram a ocorrência de uma diversidade de metabólitos secundários nas espécies do gênero. Observou-se uma variabilidade natural que é atribuída à diversidade de espécies, solventes extratores, o tempo de coleta, variação geográfica e os órgãos vegetais testados <sup>150,151</sup>.

A presença de taninos e compostos fenólicos foi detectada no extrato metanólico das cascas e raízes de *P. bracteosa*, por <sup>11</sup>. Taninos também foram detectados no extrato aquoso das cascas de *P. bracteosa* <sup>37</sup>. No extrato aquoso das folhas de *P. bracteosa* detectou-se a presença de alcaloides e taninos <sup>38</sup>. Neste

estudo FH exibiu a presença de flavonoides, terpenos, depsídeos e depsidonas e na FE e FA observou-se flavonoides, fenóis, saponinas e terpenos.

Em geral, taninos são metabólitos hidrossolúveis <sup>152</sup> e o uso de solventes menos polares para extração pode não ser capaz de extraí-los em quantidade suficiente para detecção na análise qualitativa, como observada na FH, FE e FA. Ressalta-se que resultados negativos para certos constituintes obtidos em determinadas frações podem estar relacionados à baixa concentração dos mesmos e não implicam necessariamente a ausência dos fitocompostos <sup>153</sup>.

#### 4.6 Teor de Compostos Fenólicos (TCF)

A determinação espectrofotométrica do TCF revelou que a FE ( $441,23 \pm 1,82$  mg EAG/g) apresenta o maior teor de fenólicos totais, seguida da FA ( $114,74 \pm 2,53$  mg EAG/g) e FH ( $9,12 \pm 5,17$  mg EAG/g) (Tabela 4.3).

**Tabela 4.3** – Teor de compostos fenólicos e flavonoides totais das frações hexânica (FH), etérea (FE) e acetanólica (FA) de folhas de *P. bracteosa*

Frações	Fenólicos totais <sup>1</sup> (mg EAG.g <sup>-1</sup> )	Flavonoides totais <sup>2</sup> (mg EQ.g <sup>-1</sup> )
FH	$9,12 \pm 5,2$	$84,77 \pm 5,30$
FE	$441,2 \pm 1,8$	$32,09 \pm 0,41$
FA	$114,7 \pm 2,5$	$20,10 \pm 0,74$

<sup>1</sup>Conteúdo fenólico total expresso em mg de equivalente de ácido gálico (EAG). g<sup>-1</sup> de peso seco de fração foliar. <sup>2</sup> Teor total de flavonóides expresso em mg de equivalentes de quercetina (EQ). g<sup>-1</sup> de peso seco de fração foliar. Os valores foram expressos como médias  $\pm$  DP (desvio padrão) de n=3.

Embora não detectada a presença de fenóis na FH na análise qualitativa, a partir da determinação do TCF foi possível quantificar a presença desses compostos na FH ( $9,12 \pm 5,17$  mg EAG/g) mesmo que em menor quantidade. Isso se deve a presença de outros compostos fenólicos encontrados na FH, como flavonoides, depsídeos e depsidonas. Compostos fenólicos incluem uma grande diversidade de estruturas, simples e complexas, que possuem pelo menos um anel aromático no qual, ao menos, um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila <sup>49</sup>.

Essa classe de compostos protege o organismo humano de várias doenças crônicas e degenerativas, além de contribuírem diretamente como antioxidantes,

impedindo a ação de radicais livres no organismo, protegendo as moléculas de DNA, inibindo ou abortando processos carcinogênicos <sup>154,155</sup>, o que torna interessante, principalmente a FE ( $441,23 \pm 1,82$  mg EAG/g) na qual foi observado maior valor de TCF.

#### 4.7 Teor de Flavonoides Totais (TFT)

A análise revelou uma maior quantidade de flavonoides na FH ( $84,77 \pm 5,33$  mg EQ/g), seguida da FE ( $32,09 \pm 0,42$  mg EQ/g) e FA ( $20,10 \pm 0,75$  mg EQ/g) (Tabela 4.4).

Maior quantidade de flavonoides foi detectada na fração mais apolar FH ( $84,77 \pm 5,33$  mg EQ/g) e menor na fração mais polar FA ( $20,10 \pm 0,75$  mg EQ/g). Muitos flavonoides têm grupos polares apróticos (por exemplo, metoxi) em substituição dos grupos hidroxilas presente na estrutura dos flavonoides. Isso levam a conversão de compostos altamente hidrofílicos em compostos hidrofóbicos. Como resultado, eles podem aparecer na FH <sup>156,157</sup>.

O método de flavonoides totais consiste no fato do íon alumínio ( $Al^{3+}$ ) forma complexos com OH de compostos flavonoides em C3'-C4 'ou OH em C-3 e 4-oxo, e ou OH em C-5 e 4-oxo no anel A ou B <sup>158</sup>. Não foi observada correlação entre o TCF e o TFT, suportando o fato de que a maioria dos flavonoides presentes em *P. bracteosa* apresentam grupos apróticos.

#### 4.8 Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante das frações de *P. bracteosa* avaliadas pelos métodos de DPPH e ABTS abrange uma diversidade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica existente na planta, permitindo gerar um perfil antioxidante mais completo da espécie em estudo.

Na determinação da atividade antioxidante por meio do sequestro do DPPH $\cdot$  foi evidenciado que a FE ( $CE_{50}$   $25,06 \pm 0,07$   $\mu$ g/mL) apresenta maior atividade antioxidante seguida pela a FA ( $CE_{50}$   $34,26 \pm 0,39$   $\mu$ g/mL) e FH ( $CE_{50}$   $277,07 \pm 1,06$   $\mu$ g/mL) (Tabela 4.4).

**Tabela 4.4** – Atividade antioxidante das frações hexânica (FH), etérea (FE) e acetanólica (FA) de folhas de *P. bracteosa*

Frações	Atividade antioxidante	
	DPPH <sup>1</sup> CE <sub>50</sub> (µg/mL)	TEAC <sup>2</sup> (mM Trolox/g)
<b>FH</b>	277,1 ± 1,1	336,1 ± 13,1
<b>FE</b>	25,6 ± 0,1	7061,0 ± 104,5
<b>FA</b>	34,26 ± 0,4	4280,6 ± 114,8

<sup>1</sup> Valores da concentração efetiva (CE<sub>50</sub>) para o ácido ascórbico foi 22,72 ± 0,13 µg/mL (atividade de eliminação de DPPH). <sup>2</sup> Valores expressos em capacidade antioxidante equivalente em mM de Trolox (TEAC). g<sup>-1</sup> de peso seco de fração foliar. Os valores foram expressos como médias ± DP (desvio padrão) de experimentos em triplicata.

No ensaio de redução do radical ABTS<sup>•+</sup> os resultados foram expressos em Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC). Quanto maior o valor TEAC observado, maior o potencial antioxidante da amostra. Assim, a FE apresentou maior valor de TEAC de 7061,57 ± 104,50 mM de Trolox/g de amostra foliar seguida pela FA 4280,63 ± 114,80 mM de Trolox/g de amostra e FH com 336,10 ± 13,05 mM de Trolox/g de amostra (Tabela 4.4).

Os compostos fenólicos e flavonoides são as classes de polifenóis que possuem mecanismos para moléculas protetoras (lipídios, proteínas e ácidos nucléicos) do dano oxidativo, mostrando assim uma atividade antioxidante potente <sup>159</sup>. Uma análise dos dados apresentados na Tabela 4.5 revela que a atividade antioxidante observada para as frações FH, FE e FA de *P. bracteosa* se correlacionam com os valores observados de TCF, no entanto, o mesmo não foi observado para o teor de flavonoides totais. Embora compostos fenólicos e flavonoides trabalhem juntos com o sistema de defesa antioxidante endógena, e a maior quantidade de conteúdo polifenol está associado à elevada capacidade antioxidante da FE <sup>160</sup>.

A eliminação da atividade de radicais livres e o poder de redução dos extratos botânicos também foi bem correlacionado com o teor de compostos fenólicos para o EE das cascas de *P. ferrea* e das folhas *P. bonduc*, bem como para o extrato hidroalcoólico dos frutos *P. spinosa* <sup>161,163</sup>. A ação antioxidante dos compostos fenólicos deve-se essencialmente à sua contribuição em reações redox pelas quais eles podem absorver e neutralizar as espécies reativas de oxigênio (EROS) <sup>164</sup>.

Há diferentes métodos na literatura para a determinação da capacidade antioxidante de sistemas biológicos, matriz simples e complexas como extrato de plantas <sup>165</sup>. A diversidade química de antioxidantes permite um comportamento diferente diante de cada radical, por isso, mais de um método de atividade antioxidante deve ser usado para comparar o modo de ação de moléculas bioativas <sup>166</sup>. No presente estudo, os resultados entre os dois métodos utilizados: DPPH e ABTS para determinação da atividade antioxidante foram concordantes.

No ensaio DPPH foi observada excelente atividade antioxidante para a FE ( $CE_{50} = 25.06 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$ ) quando comparada ao padrão Ácido Ascórbico ( $CE_{50} = 22,72 \pm 0,13 \mu\text{g/mL}$ ), pois não foram observadas diferenças significativas entre ambos ( $p\text{-valor} = 0.3082$ ), enquanto para as frações FH ( $CE_{50} = 277,10 \pm 1,06 \mu\text{g/mL}$ ) e FA ( $CE_{50} = 34,26 \pm 0.39 \mu\text{g/mL}$ ) observaram-se diferenças em relação ao padrão,  $p\text{-valor} = 0,0022$  e  $0,042$ , respectivamente. Além disso, pela técnica de CLAE-DAD foi possível observar a presença de compostos fenólicos com tempo de retenção entre 24-27 e 31 min na FE, que se mostraram ausentes na FA.

Quando comparada a outras espécies do mesmo gênero verificou-se que *P. bracteosa* é uma excelente fonte de antioxidantes naturais, visto que foi observada TEAC variando entre  $336,10 \pm 13,05 \text{ mM de Trolox/g de FH}$  e  $7061,57 \pm 104,50 \text{ mM de Trolox/g de FE}$  e esses resultados mostraram uma atividade antioxidante superior às demais espécies de *Poincianella sp.* já investigadas pelo ensaio de redução do radical  $ABTS^{*+}$ , no qual, para o extrato hidroalcoólico das folhas de *P. spinosa* e *P. decapetala* observou-se TEAC de  $10,17 \pm 0,20$  e  $0,36 \text{ mM de Trolox/g de amostra}$  <sup>161,167</sup>.

#### 4.9 Atividade Biológica - Bioensaio *Allium cepa*

Em razão das diferentes finalidades terapêuticas das folhas de *P. bracteosa* e a carência de informações científicas, o bioensaio *A. cepa* foi utilizado no presente estudo para avaliar os efeitos citogenotóxico e protetor da FH, FE e FA das folhas de *P. bracteosa*.

O Dimetilsulfóxido (DMSO 1%) utilizado como controle negativo (CN) não apresentou efeito citogenotóxico, pois não houve diferença significativa em relação à água destilada (controle do solvente). Desta forma, os resultados usando água destilada foram omitidos das tabelas 4.5 - 4.10. Resultados similares foram



observados em outros estudos com *A. cepa* utilizando o DMSO como solvente<sup>106,168,169</sup>.

O efeito citotóxico nas células meristemáticas de *A. cepa* foi observado nas três frações avaliadas. Na FH observou-se diminuição do índice mitótico (IM) nas concentrações de 2 e 8 mg/mL quando comparadas com o controle negativo (CN) (Tabela 4.5). A FE apresentou redução significativa do IM em todas as concentrações analisadas (2, 4, 8 e 16 mg/mL), indicando alta atividade citotóxica (Tabela 4.6). Enquanto a FA apresentou potencial citotóxico apenas nas maiores concentrações (8 e 16 mg/mL) (Tabela 4.7).

A ação citotóxica de uma substância pode ser determinada pelo aumento ou diminuição do IM das células submetidas a um agente teste<sup>170</sup>. A redução significativa do IM em relação ao CN pode indicar alterações, decorrentes do processo de morte celular e diminuição das fases de divisão celular<sup>171</sup>. Estudos anteriores do extrato aquoso das cascas<sup>37</sup> e das folhas<sup>38</sup> de *P. bracteosa* nenhuma das concentrações (2, 4, 8 e 16 mg/mL) avaliadas apresentaram efeito citotóxico. A inibição da atividade mitótica causada pelas frações FH, FE e FA de *P. bracteosa* pode estar associada à presença dos metabólitos secundários detectados em suas composições, sobretudo os terpenos e flavonoides encontrados nas três frações em estudo, uma vez que os mesmos não foram observados no extrato etanólico das folhas e aquoso das cascas ou folhas de *P. bracteosa*<sup>7,37,38</sup>.

Terpenos são metabólitos secundários inibidores da atividade da topoisomerase II, responsável pela mudança topológica da molécula de DNA, afetando a replicação e a condensação cromossômica, restringindo o processo de divisão celular<sup>172</sup>. Os terpenos podem bloquear a transição da fase G2/M impedindo a célula de entrar em mitose como observados por<sup>173</sup>. Reforçando os resultados, os terpenos são considerados um dos compostos mais tóxicos como observado em *Jatropha* sp.<sup>174</sup>, promovendo o efeito citotóxico em células meristemáticas de *A. cepa* quando expostas ao extrato etanólico das folhas de *J. gossypifolia* (Euphobiaceae)<sup>108</sup>. Resultados similares quanto à toxicidade dos terpenos também foram observados em estudos antiparasitários<sup>175</sup>.

**Tabela 4.5** – Média do índice, média das alterações cromossômicas e porcentagem de redução de danos (%RD) nas células meristemáticas de *A. cepa* quando expostas a FH das folhas de *P. bracteosa*.

Tratamentos	Índice mitótico (Média ± DP)	Total de AC (Média ± DP)	%RD
CN	27,57 ± 6,79	8,43 ± 2,40	-
MMS	14,84 ± 5,61*	40,76 ± 9,09**	-
<b>Mutagenicidade</b>			
FH 2 mg/mL	19,37 ± 6,35*	7,77 ± 1,71	-
FH 4 mg/mL	23,19 ± 6,03	9,06 ± 2,48	-
FH 8 mg/mL	16,43 ± 6,91**	9,62 ± 2,60	-
FH 16 mg/mL	22,08 ± 7,13	11,13 ± 2,98	-
<b>Antimutagenicidade</b>			
<b>Pré-tratamento</b>			
FH 2 mg/mL	4,87 ± 6,35 <sup>##</sup>	3,27 ± 1,72 <sup>##</sup>	115,96
FH 4 mg/mL	8,37 ± 5,91 <sup>#</sup>	4,62 ± 4,36 <sup>##</sup>	111,76
FH 8 mg/mL	2,55 ± 1,85 <sup>##</sup>	1,99 ± 1,34 <sup>##</sup>	119,91
FH 16 mg/mL	6,82 ± 3,61 <sup>#</sup>	2,61 ± 1,22 <sup>##</sup>	118,00
<b>Tratamento-simultâneo</b>			
FH 2 mg/mL	4,09 ± 2,10 <sup>##</sup>	1,67 ± 1,35 <sup>##</sup>	120,90
FH 4 mg/mL	5,90 ± 4,05 <sup>##</sup>	2,16 ± 1,77 <sup>##</sup>	119,39
FH 8 mg/mL	4,97 ± 5,11 <sup>##</sup>	4,16 ± 3,70 <sup>##</sup>	113,20
FH 16 mg/mL	4,75 ± 5,64 <sup>##</sup>	1,72 ± 1,41 <sup>##</sup>	120,75
<b>Pós-tratamento</b>			
FH 2 mg/mL	5,63 ± 4,47 <sup>##</sup>	20,41 ± 9,06	62,94
FH 4 mg/mL	3,94 ± 3,44 <sup>##</sup>	12,47 ± 7,45 <sup>##</sup>	87,50
FH 8 mg/mL	3,31 ± 3,05 <sup>##</sup>	20,89 ± 7,27	61,45
FH 16 mg/mL	4,57 ± 6,91 <sup>##</sup>	10,10 ± 5,41 <sup>##</sup>	94,83

CN: Controle negativo (água destilada). MMS: Metil metanosulfonato, 10 mg/mL (controle positivo). Pré-tratamento: 24 h FH + 24 h MMS. Tratamento-simultâneo: 24 h água destilada + 24 h de associação de FH e MMS. Pós-tratamento: 24 h MMS + 24 h FH. DP: Desvio Padrão. \*Comparação estatística com CN para avaliar mutagenicidade. #Comparação estatística com o MMS para avaliar antimutagenicidade. <sup>\*/#</sup> significativo pelo teste Kruskal- Wallis com o teste *a posteriori* Student-Newman-Keuls (\*, # p < 0,05; \*\*, ## p < 0,01). Os resultados são referentes à análise de 5000 células por tratamento.

**Tabela 4.6** – Média do índice mitótico, total de alterações cromossômicas e porcentagem da redução de danos (%RD) de células meristemáticas de *Allium cepa* para avaliar mutagenicidade e antimutagenicidade (pré, simultâneo e pós-tratamento) após exposição à FE e aos controles.

Tratamentos	Índice Mitótico (Média ± DP)	Total de AC (Média ± DP)	%RD
CN	27,57 ± 6,79	8,43 ± 2,40	-
MMS	14,84 ± 5,61*	40,76 ± 9,09**	-
<b>Mutagenicidade</b>			
FE 2 mg/mL	14,30 ± 12,21*	1,54 ± 2,20*	-
FE 4 mg/mL	12,43 ± 11,20**	1,76 ± 1,70*	-
FE 8 mg/mL	9,31 ± 11,75**	4,26 ± 8,00*	-
FE 16 mg/mL	4,39 ± 8,85**	4,29 ± 7,90*	-
<b>Antimutagenicidade</b>			
<b>Pré-tratamento</b>			
FE 2 mg/mL	24,72 ± 9,20	3,86 ± 2,84 <sup>#</sup>	114,13
FE 4 mg/mL	14,23 ± 12,18	2,00 ± 1,36 <sup>#</sup>	119,88
FE 8 mg/mL	5,66 ± 5,96 <sup>#</sup>	0,80 ± 1,11 <sup>##</sup>	123,60
FE 16 mg/mL	5,38 ± 3,96 <sup>#</sup>	0,53 ± 0,53 <sup>##</sup>	124,43
<b>Tratamento-simultâneo</b>			
FE 2 mg/mL	14,95 ± 13,49	1,69 ± 1,97 <sup>##</sup>	120,84
FE 4 mg/mL	14,78 ± 13,27	2,29 ± 2,13 <sup>##</sup>	118,99
FE 8 mg/mL	17,91 ± 15,27	1,46 ± 1,42 <sup>##</sup>	121,55
FE 16 mg/mL	9,59 ± 5,05	0,87 ± 0,50 <sup>##</sup>	123,38
<b>Pós-tratamento</b>			
FE 2 mg/mL	21,01 ± 12,24	2,53 ± 1,68 <sup>##</sup>	118,24
FE 4 mg/mL	20,21 ± 10,23	2,20 ± 2,12 <sup>##</sup>	119,27
FE 8 mg/mL	10,54 ± 9,73	1,42 ± 1,44 <sup>##</sup>	121,68
FE 16 mg/mL	12,06 ± 7,43	1,15 ± 1,48 <sup>##</sup>	122,51

CN: Controle negativo (água destilada). MMS: Metil metanosulfonato, 10 mg/mL (controle positivo). Pré-tratamento: 24 h FE + 24 h MMS. Tratamento-simultâneo: 24 h água destilada + 24 h de associação de FE e MMS. Pós-tratamento: 24 h MMS + 24 h FE. DP: Desvio Padrão. \*Comparação estatística com CN para avaliar mutagenicidade. <sup>#</sup>Comparação estatística com o MMS para avaliar antimutagenicidade. <sup>\*/##</sup> significativo pelo teste Kruskal- Wallis com o teste *a posteriori* Student-Newman-Keuls (<sup>\*/##</sup> P < 0.05). Os resultados são referentes à análise de 5000 células por tratamento.

A FH, FE e FA não provocaram efeito genotóxico (média total das alterações cromossômicas) significativo em nenhuma das concentrações avaliadas e ainda foi observada uma redução significativa da média total de alterações cromossômicas em todas as concentrações para a FE e na concentração 8 mg/mL da FA quando comparadas ao CN. Todas as alterações cromossômicas analisadas individualmente

não apresentaram aumento significativo, independente da fração avaliada (Tabelas 4.9-4.11).

**Tabela 4.7** – Média do índice mitótico, total de alterações cromossômicas e porcentagem da redução de danos (%RD) de células meristemáticas de *Allium cepa* para avaliar mutagenicidade e antimutagenicidade (pré, simultâneo e pós-tratamento) após exposição a FA e aos controles.

Tratamentos	Índice mitótico (Média ± DP)	Total de AC (Média ± DP)	%RD
CN	27,57 ± 6,79	8,43 ± 2,40	-
MMS	14,84 ± 5,61*	40,76 ± 9,09**	-
<b>Mutagenicidade</b>			
FA 2 mg/mL	51,46 ± 28,89	5,96 ± 7,48	-
FA 4 mg/mL	31,02 ± 18,03	5,17 ± 7,61	-
FA 8 mg/mL	12,21 ± 12,73**	4,26 ± 8,00*	-
FA 16 mg/mL	4,39 ± 8,85**	4,66 ± 7,75	-
<b>Antimutagenicidade</b>			
<b>Pré-tratamento</b>			
FA 2 mg/mL	13,32 ± 7,17	1,22 ± 1,06##	122,30
FA 4 mg/mL	8,64 ± 4,71	0,96 ± 0,81##	123,10
FA 8 mg/mL	9,24 ± 10,17	0,55 ± 0,75##	124,37
FA 16 mg/mL	0,28 ± 0,47##	0,00 ± 0,00##	126,07
<b>Tratamento-simultâneo</b>			
FA 2 mg/mL	12,24 ± 06,75	6,14 ± 7,88#	107,08
FA 4 mg/mL	13,45 ± 9,06	5,72 ± 7,25#	108,38
FA 8 mg/mL	7,51 ± 8,27	4,27 ± 7,93##	112,86
FA 16 mg/mL	4,47 ± 8,82##	3,85 ± 8,11##	114,16
<b>Pós-tratamento</b>			
FA 2 mg/mL	5,48 ± 7,38#	0,08 ± 0,27##	125,82
FA 4 mg/mL	2,63 ± 2,61##	0,24 ± 0,43##	125,33
FA 8 mg/mL	0,87 ± 0,82##	0,15 ± 0,33##	125,61
FA 16 mg/mL	0,26 ± 0,60##	0,00 ± 0,00##	126,07

CN: Controle negativo (água destilada). MMS: Metil metanosulfonato, 10 mg/mL (controle positivo). Pré-tratamento: 24 h FA + 24 h MMS. Tratamento-simultâneo: 24 h água destilada + 24 h de associação de FA e MMS. Pós-tratamento: 24 h MMS + 24 h FA. DP: Desvio Padrão. \*Comparação estatística com CN para avaliar mutagenicidade. #Comparação estatística com o MMS para avaliar antimutagenicidade. \*/## significativo pelo teste Kruskal- Wallis com o teste *a posteriori* Student-Newman-Keuls (\*/\*# P < 0.05). Os resultados são referentes à análise de 5000 células por tratamento.

**Tabela 4.8** - Média dos tipos de alterações cromossômicas em células meristemáticas de *Allium cepa* para avaliar mutagenicidade e antimutagenicidade (pré, simultânea e pós-tratamento) após exposição à fração hexânica (FH) das folhas de *P. bracteosa* e aos controles.

Tratamento	Alterações cromossômicas (Média±DP)									
	MN	BN	QC	CB	CP	AC	C-metáfase	PC	PT	AM
CN <sup>1</sup>	1,29 ± 1,41	0,19 ± 0,40	0,79 ± 0,76	0,09 ± 0,30	0,08 ± 0,26	2,65 ± 1,51	0,19 ± 0,39	1,17 ± 1,15	1,97 ± 1,44	0,00 ± 0,00
MMS <sup>1</sup>	32,03 ± 8,58**	1,99 ± 2,45	1,13 ± 0,90	0,19 ± 0,60	0,34 ± 1,07	1,58 ± 1,76	0,51 ± 0,61	1,40 ± 1,58	1,59 ± 0,69	0,00 ± 0,00
<b>Mutagenicidade</b>										
FH 2 mg/mL	1,74 ± 1,05	1,12 ± 0,94	0,94 ± 0,86	0,08 ± 0,25	0,17 ± 0,35	1,95 ± 1,05	0,33 ± 0,57	0,67 ± 0,52	0,77 ± 0,75	0,00 ± 0,00
FH 4 mg/mL	2,32 ± 1,54	0,49 ± 1,02	0,52 ± 0,61	0,24 ± 0,54	0,00 ± 0,00	2,39 ± 1,38	0,51 ± 0,71	0,58 ± 0,55	1,99 ± 1,62	0,00 ± 0,00
FH 8 mg/mL	1,78 ± 2,07	0,91 ± 1,01	1,53 ± 1,10	0,55 ± 0,82	0,00 ± 0,00	2,51 ± 1,73	0,61 ± 0,91	0,90 ± 1,00	0,74 ± 1,08	0,09 ± 0,30
FH 16 mg/mL	3,01 ± 2,40	0,70 ± 0,69	0,79 ± 1,28	0,35 ± 0,62	0,00 ± 0,00	2,86 ± 1,74	0,62 ± 0,82	1,45 ± 1,82	1,36 ± 1,61	0,00 ± 0,00
<b>Antimutagenicidade</b>										
<b>Pré-tratamento</b>										
FH 2 mg/mL	2,42 ± 2,03##	0,59 ± 0,74	0,09 ± 0,27	0,07 ± 0,22	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00##	0,00 ± 0,00	0,33 ± 0,59	0,08 ± 0,27	0,00 ± 0,00
FH 4 mg/mL	2,67 ± 3,28##	0,41 ± 0,57	0,34 ± 0,44	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,34 ± 0,43	0,00 ± 0,00	0,69 ± 0,78	0,18 ± 0,38	0,00 ± 0,00
FH 8 mg/mL	1,03 ± 0,88##	0,61 ± 0,81	0,00 ± 0,00	0,09 ± 0,28	0,00 ± 0,00	0,18 ± 0,38	0,00 ± 0,00	0,08 ± 0,25	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
FH 16 mg/mL	1,36 ± 0,99##	0,40 ± 0,56	0,17 ± 0,36	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,08 ± 0,25	0,00 ± 0,00	0,50 ± 0,57	0,09 ± 0,30	0,00 ± 0,00
<b>Tratamento-simultâneo</b>										
FH 2 mg/mL	0,84 ± 0,90##	0,09 ± 0,28##	0,08 ± 0,26	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,16 ± 0,33	0,00 ± 0,00	0,17 ± 0,35##	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
FH 4 mg/mL	1,39 ± 1,40##	0,17 ± 0,35##	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,18 ± 0,38	0,08 ± 0,26	0,26 ± 0,42##	0,08 ± 0,26	0,00 ± 0,00
FH 8 mg/mL	2,72 ± 3,45##	0,72 ± 0,57	0,26 ± 0,59	0,08 ± 0,25	0,00 ± 0,00	0,17 ± 0,35	0,00 ± 0,00	0,15 ± 0,33##	0,07 ± 0,21	0,00 ± 0,00
FH 16 mg/mL	0,69 ± 0,82##	0,51 ± 0,70	0,17 ± 0,37	0,09 ± 0,30	0,00 ± 0,00	0,17 ± 0,37	0,00 ± 0,00	0,08 ± 0,24##	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<b>Pós-tratamento</b>										
FH 2 mg/mL	20,41 ± 9,06	0,53 ± 0,66	0,48 ± 0,51	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,57 ± 0,49	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
FH 4 mg/mL	11,44 ± 6,00##	0,19 ± 0,40	0,28 ± 0,61	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,08 ± 0,27	0,00 ± 0,00	0,29 ± 0,92	0,09 ± 0,28	0,00 ± 0,00
FH 8 mg/mL	20,09 ± 6,64	0,27 ± 0,44	0,17 ± 0,53	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,19 ± 0,40	0,17 ± 0,36	0,00 ± 0,00
FH 16 mg/mL	9,24 ± 5,53##	0,34 ± 0,44	0,17 ± 0,37	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,09 ± 0,28	0,00 ± 0,00	0,26 ± 0,42	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

CN: Controle negativo (água destilada). MMS: Metil metanosulfonato, 10 mg/mL (controle positivo). Pré-tratamento: 24 h FH + 24 h MMS. Tratamento-simultâneo: 24 h água destilada + 24 h de associação de FH e MMS. Pós-tratamento: 24 h MMS + 24 h FH. **MN:** Micronúcleo. **BN:** Broto Nuclear. **QC:** Quebra Cromossômica. **CB:** Célula Binucleada. **CP:** Células Poliploides. **AC:** Aderência Cromossômica. **Cm:** C-metáfase. **PC:** Perda Cromossômica. **PT:** Ponte Cromossômica. **AM:** Anáfase Multipolar. DP: Desvio padrão. \*Comparação estatística com CN para avaliar mutagenicidade. #Comparação estatística com o MMS para avaliar antimutagenicidade. \*, # Significativo pelo teste Kruskal- Wallis com o teste *a posteriori* Student-Newman-Keuls (\*# p < 0,05; \*\*,## p < 0,01). Os resultados são referentes à análise de 5000 células por tratamento.

**Tabela 4.9** - Média dos tipos de alterações cromossômicas em células meristemáticas de *Allium cepa* para avaliar mutagenicidade e antimutagenicidade (pré, simultânea e pós-tratamento) após exposição à fração etérea (FE) das folhas de *P. bracteosa* e aos controles.

Tratamento	Alterações cromossômicas (Média ± DP)									
	MN	BN	QC	CB	CP	AC	C-metáfase	PC	PT	AM
CN <sup>1</sup>	1,29 ± 1,41	0,19 ± 0,40	0,79 ± 0,76	0,09 ± 0,30	0,08 ± 0,26	2,65 ± 1,51	0,19 ± 0,39	1,17 ± 1,15	1,97 ± 1,44	0,00 ± 0,00
MMS <sup>1</sup>	32,03 ± 8,58**	1,99 ± 2,45	1,13 ± 0,90	0,19 ± 0,60	0,34 ± 1,07	1,58 ± 1,76	0,51 ± 0,61	1,40 ± 1,58	1,59 ± 0,69	0,00 ± 0,00
<b>Mutagenicidade</b>										
FE 2 mg/mL	0,00 ± 0,00*	0,00 ± 0,00	0,29 ± 0,68	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,08 ± 0,24**	1,18 ± 1,61	0,00 ± 0,00*	0,00 ± 0,00**	0,00 ± 0,00
FE 4 mg/mL	0,14 ± 0,44	0,00 ± 0,00	0,38 ± 0,52	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00**	1,19 ± 1,38	0,00 ± 0,00*	0,06 ± 0,18**	0,00 ± 0,00
FE 8 mg/mL	0,47 ± 0,90	0,38 ± 0,81	0,38 ± 0,81	0,19 ± 0,41	0,38 ± 0,81	0,45 ± 0,80**	0,38 ± 0,81	0,38 ± 0,81	0,45 ± 0,80*	0,38 ± 0,81
FE 16 mg/mL	0,64 ± 0,70	0,38 ± 0,81	0,38 ± 0,81	0,19 ± 0,41	0,38 ± 0,81	0,38 ± 0,81**	0,38 ± 0,81	0,38 ± 0,81	0,38 ± 0,81**	0,38 ± 0,81
<b>Antimutagenicidade</b>										
<b>Pré-tratamento</b>										
FE 2 mg/mL	0,06 ± 0,18##	0,00 ± 0,00	1,17 ± 1,16	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,37 ± 0,98	1,58 ± 1,58#	0,00 ± 0,00	0,67 ± 0,77	0,00 ± 0,00
FE 4 mg/mL	0,00 ± 0,00##	0,00 ± 0,00	0,56 ± 0,77	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,85 ± 0,76	0,00 ± 0,00	0,60 ± 0,73	0,00 ± 0,00
FE 8 mg/mL	0,00 ± 0,00##	0,00 ± 0,00	0,31 ± 0,41	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,23 ± 0,39	0,00 ± 0,00	0,25 ± 0,40	0,00 ± 0,00
FE 16 mg/mL	0,00 ± 0,00##	0,00 ± 0,00	0,15 ± 0,32	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,37 ± 0,39	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<b>Tratamento-simultâneo</b>										
FE 2 mg/mL	0,00 ± 0,00##	0,00 ± 0,00#	0,38 ± 0,62	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,09 ± 0,27#	1,03 ± 1,30	0,13 ± 0,28#	0,06 ± 0,20##	0,00 ± 0,00
FE 4 mg/mL	0,13 ± 0,40##	0,00 ± 0,00#	0,39 ± 0,67	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,08 ± 0,25#	1,53 ± 1,62	0,00 ± 0,00##	0,16 ± 0,35##	0,00 ± 0,00
FE 8 mg/mL	0,00 ± 0,00##	0,00 ± 0,00#	0,40 ± 0,54	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00#	1,06 ± 1,02	0,00 ± 0,00##	0,00 ± 0,00##	0,00 ± 0,00
FE 16 mg/mL	0,00 ± 0,00##	0,00 ± 0,00#	0,00 ± 0,00##	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,06 ± 0,18#	0,75 ± 0,62	0,00 ± 0,00##	0,06 ± 0,20##	0,00 ± 0,00
<b>Pós-tratamento</b>										
FE 2 mg/mL	0,00 ± 0,00##	0,00 ± 0,00##	0,69 ± 0,74	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,06 ± 0,20#	1,24 ± 1,16	0,00 ± 0,00##	0,54 ± 0,49	0,00 ± 0,00
FE 4 mg/mL	0,00 ± 0,00##	0,00 ± 0,00##	0,83 ± 1,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00#	1,09 ± 1,03	0,06 ± 0,20#	0,22 ± 0,50##	0,00 ± 0,00
FE 8 mg/mL	0,00 ± 0,00##	0,00 ± 0,00##	0,39 ± 0,57	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,07 ± 0,22#	0,97 ± 0,95	0,00 ± 0,00##	0,00 ± 0,00##	0,00 ± 0,00
FE 16 mg/mL	0,00 ± 0,00##	0,00 ± 0,00##	0,21 ± 0,49	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00#	0,85 ± 1,15	0,09 ± 0,27#	0,00 ± 0,00##	0,00 ± 0,00

CN: Controle negativo (água destilada). MMS: Metil metanosulfonato, 10 mg/mL (controle positivo). Pré-tratamento: 24 h FE + 24 h MMS. Tratamento-simultâneo: 24 h água destilada + 24 h de associação de FE e MMS. Pós-tratamento: 24 h MMS + 24 h FE. **MN:** Micronúcleo. **BN:** Broto Nuclear. **QC:** Quebra Cromossômica. **CB:** Célula Binucleada. **CP:** Células Poliploides. **AC:** Aderência Cromossômica. **Cm:** C-metáfase. **PC:** Perda Cromossômica. **PT:** Ponte Cromossômica. **AM:** Anáfase Multipolar. DP: Desvio padrão - (não aplicável). \*Comparação estatística com CN para avaliar mutagenicidade. #Comparação estatística com o MMS para avaliar antimutagenicidade (Pré-tratamento). \*/##/+Significativo pelo teste Kruskal- Wallis com o teste *a posteriori* Student-Newman-Keuls (\*/\*##/+ P < 0.05). Os resultados são referentes a análise de 5000 por tratamento.

**Tabela 4.10** - Média dos tipos de alterações cromossômicas em células meristemáticas de *Allium cepa* para avaliar mutagenicidade e antimutagenicidade (pré, simultânea e pós-tratamento) após exposição à fração acetanólica (FA) das folhas de *P. bracteosa* e aos controles.

Tratamento	Alterações cromossômicas (Média ± DP)									
	MN	BN	QC	CB	CP	AC	C-metáfase	PC	PT	AM
CN <sup>1</sup>	1,29 ± 1,41	0,19 ± 0,40	0,79 ± 0,76	0,09 ± 0,30	0,08 ± 0,26	2,65 ± 1,51	0,19 ± 0,39	1,17 ± 1,15	1,97 ± 1,44	0,00 ± 0,00
MMS <sup>1</sup>	32,03 ± 8,58**	1,99 ± 2,45	1,13 ± 0,90	0,19 ± 0,60	0,34 ± 1,07	1,58 ± 1,76	0,51 ± 0,61	1,40 ± 1,58	1,59 ± 0,69	0,00 ± 0,00
<b>Mutagenicidade</b>										
FA 2 mg/mL	0,52 ± 1,41	0,38 ± 0,81	0,76 ± 1,31	0,19 ± 0,41	0,38 ± 0,81	0,80 ± 0,81**	1,07 ± 2,20	0,38 ± 0,81	0,68 ± 0,84*	0,38 ± 0,81
FA 4 mg/mL	0,43 ± 0,78	0,38 ± 0,81	0,38 ± 0,81	0,19 ± 0,41	0,38 ± 0,81	0,62 ± 0,77**	1,16 ± 1,58	0,38 ± 0,81	0,47 ± 0,81**	0,38 ± 0,81
FA 8 mg/mL	0,47 ± 0,90	0,38 ± 0,81	0,38 ± 0,81	0,19 ± 0,41	0,38 ± 0,81	0,45 ± 0,80**	0,38 ± 0,81	0,38 ± 0,81	0,45 ± 0,80**	0,38 ± 0,81
FA 16 mg/mL	1,01 ± 1,05	0,38 ± 0,81	0,38 ± 0,81	0,19 ± 0,41	0,38 ± 0,81	0,38 ± 0,81**	0,38 ± 0,81	0,38 ± 0,81	0,38 ± 0,81**	0,38 ± 0,81
<b>Antimutagenicidade</b>										
<b>Pré-tratamento</b>										
FA 2 mg/mL	0,00 ± 0,00##	0,00 ± 0,00##	0,11 ± 0,33#	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,08 ± 0,26	0,45 ± 0,60	0,07 ± 0,23	0,51 ± 0,56#	0,00 ± 0,00
FA 4 mg/mL	0,00 ± 0,00##	0,00 ± 0,00##	0,16 ± 0,33#	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,61 ± 0,78	0,00 ± 0,00	0,20 ± 0,40#	0,00 ± 0,00
FA 8 mg/mL	0,00 ± 0,00##	0,00 ± 0,00##	0,06 ± 0,19#	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,41 ± 0,72	0,00 ± 0,00	0,08 ± 0,25##	0,00 ± 0,00
FA 16 mg/mL	0,00 ± 0,00##	0,00 ± 0,00##	0,00 ± 0,00##	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00##	0,00 ± 0,00
<b>Tratamento-simultâneo</b>										
FA 2 mg/mL	0,52 ± 0,62##	0,56 ± 0,91	0,59 ± 0,82	0,25 ± 0,42	0,50 ± 0,84	0,73 ± 0,97	0,70 ± 0,87	0,64 ± 0,79	0,64 ± 0,79	0,50 ± 0,84
FA 4 mg/mL	0,34 ± 0,44##	0,45 ± 0,80	0,53 ± 0,79	0,19 ± 0,41	0,38 ± 0,81	0,38 ± 0,81	1,39 ± 1,49	0,61 ± 0,85	0,67 ± 0,82	0,38 ± 0,81
FA 8 mg/mL	0,37 ± 0,63##	0,38 ± 0,81	0,38 ± 0,81	0,19 ± 0,41	0,38 ± 0,81	0,46 ± 0,81	0,47 ± 0,81	0,38 ± 0,81	0,47 ± 0,81#	0,38 ± 0,81
FA 16 mg/mL	0,19 ± 0,41##	0,38 ± 0,81	0,38 ± 0,81	0,19 ± 0,41	0,38 ± 0,81	0,38 ± 0,81	0,38 ± 0,81	0,38 ± 0,81	0,38 ± 0,81#	0,38 ± 0,81
<b>Pós-tratamento</b>										
FA 2 mg/mL	0,00 ± 0,00##	0,00 ± 0,00##	0,00 ± 0,00##	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00#	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00##	0,08 ± 0,27##	0,00 ± 0,00
FA 4 mg/mL	0,00 ± 0,00##	0,00 ± 0,00##	0,00 ± 0,00##	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00#	0,12 ± 0,26	0,06 ± 0,19#	0,06 ± 0,18##	0,00 ± 0,00
FA 8 mg/mL	0,00 ± 0,00##	0,00 ± 0,00##	0,00 ± 0,00##	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00#	0,15 ± 0,33	0,00 ± 0,00##	0,00 ± 0,00##	0,00 ± 0,00
FA 16 mg/mL	0,00 ± 0,00##	0,00 ± 0,00##	0,00 ± 0,00##	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00#	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00##	0,00 ± 0,00##	0,00 ± 0,00

CN: Controle negativo (água destilada). MMS: Metil metanosulfonato, 10 mg/mL (controle positivo). Pré-tratamento: 24 h FA + 24 h MMS. Tratamento-simultâneo: 24 h água destilada + 24 h de associação de FA e MMS. Pós-tratamento: 24 h MMS + 24 h FA. **MN:** Micronúcleo. **BN:** Broto Nuclear. **QC:** Quebra Cromossômica. **CB:** Célula Binucleada. **CP:** Células Poliploides. **AC:** Aderência Cromossômica. **Cm:** C-metáfase. **PC:** Perda Cromossômica. **PT:** Ponte Cromossômica. **AM:** Anáfase Multipolar. DP: Desvio padrão. \*Comparação estatística com CN para avaliar mutagenicidade. #Comparação estatística com o MMS para avaliar antimutagenicidade (Pré-tratamento).

\*/#/+Significativo pelo teste Kruskal- Wallis com o teste *a posteriori* Student-Newman-Keuls (\*/#/+ P < 0.05). Os resultados são referentes a análise de 5000 por tratamento.

A ausência de efeitos genotóxico nas concentrações FH (2 e 8 mg/mL), FE (2, 4, 8 e 16 mg/mL) e FA (8 e 16 mg/mL) pode estar associada com o efeito citotóxico significativo destas frações, ou seja, com a menor quantidade de células entrando em divisão, menor seria a quantidade de danos observados, uma vez que para observação das alterações cromossômicas as células precisam passar pelo ciclo celular. Este resultado poderia explicar a redução significativa de micronúcleos, aderências cromossômicas, perdas e pontes cromossômicas na FE e de aderências e pontes cromossômicas nas maiores concentrações de FA (8 e 16 mg/mL). O uso de extratos ou fitocompostos capazes de inibir o progresso do ciclo celular que não são genotóxicos torna-se interessante, sobretudo no tratamento de neoplasias <sup>176</sup>.

No entanto, na FH (4 e 16 mg/mL) e na FA (2 e 4 mg/mL) não foi observado efeito citotóxico e não houve ação genotóxica. Sendo assim, os possíveis metabólitos secundários destas frações não interferiram nos processos de condensação de cromatina, polimerização das fibras do fuso e/ou na segregação mitótica <sup>106,177</sup>, o que resultou nas alterações cromossômicas individuais não significativas e/ou na redução significativa de aderências e pontes cromossômicas. Resultados similares foram observados no extrato aquoso das folhas <sup>37,38</sup> e nas menores concentrações (2, 4 e 8 mg/mL) do extrato etanólico das folhas de *P. bracteosa* <sup>108</sup>. Os resultados da FH e FA nas concentrações citadas demonstraram a ausência de efeitos aneugênicos (resultantes de alterações nas fibras do fuso) e/ou clastogênicos (resultantes de quebras cromossômicas) dos seus fitoquímicos nas células meristemáticas de *A. cepa*.

Com relação ao efeito citoprotetor, o mesmo não foi observado para nenhuma das frações nas concentrações avaliadas. Para a FH, em todos os protocolos: pré, simultâneo e pós-tratamento observou-se diminuição significativa do IM quando comparados com o MMS (Tabela 4.6). Resultado similar para FE foi observado apenas no pré-tratamento (8 e 16 mg/mL), assim como para a FA no pré (16 mg/mL), simultâneo (16 mg/mL) e pós-tratamento (2, 4, 8 e 16 mg/mL), neste último o efeito potencializador da atividade citotóxica do MMS foi mais evidente (Tabelas 4.7- 4.8).

Embora o efeito citoprotetor tenha sido relatado para o extrato aquoso das cascas e folhas de *P. bracteosa* no bioensaio *A. cepa* nos três protocolos e na maioria das concentrações <sup>37,38</sup>, o mesmo não foi observado neste estudo. As frações estudadas de *P. bracteosa* não foram capazes de neutralizar ação citotóxica



do MMS. Provavelmente, entre os compostos fitoquímicos presentes nas frações deve haver metabólitos que atuaram como pró-oxidantes nas células de *A. cepa*, potencializando a ação citotóxica do MMS. Os resultados sugerem uma ação sinérgica dos compostos fitoquímicos e/ou principalmente dos terpenos das frações FH, FE e FA com o MMS, visto que os mesmos não foram detectados nos extratos aquosos das cascas e das folhas de *P. bracteosa*, o que reforça a hipótese dos terpenos serem o principal metabólito envolvido com a potencialização do efeito citotóxico do MMS no presente estudo.

Na análise da média total de alterações cromossômicas foi observada redução significativa e superior a 110% de RD para a FH no pré-tratamento em todas as concentrações, assim como no tratamento simultâneo. Já no pós-tratamento, embora tenha sido também observada, esta redução variou entre 61,45 a 94,83% e foi significativa apenas nas concentrações de 4 e 16 mg/mL (Tabela 4.6). Em todos os tratamentos de significativos para FH observou-se que a diminuição, sobretudo de MN foi o principal fator que colaborou para a ocorrência de efeito antigenotóxico. Observou-se ainda redução da quantidade de PC no tratamento simultâneo em todas as concentrações e diminuição dos BN nas concentrações 2 e 4 mg/mL (Tabela 4.9).

De forma geral, para FE e FA o efeito protetor contra a ação mutagênica do MMS foi melhor evidenciado. Para a FE observou-se redução na média total de danos superior a 114% em todos os protocolos e concentrações, enquanto para FA a %RD variou de 107,08 a 126,07%. Em ambas as frações a frequência de MN diminuiu de forma significativa em todos os protocolos de antigenotoxicidade e concentrações. Observou-se ainda para a FE a diminuição no pós e tratamento simultâneo dos BN, AC, PC e PT (Tabela 4.10). Já na FA a diminuição de BN, QC e PT ocorreram no pré e pós-tratamento em todas as concentrações, neste último observou-se ainda redução de AC e PC (Tabela 4.11).

A redução da média total de alterações cromossômicas para a FH no ensaio antigenotóxico deveu-se majoritariamente a redução significativa de MN no pré, simultâneo e pós-tratamento, além da diminuição de aderências cromossômicas no pré-tratamento, brotos nucleares e perdas cromossômicas no simultâneo. A %RD foi maior no pré e no tratamento simultâneo evidenciando a ocorrência de ação desmutagênica dos fitoquímicos, provavelmente, a potencialização do efeito citotóxico resultante da interação dos metabólitos da FH com o MMS nos três

protocolos levaram a redução no número de alterações cromossômicas, dando a falsa impressão de que a FH apresenta excelente atividade protetora.

No pré-tratamento para a FE (2 e 4 mg/mL) e FA (2, 4 e 8 mg/mL) observou-se a diminuição da média total de alterações cromossômicas, evidenciando nessas frações uma ação desmutagênica. Os metabólitos secundários presentes nessas frações, como fenóis e flavonoides que possuem atividade antioxidante, podem ter interagido diretamente com o MMS no meio intracelular, impedindo a sua ação mutagênica em células de *A. cepa* <sup>178</sup>, o que refletiu principalmente na diminuição de MN na FE e de MN, BN, QC e PT na FA.

Para a FE, no simultâneo e pós-tratamento para todas as concentrações, a diminuição da média das alterações cromossômicas do tipo MN, BN, AC, PC e PT foi significativa, evidenciando um potencial antígeno-tóxico. Para o tratamento simultâneo, a redução nos danos à célula pode ser atribuída tanto à ação desmutagênica quanto a bioantimutagênica dos fitoquímicos evidenciados <sup>179</sup>. Já no pós-tratamento, o efeito protetor aos danos induzidos pelo MMS foi atribuído à ação bioantimutagênica dos metabólitos secundários, que atuaram em mecanismos de reparo do DNA, induzindo a reversão do efeito mutagênico e impedindo a fixação de mutações <sup>180</sup>.

Pensamento semelhante pode ser estendido ao tratamento simultâneo da FA, com exceção da FA 16 mg/mL, e pós-tratamento, nos quais é provável que a potencialização da citotoxicidade do MMS pela FA tenha interferido diretamente na redução do total de alterações cromossômicas.

No bioensaio *A. cepa*, o MMS foi utilizado como indutor de danos ao DNA devido a sua capacidade de alquilação e metilação, que pode causar quebras na cadeia dupla do DNA e inibição da forquilha de replicação <sup>181,182</sup>. Muitos estudos demonstram também a capacidade de depleção dos níveis de Glutathione-S-transferase <sup>183</sup> e da Glutathione <sup>184</sup> pelo MMS, que compromete as defesas antioxidantes celulares e leva ao acúmulo de EROs geradas como subprodutos da função celular normal, induzindo altos níveis de estresse oxidativo, que pode levar à apoptose, morte celular e danos no DNA <sup>185,186</sup>.

O teor de fenólicos totais e a atividade antioxidante tiveram papel essencial na atividade anticlastogênica do extrato metanólico de *P. bonducella*, em que se observou a redução das alterações cromossômicas nas células de linfócitos

humanos (*in vitro*) e células da medula óssea de ratos albinos (*in vivo*) induzida por MMS<sup>187</sup>, o mesmo pode ter ocorrido nas células de *A. cepa* expostas à FE e FA.

A modulação da atividade mutagênica do MMS pela FE, sobretudo no tratamento pré (2 e 4 mg/mL), simultâneo e pós-tratamento, permite inferir que os metabólitos da FE, neutralizaram as EROs resultantes da ação do MMS, uma vez a fração apresentou alto teor de compostos fenólicos e alta atividade antioxidante, principalmente devido a presença de fenóis, flavonoides, taninos, terpenos e saponinas que atuaram de forma sinérgica neutralizando a ação de radicais livres<sup>187,188</sup>. De forma semelhante, o efeito protetor observado no pré e no tratamento simultâneo da FA (2, 4 e 8 mg/mL) pode ser atribuído também à atividade antioxidantes dos fenóis, flavonoides, taninos, terpenos e saponinas presentes nesta fração.

# Capítulo 5

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

O estudo químico do extrato EE das folhas de *P. bracteosa* resultou nas frações FH (23,1 g), FE (6,8 g) e FA (4,4 g), as quais possibilitaram uma investigação do potencial químico da espécie.

Os espectros de infravermelho do EE e frações mais polares (FE e FA) de *P. bracteosa* indicaram a presença de compostos hidroxilados de cadeia longa, ésteres, cetona, álcool e fenóis. A fração menos polar (FH) exibiu bandas características de cadeia hidrocarbonada. Essas informações foram confirmadas pela análise de ESI-IT/MS<sup>n</sup> do EE, que permitiu a identificação predominante de compostos fenólicos e pela análise por CLAE-DAD do EE, FE e FA que apresentou bandas com espectros de UV sugerindo a presença de compostos fenólicos.

A análise dos perfis cromatográficos por CLAE-DAD do EE, FE e FA, indicaram a presença de duas classes de metabólitos secundários: flavonoides e taninos.

Por meio da técnica ESI-IT-MS<sup>n</sup> foi possível a identificação de 7 compostos: ácido gálico, ácido quínico, ácido elágico, amentoflavona, corilagina, ácido chebulático e castalagina, a maioria pertencente aos taninos do tipo elagitaninos. Todos esses compostos estão sendo descritos pela primeira vez na espécie *P. bracteosa*.

A prospecção fitoquímica das FE e FA mostraram a presença de fenóis flavonoides e terpenos. Além dessas duas últimas classes de metabólitos secundário, a FH exibiu a presença de depsídeos e depsidonas na *P. bracteosa*.

Na quantificação de compostos fenólicos totais, a FE apresentou os melhores resultados, o que explica sua expressiva atividade antioxidante nos métodos DPPH e ABTS, seguida pela FA e FH. Já o teor de flavonoides totais foi maior na FH.

Todas as frações apresentaram citotoxicidade, o que pode ser atribuído à presença de terpenos, taninos e flavonoides em todas as frações (FH, FE e FA). No entanto, nenhum efeito genotóxico foi observado no sistema teste de *A. cepa*, o que foi atribuído à ausência de efeitos aneugênicos e/ou clastogênicos nos metabólitos secundários identificados.

Quando avaliada a antigenotoxicidade, FE e FA apresentaram efeitos preventivos e moduladores mais significativos nas células da raiz de *A. cepa*, inibindo principalmente a ocorrência de micronúcleos. Dentre as frações de *P. bracteosa* avaliadas, a FE pode ser considerada a mais promissora, visto que é uma excelente fonte de antioxidantes naturais, não foi genotóxica, apresentou atividade antimutagênica em todos os protocolos avaliados e ainda apresentou atividade citotóxica, qualidade desejada na busca de anticarcinogênicos naturais.

Portanto, deve ser incentivado um estudo na FE, no sentido de isolar compostos que possuam atividade antioxidante e antimutagênica evidenciada pelo bioensaio *A. cepa*.

# REFERÊNCIAS

---

1. Felhi S, Hajlaoui H, NCIR M, Bakari S, Ktari N, Saoudi M, et al. Nutritional, phytochemical and antioxidant evaluation and FT-IR analysis of freeze dried extracts of *Ecballium elaterium* fruit juice from three localities. Food Sci Technol. 2016 Aug 25;36(4):646–55.
2. Yang L, Wen K-S, Ruan X, Zhao Y-X, Wei F, Wang Q. Response of Plant Secondary Metabolites to molecules. 2018 March 27; 23(4):1–26.
3. Starfield B. Primary care: An increasingly important contributor to effectiveness, equity, and efficiency of health services. SESPAS report 2012. Gac Sanit. 2012 Mar 26;26(SUPPL.1):20–6.
4. Teixeira JBP, Barbosa AF, Gomes CHC, Eiras NS V. A Fitoterapia no Brasil: da Medicina Popular à Regulamentação pelo Ministério da Saúde. Univ Fed Juiz Fora. 2011;1–4.
5. Figueredo CA, Gurgel IGD, Gurgel JGD. A política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos: Construção, perspectivas e desafios. Physis. 2014 fev 24 ;24(2):381–400.
6. Marmitt DJ, Bitencourt S, Silva AC, Rempel C, Goettert MI. Medicinal plants used in Brazil Public Health System with neuroprotective potential – A systematic review. Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat. 2018 mar 30;17(2):84–103.
7. Coradin L, Camillo J, Pareyn FGC. Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial Planta para Futuro: Região Nordeste. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Livro científico (ALICE); 2018.
8. Queiroz LP. leguminosas da Caatinga. Bahia: Universidad Estadual de Feira de Santana; 2009.
9. Castro AS, Cavalcante A. Flores da Caatinga Caatinga Flowers. Campinas Grande: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação–Instituto Nacional do Semiárido; 2010.
10. Ribeiro DL, Cilião HL, Flávia A, Specian L, Serpeloni JM, Souza MF De, et al. Chemical and biological characterisation of *Machaerium hirtum* ( Vell .) Stellfeld: absence of cytotoxicity and mutagenicity and possible chemopreventive potential. Mutagenesis. 2016 augst 27;31(2):147–60.
11. Monteiro JM, de Souza JSN, Lins Neto EMF, Scopel K, Trindade EF. Does total tannin content explain the use value of spontaneous medicinal plants from the Brazilian semi-arid region? Brazilian J Pharmacogn. 2014 Mar./Apr 27;24(2):116–23.
12. Oliveira FCS, Barros RFM, Moita Neto JM. Plantas medicinais utilizadas em comunidades rurais de Oeiras, semiárido piauiense. Rev Bras Plantas Med. 2010 July/Sept 25;12(3):282–301.
13. Baptistel AC, Coutinho JMCP, Lins Neto EMF, Monteiro JM. Plantas medicinais utilizadas na Comunidade Santo Antônio, Currais, Sul do Piauí: Um enfoque etnobotânico. Rev Bras Plantas Med. 2014 fev 06;16(2 SUPPL. 1):406–25.
14. Bitencourt APR, Almeida SSM da S. Estudo fitoquímico, toxicológico e microbiológico das folhas de *Costus spicatus jacq.* Biota Amaz. 2014 dez 19;4(4):75–9.

15. Bhat SA, Singh J, Singh K, Vig P. Genotoxicity monitoring of industrial wastes using plant bioassays and management through vermitechnology : A review. *Agric Nat Resour*. 2017 dec 8;51(5):325–37.
16. Bruning MCR, Mosegui GBG, Vianna CM de M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu – Paraná: a visão dos profissionais de saúde The use of phytotherapy and medicinal plants in primary healthcare units in the citie. *Clin e Saude*. 2011Janeiro Oct ;17 (10) 2675–86.
17. Pouyan N. Mesopotamia, the cradle of civilization and Medicine. *World J Pharm Res*. 2016 mar 27;5(4):192–225.
18. Dutra RC, Campos MM, Santos ARS, Calixto JB. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacol Res*. 2016 jan 23;112:4–29.
19. Ucelli P. Febrafar fala sobre fitomedicamentos no guia das farmácias. São Paulo: Febrafar, 2019 [acesado em 2020 maio 22]. Disponível em: <https://www.febrfar.com.br/febrfar-fitomedicamentos-farmacias/>. 2019.
20. Parvaiz M, Hussain K, Khalid S, Hussnain N, Iram N, Hussain Z, et al. A review: Medicinal importance of *Glycyrrhiza glabra* L. (Fabaceae Family). *Glob J Pharmacol*. 2014 jan;8(1):8–13.
21. Szopa A, Ekiert R, Ekiert H. Current knowledge of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. (Chinese magnolia vine) as a medicinal plant species: a review on the bioactive components, pharmacological properties, analytical and biotechnological studies. *Phytochem Rev*. 2017 may 12;16(2):195–218. doi: 10.1007/s11101-016-9470-4.
22. Pferschy-wenzig EM, Atanasov AG, Waltenberger B, Pferschy-wenzig E, Linder T, Wawrosch C, et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products : A review Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products : A review. *Biotechnol Adv*. 2015 aug 15;33(8):1582–614. doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.08.001
23. Junior VF V, Pinto AC. Plantas Medicinais: cura segura? Valdir. *Quim Nov*. 2005 fev 28;28(3):519–28. doi: 10.1590/S0100-40422005000300026
24. Nunes JD, Maciel M V. A importância da informação do profissional de enfermagem sobre o cuidado no uso das plantas medicinais : uma revisão de literatura. *Fitos*. 2017 may ;10(4):518–25. doi: 10.5935/2446-4775.20160037
25. Fitzhugh B, Butler VL, Bovy KM, Etnier MA. Journal of Archaeological Science : Reports Human ecodynamics : A perspective for the study of long-term change in socioecological systems. *J Archaeol Sci Reports* [Internet]. 2019 apr 5;23(February 2018):1077–94. doi: 10.1016/j.jasrep.2018.03.016
26. Gutiérrez-Urbe JA, Guajardo-Flores D, López-Barrios L. Legumes in the Diet. *Encycl Food Heal*. 2016 dez;2016:539–43. doi:10.1016/B978-0-12-384947-2.00420-7
27. Gao T, Yao H, Song J, Liu C, Zhu Y, Ma X, et al. Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2. *J Ethnopharmacol*. 2010 may 7;130(1):116–21.doi: 10.1016/j.jep.2010.04.026
28. Banks H, Lewis G. Phylogenetically informative pollen structures of “caesalpinoid” pollen (Caesalpinioideae, Cercidoideae, Detarioideae, Dialioideae and Duparquetioideae: Fabaceae). *Bot J Linn Soc*. 2018 apr 12;187(1):59–86. doi:10.1093/botlinnean/boy005
29. Dzoyem JP, McGaw LJ, Eloff JN. In vitro antibacterial, antioxidant and cytotoxic activity of acetone leaf extracts of nine under-investigated Fabaceae

- tree species leads to potentially useful extracts in animal health and productivity. BMC Complement Altern Med. 2014 may 5;14:1-7
30. Arogundade OO, Onubogu UP. Comparative wood anatomy of some members of the genus *Caesalpinia* (Linn.) Sw. Ife J Sci. 2018 Aug 13;20(2): 259-271. doi:10.4314/ijss.v20i2.6
  31. Wyrepkowski CC, Lu D, Gomes M, Sinhorin AP, Vilegas W, Grandis RA De, et al. Characterization and Quantification of the Compounds of the Ethanolic Extract from *Caesalpinia ferrea* Stem Bark and Evaluation of Their Mutagenic Activity. molecules. 2014 Oct 8;19 (10):16039–16057.
  32. Gilani SMU, Ahmed S, Baig SG, Hasan MM. Ethnopharmacognosy, phytochemistry and pharmacology of genus *Caesalpinia*: A review. J Pharmacogn Phytochem. 2019 Jun 24;8(4):2222–2229.
  33. Karina N de CC, Dolores W, Roberta RSL, Ivanilza M de A, Jo atilde o AM atilde es, Simon JM. Ethnobotanical and ethnoveterinary study of medicinal plants used in the municipality of Bom Princípio do Piauí, Piauí, Brazil. J Med Plants Res. 2016 Jun 16;10(23):318–330. doi:10.5897/JMPR2015.6038
  34. Gagnon E, Bruneau A, Hughes CE, Queiroz LP De, Lewis GP. A new generic system for the pantropical *Caesalpinia* group ( Leguminosae ). PhytoKeys. 2016 Oct 12;160(71):1–160.
  35. Rcpol. *Poincianella bracteosa* (Tul.) L.P. Queiroz. São Paulo: USP, 2020. [citado em 2020 Jun 17]. Disponível: <http://chaves.rcpol.org.br/profile/species/eco/eco:pt-BR:Poincianella%20bracteosa>. 2020.
  36. Santos IPC dos, Cruz RCD da, Carvalho K da S, Silva SL da C e, Gualberto SA. Bioatividade de extratos aquosos da parte aérea de *Poincianella bracteosa* sobre larvas de *Aedes aegypti*. Enciclopédia Biosf [Internet]. 2015 Jun 01;11(21):1–8.
  37. Couto ACF, De Pinho Araújo IK, Lopes AP, Castelo Branco Couto LMFM, Santos PIB, Silva Sousa RM, et al. Antimutagenic activity and identification of antioxidant compounds in the plant *Poincianella bracteosa* (Fabaceae). Rev Biol Trop. 2019 Dez;67(6):1103–1113.
  38. Pereira ML, Monteiro CN, Siqueira CFN, Ribeiro MS, Lopes AP, Sousa RMS, et al. Evaluation of effects of *Poincianella bracteosa* (Tul.) L.P. Queiroz leaves in *Allium cepa* and *Mus musculus*. Biotech Histochem [Internet]. 2020 Feb 10;00(00):464–473. doi:10.1080/10520295.2020.1719197
  39. Isah T. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. Biol Res [Internet]. 2019 Jul 29;52(39):1-25.
  40. Stevenson PC, Nicolson SW, Wright GA. Plant Secondary Metabolites in Nectar: Impacts on Pollinators and Ecological Functions. Funct Ecol. 2017 Sep 07;31(1):65–75. doi: 10.1111/1365-2435.12761
  41. Seca AML, Pinto DCGA. Plant secondary metabolites as anticancer agents: Successes in clinical trials and therapeutic application. Int J Mol Sci. 2018 Jan 16;19(1): 1-22. doi: 10.3390/ijms19010263
  42. Pagare S, Bhatia M, Tripathi N, Pagare S, Bansal YK. Secondary metabolites of plants and their role : Overview. Curr Trends Biotechnol Pharm. 2015 Jul;9(3):293–304.
  43. Jorge TF, Mata AT, António C. Mass spectrometry as a quantitative tool in plant metabolomics. Philos Trans R Soc A Math Phys Eng Sci. 2016 Oct 28;374(2079):1–26.
  44. Prakash V. Terpenoids as Cytotoxic Compounds : A Perspective. Pharmacogn



- Rev. 2018 Jul-Dec;12(24):166–176.
45. Nuutinen T. Medicinal properties of terpenes found in *Cannabis sativa* and *Humulus lupulus*. *Eur J Med Chem* [Internet]. 2018 Sep 05;157(5):198–228. doi: 10.1016/j.ejmech.2018.07.076
  46. Mendanha SA, Moura SS, Anjos JL V, Valadares MC, Alonso A. Toxicology in Vitro Toxicity of terpenes on fibroblast cells compared to their hemolytic potential and increase in erythrocyte membrane fluidity. *Toxicol Vitro*. 2013 Feb;27(1):323–329.
  47. Tyagi T. Phytochemical Screening of Active Metabolites present in *Eichhornia crassipes* ( Mart .) Solms and *Pistia stratiotes* ( L .): Role in Ethanomedicine. *Asian J Pharm Educ Res*. 2017 Oct-Dec;6(4):1–17.
  48. Fernandes BF, Gonçalves HR, Guimarães MR, Alves AA, Bieski IG. Estudo Etnofarmacológico das Plantas Medicinais com Presença de Saponinas e sua Importância Medicinal. *Rev da Saúde da AJES*. 2019 Jan-Jun;5(9):16–22.
  49. Simões Cmo, Schenkel Ep, Gosman G, Melo Jcp, Petrovick PR. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6ª ed. Florianópolis: UFSC, 2001.
  50. Forni C, Facchiano F, Bartoli M, Pieretti S, Facchiano A, Arcangelo DD, et al. Beneficial Role of Phytochemicals on Oxidative Stress and Age-Related Diseases. *Biomed Res Int*. 2019 Apr 07;2019(10):1–16.
  51. Cheynier V. Phenolic compounds: From plants to foods. *Phytochem Rev*. 2012 Jan 30;11(2–3):153–177.
  52. Oliveira LDL De, Carvalho MV De, Melo L. Health promoting and sensory properties of phenolic compounds in food. *Rev Ceres*. 2014 Nov-Dez;61:764–779. doi: 10.1590/0034-737x201461000002
  53. Proença C, Freitas M, Ribeiro D, Sousa JLC, Carvalho F, Silva AMS, et al. Inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B by flavonoids: A structure - activity relationship study. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2018 Jan;111(September 2017):474–81. doi: 10.1016/j.fct.2017.11.039
  54. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: An overview. *J Nutr Sci*. 2016 Dec;29(5):1–15. doi: 10.1017/jns.2016.41
  55. Iwashina T. Contribution to Flower Colors of Flavonoids Including Anthocyanins : a review. *Nat Prod Commun*. 2015 Mar 01;10(3):529–544.
  56. Pandey A, Alok A, Lakhwani D, Singh J, Asif MH. Genome-wide Expression Analysis and Metabolite Profiling Elucidate Transcriptional Regulation of Flavonoid Biosynthesis and Modulation under Abiotic Stresses in Banana. *Nat Publ Gr*. 2016 Aug 19;6 (31361):1–13. doi: 10.1038/srep31361
  57. Malaguti M, Angeloni C, Hrelia S. Polyphenols in Exercise Performance and Prevention of Exercise-Induced Muscle Damage. *Oxid Med Cell Longev*. 2013 Jul 24;2013:1–10. doi: 10.1155/2013/825928
  58. Smeriglio A, Barreca D, Bellocchio E, Trombetta D. Proanthocyanidins and hydrolysable tannins : occurrence , dietary intake and pharmacological effects . *Br J Pharmacol*. 2017 Jun 26;174(11):1244–1262.
  59. Manojlovic NT, Vasiljevic PJ, Pavle Z. Chemical composition and antioxidant activity of lichen *Toninia candida*. *Rev Bras Farmacogn*. 2012 Mar-Apr;22(2):291–298. doi:10.1590/S0102-695X2011005000184
  60. Gomes ES, Schuch V, Gertrudes E, Lemos DM. Biotechnology of polyketides : New breath of life for the novel antibiotic genetic pathways discovery through metagenomics. *Brazilian J Microbiol*. 2013 Oct-Dec;44(4):1007–1034.
  61. Dewick PM. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. 3ª. ed. Nova Jersey, EUA: Wiley, 2002.

62. Gomez-Serranillos MP, Fernandez-Moriano C, Gonzalez-Burgos E, Divakarb PK, Crespo A. Parmeliaceae family: phytochemistry, pharmacological potential and phylogenetic features. *RSC Adv.* 2014 Nov 14;4(103):59017–59047.
63. Barbosa, W. L. R. Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais (Edição Revisada). Revista Científica da UFPA. Belém-PA; 2004. [Apostila do curso de Farmácia - Universidade Federal do Pará].
64. Jayakumar K, Murugan K. Solanum Alkaloids and their Pharmaceutical Roles : A Review. *J Anal Pharm Res.* 2016 Dec 15;3(6):1–14.
65. Nwachukwu ID, Slusarenko AJ, Gruhlke MCH. Sulfur and sulfur compounds in plant defence. *Nat Prod Commun.* 2012 Mar 01;7(3):395–400.
66. Monteiro JP, Alves MG, Oliveira PF, Silva BM. Structure-bioactivity relationships of methylxanthines: Trying to make sense of all the promises and the drawbacks. *Molecules.* 2016 Jul 27;21(8):1–32.
67. Apak R, Özyürek M, Güçlü K, Çapanoğlu E. Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays. Vol. 64, *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2016 Feb 10; 64(5): 997–1027. doi: 10.1021/acs.jafc.5b04739
68. Xu DP, Li Y, Meng X, Zhou T, Zhou Y, Zheng J, et al. Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment and resources. *Int J Mol Sci.* 2017 Jan 05;18(1):20–31.
69. Moharram, H. A.; Youssef MM. Methods for Determining the Antioxidant Activity : A Review. *Alex J Fd Sci Technol.* 2014 Jun 08;11(1):31–42.
70. Elnour A, Mohamed E S M, Musa K, Kabbashi N, Alam M. Challenges of Extraction Techniques of Natural Antioxidants and Their Potential Application Opportunities as Anti-Cancer Agents. *Heal Sci J.* 2018 Oct 29;12(5):1–25.
71. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Vol. 28, *LWT - Food Science and Technology.* 1995 Jun 28; 28(1): 25–30.
72. Tsimogiannis DI, Oreopoulou V. The contribution of flavonoid C-ring on the DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3',4'-hydroxy substituted members. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2006 May 31;7(1–2):140–146.
73. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang, Min; Rice-Evans C. Antioxidant Activity Applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999 May;26(9–10):1231–1237.
74. Sucupira NR, Silva BA, Pereira G, Costa NJ. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos/ Methods for Measuring Antioxidant Activity of Fruits. *UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde.* 2012 Out;14(4):263–9.
75. Venkatachalam H, Nayak Y, Jayashree BS. Evaluation of the Antioxidant Activity of Novel Synthetic Chalcones and Flavonols. *Int J Chem Eng Appl.* 2012 Jun;3(3):216–219.
76. Guillén MD, Cabo N. Infrared spectroscopy in the study of edible oils and fats. *J Sci Food Agric.* 1997 Mar 26;75(1):1–11.
77. Huck C. W. Near infrared spectroscopy in natural products analysis. *Planta Med.* 2014 Sep 22;75(7):746–756.
78. Noh CHBC, Azmin NFBM, Asnawi, A. L. A review: Fourier Transform Infrared (FTIR) Application on Bioactive Compounds. 4th Int Conf Biotechnol Eng 2016, Kuala Lumpur, Malaysia. 2016 Jul;(11): 1-6.
79. Huck C. W. Advances of infrared spectroscopy in natural product research. *Phytochem Lett [Internet].* 2015 Mar 12;11:384–393. doi:

- 10.1016/j.phytol.2014.10.026
80. PerkinElmer. Spectrum IR Series Mid-, Near- and Far-Infrared Spectroscopy. [https://www.perkinelmer.com.cn/lab-solutions/resources/docs/BRO\\_Spectrum\\_IR\\_Series\\_Mid-Near-and\\_Far-Infrared\\_Spectroscopy.pdf](https://www.perkinelmer.com.cn/lab-solutions/resources/docs/BRO_Spectrum_IR_Series_Mid-Near-and_Far-Infrared_Spectroscopy.pdf). 2020.
  81. Wolfender JL. HPLC in natural product analysis: The detection issue. *Planta Med.* 2009 Jun 14;75(7):719–734.
  82. Juszczak AM, Zovko-Končić M, Tomczyk M. Recent trends in the application of chromatographic techniques in the analysis of luteolin and its derivatives. *Biomolecules.* 2019 Nov 12;9(11):1–38.
  83. Wolfender J. Advances in chromatography: Efficient profiling of crude extracts and isolation of natural products. *Planta Med.* 2013 Jul 01;4(11):1.
  84. Silva CGA, Collins CH. Super/subcritical fluid chromatography with packed columns: State of the art and applications. *Quim Nova.* 2014 Jun 11;37(6):1047–1057.
  85. Jadaun GPS, Dixit S, Saklani V, Mendiratta S, Jain R, Singh S. HPLC for Peptides and Proteins: Principles, Methods and Applications. *Pharm Methods.* 2016 Jan-Jun;8(1):139–144.
  86. Boligon AA, Athayde ML. Importance of HPLC in Analysis of Plants Extracts. *Austin Chromatogr.* 2014 Oct 18;1(3):1–3.
  87. Gupta P, Daswani P, Birdi T. Approaches in fostering quality parameters for medicinal botanicals in the Indian context. *Indian J Pharmacol.* 2014 Jul-Aug;46(4):363–71.
  88. Urban PL. Quantitative mass spectrometry: An overview. *Philos Trans R Soc A Math Phys Eng Sci.* 2016 Apr 08;374(2079): 1-5.
  89. Kumar BR. Application of HPLC and ESI-MS techniques in the analysis of phenolic acids and flavonoids from green leafy vegetables (GLVs). *J Pharm Anal [Internet].* 2017 Jun 16;7(6):349–364. doi: 10.1016/j.jpha.2017.06.005
  90. Vijlder T, Valkenburg D, Lemi re F, Romijn EP, Laukens K, Cuyckens F. A tutorial in small molecule identification via electrospray ionization-mass spectrometry: The practical art of structural elucidation. *Mass Spectrom Rev.* 2018 Nov 09;37(5):607–629. doi: 10.1002/mas.21551
  91. Stachniuk A, Fornal E. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in the Analysis of Pesticide Residues in Food. *Food Anal Methods.* 2016 Oct 28;9(6):1654–1665.
  92. Peacock PM, Zhang WJ, Trimpin S. Advances in Ionization for Mass Spectrometry. *Anal Chem.* 2017 Nov 15;89(1):372–388.
  93. Dole M, Mack LL, Hines RL, Chemistry DO, Mobley RC, Ferguson LD, et al. Molecular beams of macroions. *J Chem Phys.* 1968;49(5):2240–9.
  94. GRAYSON MA. John Bennett Fenn: a curious road to the prize. *J Am Soc Mass Spectrom.* 1968 Sep 18;49(5):2240–2249.
  95. BANERJEE S, MAZUMDAR S. Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. *Int J Anal Chem.* 2012 Mar 12;2012:1-41.
  96. Konermann L, Ahadi E, Rodriguez AD, Vahidi S. Sampling-based Minimum Risk path planning in multiobjective configuration spaces. *Proc IEEE Conf Decis Control.* 2015 Dec 15; 2015(54):814–821.
  97. Fernandes TCC, Mazzeo DEC, Marin-Morales MA. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pestic Biochem Physiol.* 2007 Jul 01;88(3):252–259.

98. Roberto MM, Jamal CM, Malaspina O, Marin-Morales MA. Antigenotoxicity and antimutagenicity of ethanolic extracts of Brazilian green propolis and its main botanical source determined by the *Allium cepa* test system. Genet Mol Biol. 2016 May 24;39(2):257–269.
99. Leme DM, Marin-morales MA. *Allium cepa* test in environmental monitoring : A review on its application. Mutat Res. 2009 Jul 02;682(1):71–81. doi: 10.1016/j.mrrev.2009.06.002
100. Lessa LR, Da Silva MCC, Cariello FDMR. Fundamentos e aplicações do *Allium cepa* como bioindicador de mutagenicidade e citotoxicidade de plantas medicinais. Rev Intertox Toxicol Risco Ambient e Soc. 2017 Out 30;10(3):39–48.
101. Agbor GA, Vinson JA, Donnelly PE. Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay. Int J Food Sci Nutr Diet. 2014 Aug 21;3(8):147–156.
102. Oliveira AC, Valentim IB, Goulart MOF, Silva CA, Bechara EJH, Trevisan MTS. Vegetals as natural sources of antioxidants. Quim Nova. 2009 Abr 2;32(3):689–702.
103. Hillis WE, Swain T. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. II.—The analysis of tissues of the Victoria plum tree. J Sci Food Agric. 1959 Feb 05;10(2):533–537.
104. Pękal A, Pyrzynska K. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. Food Anal Methods. 2014 Feb 11;7(9):1776–1782.
105. Woisky RG, Salatino A. Analysis of propolis: Some parameters and procedures for chemical quality control. J Apic Res. 1998 Mar 13;37(2):99–105.
106. Bianchi J, Cristina T, Fernandes C, Marin-morales MA. Chemosphere Induction of mitotic and chromosomal abnormalities on *Allium cepa* cells by pesticides imidacloprid and sulfentrazone and the mixture of them. Chemosphere [Internet]. 2016 Feb 18;144:475–83. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.09.021
107. Fedel-Miyasato, L. E. S; Formagio, A S N; Auharek, S.A; Kassuya, C. A. L; Navarro, S. D; Cunha-Laura, A. L; Monreal, A. C. D; Vieira, M. C; Oliveira RJ. Antigenotoxic and antimutagenic effects of *Schinus terebinthifolius* Raddi in *Allium cepa* and Swiss mice : A comparative study. Genet Mol Res. 2014 Apr 30;13(2):3411–25. doi: 0.4238/2014.April.30.2
108. Almeida PM, Araújo SS, Santos IRMR, Marin-Morales MA, Benko-Iseppon AM, Santos A V., et al. Genotoxic potential of leaf extracts of *Jatropha gossypifolia* L. Genet Mol Res. 2016 Feb 05;15(1):1–8. doi: 10.4238/gmr.15017415
109. Fernandes TCC, Mazzeo DEC, Marin-Morales MA. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent- Trifluralin herbicide. Ecotoxicol Environ Saf. 2009 May 05;72(6):1680–1686.
110. FISKEJÖ G. The *Allium* test - a potential standard for the assessment of environmental toxicity. Am Soc Test Mater. 1993 May 15;2:331–45.
111. Ayres, Manuel; Ayres Jr, Manuel; Ayres LD. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. 5ª. ed. Belém – PARÁ: Inst Mamirauá, 2007.
112. Balan V, Mihai CT, Cojocaru FD, Uritu CM, Dodi G, Botezat D, et al. Vibrational spectroscopy fingerprinting in medicine: From molecular to clinical practice. Materials (Basel). 2019 Sep 06;12(18):1–40. doi: 10.3390/ma12182884
113. GRISI, C V B et al. Potencial antioxidante e estabilidade do bioaditivo de jucá (*Libidibia ferrea*). Res Soc Dev [Internet]. 2020 Jun 20;9(7):1–19. doi: 10.1016/j.solener.2019.02.027%0Ahttps://www.golder.com/insights/block-caving-a-viable-alternative/%0A???
114. Gnanasambandam, R., Proctor A. Determination of pectin degree of

- esterification by diffuse reflectance. *Food Chem.* 2000 Jan 31;68(3):327–332.
115. Li HW, Strauss HL, Snyder RG. Differences in the IR methylene rocking bands between the crystalline fatty acids and n-alkanes: Frequencies, intensities, and correlation splitting. *J Phys Chem A.* 2004 Jul 16;108(32):6629–6642. doi: 10.1021/jp049106x
116. Hari N, Nair VP. FTIR spectroscopic analysis of leaf extract in hexane in *Jasminum azoricum* L. *Int J Sci Res Technol.* 2018 May-Jun;4(8):170–2.
117. Kim J, Kim S, Kim D, Chang S. Ru-Catalyzed Deoxygenative Regioselective C8-H Arylation of Quinoline N-Oxides. *J Org Chem.* 2019 Jul 19;84(20):13150–13158.
118. Daisy ERAC, Rajendran NK, Houreld NN, Marraiki N, Elgorban AM, Rajan M. Curcumin and *Gymnema sylvestre* extract loaded graphene oxide-polyhydroxybutyrate-sodium alginate composite for diabetic wound regeneration. *React Funct Polym [Internet].* 2020 Jun 06;154(June):1–11. doi: 10.1016/j.reactfunctpolym.2020.104671
119. Moosavinejad SM, Madhoushi M, Vakili M, Rasouli D. Evaluation of degradation in chemical compounds of wood in historical buildings using Ft-Ir And Ft-Raman vibrational spectroscopy. *Maderas Cienc y Tecnol.* 2019 Jan 22;21(3):381–392.
120. Pitsevich G ~A., Kozlovskaya E, Doroshenko I. Analysis of the carbonyl group stretching vibrations in some structural fragments of poly-3-hydroxybutyrate. *ArXiv e-prints.* 2016 Mar 31;1–9.
121. Franco DM, Saldanha LL, Neto J de SL, dos Santos LC, Dokkedal AL, de Almeida LFR. Seasonal variation in allelopathic potential of the leaves of *Copaifera Langsdorffii* desf. *Acta Bot Brasilica.* 2016 Mar 16;30(2):157–65.
122. Yang B, Kortessniemi M, Liu P, Karonen M, Salminen JP. Analysis of hydrolyzable tannins and other phenolic compounds in emblic leafflower (*Phyllanthus emblica* L.) fruits by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J Agric Food Chem.* 2012 Aug 13;60(35):8672–8683.
123. Bargiacchi E, Campo M, Romani A, Milli G, Miele S. Hydrolysable Tannins from Sweet Chestnut (*Castanea sativa* Mill.) to improve Tobacco and Food/Feed Quality. Note 1: Fraction characterization, and Tobacco biostimulant effect for gall-nematode resistance. *AIMS Agric Food.* 2017 Set 28;2(3):324–38.
124. Hernández-Aguilar C, Domínguez-Pacheco A, Cruz-Orea A, Ivanov R. Photoacoustic spectroscopy in the optical characterization of foodstuff: A review. *J Spectrosc.* 2019 Jan 13;2019:1–35.
125. Rhimi W, Boulila A, Gheribi R, Khwaldia K. Development, characterization and application of hydroxypropylmethylcellulose films enriched with cypress seed extract. *RSC Adv.* 2018 Jun 28;8(42):23615–23622.
126. Lin L, Harnly JM. NPC Natural Product Communications. *Nat Prod Commun.* 2012 Feb;7(6):749–52.
127. Rattanata N, Klaynongsruang S, Daduang S, Tavichakorntrakool R, Limpaboon T, Lekphrom R, et al. Inhibitory effects of gallic acid isolated from *Caesalpinia mimosoides* lamk on cholangiocarcinoma cell lines and foodborne pathogenic bacteria. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2016 Apr 11;17(3):1341–5.
128. Li C, Seeram NP. HHS Public Access. *J Sep Sci.* 2018 Jun;41(11):2331–2346.
129. Nayeem N, Smb A, Salem H, Ahel-alfqy S. Gallic Acid: A Promising Lead Molecule for Drug Development. *J Appl Pharm.* 2016 Jan 31;8(2):8–11.
130. Silva LN, Rigo G V, Silva DB, Carollo CA, Trentin DS, Silva M V, et al.

- Hydrolyzable tannins from *Poincianella* (Caesalpinia) *microphylla* fruits: Metabolite profiling and anti-*Trichomonas vaginalis* activity. *Food Res Int*. 2020 Apr 12;134(January):1–7.
131. Singh A, Chauhan SS, Tripathi V. Quinic Acid Attenuates Oral Cancer Cell Proliferation by Downregulating Cyclin D1 Expression and Akt Signaling Chemical reagents. *Pharmacogn Mag*. 2018 Jun 28;14(51):14–19.
132. Fathoni A, Saepudin E, Cahyana AH, Rahayu DUC, Haib J. Identification of nonvolatile compounds in clove ( *Syzygium aromaticum* ) from Manado. In: AIP Conference Proceedings. 2017 Jul 10; 1862 (030079): 1-11.
133. GARCÍA-NIÑO WR, Zazueta C. Ellagic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in liver protection. *Pharmacol Res*. 2015 Jul;97:84–103. doi: 10.1016/j.phrs.2015.04.008
134. Souza JE De, Borsodi MPG, Almeida AP De, Rossi-bergmann B. Leaves from the tree *Poincianella pluviosa* as a renewable source of antiplasmodial compounds against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. *J Braz Chem Soc*. 2018 Jun;29(6):1318–1327.
135. Wang D, Chen Q, Liu B, Li Y, Tan Y, Yang B. Ellagic acid inhibits proliferation and induces apoptosis in human glioblastoma cells. *Acta Cir Bras*. 2016 Feb;31(2):143–9.
136. Yao H, Chen B, Zhang Y, Ou H, Li Y, Li S, et al. Analysis of the total biflavonoids extract from *Selaginella doederleinii* by HPLC-QTOF-MS and its in vitro and in vivo anticancer effects. *Molecules*. 2017 Feb 20;22(2). 1-17.
137. Magalhães IL, Chagas F, Pinto L, Filho RB. Chemical Constituents from *Caesalpinia férrea*: Identification and <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C Resonance Assignment. *Am J Anal Chem*. 2014 Jul;5(10):688–694.
138. Bais S, Abrol N. Review on Chemistry and Pharmacological Potential of Amentoflavone. *Curr Res Neurosci [Internet]*. 2016 Sep 15;6(1):16–22. doi: 10.3923/crn.2016.16.22
139. Ogunwa TH. Insights into interaction profile and inhibitory potential of amentoflavone with  $\alpha$ -glucosidase, tyrosinase and 15-lipoxygenase as validated therapeutic targets. *J Syst Biol Proteome Res*. 2018 May;2(1):10–20.
140. Lee E, Shin S, Lee JY, Lee S, Kim JK, Yoon DY, et al. Cytotoxic activities of amentoflavone against human breast and cervical cancers are mediated by increasing of pten expression levels due to peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  activation. *Bull Korean Chem Soc*. 2012 Jul 20;33(7):2219–2223.
141. Pfundstein B, El Desouky SK, Hull WE, Haubner R, Erben G, Owen RW. Polyphenolic compounds in the fruits of Egyptian medicinal plants ( *Terminalia bellerica*, *Terminalia chebula* and *Terminalia horrida*): Characterization, quantitation and determination of antioxidant capacities. *Phytochemistry [Internet]*. 2010 Jul;71(10):1132–48. doi: 10.1016/j.phytochem.2010.03.018
142. Walia H, Arora S. *Terminalia chebula* - A pharmacognostic account. *J Med Plants Res*. 2013 May 28;7(20):1351–1361.
143. Abdulla R, Mansur S, Lai H, Ubul A, Sun G, Huang G, et al. Qualitative Analysis of Polyphenols in Macroporous Resin Pretreated Pomegranate Husk Extract by HPLC-QTOF-MS. *Phytochem Anal*. 2017 Jan 23;28(5):465–473. doi: 10.1002/pca.2695
144. Li X, Deng Y, Zheng Z, Huang W, Chen L, Tong Q, et al. Corilagin, a promising medicinal herbal agent. *Biomed Pharmacother*. 2018 Mar;99(November 2017):43–50. doi: 10.1016/j.biopha.2018.01.030
145. Moreira J, Klein-Júnior LC, Filho VC, Buzzi FDC. Anti-hyperalgesic activity of

- corilagin, a tannin isolated from *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae). J Ethnopharmacol. 2013 Mar 07;146(1):318–323.
146. Reddy DB, Reddy TCM, Jyotsna G, Sharan S, Priya N, Lakshmipathi V, et al. Chebulagic acid, a COX-LOX dual inhibitor isolated from the fruits of *Terminalia chebula* Retz., induces apoptosis in COLO-205 cell line. J Ethnopharmacol. 2009 Jul 30;124(3):506–512.
147. Fischer UA, Carle R, Kammerer DR. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MSn. Food Chem [Internet]. 2011 Jul 15;127(2):807–21. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.12.156
148. Yamada H, Wakamori S, Hirokane T, Ikeuchi K, Matsumoto S. Structural revisions in natural ellagitannins. Molecules. 2018 Jul 30;23(8): 1-46.
149. Kamada Y, Yakabu H, Ichiba T, Tamanaha A, Shimoji M, Kato M, et al. Castalagin and vescalagin purified from leaves of *Syzygium samarangense* (Blume) Merrill & L.M. Perry: Dual inhibitory activity against PARP1 and DNA topoisomerase II. Fitoterapia [Internet]. 2018 Jun 19;129(11):94–101. doi: 10.1016/j.fitote.2018.06.015
150. Tomi, Félix.; Barzalona M., Casanova, Joseph.; Louro F. Chemical variability of the leaf oil of 113 hybrids from *Citrus clementina* (Commun) × *Citrus deliciosa* (Willow Leaf). Flavour Fragr J. 2008 Apr 11;23(3):152–163.
151. Zhumashova G, Kukula-Koch W, Koch W, Baj T, Sayakova G, Shukirbekova A, et al. Phytochemical and Antioxidant Studies on a Rare *Rheum cordatum* Losinsk. Species from Kazakhstan. Oxid Med Cell Longev. 2019 Nov 16;2019: 1-10. doi: <https://doi.org/10.1155/2019/5465463>
152. Uruena C, Mancipe J, Hernandez J, Pombo LM, Catadena D, Gomez A, et al. Gallotannin-rich *Caesalpinia spinosa* fraction decreases the primary tumor and factors associated with poor prognosis in a murine breast cancer model. BMC Complement Altern Med. 2013 Apr 03;13(10): 1-13.
153. De Oliveira, J. T; Barbosa, M. C. da S; de Camargos LF et al. Digoxin reduces the mutagenic effects of Mitomycin C in human and rodent cell lines. Cytotechnology. 2017 Mar 20;69 (2017):699–710.
154. Bendary E, Francis RR, Ali HMG, Sarwat MI, El Hady S. Antioxidant and structure–activity relationships (SARs) of some phenolic and anilines compounds. Ann Agric Sci [Internet]. 2013 Sep 07;58(2):173–181. doi: 10.1016/j.aos.2013.07.002
155. Rabêlo SV, Libório RC, Da Costa MM, Almeida JRGS. Antioxidant and antimicrobial activity of extracts from atemoia (*Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.). Rev Bras Frutic. 2014 Nov 12;36(1):265–271. doi: 10.1590/S0100-29452014000500031
156. Ahmed D, Khan MM, Saeed R. Comparative analysis of phenolics, flavonoids, and antioxidant and antibacterial potential of methanolic, hexanic and aqueous extracts from *Adiantum caudatum* leaves. Antioxidants. 2015 Jun 04;4(2):394–409.
157. Alseekh S, Perez de Souza L, Benina M, Fernie AR. The style and substance of plant flavonoid decoration; towards defining both structure and function. Phytochemistry. 2020 Jul 31;174(3):1–15.
158. Fitriansyah SN, Fidrianny I, Ruslan K. Correlation of Total Phenolic, Flavonoid and Carotenoid Content of *Sesbania sesban* (L. Merr) Leaves Extract with DPPH Scavenging Activities. Int J Pharmacogn Phytochem Res. 2017 Dec 16;9(1):89–94.

159. Shukla S, Meht A. Antioxidant, total phenolics and total flavonoid content of the aqueous extract of *Caesalpinia bonducella* seeds. Chiang Mai J Sci. 2017 Jul 12;44(3):929–938.
160. Lucena C F. Antioxidantes em exercícios aeróbios: papel do selênio e glutathione peroxidase. Rev Mackenzie Educ Física e Esporte. 2010 Abr 22;9(1):54–61.
161. Skowrya M, Falguera V, Gallego G, Peiró S, Almajano MP. Antioxidant properties of aqueous and ethanolic extracts of tara (*Caesalpinia spinosa*) pods in vitro and in model food emulsions. J Sci Food Agric. 2014 Mar 30;94(5):911–8.
162. Nascimento, L A; Nascimento, Talita C E S; Gomes JEG, Silva MDS. Antioxidant and antimicrobial properties ethanolic extract of *Libidibia ferrea* pods of Propriedade antioxidante e antimicrobiana do extrato etanólico de vagens de *Libidibia ferrea*. Rev Fitos. 2015 Feb 12;9(3):207–16.
163. Sembiring EN, Elya B, Sauriasari R. Phytochemical screening, total flavonoid and total phenolic content and antioxidant activity of different parts of *Caesalpinia bonduc* (L.) Roxb. Pharmacogn J. 2018 Jan-Feb;10(1):123–127.
164. Ciansiosi D, Yuliett T, Afrin S, Gasparrini M, Reboredo-rodriguez P, Manna PP, et al. Phenolic Compounds in Honey and Their Associated Health Benefits : A Review. Molecules. 2018 Sep 11;23(9):1–20.
165. Denardin CC, Hirsch GE, Ricardo F, Henriques T, Moreira CF, Guma TCR, et al. Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. J food drug Anal. 2015 Mar 28;23(3):387–398.
166. Becker, Magda M. Nunes, G. S.; Ribeiro, D. B.; Silva, F. E. P. S.; Catanante, G.; Marty J-L. Determination of the Antioxidant Capacity of Red Fruits by Miniaturized Spectrophotometry Assays Magda. J Braz Chem Soc. 2019 Apr 08;30(5):1108–1114.
167. Gallego MG, Rodríguez T, Rodríguez I, Almajano MP. Analytical Characterization of Polyphenols from Tara and *Caesalpinia decapetala* as Stabilizers of O/W Emulsions. J Food Sci. 2016 Nov 10;81(11):C2676–2685. doi: 10.1111/1750-3841.13502
168. Anacleto LR, Roberto MM, Marin-Morales MA. Toxicological effects of the waste of the sugarcane industry, used as agricultural fertilizer, on the test system *Allium cepa*. Chemosphere. 2017 Apr;173:31–42. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.01.033
169. Dias WLF, do Vale Junior EP, das Dores Alves de Oliveira M, Barbosa YLP, do Nascimento Silva J, da Costa Júnior JS, et al. Cytogenotoxic effect, phytochemical screening and antioxidant potential of *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill leaves. South African J Bot. 2019 Jul ;123:30–5. doi: 10.1016/j.sajb.2019.02.007
170. Silva MSA, Yamashita OM, Rossi AAB, Concenço G, Carvalho MAC, Felito RA. Cytotoxic and genotoxic effects of *macroptilium lathyroides*. Planta Daninha. 2018 Jul 16;1-8. doi: 10.1590/S0100-83582018360100043
171. Pamieri, M. J.; Vieira-Andrade, L. F.; Campos, J. M. S.; Gedraite, L. S.; Davide LC. Ecotoxicology and Environmental Safety Cytotoxicity of Spent Pot Liner on *Allium cepa* root tip cells : A comparative analysis in meristematic cell type on toxicity bioassays. Ecotoxicol Environ Saf. 2016 Nov 10;133(2016):442–447. doi: 10.1016/j.ecoenv.2016.07.016
172. Ceferino, José A. Aybar; Cruz FZ de la. Efecto Citotóxico del extracto acuoso del pericarpio de *Caesalpinia spinosa* “ tara ” en células meristemáticas de



- Allium cepa* L. var. Arequipeña. "Ciencia y Tecnol. 2016 Apr 04;12(2):185–193.
173. Liman R, Ciğerci İH, Gökçe S. Cytogenetic and genotoxic effects of Rosmaniric Acid on *Allium cepa* L. root meristem cells. Food Chem Toxicol. 2018 Nov 20;121(11):444–449. doi: 10.1016/j.fct.2018.09.022
  174. Devappa RK, Makkar HPS, Becker K. Jatropha diterpenes: A review. JAOCS, J Am Oil Chem Soc. 2011 Dec 28;88(3):301–322.
  175. Wink M. Medicinal plants: A source of anti-parasitic secondary metabolites. Molecules. 2012 Oct 31;17(11):12771–91. doi: 10.3390/molecules171112771
  176. Kaur V, Kumar M, Kumar A, Kaur K, Dhillon VS, Kaur S. Pharmacotherapeutic potential of phytochemicals: Implications in cancer chemoprevention and future perspectives. Biomed Pharmacother [Internet]. 2018 Jan 07;97(11):564–586. doi: 10.1016/j.biopha.2017.10.124
  177. Bianchi J, Mantovani MS, Marin-Morales MA. Analysis of the genotoxic potential of low concentrations of Malathion on the *Allium cepa* cells and rat hepatoma tissue culture. J Environ Sci (China). 2015 Oct 01;36:102–11. doi: 10.1016/j.jes.2015.03.034
  178. Felicidade I, Lima JD, Pesarini JR, Monreal ACD, Mantovani MS, Ribeiro LR, et al. Mutagenic And Antimutagenic Effects Of Crude Hydroalcoholic Extract Of Rosemary ( *Rosmarinus Officinalis* L .) On Cultured Meristematic Cells *Allium cepa*. VRI- Phytomedicine Publ. 2014 Jan 25;2(1):30-39.
  179. Mauro, MO; Pesarini, JR; Marin-Morales, MA; Monreal, MTFD; Morenal, ACD; Mantovani, MS; Oliveira RJ. Evaluation of the antimutagenic activity and mode of action of the fructooligosaccharide inulin in the meristematic cells of *Allium cepa* culture. Genet Mol Res. 2014 Feb 14;13(3):4808–19. doi: 10.4238/2014.February.14.14.
  180. Dametto AC, Agustoni D, Moreira TF, Plaza C V., Prieto AM, Silva TGA, et al. Chemical composition and in vitro chemoprevention assessment of *Eugenia jambolana* Lam. (Myrtaceae) fruits and leaves. J Funct Foods. 2017 Jul 27;36:490–502. doi: 10.1016/j.jff.2017.07.013
  181. Chatterjee N, Walker GC. Mechanisms of DNA Damage, Repair, and Mutagenesis. Environ Mol Mutagen. 2017 June 09;58(5):235–263. doi:10.1002/em.22087
  182. Wyatt MD, Pittman DL. Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks. Chem Res Toxicol. 2006 Dec;19(12):1580–1594. doi: 10.1021/tx060164e
  183. Liu H, Lightfoot R, Stevens JL. Activation of heat shock factor by alkylating agents is triggered by glutathione depletion and oxidation of protein thiols. J Biol Chem. 1996 Mar 01;271(9):4805–12.
  184. Siddique YH, Akhtar S, Rahul, Ansari MS, Shakya B, Jyoti S, et al. Protective effect of Luteolin against methyl methanesulfonate-induced toxicity. Toxin Rev. 2019 Jan 28;0(0):1–12. doi:10.1080/15569543.2018.1564142
  185. Lackinger D, Eichhorn U, Kaina B. Effect of ultraviolet light, methyl methanesulfonate and ionizing radiation on the genotoxic response and apoptosis of mouse fibroblasts lacking c-Fos, p53 or both. Mutagenesis. 2001 May;16(3):233–41. doi: 10.1093/mutage/16.3.233
  186. Jiang Y, Shan S, Chi L, Zhang G, Gao X, Li H, et al. Methyl methanesulfonate induces necroptosis in human lung adenoma A549 cells through the PIG-3-reactive oxygen species pathway. Tumor Biol. 2016 Mar;37(3):3785–95. doi: 10.1007/s13277-015-3531-y
  187. Kaur R, Arora S. Alkaloids- Important Therapeutic Secondary Metabolites Of

- Plant Origin. J Crit Rev. 2015 Jan 01;2(3):1–8.
188. Tsoi B, Yi RN, Cao LF, Li SB, Tan RR, Chen M, et al. Comparing antioxidant capacity of purine alkaloids: A new, efficient trio for screening and discovering potential antioxidants in vitro and in vivo. Food Chem [Internet]. 2015 Jun 01;176:411–9. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.12.087