

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ**

CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDO FITOQUÍMICO, AVALIAÇÃO DA  
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CITOGENOTÓXICA  
DOS EXTRATOS ETANÓLICOS E DAS FRAÇÕES DAS  
CASCAS E FOLHAS DE *Combretum leprosum***

**HERBERT GONZAGA SOUSA**

**ORIENTADOR(A): PROF<sup>A</sup>. DRA. SUZANA MARIA GALVÃO CAVALCANTI**

**CO-ORIENTADOR(A): PROF<sup>A</sup>. DRA. VALDILÉIA TEIXERA UCHÔA**

Teresina – PI  
2018

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ**

CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDO FITOQUÍMICO, AVALIAÇÃO DA  
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CITOGENOTÓXICA  
DOS EXTRATOS ETANÓLICOS E DAS FRAÇÕES DAS  
CASCAS E FOLHAS DE *Combretum leprosum***

**HERBERT GONZAGA SOUSA**

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: Bioprospecção Fitoquímica

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dra. Suzana Maria Galvão Cavalcanti

**Co-orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dra. Valdileia Teixeira Uchôa

Teresina – PI

2018

**ESTUDO FITOQUÍMICA, AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
ANTIOXIDANTE E CITOGENOTÓXICA DOS EXTRATOS  
ETANÓLICOS E DAS FRAÇÕES DAS CASCAS E FOLHAS DE**  
*Combretum leprosum*

**HERBERT GONZAGA SOUSA**

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: Bioprospecção Fitoquímica.

Aprovado em 14 de Setembro de 2018.

Membros da Banca:

---

Prof(a). Dr(a). Suzana Maria Galvão Cavalcanti  
(Presidente da Banca – UESPI)

---

Prof. Dr. Pedro Marcos Almeida  
(Membro Titular – UESPI)

---

Prof(a). Dr(a). Mariana Helena Chaves  
(Membro Titular – UFPI)

---

Prof. Dr. Joaquim Soares da Costa Junior  
(Membro Suplente – IFPI)

Teresina – PI

2018

Dedico esse trabalho a Deus, aos meus pais, familiares e aos meus amigos, que me acompanharam deram apoio, incentivo e acreditaram no meu esforço.

## AGRADECIMENTOS

---

- ❖ Agradeço a Deus por me proporcionar mais uma conquista, por me iluminar e guiar meus caminhos, proporcionando-me saúde, força e o dom da vida.
- ❖ Aos meus pais, Francisco e Maria Helena, ao meu irmão Héverton e meu padrinho Antônio por sempre me incentivar, apoiar e me ajudar nos momentos difíceis. Obrigado pelo carinho, pela dedicação, ensinamentos e esforços em sempre me proporcionar uma boa educação e princípios.
- ❖ À Universidade Estadual do Piauí, pela oportunidade de fazer minha pós graduação em química, ao laboratório GERATEC, pelos momentos de aprendizagem e amizades cultivadas.
- ❖ A minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dra. Suzana Maria Galvão Cavalcanti, pela oportunidade de realizar esta pesquisa, pelo apoio, confiança e paciência e ensinamentos compartilhado. A minha co-orientadora Prof<sup>a</sup>. Dra. Valdileia Teixeira Uchôa pela ajuda ao trabalho, pela amizade, paciência, dedicação e ajudar na formação acadêmica.
- ❖ A todos os amigos do GERATEC da UESPI, todos amigos que dividiram conhecimento nas disciplinas. Agradeço aos meus amigos da turma de Mestrado turma de mestrado pela união, força e ajuda.
- ❖ A todos os professores do programa de pós graduação em Química, pela excelente formação profissional, pelos conhecimentos adquiridos, pelo incentivo, condutas e ajuda nas pesquisas. A todos os colaboradores, pesquisadores, professores que me ajudaram na realização desse trabalho.
- ❖ A todos os professores, colaboradores e técnicos de outras instituições, ao Laboratório de Produtos Naturais do IFPI e da UFPI, ao Laboratório de Geoquímica Orgânica (LAGO), ao departamento de Biofísica da UFPI, ao Laboratório de Genética da UESPI, ao Herbário Afrânio Gomes Fernandes (HAF) do Centro de Ciências da Natureza da Universidade Estadual do Piauí (UESPI), entre outros.
- ❖ A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho.

**"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis." (José de Alencar)**

**“É necessário que ele cresça e que eu diminua.”**

João 3:30

## RESUMO

SOUSA, H.G. Estudo **fitoquímico, avaliação da atividade antioxidante e citogenotóxica dos extratos etanólicos e das frações das cascas e folhas de *Combretum leprosum***. 2018. 98 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual do Piauí. Teresina.

O *Combretum leprosum* é um arbusto pertencente à família Combretaceae, conhecido como mofumbo. O objetivo deste trabalho foi investigar classes de compostos por estudo químico qualitativo e quantitativo dos extratos etanólicos e das frações de AcOEt das cascas e folhas, investigar a atividade antioxidante "*in vitro*" pelo método químico (DPPH, ABTS, fenólico e flavonoides totais) e avaliar a citogenotoxicidade por método biológico (Teste de *Allium cepa* e micronúcleo em sangue periférico). O perfil cromatográfico do extrato etanólico das folhas e cascas do *C. leprosum*, identificação e quantificação da substância, foram obtidos através da análise por cromatografia líquida ultra-rápida (UFLC), acoplada a um detector UV. Foi possível identificar e quantificar os flavonoides *epi*-catequina no extrato etanólico das cascas com cerca de 0,065 mg de *epi*-catequina/g de extrato e rutina nos extratos etanólicos das folhas com cerca de 3,33 mg/g de extrato. As frações de acetato de etila da casca e da folha apresentaram maiores teores fenólicos ( $411,40 \pm 15,38$  e  $225,49 \pm 9,47$  GAE/g), enquanto fração acetato de etila das folhas e fração hexânica da casca ( $238,91 \pm 1,73$  e  $124,28 \pm 56$  mg de rutina/g amostra) apresentou maior teor de flavonoides. Os valores de IC<sub>50</sub> foram calculados e os resultados indicam que as frações de acetato de etila da folha e intermediário (hexano) da casca têm inibição de alta atividade do radical livre DPPH ( $40 \pm 0,56$  e  $28,5 \pm 0,60$  µg / mL), enquanto a fração hidrometanólica da folha e o intermediário casca (hexano) apresenta inibição dos radicais livres ABTS ( $81 \pm 1,4$  e  $27,5 \pm 0,90$  µg/mL). Para análises de citogenotoxicidade (*Allium cepa* e Micronúcleos em sangue periférico), nenhuma das concentrações testadas de extratos etanólicos das folhas e da casca mostraram significativo potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico.

**Palavras-chave:** Antioxidante, Mofumbo, Citogenotoxicidade

## ABSTRACT

The *Combretum leprosum* is a shrub belonging to the family Combretaceae, known as mofumbo. The objective of this work was to investigate the chemical classes (DPPH, ABTS, phenolic content and total flavonoids) and qualitative and quantitative chemical studies of the extracts of the bark and leaves, to establish the antioxidant activity "*in vitro*" and to evaluate the cytotoxicity by biological method (Test of *Allium cepa* and Micronucleus in peripheral blood). The chromatographic profile of the ethanol extract from *C. leprosum* leaves and bark, identification and quantification of the substance were obtained by ultra-fast liquid chromatography (UFLC) analysis, coupled to a UV detector. It was to identify and quantify flavonoids epi-catechin in bark extract with about 0.065 mg epi-catechin / g extract and rutin in ethanolic extracts of *C. leprosum* leaves with about 3.33 mg / g extract. The evaluation of total phenolics of the samples by the Folin-Ciocalteu method showed that the ethyl acetate fraction of bark and leaf had higher phenolic contents ( $411.40 \pm 15.38$  and  $225.49 \pm 9.47$  GAE / g), while the ethyl acetate fraction leaves and the hexanic fraction of the bark ( $238.91 \pm 1.73$  and  $124.28 \pm 56$  mg of Rutin / g sample) presented higher flavonoid content.  $IC_{50}$  values were calculated and the results indicate that the fractions of ethyl acetate of the leaf and intermediate (hexane) of the shell have high activity inhibition of free radical DPPH ( $40 \pm 0,56$  and  $28,5 \pm 0,60$   $\mu\text{g/mL}$ ), whereas the hydromethanol fraction of the leaf and the bark intermediate (hexane) has inhibition of ABTS free radicals ( $81 \pm 1,4$  and  $27,5 \pm 0,90$   $\mu\text{g / mL}$ ). For cytogenotoxicity analysis (*Allium cepa* and micronuclei in peripheral blood) none of the tested concentrations of ethanol extracts from leaves and bark showed significant cytotoxic, genotoxic and mutagenic potential.

**Keywords:** Antioxidant, Mofumbo, Cytogenotoxicity



## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figure 1.</b> Fotos da espécie <i>Combretum leprosum</i> : a) arbusto; b) flores; c) folhas d) fruto.....	18
<b>Figura 2.</b> Triterpenos isolados do <i>C. leprosum</i> : cicloartano (1), ácido arjunólico (2), ácido mollico (3), $3\beta,6\beta,16\beta$ -trihidroxi-lup-20(29)-eno (4) e flavonoides (3-O-metilquercetina (5) 5,3'-di-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona (6) ;5,3',4'-tri-hidroxi-3,7-dimetoxiflavona (7), quercetina (8) e epi-catequina (9).....	19
<b>Figura 3.</b> Atividade antioxidante pelo método do DPPH.....	28
<b>Figura 4.</b> Reação entre o radical DPPH• e um antioxidante através da transferência de um átomo de hidrogênio.....	28
<b>Figura 5.</b> Amostras avaliada pelo método do ABTS.....	29
<b>Figura 6.</b> Reação com persulfato de potássio e redução do ABTS•+ ocasionada por um composto antioxidante.....	29
<b>Figura 7.</b> Distribuição eletrônica do oxigênio no estado fundamental (triplete) e no estado excitado (singlete).....	32
<b>Figura 8.</b> Estrutura básica dos núcleo flavonoides. ....	34
<b>Figura 9.</b> Reação de oxirredução do ácido gálico com molibdênio (componente do reagente de Folin-Ciocalteu).....	35
<b>Figura 10.</b> Formação do complexo Flavonoide-Al <sup>+</sup> .....	36
<b>Figura 11.</b> Esquema de um cromatógrafo a líquido contendo: reservatório da FM; bomba; injetor; coluna cromatográfica; detector e o sistema para coletar os dados composto de um detector integrado a um software.....	39
<b>Figura 12.</b> Aberrações cromossômicas observadas nas células meristemáticas de raiz de <i>Allium cepa</i> em vários estágios da mitose: A. interfase normal; B. Prófase normal; C. metáfase normal; D. anáfase normal; E. telófase normal; F. interfase com um botão nuclear; G. metaphasis com aderência cromossômica; H. metáfase poliploide; I. telófase com ponte cromossômica; J. telófase com perda cromossômica; K-M interfase com micronúcleo; N. poliploide interfase.....	42
<b>Figura 13.</b> Formação de micronúcleo em células eucariontes.....	43
<b>Figura 14.</b> Preparação dos extratos e extração líquido-líquido dos extratos etanólico das cascas e folhas do <i>Combretum leprosum</i> .....	46
<b>Figura 15.</b> Placas dos extratos e frações das cascas de <i>C. leprosum</i> reveladas. 1: extrato	

etanólico; 2: fração intermediário; 3: fração hexânica; 4: fração clorofórmica; 5: fração acetato de etila, 6: fração hidrometanólica. ....	57
<b>Figura 16.</b> Placas dos extratos e frações das folhas de <i>C. leprosum</i> reveladas. 1: extrato etanólico; 2: fração hexânica; 3: fração clorofórmica; 4: fração acetato de etila; 5: fração hidrometanólica.....	57
<b>Figura 17.</b> <i>Epi</i> -catequina ( <b>1</b> - $t_R=18,41\text{min}$ ), rutina ( <b>2</b> - $t_R=32,15\text{min}$ ) e quercetina ( <b>3</b> - $t_R=37,64\text{ min}$ ), Fase Móvel: MeOH-H <sub>2</sub> O/AcOH (0,2%), vazão 1,0 mL min <sup>-1</sup> ; gradiente, $\lambda=254\text{ nm}$ .....	58
<b>Figura 18.</b> Cromatograma da fração acetato de etila das folhas de <i>C.leprosum</i> , co-injeção da fração com os padrões rutina ( $t_R=32,15\text{ min}$ ) e quercetina ( $t_R=37,64\text{ min}$ ); Fase Móvel: MeOH-H <sub>2</sub> O/AcOH (0,2%), vazão 1,0 mL min <sup>-1</sup> ; gradiente, $\lambda=254\text{ nm}$ .....	59
<b>Figura 19.</b> Espectros de absorção molecular no UV-Vis das bandas registradas no cromatograma da fração acetato de etila das folhas de <i>C. leprosum</i> referente a rutina e quercetina.....	59
<b>Figura 20.</b> Cromatograma da fração acetato de etila das casca de <i>C. leprosum</i> , co-injeção da fração acetato de etila das casca com <i>epi</i> -catequina ( $t_R=18,41\text{min}$ ); Fase Móvel: MeOH-H <sub>2</sub> O/AcOH (0,2%), vazão 1,0 mL min <sup>-1</sup> ; gradiente, $\lambda=254\text{ nm}$ .....	60
<b>Figura 21.</b> Espectros de absoção molecular no UV-Vis da <i>epi</i> -catequina atribuída a bandas registradas no cromatograma da fração acêtato de etila da casca de <i>C. leprosum</i> .	60
<b>Figura 22.</b> Curva de calibração construída com padrão <i>epi</i> -catequina em 278 nm.....	62
<b>Figura 23.</b> Curva de calibração construída com a adição de padrão rutina em 352 nm.....	63
<b>Figura 24.</b> a) Sobreposição dos cromatogramas do extrato etanólico das cascas de <i>C. leprosum</i> (EECCI) com o padrão <i>epi</i> -catequina em 278 nm. b) Cromatograma do extrato etanólico das cascas de <i>C. leprosum</i> , no comprimento de onda de 278 nm dopado com 120 $\mu\text{L}$ de <i>epi</i> -catequina.....	64
<b>Figura 25.</b> a) Sobreposição dos cromatogramas do extrato etanólico das folhas de <i>C. leprosum</i> (EEFCl) com o padrão rutina em 352 nm, A: expansão da região da dopagem, mostrando o sinal da rutina no extrato. b) cromatograma do extrato etanólico das folhas de <i>C. leprosum</i> , no comprimento de onda de 352 nm dopado com 120 $\mu\text{L}$ de rutina, 1:	

sinal referente a rutina adicionada ao extrato no volume de 120 $\mu$ L.....	65
<b>Figura 26.</b> Curva de calibração de padrão de ácido gálico em diferentes concentrações...	66
<b>Figura 27.</b> Curva de calibração de padrão de rutina em diferentes concentrações.....	68

## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 1.</b> Atividades biológicas da espécie <i>C. leprosum</i> .....	23
<b>Tabela 2.</b> Redução do oxigênio a espécies reativas.....	32
<b>Tabela 3.</b> Resultados da triagem fitoquímica em extratos etanólico da folhas e cascas.....	54
<b>Tabela 4.</b> Parâmetros para a equação de regressão das curvas analíticas, coeficientes de correlação dos flavonoides <i>epi</i> -catequina e rutina.....	61
<b>Tabela 5.</b> Teor de fenólicos total, teor de flavonoides totais e atividade antioxidante (ensaio de DPPH e ABTS) dos extratos etanólicos das folhas e casca do <i>C. leprosum</i> .....	72
<b>Tabela 6.</b> Tabela comparativa de espécies do gênero <i>Combretum</i> . (Teor de fenólicos e flavonoides totais).....	73
<b>Tabela 7.</b> Tabela comparativa de espécies do genero <i>Combretum</i> (Atividade antioxidante – DPPH e ABTS )......	74
<b>Tabela 8.</b> Média do índice mitótico e das alterações cromossômicas em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> , após a exposição por 24 h ao extrato etanólico das cascas de <i>C. leprosum</i> .....	77
<b>Tabela 9.</b> Média de eritrócitos micronucleados em células sanguíneas de camundongos machos ( <i>M. musculus</i> ) após tratamento com três diferentes concentrações dos extratos etanólico da cascas e folhas do <i>C. leprosum</i> , por 24, 48 e 72 h.....	79

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

- AA% - Atividade Antioxidante
- ABTS - Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfônico;
- ABTS<sup>•+</sup> - Cátion radicalar do ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfônico;
- AlCl<sub>3</sub> - Cloreto de alumínio
- AC - Alteração cromossômica
- CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência
- CCD – Cromatografia de camada delgada
- CN - Controle negativo
- CP – Controle positivo
- DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazil;
- EEFCI - Extrato etanólico das folhas de *C. leprosum*;
- EECCI - Extrato etanólico da casca do *C. leprosum*
- ERO - Espécies reativas de oxigênio
- FHCCI - Fração hexânica das cascas de *Combretum leprosum*
- FICCI - Fração intermediária das cascas de *Combretum leprosum*
- FCCCI - Fração clorofórmica das cascas de *Combretum leprosum*
- FActCCI – Fração acetato de etila das cascas de *Combretum leprosum*
- FHMCCI - Fração hidrometanólica das cascas de *Combretum leprosum*
- FHFCl – Fração hexânica das folhas de *Combretum leprosum*,
- FIFCl - Fração intermediária das folhas de *Combretum leprosum*,
- FCFCl - Fração clorofórmica das folhas de *Combretum leprosum*;
- FActFCl - Fração acetato de etila das folhas de *Combretum leprosum*;
- FHMFCl - Fração hidrometanólica das folhas de *Combretum leprosum*.
- GAE - Equivalentes de ácido gálico (do inglês “gallic acid equivalent”);
- HIV - vírus da imunodeficiência humana (do inglês Human immunodeficiency vírus)
- HO<sup>•</sup> - radical hidroxila
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - peróxido de hidrogênio
- IC<sub>50</sub> - Concentração inibitória em 50% (do inglês “inhibition concentration”)
- LC<sub>50</sub> - Concentração Letal em 50% (do inglês “Lethal Concentration”)
- MTT - Ensaio de captação do corante Tetrazolium (atividade metabólica mitocondrial) ou 3-(4,5 dimethyl thiazole-2yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide]
- OMS – Organização Mundial de Saúde

$O_2^{\bullet-}$  - ânion superóxido

$^1O_2$  - Oxigênio singleto

$RO^{\bullet}$  - Radical alcoxila;

$ROO^{\bullet}$  - radical peroxila

TTHL -  $3\beta,6\beta,16\beta$ -trihidroxi-lup-20(29) -eno

UHPLC - Cromatografia líquida de ultra-alta performance (do inglês “*ultra-high performance liquid chromatography*”)

Uv/Vis - Espectroscopia no ultravioleta visível

## SUMÁRIO

---

<b>CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
1.1 Produtos Naturais: contexto geral .....	13
1.2 <i>Combretum leprosum</i> Mart. & Eich .....	13
1.3 Compostos antioxidantes e estresse oxidativo.....	14
1.4 Teste de toxicidade .....	14
1.5 Objetivos.....	15
1.5.1 Gerais .....	15
1.5.2 Específicos .....	15
<b>CAPÍTULO 2 – REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>16</b>
2.1 Plantas Medicinais.....	16
2.2 <i>Combretum leprosum</i> Mart. & Eich.....	17
2.3 Avaliação das atividades antioxidantes.....	26
2.4 Compostos antioxidantes e estresses oxidativos.....	30
2.5 Compostos fenólicos.....	33
2.6 Determinação de fenóis e flavonoides totais .....	35
2.7 Métodos Cromatográficos de análises de compostos .....	36
2.7.1 Cromatografia de camada delgada (CCD).....	37
2.7.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	38
2.8 Teste de Citogenotoxicidade .....	40
2.8.1 Teste de <i>Allium cepa</i> .....	40
2.8.2 Tese de Micronúcleo.....	42
<b>CAPÍTULO 3 – METODOLOGIA EXPERIMENTAL .....</b>	<b>45</b>
3.1 Materiais e Reagentes.....	45
3.2 Material vegetal .....	45
3.3 Preparo dos extratos e frações .....	45
3.4 Prospecção preliminar fitoquímica .....	47
3.5 Cromatografia de camada delgada (CCD).....	47
3.6 Obtenção do perfil dos extratos e frações por CLAE.....	47
3.7 Identificação e quantificação de flavonoides nos extratos etanólicos das cascas e folhas do <i>Combretum leprosum</i> .....	48

3.7.1	Identificação de rutina e epi-catequina.....	48
3.7.2	Construção da curva analítica do padrão rutina e do padrão <i>epi</i> -catequina.....	49
3.8	Determinação de fenólicos e flavonoides totais.....	50
3.8.1	Determinação de fenólicos totais.....	50
3.8.2	Determinação de flavonoides totais.....	50
3.9	Ensaio antioxidantes ( <i>in vitro</i> ).....	51
3.9.1	Método de DPPH.....	51
3.9.2	Método de ABTS.....	51
3.10	Atividade de Citogenotóxica.....	52
3.10.1	Teste de <i>Allium cepa</i> .....	52
3.10.2	Teste de micronúcleo em sangue periférico.....	53
3.11	Análise Estatística.....	54
<b>CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>		<b>55</b>
4.1	Perfil químico dos extratos e frações das cascas e folhas de <i>Combretum leprosum</i> .....	55
4.1.1	Prospecção preliminar fitoquímica.....	55
4.1.2	Cromatografia de camada delgada.....	56
4.1.3	Perfil das frações AcOEt por cromatografia líquida de alta eficiência.....	58
4.2	Identificação e Quantificação de flavonoides rutina e epi-catequina nos extratos das folhas e cascas do <i>C. leprosum</i> .....	61
4.2.1	Quantificação de <i>epi</i> -catequina no extrato etanólico das cascas de <i>C.leprosum</i> .....	61
4.2.2	Quantificação de <i>rutina</i> no extrato etanólico das folhas de <i>C.leprosum</i> .....	62
4.3	Determinação de fenólicos e flavonoides totais.....	66
4.3.1	Determinação de fenólicos totais.....	66
4.3.2	Determinação de flavonoides totais.....	68
4.4	Atividade antioxidante de <i>C.leprosum</i> pelo método de DPPH e ABTS.....	69
4.5	Teste de citogenotoxicidade.....	75
4.5.1	Teste de <i>Allium cepa</i> .....	75
4.5.2	Teste de micronúcleo em sangue periférico.....	78
<b>CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>		<b>80</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>		<b>81</b>



# Capítulo 1

## INTRODUÇÃO

---

### 1.1 Produtos naturais: contexto geral

As plantas medicinais são conhecidas como agentes terapêuticos para o tratamento, prevenção, cura de várias doenças e uso de suplementos energéticos ou vitamínicos<sup>1</sup>. Apesar do grande avanço tecnológico na farmacologia e na área da saúde, o uso de plantas medicinais continua sendo a forma de tratamento bastante comum na população mundial<sup>2</sup>. Dados levantados pela OMS indicam que cerca de 80% da população mundial faz uso de algum tipo de planta em busca de alívio<sup>3</sup>. A alta incidência de uso de plantas medicinais possivelmente deve-se ao fácil acesso, baixo custo, menor efeitos colaterais e por serem consideradas inofensivas por grande parte da população<sup>4</sup>. O Brasil é considerado o detentor da maior diversidade biológica do planeta, com cerca de um número de espécies catalogadas superior a 350 mil, representando apenas uma fração da biodiversidade da flora brasileira<sup>3</sup>, sua utilização para o tratamento de enfermidades está fundamentada pelos conhecimento empírico pela culturas indígena, africana e dos imigrantes europeus<sup>5</sup>.

### 1.2 *Cobretum leprosum* Mart. & Eich

As plantas da família *Combretaceae* são amplamente utilizadas para fins medicinais na África, Ásia, América do Sul e na Índia<sup>6</sup>. As plantas do gênero *Combretum* estão amplamente distribuídas entre as regiões tropicais e subtropicais, sendo encontradas em maioria nas regiões Norte e Nordeste do Brasil<sup>7,8</sup>. Espécies desse gênero apresentam inúmeras atividades farmacológicas para tratamento de doenças infecciosas na medicina popular, como diarreia, malária, dores abdominais, pneumonia, ações anti-HIV, febre e entre outras<sup>9,10</sup>. A espécie *Combretum leprosum*, popularmente conhecida como mofumbo ou cipoaba, é encontrada somente na América do Sul, utilizada pela medicina popular para tratamento de hemorragias e como sedativo natural<sup>11</sup>. Análise fitoquímica demonstrou que a *C. leprosum* apresenta diversas classes químicas de compostos que podem contribuir para o efeito biológico desta planta, sendo rica em compostos antioxidantes (triterpenos e flavonoides)<sup>12</sup>.

### 1.3 Compostos antioxidantes e estresse oxidativos

Muitos antioxidantes são compostos naturais de estrutura fenólica produzido por plantas, que impede a formação de radicais livres, ou retarda o estresse oxidativo<sup>13,14</sup>. Os radicais livres são átomos ou moléculas instáveis, tornando-se altamente reativos e possuindo a capacidade de reagir com várias moléculas celulares<sup>15</sup>. O estresse oxidativo resulta em um desequilíbrio na produção de espécies reativas de oxigênio e a capacidade antioxidante das células<sup>16</sup>. A produção não controlada de radicais livres e estresse oxidativo apresenta efeitos prejudiciais ao metabolismo celular como doenças crônicas e degenerativas, tais como doenças inflamatórias, cardiovasculares e neurodegenerativas<sup>17</sup>. Com isso, extratos de plantas e derivados de produtos naturais por apresentarem potenciais antioxidantes estão diretamente associados à inibição, protegendo as células contra os efeitos danosos dos radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ERO)<sup>18,19</sup>. Os métodos mais comuns, para a determinação da atividade antioxidante são os que envolvem as reações com radicais colorimétricos, sendo os radicais ABTS e DPPH, muitos utilizados devido à sua simplicidade e rapidez de reação<sup>20,21</sup>.

### 1.4 Testes de toxicidade

As plantas medicinais são utilizadas mundialmente com fins terapêuticos, muitas não são suficientemente estudadas e são ingeridas sem acompanhamento médico, representando um perigo para a população, pois algumas apresentam a possibilidade de risco de consumirem substâncias capazes de exercer ação tóxica sobre outros organismos vivos<sup>4,22</sup>. Assim, os ensaios de toxicidade são frequentemente empregados para averiguar a segurança do uso de plantas na medicina popular, assim como extratos e outros insumos obtidos através de produtos naturais<sup>23,24</sup>. Os testes de citotoxicidade/genotoxicidade realizados pelo sistema teste em vegetais (*Allium cepa*) e animais (roedores), baseiam-se na análise de diversos parâmetros que permitem avaliar danos cromossômicos e perturbações do ciclo mitótico, usado como um monitor conveniente para a citotoxicidade de produtos e sensível a substâncias tóxicas<sup>25,26</sup>.

## 1.5 Objetivo

### 1.5.1 Objetivo Geral

Realizar a triagem fitoquímica, identificar constituintes químicos e avaliar as atividades biológica (atividade antioxidante e testes genotóxicos) dos extratos etanólicos e frações das cascas e folhas de *C. leprosum* Mart. & Eich (Combretaceae).

### 1.5.2 Objetivos Específicos

- Submeter os extratos etanólicos a triagem fitoquímica por prospecção preliminar
- Obter os perfis químicos dos extratos etanólicos e frações obtidas, por cromatografia em camada delgada (CCD e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)
- Quantificar os teores dos flavonoides rutina e epi-catequina nos extratos etanólicos.
- Determinar os teores de fenóis e flavonoides totais dos extratos etanólicos e frações por espectrofotometria
- Analisar os extratos etanólicos e frações quanto a atividade antioxidante *in vitro* pelos métodos DPPH e ABTS
- Determinar a citotoxicidade (índice mitótico), genotoxicidade (aberrações cromossômica) dos extratos etanólicos em diferentes concentrações com o teste de *Allium cepa* e micronúcleo em sangue periférico

# Capítulo 2

## REFERENCIAL TEÓRICO

---

### 2.1 Plantas Medicinais

A medicina popular está presente em nossas vidas desde a antiguidade, através da procura da cura de doenças por meio da ingestão de ervas e partes de plantas, provavelmente uma das primeiras utilização dos produtos naturais<sup>27</sup>. Os primeiros registros fitoterápicos datam do período 2838- 2698 a.C. quando o imperador chinês Shen Nung catalogou 365 ervas medicinais e venenos que eram usados sob inspiração taoísta de Pan Ku, considerado deus da criação<sup>28</sup>. As plantas medicinais são fontes naturais bem conhecidas de agentes terapêuticos utilizados para o tratamento de várias doenças<sup>29</sup>. Os remédios naturais são bastantes prescritos, por serem reconhecidos empiricamente como um material seguro com menos efeitos colaterais do que os dos medicamentos sintéticos, tornando-se o uso mais frequente na medicina terapêutica e como material complementar<sup>1,30</sup>.

As plantas medicinais constituem uma fonte importante de produtos naturais ativos que diferem amplamente em termos de estrutura e propriedades biológicas. São usadas e comercializadas no mundo todo com medicamentos fitoterápicos ou como ingredientes ativos<sup>31,32</sup>. Além de seu consumo popular para tratar e curar doenças humanas, os produtos naturais derivados de plantas podem reproduzir um papel importante como fonte de ferramentas farmacológicas para a compreensão das vias bioquímicas e dos mecanismos das doenças<sup>33</sup>. Acredita-se que o consumo regular de fitoterápicos que possui altos níveis de polifenóis é benéfico para a saúde humana devido às suas fortes atividades antioxidante e anti-inflamatória, que reduzem o risco de doenças relacionadas à idade<sup>34</sup>.

Muitas pesquisas são realizadas para desenvolver e fortalecer as propriedades farmacêuticas na medicina popular, possibilitando descobertas significativas de drogas naturais contendo efeitos terapêuticos e farmacêuticos. Cerca de 20 000 espécies de plantas, foram documentadas como valiosas para fins medicinais pela Organização Mundial da Saúde (OMS)<sup>35</sup>. As drogas derivadas dessas plantas medicinais representam cerca de 30% do mercado farmacêutico global. Embora o Brasil apresente mais de 45000 espécies, cerca de 20

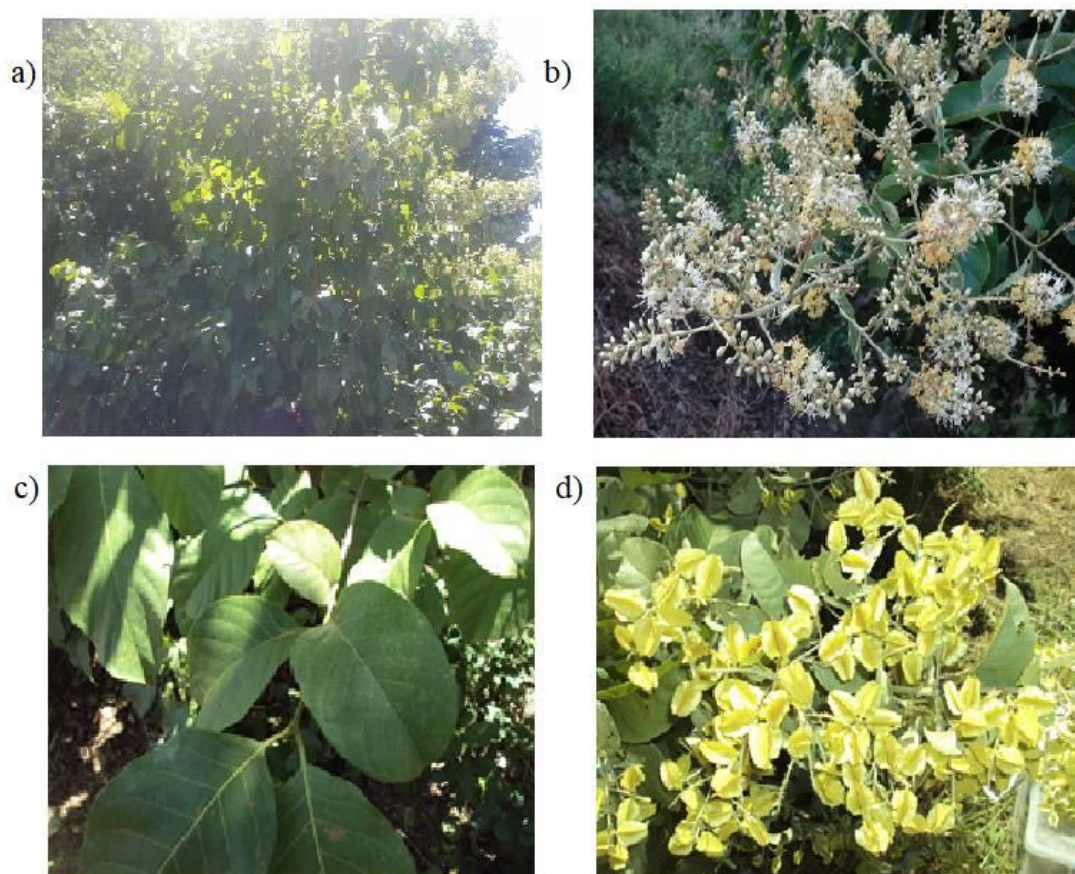
a 22% da biodiversidade mundial, há poucos estudos disponíveis sobre a etnofarmacologia brasileira<sup>1</sup>, 82% da população nacional usa plantas medicinais como primeira opção de tratamento ou prevenção de alguma enfermidade<sup>36</sup>.

Segundo a Organização Mundial de Saúde, aproximadamente 4 bilhões de pessoas (80% da população dos países em desenvolvimento) dependem de plantas medicinais para seus cuidados primários de saúde<sup>37</sup>. No entanto, a segurança de seu uso deve ser questionada devido aos relatos de toxicidade ou doença. Antes de serem considerados drogas, os extratos de plantas medicinais devem ser avaliados quanto a sua composição química exata, o mecanismo de ação e suas doses terapêuticas. Altos níveis de agentes tóxicos podem ocorrer em plantas medicinais quando eles estão em locais contaminados, como perto de estradas ou mineração de metais<sup>38</sup>.

## 2.2 *Combretum leprosum* Mart. & Eich

As plantas da família Combretáceae abrange cerca de 20 gêneros com aproximadamente 600 espécies, sendo que o maior delas é *Combretum*, com cerca de 370 espécies<sup>39</sup>. Esses gêneros são distribuídas nas regiões tropicais de todo o mundo, em maior abundância na partes da África e Brasil<sup>6</sup>. Foi demonstrado que alguns dos extratos ou princípios ativos obtidos de espécies de *Combretum* possuem um amplo espectro de atividade biológicas, incluindo atividade antibacterianas, antiprotozoárias, anticancerígenas, citotóxicas, analgésicas, anti-inflamatórias, hepatoprotetora e antivirais<sup>6,9</sup>. Dentre os compostos bioativos encontrados nesse gênero, foi verificado a predominância de flavonoides e triterpenoides<sup>40</sup>.

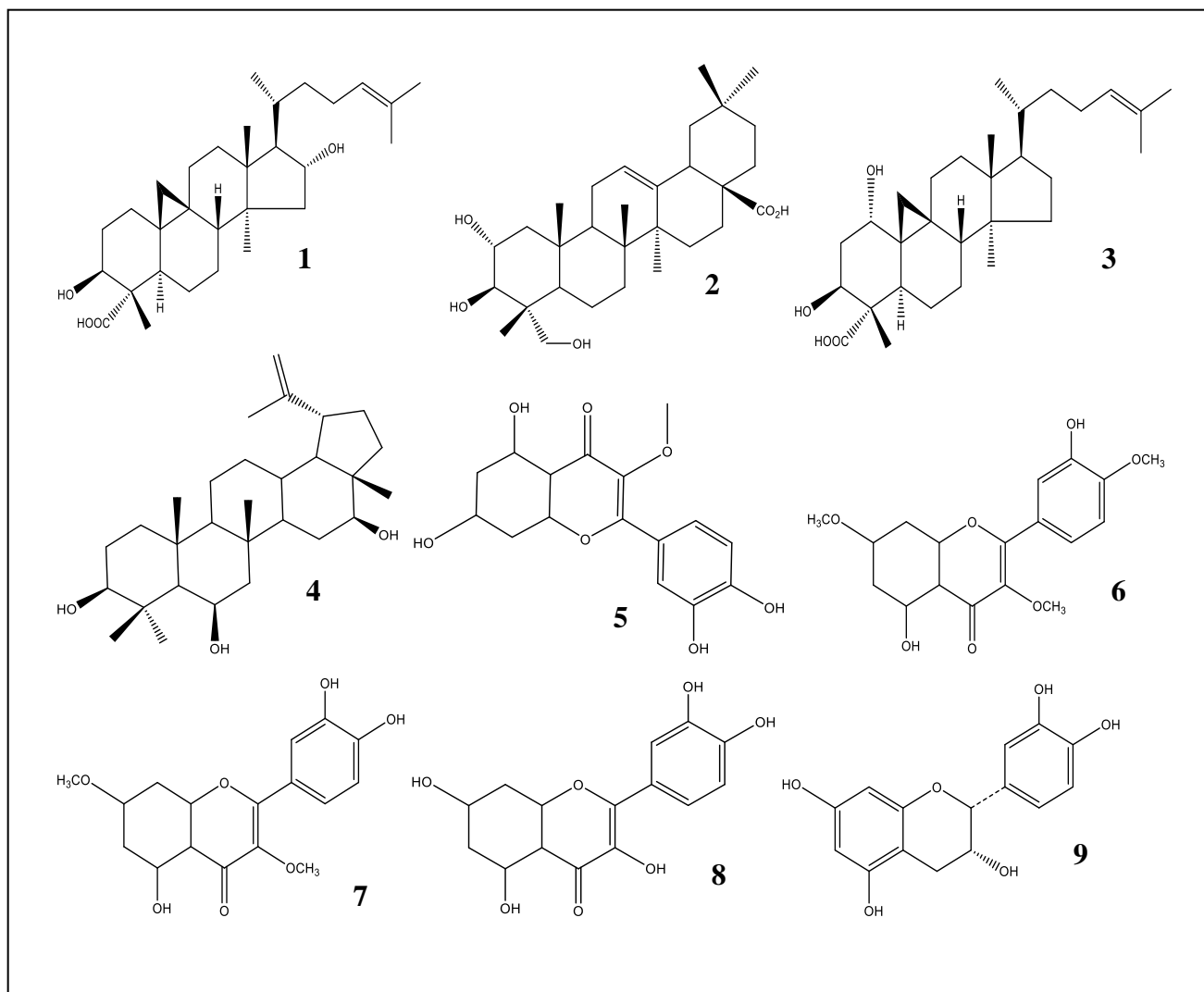
A espécie *Combretum leprosum* Mart. & Eich (Figura 1) é bem distribuída no Brasil na região Nordeste do Piauí à Bahia e popularmente conhecida como mofumbo, mufumbo ou pente de macaco<sup>41,42</sup>. Seu nome dado ao epitélio *leprosum* faz referência às manchas nas folhas, com a relativa semelhança com a lepra<sup>43</sup>. Esta planta caracteriza-se como uma arvoretas, arbustos escandentes ou lianas que varia de 2,5 a 5,0 m de altura, possui tronco coberto com indumento lepidoto esbranquiçado ou amarelado. As inflorescências são em panículas de racemos congestas, terminais e axilares com flores hermafroditas. As folhas são do tipo opostas e pecioladas; cartácea a subcoriácea, elíptica, largo-elíptica a arredondada, nervuras proeminentes abaxialmente. Os frutos são secos, indeiscentes, alados e monospermicos e medem de 2,0 a 2,5 cm de comprimento<sup>8,44</sup>.



**Figure 1.** Fotos da espécie *Combretum leprosum*: a) arbusto; b) flores; c) folhas d) fruto.

**Fonte:** Autor

As folhas, flores, raízes e cascas do caule do *C. leprosum* são empregadas como uso popular por meio de infusos, decoctos e xaropes no tratamento de hemorragias uterinas, coqueluches, para dores de estômago e utilizado como sedativo, além de possuir propriedade sudorífera e afrodisíacas<sup>12,45</sup>. Plantas da família Combretaceae são ricas em triterpenos, flavonoides, estilbenos, fenantrenos e lignanas<sup>39</sup>. Estudos fitoquímico realizado com o *C. leprosum* permitiram a identificação e isolamento de triterpenos: cicloartano (1), ácido arjunólico (2), ácido mollico (3),  $3\beta,6\beta,16\beta$ -trihidroxi-lup-20(29)-eno (4) e flavonoides: 3-O-metilquercetina (5),  $5,3\beta$ -di-hidroxi-3,7,4 $\beta$ -trimetoxiflavona (6),  $5,3\beta,4\beta$ -tri-hidroxi-3,7-dimetoxiflavona (7), quercetina (8) e epi-catequina (9)<sup>11,40,45</sup>(Figura 2).



**Figura 2.** Triterpenos isolados do *C. leprosum*: cicloartano (1), ácido arjunólico (2), ácido mollico (3),  $3\beta,6\beta,16\beta$ -trihidroxi-lup-20(29)-eno (4) e flavonoides (3-O-metilquercetina (5), 5,3'-di-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona (6); 5,3',4'-tri-hidroxi-3,7-dimetoxiflavona (7), quercetina (8) e epi-catequina (9).

Estudos prévios desta espécie revelou que os extratos e constituintes químicos apresentam propriedades antinociceptiva<sup>45</sup>, antimicrobiana<sup>15</sup>, antioxidantes<sup>12</sup>, anti-inflamatória<sup>46</sup>, antiproliferativa<sup>47</sup>, gastroprotetora<sup>48</sup>, antidiarreica, anticolinesterática<sup>49</sup>, imunomoduladora<sup>42</sup>, cicatrizante<sup>50</sup>, citotóxica e mutagênica<sup>39</sup>, atividade antienzimática da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase<sup>51</sup>, atividade leishmanicida<sup>52</sup>, neuropática (Parkinson)<sup>53</sup>, atividade vasoativa com relaxamento de anéis arteriais<sup>41</sup> e antiofídica<sup>54</sup>. (Tabela 1)

Entre os estudos biológicos comprovados, Pietrovski et al. 2006 verificou a ação antinociceptiva em camundongos após tratamento com extrato etanólico das flores em modelo de nocicepção por injeção intraplantar de glutamato, assim como por outros modelos de

nocicepção, tanto química (ácido acético, formalina e capsaicina) e térmica (placa quente). O triterpeno  $3\beta,6\beta,16\beta$ -trihidroxi-lup-20(29)-eno (**4**) obtido das flores de *C. leprosum*, apresentou efeito antinociceptivo similar ao apresentado pelo extrato etanólico de *C. leprosum*<sup>11</sup>. Para Longhi-Balbinotn et al. 2009, a amostra de TTHL (**4**) apresentou efeito antinociceptivo quando administrado pelas vias intraperitoneal ou intratecal, produzindo inibição dependente da dose de nocicepção induzida pelo glutamato, por via agonista causando redução acentuada induzida por N- metilpolol , não obteve efeito sobre o ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico e ácido caínico<sup>55</sup>.

Segundo Moraes et al 2016,o extrato etanólico das flores do *C. leprosum*, apresentou atividade neuroprotetora, prevenindo as mudanças motoras e moleculares induzida pela toxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina e reverteu parcialmente o déficit de dopamina, sugerindo como um potencial terapêutico para a prevenção e tratamento da doença de Parkinson<sup>53</sup>. Segundo Lacouth-Silva et al. 2015, o lupano isolado das flores ( $3\beta,6\beta,16\beta$ -trihidroxi-lup-20(29)-eno)(**4**) apresentam atividade imunomoduladora, em concentrações abaixo de 1,5  $\mu\text{g/mL}$ , não possui toxicidade para as células, não foi capaz de ativar as funções celulares e não alterou a produção de IL-10 (citocina imuno-reguladora) e TNF- $\alpha$  (citocina inflamatória) e não interferiu na ação da topoisomerase I nem na ação da topoisomerase<sup>42</sup>.

A ação anti-inflamatória, imunomoduladora e antiproliferativa após uso tópico do extrato etanólico das flores de *C. leprosum* e de seu triterpeno TTHL (**4**) (0,01–10 mg/kg), foram demonstrados em modelos animais de inflamação de pele, induzida por 12-O-tetradecanoilforbol-acetato e óleo de cróton e em modelos de inflamação induzidos por ácido acético (i.p.)<sup>46, 47</sup>. A atividade antioxidante foi avaliada pelo extrato etanólico de flores de *C. leprosum* e seus isolados 5,3'-dihidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona e 5,3',4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona em cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. A atividade mutagênica foi testada em *S. cerevisiae*, enquanto que as propriedades citotóxicas e genotóxicas foram avaliadas por ensaios MTT e Cometa. O extrato etanólico das flores de *C. leprosum* apresentou maior toxicidade, genotoxicidade e indução de mutação na levedura *S. cerevisiae* em comparação com seus produtos isolados<sup>12</sup>.

O efeito citotóxico do TTHL (**4**) foi investigado em células cancerígenas em diferentes intervalo de tratamento. Os resultados indicaram que o TTHL induziu uma inibição do crescimento dependente do tempo e da concentração em todas as linhagens de células cancerígenas humanas, perturbando uma função celular desencadeando uma apoptose<sup>39</sup>. O TTHL (**4**) reduziu as crises convulsivas induzidas pelo pentilenotretazol, adicionalmente observou-se uma diminuição da peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas, além de



diminuir a inibição da atividade enzimática da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP sugerindo uma proteção contra danos oxidativos<sup>51</sup>.

Lopes et al 2010, comprovou que a fração hidroalcoólica e (-) epicatequina obtida das cascas da *Combretum leprosum* mostrou efeito antinociceptivo em camundongos em vários modelos químicos de nocicepção por diferentes substâncias<sup>45,56</sup>. Segundo Nunes et al. 2009, o extrato etanólico das cascas de *C. leprosum*, via oral reduziu a lesão na mucosa gástrica em ratos dose-dependente e a dose de 500 mg/kg demonstrou obter efeito protetor similar ao observado pela ranitidina (antiulcerogênico)<sup>48</sup>. Segundo Galvão, os extrato etanólico 70% das cascas do *C. leprosum* apresentou atividade antioxidante “*in vitro*” por inibir a formação de malonaldeído (MDA), reduziu o trânsito intestinal e mostrou ação antidiarréica em camundongos.

Segundo Alves Filho et al 2015, o extrato etanólico 70% das cascas de *C. leprosum* induziu relaxamento em anéis de artérias de diferentes espécies de animais. Em todas as preparações testadas, este extrato provocou relaxamentos dependentes de endotélio, promoveu estimulação dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  das células endoteliais a qual resulta numa produção prolongada de fatores relaxantes<sup>41</sup>. Segundo Lira et al. 2002, o extrato etanólico da casca apresenta propriedades antinociceptivas e analgésica, demonstrados por teste químico (formalina) e um térmico (imersão da cauda)<sup>57</sup>.

Segundo Nascimento-Filho et al. (2015), o triterpeno bioativo  $3\beta,6\beta,16\beta$ -trihidroxilup-20(29)-eno (**4**) e o extrato etanólico das folhas de *C. leprosum* apresentaram atividade cicatrizante, testados em feridas ( $1\text{ cm}^2$ ) na zona dorsal de camundongos por aplicação diária, verificando a reestruturação dos vasos e aumentando a resistência à tração da lesão, levando a um fechamento mais rápido e eficaz<sup>50</sup>. Para Evaristo (2014) o  $3\beta,6\beta,16\beta$ -trihydroxylup-20(29)-ene (**4**), triterpeno isolado do extrato hidroetanólico das folhas do *C. leprosum* apresentou efeito antimicrobiano, por inibir o crescimento planctônicos e biofilmes de bactérias gram positivas *Streptococcus mutans* e *S. Mitis*. Além disso o TTHL (**4**) apresentou efeito anti-artemia com concentração letal a 50% ( $\text{LC}_{50}$ ) de  $98,19\ \mu\text{g}$ <sup>58</sup>. Para Evaristo o  $3\beta,6\beta,16\beta$ -trihydroxylup-20(29)-ene (**4**), apresentou atividade bactericida por não obterem crescimento bacteriano durante as 24 h e apresentou atividade antioxidante por apresentar capacidade de eliminação do radical DPPH e na inibição da oxidação do  $\beta$ -caroteno<sup>15</sup>.

Segundo Fernandes et al 2014, o extrato etanólico das raízes do *C. leprosum* e o ácido arunólico, avaliados nos testes antiofídicos para reduzir alguns efeitos *in vivo* e *in vitro* dos venenos de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops jararaca*. Tanto o extrato como o ácido

arjunólico (2) aboliram a ação miotóxica do veneno de *B. jararacussu*. A pré-incubação do veneno de *B. jararacussu* com o extrato ou ácido arjunólico preveniu o aumento da atividade da creatina quinase plasmática em camundongos, reduziu a formação de edema induzida pelo veneno de *B. jararacussu* tanto na pré-incubação quanto no pré-tratamento, mas não no pós-tratamento<sup>54</sup>. Segundo Facundo et al 2005, o extrato etanólico das raízes e ácido arunólico apresentam atividade anti-inflamatória e anticolinesterática, capaz de inibir significativamente o edema da para induzido por carragenina e ácido acético com 37,6 e 80,8% de inibição, porém não foi observada toxicidade na menor dose<sup>49</sup>.

Os testes antimicrobianos foram avaliados por Lima et al 2011, quanto a atividade antimicrobiana (6 diferentes microrganismos), antileishmania e candidacida do extrato etanólico e triterpeno lupano (4) obtidos dos frutos de *C. leprosum*. Foi verificando que nos testes de difusão em disco não obtiveram formação de halo para *P. aeruginosa* e *C. albicans*; halo inferior ou igual ao diluente (Etanol, 95%) para *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*; e halo superior ao diluente para *S. aureus* e *E. coli*. A atividade leishmanicida foi comprovada pelo triterpeno lupano e o extrato etanólico dos frutos do *C. leprosum* que apresentaram inibição no crescimento, citotoxicidade e viabilidade nas atividade contra formas promastigotas de *Leishmana amazonensis*<sup>59,60</sup>.

Teles et al 2015, observou que o lupano foi capaz de interferir na replicação da forma amastigota de *L. amazonensis* e na sobrevivência em células hospedeiras de vertebrados comprovado sua ação leishmanicida e comprovando que esta molécula foi o inibidor potencial da topoisomerase<sup>61</sup>. Segundo Barros et al 2013, também foi possível comprova a eficácia do lipossoma-lupano no modelo de infecção por *L. amazonensis*, havendo toxicidade e inibição no crescimento replicação nos macrófagos *in vitro*, efeito no tamanho das lesões cutânea induzida por medições e por análises histopatológica<sup>52</sup>. Segundo Almeida (2011), o extrato etanólico dos frutos e o triterpeno  $3\beta,6\beta,16\beta$ -trihidroxi-lup-20(29)-eno (4) apresentou inibição de crescimento das promastigotas de *L. braziliensis* e *L. guyanensis* e das epimastigotas de *T. cruzi*. O sistema liposomal contendo lupano ( $3\beta,6\beta,16\beta$ -trihidroxilup-20(29)-ene), isolado das flores da *C. leprosum* demonstrou ser promissor na quimioterapia alternativa contra *Leishmaniose cutânea*.

**Tabela 1.** Atividades biológicas da espécie *C. leprosum*.

<b>PARTE DA PLANTA</b>	<b>TIPOS DE EXTRATOS OU COMPOSTO ISOLADO</b>	<b>ATIVIDADES TESTADAS</b>	<b>REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA</b>
<b>Flores</b>	Extrato etanólico das flores <i>3β,6β,16β</i> -trihidroxi-lup-20(29) -eno	Atividade Antinociceptiva	(Petrovski et al., 2006).
	<i>3β,6β,16β</i> -trihidroxi-lup-20(29) -eno	Atividade Antinociceptiva	(Longhi-Balbinot et al., 2009).
	Extrato etanólico das flores	Atividade Neuroprotetora	(Moraes et al 2016)
	<i>3β,6β,16β</i> -trihidroxi-lup-20(29) -eno	Atividade Enzimática	(Della-Pace et al., 2013).
	Extrato etanólico das flores	Atividade Anti-inflamatória Imunomoduladora e Antiproliferativa	(Horinouchi et al., 2013)
	<i>3β,6β,16β</i> -trihidroxi-lup-20(29) -eno		(Longhi-Balbinot et al., 2012).
	Extrato etanólico das flores 5,3'- diidroxi- 3,7,4' - trimetoxiflavona 5,3',4'- triidroxi-3,7- dimetioxiflavona	Atividade Antioxidante, Citotóxica e Mutagênica	(Viau, 2016)
	<i>3β,6β,16β</i> -trihidroxi-lup-20(29) -eno	Citotóxica e Mutagênica	(Viau, 2014).
	<i>3β,6β,16β</i> -trihidroxi-lup-20(29) -eno	Imunomoduladora	( Lacouth-Silva et al,2015)

Continuação das atividades biológicas

<b>PARTE DA PLANTA</b>	<b>TIPOS DE EXTRATOS OU COMPOSTO ISOLADO</b>	<b>ATIVIDADES TESTEDAS</b>	<b>REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA</b>
<b>Casca</b>	Fração hidroalcoólica e (-) epicatequina	Atividade antinociceptiva	(Lopes et al., 2010)
	(-) epicatequina	Atividade antinociceptiva	(Lopes et al., 2012)
	Extrato etanólico das cascas	Atividade gastroprotetora	(Nunes et al., 2009),
	Extrato etanólico 70%	Atividade antidiarreica	(Galvão et al., 2006).
	Extrato etanólico 70%	Atividade relaxante e vasoativa	(Alves Filho et al. 2015),
	Extrato etanólico da casca	Atividade antinociceptivas e analgésica	(Lira et al. 2002)
<b>Folhas</b>	<i>3β,6β,16β</i> -tri-hidroxilup-20(29)-eno	Atividade cicatrizante	(Nascimento- Neto et al. 2015)
	<i>3β,6β,16β</i> -tri-hidroxilup-20(29)-eno	Atividade antimicrobiano e anti-artemia	(Evaristo et al. 2014)
	<i>3β,6β,16β</i> -tri-hidroxilup-20(29)-eno	Atividade antimicrobiana e antioxidante	(Evaristo et al. 2017)
<b>Raízes</b>	Extrato etanólico das raízes Ácido arunólico	Atividade antiofídica	(Fernandes et al 2014)
		Atividade anti-inflamatória e anticolinesterática	(Facundo et al. 2005)

Continuação das atividades biológicas

PARTE DA PLANTA	TIPOS DE EXTRATOS OU COMPOSTO ISOLADO	ATIVIDADES	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA
<b>Frutos</b>	Extrato etanólico dos frutos <i>3β,6β,16β</i> -tri-hidroxilup-20(29)-eno	Atividade leishmanicida e antimicrobiano	( Lima et al. 2011)
		Atividade leishmanicida	(Teles et al. 2011)
		Atividade leishmanicida e tripanocida	Almeida 2011
	<i>3β,6β,16β</i> -tri-hidroxilup-20(29)-eno	Atividade leishmanicida	(Teles et al. 2015)
		Atividade leishmanicida	(Barros et al. 2013)

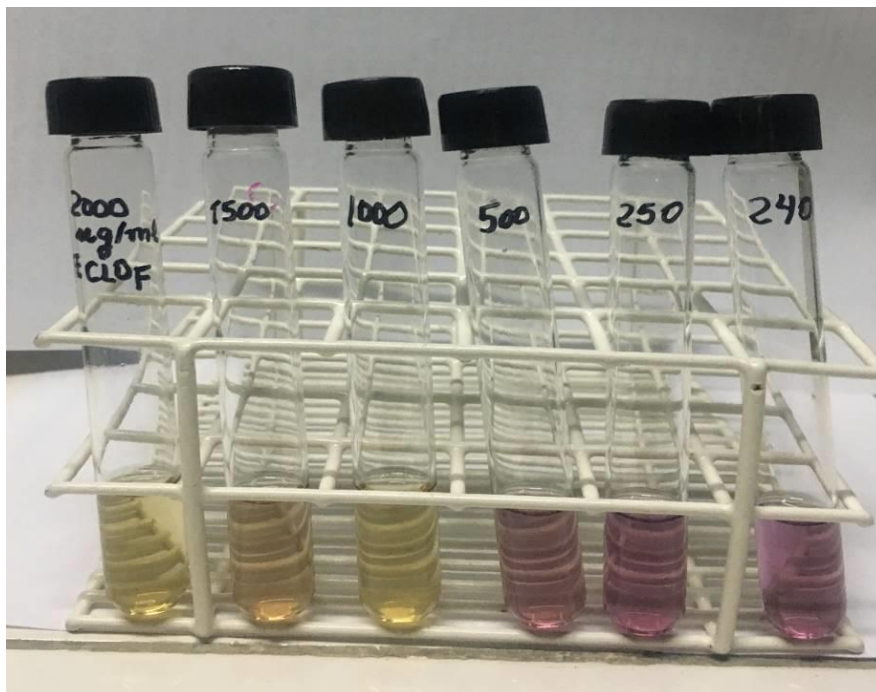
## 2.3 Avaliação da atividade antioxidante

Existem diversos métodos usados para avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* de extratos de plantas e de substâncias puras biologicamente ativas, envolvendo desde ensaios químicos com substratos lipídicos a ensaios mais complexos utilizando as mais diversas técnicas instrumentais<sup>62,63</sup>. Um dos métodos mais confiáveis envolve avaliar o sequestro de radical livre nos ensaios de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazina) e ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), que são mais comumente utilizados para avaliar a atividade antioxidante (AA%) de alimentos e produtos naturais<sup>19,64</sup>. Verifica-se que a atividade antioxidante não deve ser baseada em um único modelo de teste antioxidante, são necessário vários procedimentos de testes *in vitro* para avaliar a atividade antioxidante com as amostras de interesse<sup>65</sup>. Estes testes têm se tornado ferramentas comuns e extremamente necessárias na seleção inicial de substâncias que possam ser utilizadas como fármacos, auxiliando os pesquisadores na avaliação da atividade<sup>66</sup>.

O DPPH é um radical livre estável de nitrogênio orgânico, amplamente utilizado para determinar a atividade anti-radical e antioxidante de compostos fenólicos purificados, bem como de extratos vegetais<sup>67,68</sup>. Descoberto por Goldschmidt e Renn em 1922, é um método colorimétrico amplamente utilizado em pesquisas de produtos naturais no isolamento de antioxidantes e para testar a capacidade de oxi-redução dos extratos e compostos puros na absorção de radical. A sua estabilidade é devido a sua estrutura química que possui três anéis aromáticos apresentando efeito de ressonância, estabilizando a carga eletrônica do radical. Essa estabilização é atribuído também ao deslocamento do elétron desemparelhado sobre o radical DPPH, nos três grupos de NO<sub>2</sub> e nos átomos de nitrogênio, que são grupos que permitem o deslocamento de elétrons<sup>64,69</sup>. O método do DPPH é muito conveniente para uso em triagem de pequenas moléculas antioxidantes, por suas reações serem observadas visualmente usando técnicas comuns de CCD e dot-blot, e também sua intensidade pode ser analisada por ensaios espectrofotométricos ou cromatográficos simples<sup>70,71</sup>. Assim verifica que o DPPH apresenta muitas vantagens, tais como uma boa estabilidade na ausência da luz, aplicabilidade, simplicidade, alta viabilidade, fácil manipulação, altamente sensível, preciso, rápido, simples e econômico<sup>69</sup>.

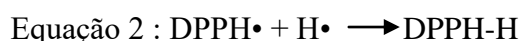
Por causa da localização do elétron livre ao longo da molécula de DPPH•, o radical possui à cor púrpura ou violeta com uma absorção em solução de etanol ou metanol a 515-520 nm<sup>72</sup>. Quando os compostos antioxidante doam um átomo de hidrogênio ou transferir um

elétron para a molécula de DPPH•, é obtida a hidrazina, uma molécula estável diamagnética originanda da forma reduzida DPPH-H, com mudança simultânea na coloração de violeta a amarelo pálido, (Figura 3) a intensidade da cor varia de acordo com a concentração<sup>62,72</sup>.

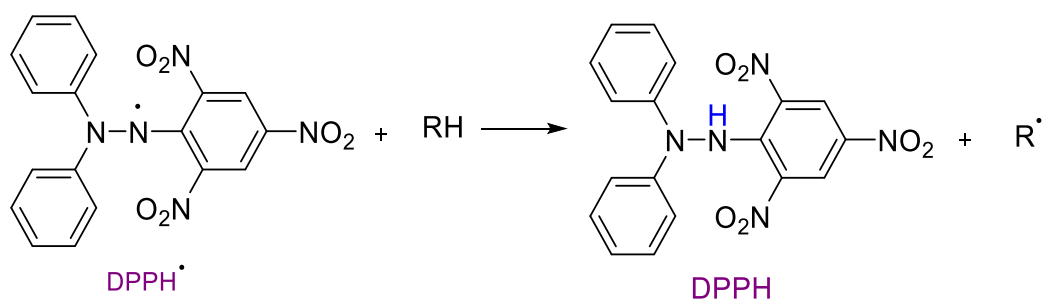


**Figura 3.** Amostras avaliada pelo método do DPPH. **Fonte:** Autor.

Existem dois tipos de mecanismos de reação que acontecem na determinação da capacidade antioxidante, ambos resultando de neutralização ou redução de um radical<sup>73;74</sup>. Um desses mecanismos se baseia na transferência de elétron e o outro na transferência de um átomo de hidrogênio, ambos podem ser vistos na equação 1 e 2 ( Figura 4). Porém, o mecanismo de reação de transferência de hidrogênio entre o radical DPPH• e o antioxidante pode ser reversível (equação 3), sendo que o DPPH-H pode se converter na forma de DPPH•<sup>69</sup>.



A capacidade de remoção de radicais livres de compostos puros ou extratos vegetais pode ser avaliada pelo sequestro deste radical sintético e estável em solução de metanol à temperatura ambiente, a eliminação do DPPH é seguida pela monitorização da diminuição da absorvância a 515 nm em espectrofotômetro UV-Vis<sup>75</sup>.



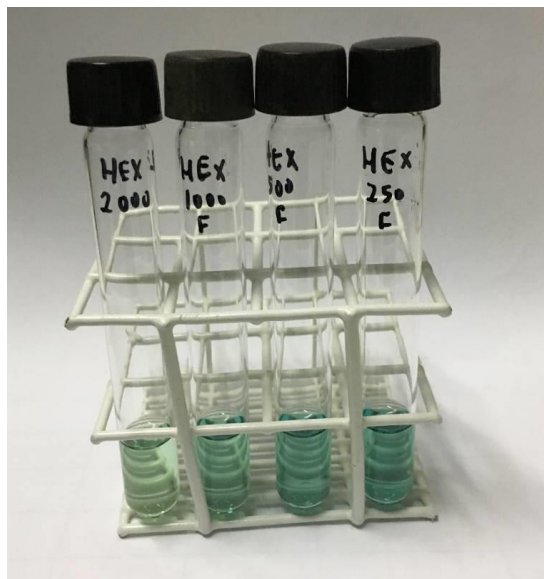
**Figura 4 :** Reação entre o radical DPPH• e um antioxidante através da transferência de um átomo de hidrogênio. **Fonte :** Oliveira,2015.

O radical ABTS<sup>•+</sup> contém um cromóforo quimicamente estável, produzido a partir do ácido 2,29-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfônico, apresenta em seu espectro de absorção uma faixa de UV de 200 a 400 nm, e de medidas secundárias em 645, 734 e 815 nm<sup>65</sup>. O método foi inicialmente sugerido por Miller, Rice-Evans, Davies, Copinathan e Milner (1993) para testar amostras biológicas e depois foi amplamente aplicado para testar alimentos e fenólicos solúveis em água<sup>76</sup>.

O método ABTS<sup>•+</sup> apresenta excelente estabilidade, sendo um dos testes mais rápidos de atividade antioxidante e que oferece resultados reprodutíveis, além de oferecer vários máximos de absorção e uma boa solubilidade, permitindo análises de compostos tanto de natureza lipofílica como hidrofílica, apresentando grande flexibilidade de ser medida em diferentes níveis de pH. O radical ABTS<sup>•+</sup> pode ser gerado por meios de reações enzimáticas ou químicas, solubilizado em meios orgânicos e aquosos nos quais a atividade antioxidante pode ser determinada, dependendo da natureza dos compostos antioxidantes, cuja reação ocorre na ausência de luz<sup>65</sup>.

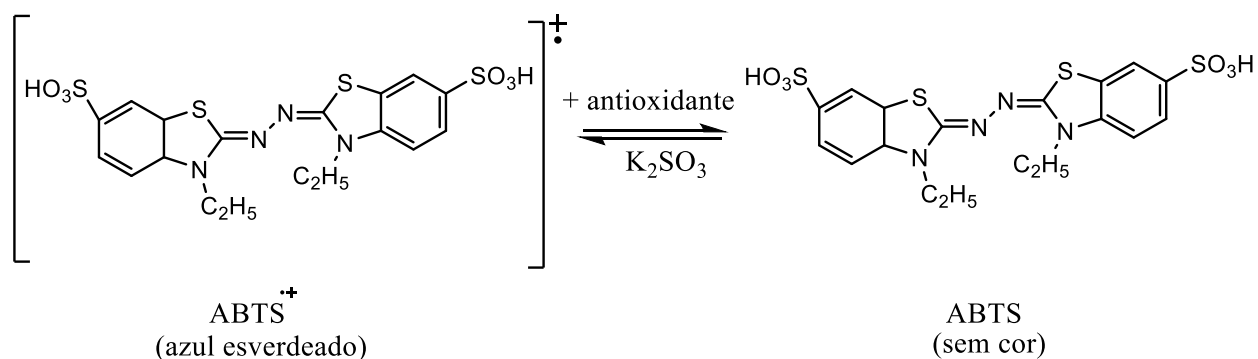
O método para geração do ABTS<sup>•+</sup>, que apresenta cor azul esverdeado, por meio da reação do ABTS com persulfato de potássio e deixando a mistura em repouso no escuro durante 12-16 h, apresentando absorção máxima em 645, 734 e 815 nm que pode ser facilmente determinada por espectrofotometria UV-Vis (Figura 5). Com a adição de um antioxidante, ocorre a redução do ABTS<sup>•+</sup> a ABTS promovendo a perda da coloração do meio reacional. Com a perda de cor, a porcentagem de inibição do ABTS<sup>•+</sup> é determinada em função do Trolox, um padrão submetido às mesmas condições de análise do antioxidante<sup>77</sup>(Figura 6).





**Figura 5.** Amostras avaliada pelo método do ABTS. **Fonte:** Autor, 2017

A captura do cátion  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  provoca um decréscimo na absorvância, que é lida a partir da mistura do radical com o antioxidante em diferentes tempos, sendo representadas graficamente. Este método apresenta vantagem em relação a outros. Na ausência de fenólicos, o ABTS é bastante estável, mas reage energeticamente com um doador de átomos de H, como os fenólicos, sendo convertido em uma forma não colorida de  $\text{ABTS}^{78}$ .



**Figura 6.** Reação com persulfato de potássio e redução do  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  ocasionada por um composto antioxidante. **Fonte:** Oliveira, 2015.

Os modelos de teste de antioxidantes variam em diferentes aspectos, sendo difícil comparar totalmente um método com outro, cada método se refere à geração de um radical diferente, atuando através de uma variedade de mecanismos. Sendo necessário o pesquisador verificar os métodos de análise antes de adotá-lo para seu propósito de pesquisa. Para avaliar

uma ação antioxidante *in vivo*, necessita primeiro obter resultados por experimentos simples, pois um composto que apresenta uma baixa atividade antioxidante *in vitro* provavelmente exibirá pouca atividade *in vivo*<sup>62</sup>. Os valores de IC<sub>50</sub> caracterizam a capacidade antioxidante de extratos e compostos puros, que podem ser usados para indicar se são adequados como fontes de compostos antioxidante<sup>79</sup>.

## 2.4 Compostos antioxidantes e estresse oxidativo

Grupos de pesquisas têm evidenciado a importância da variedade de substâncias antioxidantes naturais como fonte terapêutica no controle de doenças degenerativas (associadas ao envelhecimento celular, câncer, doenças cardiovasculares, Alzheimer, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais), por serem substâncias que em pequenas quantidades podem prevenir, tratar e apresentar alto potencial terapêutico no combate à doenças causadas por radicais livres<sup>27</sup>. As doenças degenerativas são consideradas uma das principais causas da taxa de mortalidade em todo o mundo. Essas doenças particularmente são causadas por radicais instáveis (radicais livres) originadas por espécies reativas causando o estresse oxidativo (produção excessiva de radicais<sup>80</sup>).

Os compostos antioxidantes naturais são essencialmente substâncias da natureza polifenólica que geralmente estão presentes em partes de espécies vegetais,<sup>31</sup> sendo de origem endógena, tal como enzimas e proteínas, e de origem exógena, tal como as substâncias de baixa massa molecular como vitaminas, carotenoides, flavonoides, antocianinas e outros compostos fenólicos geralmente presentes em plantas<sup>19,24</sup>. Compostos fenólicos, especialmente flavonoides (flavonas, flavonóis, flavonóis, flavonóis, isoflavonas e antocianidinas), são poderosos antioxidantes por possuir estrutura ideal para o sequestro de radicais, sendo mais eficazes que as vitaminas C e E<sup>81</sup>.

Em geral, quanto maior o número de hidroxilas, mais pronunciado é a atividade doadora de prótons e elétrons. As plantas sintetizam e acumulam essa grande diversidade de substâncias (metabólitos secundários) que é produzido através da sua rota biossintética e também pela resposta ao mecanismo de defesa (lesão, radiação UV, pesticidas)<sup>82</sup>. O consumo regular de frutas e vegetais é importante na dieta humana, pois contém componentes antioxidantes que protegem contra os radicais livres e que têm sido associados com a redução das doenças degenerativas<sup>19</sup>.

Esses efeitos exercidos pelos alimentos têm sido atribuído à presença de compostos fitoquímicos com ação antioxidante. Os compostos antioxidantes são substâncias que inibem

ou reduzem a velocidade, os mecanismos dos processos oxidativos metabólico e níveis de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, protegendo o organismo contra danos causados por radicais instáveis (radicais livres). Os compostos antioxidantes funcionam como agentes redutores, devida às suas propriedades de óxido-redução, como inibidores de radicais livres, como quelantes ou sequestrantes do oxigênio singlete e como desativadores de metais pró-oxidantes<sup>83,84</sup>.

As espécies reativas podem ainda ser divididas em dois grupos: os radicais livres e os compostos não radicalares. Os radicais livres são átomos ou moléculas que possuem pelo menos um elétron desemparelhado em seus orbitais externos, altamente reativos, permitindo a transferência de elétrons como aceptores ou doadores de elétrons, criando alterações no ambiente molecular ao seu redor<sup>85</sup>.

As principais fontes de radicais livres são as organelas citoplasmáticas que metabolizam oxigênio, nitrogênio e cloro, gerando grande quantidade de metabólitos. O excesso de radicais livres apresenta efeitos prejudiciais ao metabolismo celular, tais como a peroxidação dos lipídeos de membrana e agressão às proteínas dos tecidos, às enzimas, carboidratos e DNA, relacionados com várias patologias crônicas e degenerativas, tais como: doenças inflamatórias, artrite, choque hemorrágico, doenças cardíacas, doenças neurodegenerativas (doenças de Alzheimer e Parkinson), catarata, diabetes mellitus, disfunções cognitivas, envelhecimento das células e câncer, doenças auto-imunes das glândulas endócrinas, carcinogênese e mutagênese, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral<sup>69</sup>.

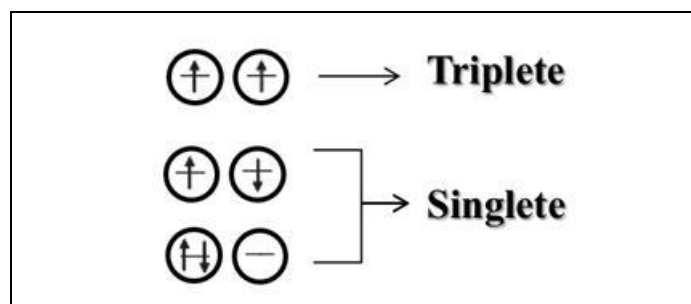
O estresse oxidativo é uma condição biológica de desequilíbrio entre os sistemas antioxidantes e pré-oxidantes prevalecendo a ação prejudicial de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Tabela 2). O termo “espécies reativas de oxigênio” (ERO) inclui os radicais livres contendo oxigênio, como; radical hidroxila ( $\text{HO}^\bullet$ ), ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), alcoxila ( $\text{RO}^\bullet$ ); peroxila ( $\text{ROO}^\bullet$ ) e os não-radicalares: peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ )<sup>85</sup>.

Tabela 2: Redução do oxigênio a espécies reativas.

	Reação	Radicais
(1)	$H_2O \xrightarrow{luz\ UV} \cdot OH + \cdot H$	Radical hidroxila
(2)	$M^{n+} + H_2O_2 \longrightarrow M^{(n+1)} + \cdot OH + OH^-$	Radical hidroxila
(3)	$O_2 + e^- \longrightarrow O_2^{\cdot -}$	Radical superóxido
(4)	$O_2^{\cdot -} + e^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2$	Peróxido de hidrogênio
(5)	$H_2O_2 + e^- + H^+ \longrightarrow \cdot OH + H_2O$	Radical hidroxila
(6)	$2O_2^{\cdot -} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$	Peróxido de hidrogênio
(7)	$O_2^{\cdot -} + H^+ \rightleftharpoons HOO\cdot$	Radical hidroperoxil
(8)	$H_2O_2 + Cl^- + H^+ \xrightarrow{MPO} H_2O + HOCl$	Ácido hipocloroso

Fonte: BARREIROS, DAVID e DAVID, 2006

O oxigênio molecular, no estado fundamental, possui dois elétrons com spins paralelos ocupando dois orbitais  $\pi$  de mesma energia, caracterizando um estado triplete, os dois elétrons solitários do subnível p fazem intercâmbio com os dois elétrons de outro elemento oxigênio, garantindo a estabilidade. Uma forma mais reativa do oxigênio, conhecida como oxigênio singlete, pode ser gerada por um acréscimo de energia, sendo assim, o oxigênio singlete é muito mais oxidante que o oxigênio molecular no seu estado fundamental. Existem dois estados singlete do oxigênio: o primeiro estado excitado, contendo dois elétrons com spins opostos no mesmo orbital e segundo estado excitado, tem um elétron em cada orbital  $\pi$  degenerado, com spins opostos (Figura 7). Durante esse processo são formados intermediários reativos, produzidos em um cenário de reações de óxido-redução<sup>86</sup>.



**Figura 7.** Distribuição eletrônica do oxigênio no estado fundamental (triplete) e no estado excitado (singlete). **Fonte:** RONSEIN et al., 2006

Há fatores de diversas ordens associados ao ERO, como: hábitos de vida considerados inapropriados (consumo de álcool, tabagismo, dieta inadequada, exercício físico realizado de

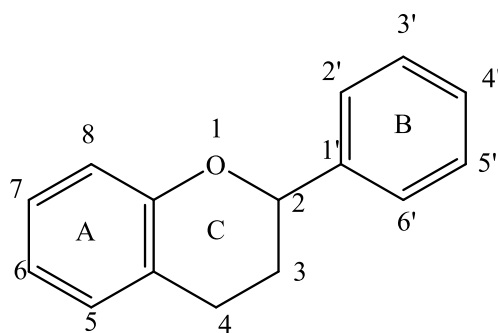
forma extrema e exposição à radiação não ionizante ultravioleta e outras ondas curtas); condições ambientais impróprias (temperatura elevada e poluição ambiental, domiciliar e ocupacional); envelhecimento e estados psicológicos que provoquem estresse emocional. Há também patologias crônicas (diabetes mellitus, hipertensão arterial, câncer, entre outras) e patologias degenerativas (Mal de Alzheimer e Parkinson) associadas ao estresse redox<sup>85</sup>.

## 2.5 Compostos fenólicos

Compostos fenólicos são metabólitos secundários que possuem efeito benéfico à saúde devido à sua atividade antioxidante e moduladora do estresse oxidativo<sup>87</sup>. Eles são formados como metabólitos secundários em planta durante o crescimento, como resposta ao estresse (infecção, lesão, radiação UV)<sup>64,88</sup>. As atividades de compostos fenólicos devem-se às propriedades redutoras e estrutura química. Os compostos fenólicos podem facilmente estabilizar a oxidação de radicais livres de lipídios ou outras biomoléculas, por doar hidrogênio a partir de grupos hidroxila posicionadas na cadeia e em razão da ressonância do anel aromático presente na estrutura dessas substâncias<sup>89</sup>.

Os fenóis naturais são metabólitos secundários exclusivos das plantas, cuja função está principalmente relacionada à pigmentação e proteção contra patógenos e predadores. Existem mais de 10.000 compostos fenólicos diferentes, desde os mais simples até os mais complexos, e suas análises e características são indicativas de sua grande diversidade na natureza. Eles realizam uma ampla gama de atividades metabólicas: potencial antimicrobiano, antidiarreico, antiulceroso, antiaterosclerótico, antitumoral, antimutagênico, anticarcinogênico e anti-inflamatório antioxidante, anti-inflamatória, inibição da agregação plaquetária e funções imunológicas, participam na proteção direta do DNA e na promoção da apoptose, entre outras atividades<sup>34,90</sup>.

A classe de compostos fenólicos se divide em flavonoides (polifenóis) e não-flavonoides (fenóis simples ou ácidos)<sup>91,92</sup>. A classe de flavonoides compreende um grupo de compostos fenólicos amplamente distribuídos nas frutas e nos vegetais, sua estrutura está baseada no núcleo flavilium, o qual consiste de três anéis fenólicos, descrito como C6-C3-C6 (Figura 8). Os flavonoides são formados da combinação de derivados sintetizados da fenilalanina (via metabólica do ácido chiquímico) e ácido acético. A diversidade estrutural dos flavonoides emana dos diferentes padrões e graus de hidroxilação, metoxilação, prenilação ou glicosilação do núcleo flavan<sup>93,94</sup>.



**Figura 8.** Estrutura básica dos núcleos dos flavonoides. **Fonte:** Dornas,2009

O anel benzeno A é condensado com o anel C que na posição 2 carrega um anel de fenil-benzeno B como substituinte. O anel C pode ser um pirano heterocíclico, gerando as estruturas básicas das leucoantocianinas (ou proantocianinas ou catequinas) e as antocianidinas, denominado de núcleo flavano. No caso do anel C apresentar como uma pirona, ocorre a formação das flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas, chalconas e auronas, recebendo a denominação de núcleo 4-oxo-flavonóide<sup>93</sup>.

Sua alta atividade antioxidante está ligada aos átomos de hidrogênio dos grupos hidroxila adjacentes (*orto*-difenois), localizados em várias posições dos anéis A, B e C, as ligações duplas dos anéis benzênicos e a ligação dupla da função oxo ( $-C=O$ ) de algumas moléculas de flavonoides. O núcleo fundamental é constituído pelo anel A, proveniente da rota do acetato (Malonil-CoA), enquanto o anel B juntamente à cadeia propiônica que forma o anel heterocíclico C é oriundo da rota do chiquimato (*p*-Cumaril-CoA), podendo estar ligados a carboidratos (heterosídeos), não associados (agliconas) ou ainda polimerizados (antocianinas)<sup>95</sup>.

A atividade de sequestro está diretamente ligada ao potencial de oxidação dos flavonoides e das espécies a serem sequestradas, pois quanto menor o potencial de oxidação do flavonoide, maior é sua atividade como sequestrador de radicais livres. Flavonoides com potencial de oxidação menor que o do  $Fe^{+3}$  e  $Cu^{+2}$  e seus complexos podem reduzir esses metais, sendo potencialmente prooxidantes, tendo em vista que o  $Fe^{+2}$  e o  $Cu^{+}$  participam da reação de Fenton geradora de radicais livres. Quanto maior o número de hidroxilas, maior a atividade como agente doador de H e de elétrons<sup>96</sup>.

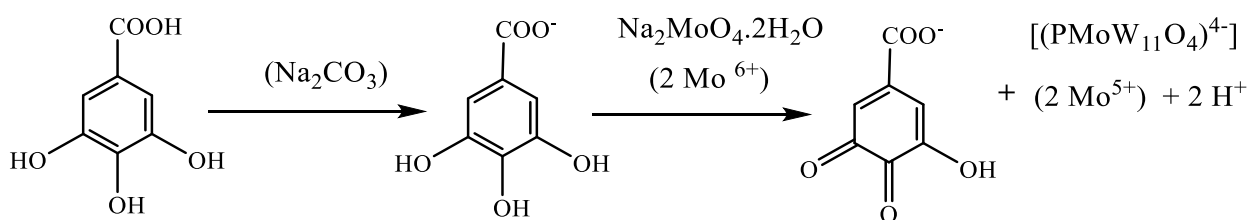
Na classe dos não-flavonoides estão os derivados dos ácidos hidroxicinâmico e hidroxibenzóico. Os compostos fenólicos não-flavonoides derivados dos ácidos hidroxicinâmicos, estruturas químicas C6-C3, mais conhecidos são os ésteres dos ácidos caféico, *p*-cumárico e felúrico<sup>92</sup>. Quanto aos derivados dos ácidos hidroxibenzóicos, apresenta

estruturas químicas C6-C1, podem-se destacar os ácidos salicílico, gálico, elágico, protocatéico e vanílico. Além dos derivados das estruturas químicas C6-C2-C6 específicas do *trans*-resveratrol, *cis*-resveratrol e *trans*-resveratrol-glicosídeo. Sua atividade antioxidante está relacionada com a posição dos grupos hidroxilas e também com a proximidade do grupo  $\text{CO}_2\text{H}$  em relação ao grupo fenil. Quanto mais próximo esse grupo estiver do grupo fenila, maior será a capacidade antioxidante do grupo hidroxila na posição *meta*<sup>62,92</sup>.

## 2.6 Determinação de fenóis e flavonoides totais

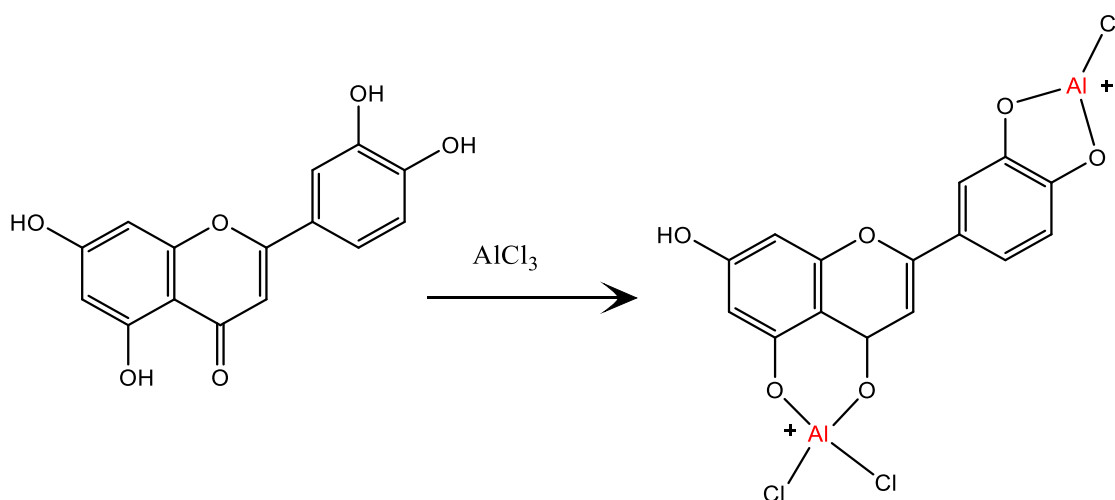
Diversos métodos podem ser utilizado para a identificação e quantificação de compostos fenólicos, tais como: métodos espectrofotométricos, eletroquímicos, e cromatográficos.<sup>82</sup> Dentre estes métodos, a técnica de espectrofotometria UV-Vis, destaca-se por ser acessível, prático e menos onerosa, utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu<sup>97</sup>. O Folin-Ciocalteu é um método colorimétrico que permite a análise de compostos orgânicos que possuem anéis aromáticos hidroxilados, possui caráter sensível e permite a medição do conteúdo de compostos fenólicos<sup>98</sup>.

O reagente de Folin-Ciocalteu consiste de mistura dos ácidos fosfomolibdídico e fosfotungstúico (Figura 9), no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se na forma complexada  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , com estado de oxidação 6+ ( $\text{Mo}_{6+}$ ) e incolor<sup>98,99</sup>. Na presença de alguns agentes redutores como os compostos fenólicos (ácido gálico), em meio alcalino ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) são desprotonados e produzindo ânions carboxilatos, que por meio de reação de oxirredução entre o ânio fenolato e o reagente de Folin, são formado complexos molibdênio-tungstênio $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^{4-}]$ , apresentando mudança de coloração para azul, por meio de espectroscopia na região do visível a um comprimento de onda entre 730 a 765 nm, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5+ e 6+ e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras que não necessariamente precisam ter natureza fenólica<sup>99,100</sup>.



**Figura 9:** Reação de oxirredução do ácido gálico com molibdênio (componente do reagente de Folin-Ciocalteu). **Fonte:** Oliveira, 2009

Dentre os compostos fenólicos, os flavonoides se destacam por apresentar um grande potencial antioxidantes que atuam na redução de riscos de doenças, que devido às ligações duplas presentes nos anéis aromáticos, os flavonoides podem ser analisados na região do ultravioleta ou visível<sup>64</sup>. A quantificação de flavonoides totais em plantas é determinado por métodos espectrofotométrico de UV-Vis, utilizando-se cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) a 2% em metanol<sup>101</sup> (Figura 10). Após a mistura do cloreto de alumínio e da amostra, os cátions de alumínio formam complexos com os flavonoides presente, sendo possível observar mudança de cor que determina o desvio no comprimento de onda e na intensidade de absorção. A leitura da absorvância é feita na medida de 425 nm, onde os complexos flavonoide- $\text{Al}^+$ , absorve um comprimento de onda bem maior do que os flavonoides não complexados e dos ácidos fenólicos complexados (comprimento de onda muito inferiores). Dessa forma é possível determinar a quantidade de flavonoides, evitando a interferência de outras substancias fenólica<sup>99,102</sup>.



**Figura 10:** Formação do complexo Flavonoide- $\text{Al}^+$ . **Fonte:** Markham,1982.

Para análise dos dados, é necessária a utilização de uma curva padrão, para os teores de fenóis totais, os valores são expresso em mg de equivalente de ácido gálico por grama de amostra ( $\text{mg EAG g}^{-1}$ ), e para os flavonoides totais, expresso em miligramas de equivalente de rutina por grama de amostra ( $\text{mg ER g}^{-1}$ )<sup>103</sup>.

## 2.7 Métodos Cromatográficos de análise de componentes

A cromatografia é um processo físico-químico de separação de misturas, como por exemplo, extratos de plantas, no qual os componentes a serem separados distribuem-se em



duas fases que estão em contato: fase estacionária e fase móvel. A fase estacionária pode ser sólida ou líquida dispostos sobre um suporte sólido com grande área superficial. A fase móvel, que pode ser gasosa, líquida ou ainda um fluido supercrítico, passa sobre a fase estacionária, arrastando consigo os diversos componentes da mistura<sup>104</sup>. O termo cromatografia pode ser atribuído ao botânico russo Mikhael Semenovich Tswett que, em 1906, o empregou para descrever o processo utilizado para separar os pigmentos de folhas de plantas. O termo cromatografia deriva do grego “*chrom*” (cor) e “*graphie*” (escrever), embora Tswett tenha indicado que o método não depende da cor, exceto para facilitar a visualização das frações separadas<sup>105,106</sup>.

A caracterização de diferentes classes de produtos naturais é normalmente realizada através de diferentes modalidades de cromatografia que podem ser classificadas de acordo com o mecanismo de separação envolvido e os diversos tipos de fases utilizadas. A cromatografia pode ser subdividida em cromatografia em coluna e cromatografia planar. Dentre elas estão a cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)<sup>107</sup>.

### 2.7.1 – Cromatografia de Camada Delgada - CCD

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica de separação rápida, fácil e de baixo custo, comparado a métodos cromatográficos modernos que podem ser acoplados a várias técnicas analíticas para identificar compostos (espectrometria de massas, espectroscopia no infravermelho e Raman)<sup>108</sup>. Esta técnica teve início com as pesquisas de Izmailoz e Shraiber em 1938<sup>109</sup>. Considerada uma ferramenta eficaz de análise qualitativa para avaliação da pureza de uma amostra simples, avaliação do número de componentes de uma mistura, determinação da identidade de uma amostra por comparação com um padrão, identificação de uma ou mais substâncias presentes em uma mistura por comparação com padrões, monitoramento do progresso de uma reação química, escolha de um solvente apropriado para uma separação cromatográfica em coluna e monitoramento de uma separação cromatográfica em coluna<sup>110,111</sup>.

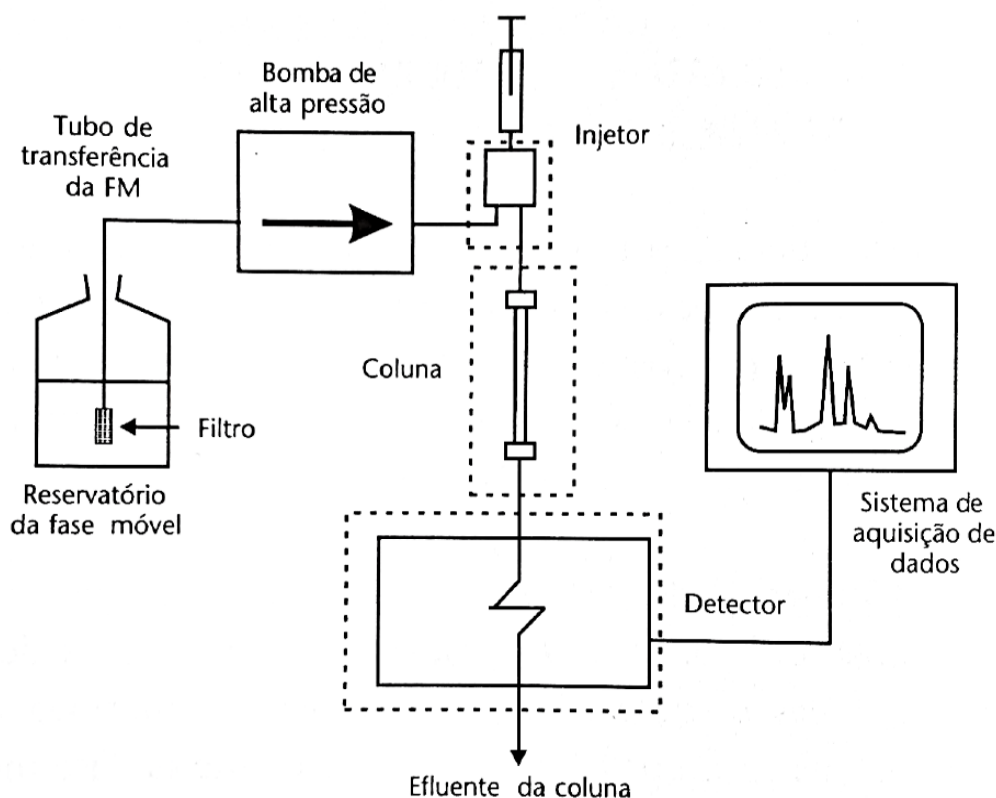
Na cromatografia em camada delgada (CCD), a fase estacionária é uma camada fina formada por um sólido granuloso (sílica, óxido de alumínio, poliamida, etc.), depositada sobre uma placa de vidro, folha de alumínio ou outro suporte inerte. Entre os tipos de fase estacionária usada, o gel de sílica é a fase estacionária mais utilizada em análises de CCD por obter uma elevada área superficial, que possibilita uma maior interação com os analitos e

a fase estacionária<sup>112</sup>. A fase móvel, geralmente constituída de um solvente ou uma mistura de solventes (gradientes), é selecionada previamente de forma a garantir a melhor separação das substâncias presentes na amostra. A fase móvel percorre por capilaridade a placa cromatográfica, realizando a migração dos compostos pela afinidade com o solvente utilizado.

A polaridade do solvente deverá ser de acordo com a substância que se deseja separar, a separação se dá pela diferença de afinidade dos componentes de uma mistura pela fase estacionária<sup>113</sup>. As fases estacionárias não devem ser utilizadas solventes muito apolares ou polares, para não interferir no processo de arraste dos componentes da amostra. Os melhores resultados são obtidos com misturas de solventes, de modo a se obter uma polaridade média em relação à polaridade dos componentes da amostra. A placa é deixada na cuba, onde o solvente irá subir por capilaridade. Ao entrar em contato, o solvente irá arrastar mais os compostos menos adsorvidos na fase estacionária, separando-os dos mais adsorvidos<sup>108</sup>. Como a maioria dos compostos orgânicos são incolores, há necessidade da utilização de um processo de revelação para que se possa analisar o resultado (sulfato de *cério*). As bandas cromatográficas separadas na placa cromatográfica podem ser visualizados por diversos métodos, como por exemplo: radiação UV, revelação química, ou por derivação da amostra<sup>114</sup>.

### 2.7.2 - Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A Cromatografia Líquida de Alta Performance (CLAE), também conhecida como Cromatografia Líquida de Alta Pressão, é um dos métodos analíticos mais empregados para separação, tanto para análises quantitativas quanto para análises qualitativas, sendo utilizada para detectar, quantificar, realizar análises estruturais e purificar substância em pouco tempo, derivadas de materiais orgânicos, inorgânicos ou biológico<sup>115,116</sup>. A CLAE apresenta diferentes parâmetros que necessitam ser adequados às condições em que será feita a análise, para que se obtenha as separações definidas<sup>117</sup>. Esta técnica apresentam grandes vantagens quando comparadas à cromatografia em coluna aberta e cromatografia de camada delgada, tais como: a possibilidade de aplicação em grande variedade de amostras; alta precisão e resolução dos resultados obtidos; boa reprodutibilidade, tempo de análise reduzido; alta sensibilidade, por acoplagem de detectores cada vez mais sofisticados<sup>118</sup>. Os componentes de um cromatógrafo de fase líquida consistem em um reservatório de Solvente, bomba, injetor de amostras, colunas, detector, dispositivos de coleta de dados ou integrador<sup>119,120</sup> (Figura 11).



**Figura 11.** Esquema de um cromatógrafo a líquido contendo: reservatório da FM; bomba; injetor; coluna cromatográfica; detector e o sistema para coletar os dados composto de um detector integrado a um software. **Fonte:** Collins, 2006.

A fase móvel deve apresentar alto grau de pureza e estar livre de oxigênio ou outros gases dissolvidos, sendo necessário a filtração e degaseificação da fase antes de sua utilização, pois a presença de bolhas e impurezas podem interferir na detecção do analito por ultravioleta (UV) e levar a problemas no sistema bombeamento<sup>113</sup>.

A fase móvel deve ser compatível com o detector utilizado, apresentando polaridade adequada para permitir uma separação convenientes componentes da amostra, geralmente é uma mistura de um ou mais solventes orgânicos com água<sup>121</sup>. Como fase estacionária utiliza-se sólidos ou semirígidos, cujas partículas porosas esféricas ou irregulares apresentam diferentes diâmetros e suportam pressão até 350 bar. Dependendo do substrato utilizado, isto é, da fase estacionária utilizada, o CLAE é dividido nos seguintes tipos: CLAE de fase normal, CLAE de fase reversa, CLAE de exclusão de tamanho e CLAE de troca iônica<sup>122</sup>.

A coluna cromatográfica é feita de um material inerte (aço inoxidável), que resiste a todas as pressões em que ela pode ser utilizada. A capacidade da coluna é determinada pelo comprimento, diâmetro e pelo material de recheio. Quanto aos detectores, não existe um que

apresente todas as propriedades para que ele seja ideal para CLAE. Não são versáteis, ou universais, mas existem detectores que apresentam ampla faixa de aplicações. Os detectores mais usadas na CLAE são os fotométricos, baseados na absorvância no ultravioleta e no visível<sup>104</sup>.

A fase estacionária mais utilizada no CLAE para separação de compostos orgânicos são tipo fase reversa (FR)<sup>123</sup>. Os Sistemas de CLAE-FR consistem de uma fase estacionária de menor polaridade e uma fase móvel de maior polaridade, enquanto a fase normal tem as polaridades invertidas. Estas fases apresentam algumas vantagens, tais como: uso de fases móveis menos tóxicas e de menor custo, como metanol e água; fases estacionárias estáveis de muitos tipos diferentes; rápido equilíbrio da coluna após a mudança da fase móvel; facilidade de empregar eluição por gradiente; maior rapidez em análises e boa reprodutibilidade dos tempos de retenção. Além disso, são muito aplicadas à separação de solutos de diferentes polaridades, massas molares e funcionalidades químicas<sup>116</sup>.

## 2.8 Teste de citogenotoxicidade

O uso de plantas medicinais com finalidade terapêutica pode ser muito eficiente, contudo alguns compostos presentes em determinadas espécies podem causar efeitos deletérios, provocando sintomas de intoxicação por uso dessas substâncias. Portanto faz necessário investigar através de testes biológicos<sup>20</sup>, se os extratos vegetais possuem caráter citogenotóxico, ou seja, capacidade de alterar o ciclo celular humano ou danificar seu material genético<sup>124; 125</sup>. Existem vários indicadores biológicos de citogenotoxicidade de extratos de plantas medicinais utilizados em laboratório, dentre eles podemos citar o uso de animais e espécies vegetais, como o Sistema *Allium cepa* e o Sistema de micronúcleo em sangue periférico de camundongos, considerado de grande eficácia pela comunidade científica<sup>126</sup>.

### 2.8.1 Teste de *Allium Cepa*

A espécie *A. cepa* (cebola) é um bioindicador conhecido utilizado em ensaios de monitoramento ambiental, bem como substâncias gerais e resíduas. O sistema *Allium cepa* é um dos métodos mais eficaz na identificação de características citogenotóxicas de extratos de plantas medicinais, possibilitando identificar aberrações cromossômicas, formação de micronúcleo e qualquer alteração no processo de divisão celular<sup>127</sup>. Estudos com uso do sistema *Allium cepa* apresentam grandes vantagens pelo seu baixo custo, confiabilidade,

apresenta boa cinética de proliferação, rápido crescimento das raízes, grande número de células em divisão, apresenta grandes cromossomos em número reduzido ( $2n=16$ ), disponibilidade durante o ano todo, exclui a necessidade de uso e sacrifício de animais, equivalência entre os conceituados testes de citogenotoxicidade e pela grande semelhança do processo de divisão celular de suas raízes com o processo de divisão celular humano<sup>126; 127</sup>.

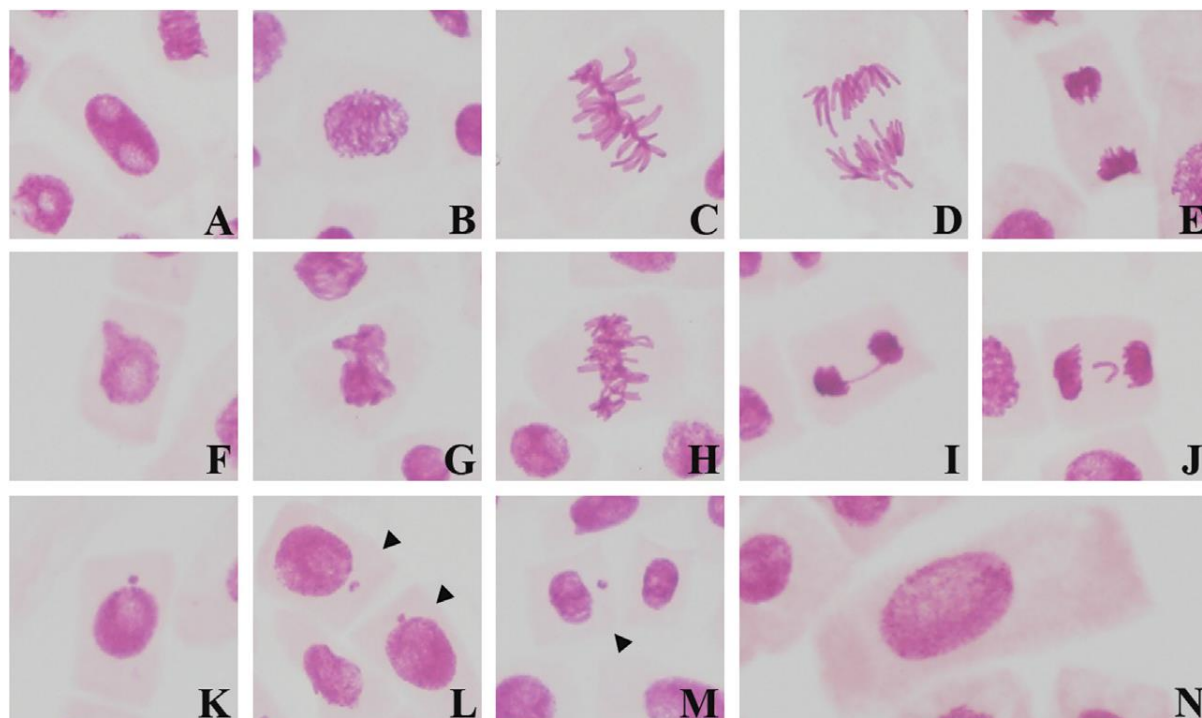
A espécie *A. cepa* constitui um dos mais antigos sistemas para análise de aberrações cromossômicas, foi introduzida em 1938, por Levan, com a demonstração da ocorrência de distúrbios no fuso mitótico de células de ponta de raiz de cebola, pela ação da colchicina. Com algumas propostas de novas modificações ao teste, tornou-se ainda mais eficiente a análise de misturas complexas. O método de avaliação de alterações celulares é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (International Program on Chemical Safety - IPCS), Programa Ambiental das Nações Unidas (United Nations Environment Program - UNEP), Organização Internacional do Trabalho e Organização Mundial da Saúde (OMS), como eficiente instrumento para análise e monitoramento in situ da genotoxicidade de substâncias químicas<sup>56</sup>. Apesar das diferenças metabólicas entre plantas e animais, existe um grande número de semelhanças, indicando que o *Allium cepa* pode ser usado para estudar processos que também ocorrem em mamíferos. A indução de dano direto ou indireto ao DNA de agentes genotóxicos é inferida com base na produção de aberrações cromossômicas<sup>128</sup>.

Verifica-se que este sistema de teste permite a avaliação simultânea de efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de um determinado composto, amostras ambientais, produtos naturais, agentes químicos, físicos ou biológicos que afeta o processos vitais como a duplicação e a transcrição gênica, bem como alterações cromossômicas, levando a processos cancerosos e morte celular<sup>129</sup>.

Os testes aplicados a toxicidade genética são utilizados, para avaliação do espectro toxicológico de substâncias e medicamentos. Entre os métodos empregados na detecção de alterações cromossômicas inclui-se a avaliação de aberrações cromossômicas, que possibilita a identificação de quase todas as alterações na estrutura do cromossomo, encontradas nas diferentes fases da divisão celular (prófase, metáfase, anáfase e telófase).

A quantificação de aberrações cromossômicas (Figura 12) é realizada pela medida direta das lesões, o que oferece uma avaliação precisa da atividade clastogênica e/ou aneugênica. O tipo de aberração produzida depende do agente genotóxico, da fase do ciclo celular e do tempo de tratamento. Verifica-se que as aberrações cromossômicas, como fragmentos e perdas cromossômicas, podem resultar em células micronucleadas, uma vez que ambos os fragmentos e cromossomos inteiros não podem ser incorporados ao núcleo principal

durante o ciclo celular. Os micronúcleos são caracterizado como simples indicador de danos citológicos, o que torna a análise desse parâmetro mais eficiente para avaliação<sup>130</sup>.

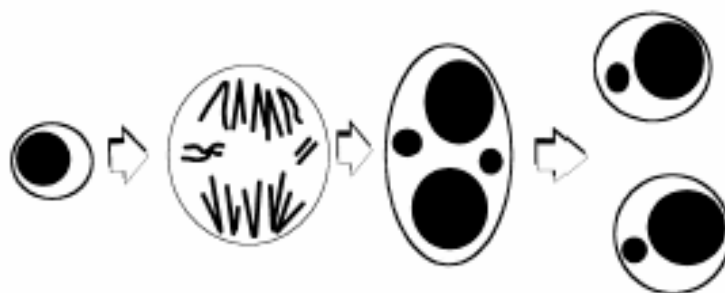


**Figura 12:** Aberrações cromossômicas observadas nas células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* em vários estágios da mitose: A. interfase normal; B. Prófase normal; C. metáfase normal; D. anáfase normal; E. telófase normal; F. interfase com um botão nuclear; G. metáfase com aderência cromossômica; H. metáfase poliploide; I. telófase com ponte cromossômica; J. telófase com perda cromossômica; K-M interfase com micronúcleo; N. poliploide interfase. **Fonte** Roberto, 2016

A maioria das aberrações observada nas células é letal, mas há muitas que são viáveis e podem causar danos genéticos em células somáticas ou germinativas<sup>129,131</sup>. Embora haja ampla utilização de ervas medicinais pela população, existem poucos estudos científicos na área de genotoxicidade e ação mutagênica, sendo que a segurança e a eficácia destes tratamentos podem estar comprometidas pela escassez de informações essenciais sobre as espécies vegetais<sup>132</sup>.

### 2.8.2 Teste de Micronúcleo

Os micronúcleos (MN) são alterações resultantes de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal da célula, localizados no citoplasma, durante a divisão celular (Figura 13). Desta forma, os micronúcleos são originados por perda de cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural (fragmento) ou de dano cromossômico numérico, por falhas manifestações no processo mitótico. Estas estruturas são formadas durante a divisão celular mitótica ou meiótica, quando o envoltório nuclear é reconstituído ao redor do conjunto cromossômico das células filhas<sup>133,134</sup>. Os micronúcleos foram primeiramente descritos por Howell em 1891 como inclusões citoplasmáticas em células vermelhas do sangue de gatos anêmicos. Por volta de 1901, Jolly observou essas mesmas estruturas em seus estudos com eritrócitos de embriões de ratos<sup>135</sup>.



**Figura 13.** Formação de micronúcleo em células eucariontes. **Fonte:** Fenech et al. (1999)

O teste do micronúcleo é uma ferramenta importante que evoluiu rapidamente no campo da genética toxicológica. As análises de micronúcleos são comumente realizadas a partir da análise em eritrócitos policromático de medulas ósseas e retículos de sangue periférico. Entre as principais análises, verifica-se que a utilização do teste de micronúcleo em sangue periférico apontadas por Macgregor,<sup>136</sup> obtém grande vantagem, pelo fato do mesmo animal pode fornecer várias amostras de material em vários período de tempo, sem a necessidade da eutanásia, pela simplicidade da preparação das amostras e a abundância e uniformidade.

O teste se caracteriza como um método simples para avaliação de vários tipos de danos citogenéticos, tendo aplicação em diversas áreas biológicas e da saúde, na identificação do potencial genotóxico de novos produtos farmacêuticos, agroquímicos ou agentes físicos em geral<sup>137</sup>. Este teste apresenta vantagens pela simplicidade de análise dos resultados e pela

possibilidade de aplicação em qualquer população celular em proliferação. Além disso, o teste do micronúcleo possibilita uma detecção rápida de danos causados no material genético de organismos expostos a químicos ambientais, como quebras e perdas de cromossomos inteiros, que são facilmente visualizados nas células filhas como micronúcleos. Os MN variam em número e tamanho, dependendo do grau e do tipo de alteração cromossômica que os originam. O tamanho dos micronúcleos varia conforme o agente indutor, sendo que os derivados de cromossomos inteiros, são normalmente maiores do que aqueles derivados de fragmentos cromossômicos<sup>138</sup>.

O teste do micronúcleo é um método amplamente utilizado para avaliar a genotoxicidade de produtos químicos no organismo, que podem ser classificados e avaliados de acordo com seus efeitos mutagênicos, carcinogênicos ou teratogênicos, resultando em três tipos de processos: mutagênese, carcinogênese e teratogenicidade<sup>139</sup>. Os agentes mutagênicos podem ser detectados, citologicamente pela inibição do ciclo celular, interrupção em metáfases, indução de alterações cromossômicas numéricas e estruturais e de trocas entre cromátides irmãs entre outro<sup>26; 140</sup>.



# Capítulo 3

## METODOLOGIA EXPERIMENTAL

---

---

### 3.1 Materiais e Reagentes

A água destilada foi obtida a partir do destilador Quimis® 341 pilsen (Diadema - SP - Brasil). DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila), ABTS (ácido 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), reagente de Folin-Ciocalteu, ácido gálico, Trolox e Rutina foram adquiridos do Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Sulfato cérico ( $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) da Vetec Solventes: álcool metílico, álcool etílico, hexano, clorofórmio, acetato de etila de grau analítico absoluto foram obtidos do Laboratório Dinâmica (Teresina, Brasil). Detector Espectrofotométrico UV-Vis (Biospectro SP-220, EQUIPAR Ltda., Curitiba, Brasil), Liofilizador Terroni LS 3000D, Evaporador rotatório sob pressão reduzida Fisatom modelo 801.

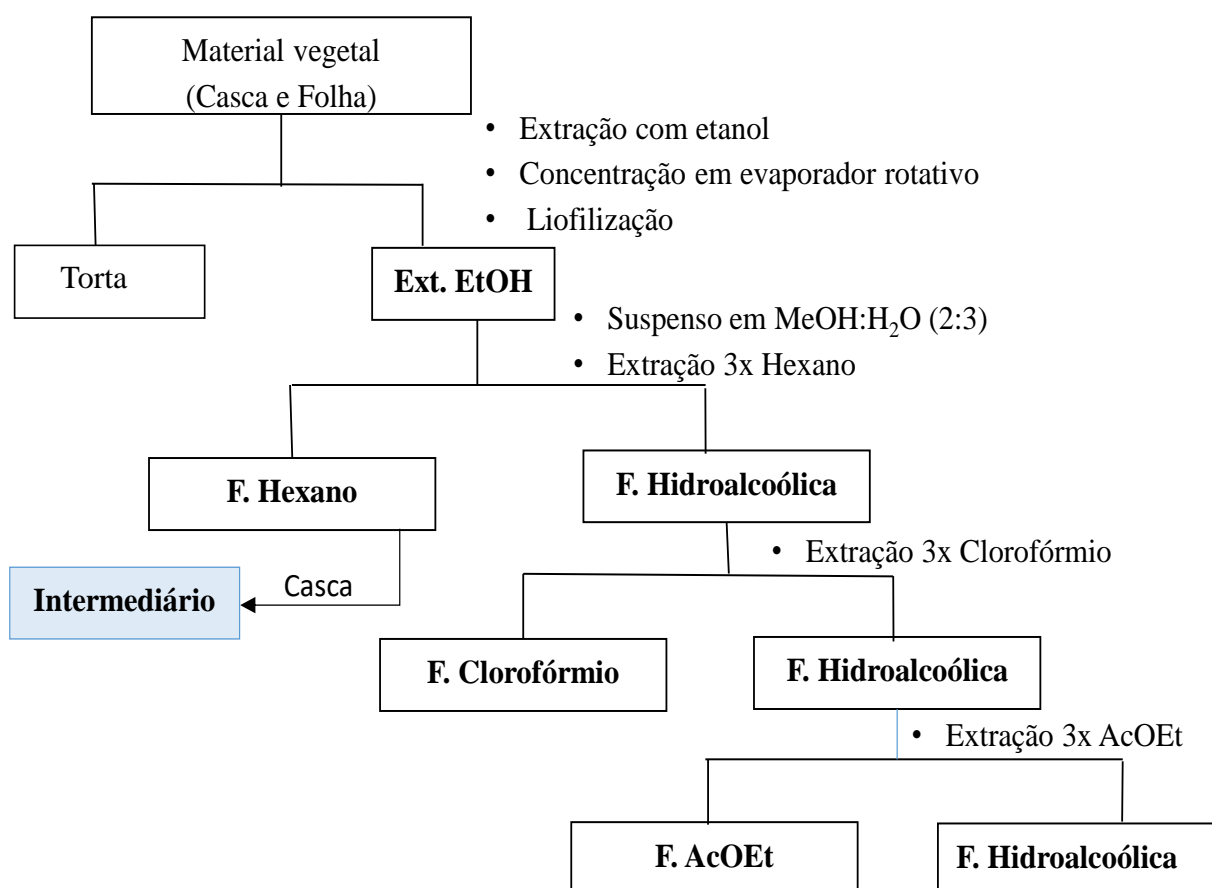
### 3.2 Materiais Vegetal

As cascas do caule e folhas de *C. leprosum* foram coletadas no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí (CCA/UFPI) em maio de 2016 em Teresina-PI (coordenadas - 5° 04'74.42 "S, 42° 77'83.52" W, 93 metros acima do nível do mar). Após a coleta do material vegetal, a exsicata foi identificada pelo Prof. Dr. Francisco Soares Santos Filho e depositada no Herbário Afrânio Gomes Fernandes (HAF) do Centro de Ciências da Natureza da Universidade Estadual do Piauí (UESPI), sob o número de registro HAF 03846.

### 3.3 Preparo dos extratos e frações

As cascas do caule e folhas de *C. leprosum* foram secas em temperatura ambiente, trituradas, obtendo-se 1,391g de pó de cascas de caule e 1,225g de pó de folhas, submetidos ao processo de extração empregando o método da maceração com etanol absoluto P.A. Foram realizadas seis extrações sucessivas a intervalos de 7 dias, sob temperatura ambiente (24 °C). Posteriormente, o material foi filtrado e concentrado em um evaporador rotatório sob pressão reduzida a 40 °C e a água residual removida em liofilizador, produzindo o extrato etanólico das cascas (222 g - 16 % de rendimento) e das folhas (182 g - 14,9 % de rendimento) de *C.*

*leprosum*. Os extratos etanólicos das cascas do caule (200 g) e folhas (160 g) foram suspensos separadamente em MeOH/H<sub>2</sub>O na proporção (2:3) e submetidos ao processo de partição com hexano (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>) (3 x 700 mL), clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>) (3 x 700 mL) e acetato de etila (EtOAc) (3 x 700 ml). Após a evaporação da fração hidrometanol (MeOH/H<sub>2</sub>O), foram obtidas quatro frações do extrato etanólico das folhas: hexano (3,1 g - 1,9%), clorofórmio (59 g - 37,2 %), acetato de etila (30,4 g, 19 %) e hidrometanol (53,3 g - 33,3 %) e cinco frações do extrato de etanólico da casca do caule: hexano (7,3 g - 3,7%), Intermediário (8,5 g - 4,2%), clorofórmio (2,3 g - 1,2 %), em acetato de etila (49,7 g - 25%) e hidrometanol (114,1 g; 57%) (Figura 14).



**Figura 14.** Preparação dos extratos e extração líquido-líquido dos extratos etanólico das cascas e folhas do *Combretum leprosum*..

### 3.4 Prospecção preliminar fitoquímica

A prospecção fitoquímica foi realizada inicialmente como método preliminar para verificar as classes dos compostos secundários presentes na espécie. Os experimentos foram realizados de acordo com a metodologia de Matos (1997)<sup>141</sup>, baseada nas reações qualitativas de precipitação e mudança de coloração.

### 3.5 Cromatografia de camada delgada (CCD)

Os extratos e frações das folhas e cascas de *C.leprosum* foram dissolvidos em metanol (10 mg mL<sup>-1</sup>). As amostras foram aplicadas com tubo capilar nas extremidades da placa, e em seguida depositada em uma cuba contendo os diferentes eluentes (hexano/AcOEt (8:2), clorofórmio/metanol (9:1) e clorofórmio/metanol/água (65:30:5).

### 3.6 Obtenção do perfil dos extratos e frações por CLAE

O perfil cromatográfico das frações acetato de etila da cascas e folhas foram feitos no Laboratório de Produtos Naturais – UFPI, em cromatógrafo líquido de alta eficiência da Shimadzu® equipado com bomba LC-20AT, injetor automático SIL-20AHT, detector de arranjo de fotodiodo SPD-M20A, forno para coluna CTO-20A, pré-coluna C18 Shim-pack 6-SIL, coluna C-18 Shim-pack VP-ODS de 250 mm x 4.6 mm e partícula de 5,0 µm. As amostras analisadas foram submetidas a um pré-tratamento (*clean up*) em cartucho de extração em fase sólida (SPE) Strata C18-E (1000 mg/6 mL) da Phenomenex. Todas as frações foram filtradas em membrana filtrante Phenomenex de 30 mm e poro de 0,45 µm. O desenvolvimento do método cromatográfico foi realizado usando a fração acetato de etila, iniciado com um gradiente exploratório de eluição para fornecer o *fingerprint* (impressão digital). A eluição foi realizada com MeOH e H<sub>2</sub>O/AcOH (0,2% v/v), em um modo de gradiente de eluição (5 → 100% em 45 min) e fluxo de 1,0 mL/min, injeção de 10 µL das amostras a concentração de 5,0 mg/mL e temperatura do forno da coluna de 40 °C. Os cromatogramas foram monitorados a 254 e 360 nm. A partir do gradiente exploratório inicial e obtenção dos perfis cromatográficos, foram feitas co-injeções com adição de 100 µL dos padrões (quercetina, rutina e *epi*-catequina) nas amostras das frações acetado de etila das cascas e folhas.

### 3.7 Identificação e quantificação de flavonoides nos extratos etanólicos das cascas e folhas do *Combretum leprosum*

#### 3.7.1 Identificação de rutina e *epi*-catequina

As soluções dos padrões rutina e *epi*-catequina, às soluções de extrato etanólico das folhas e cascas de *C. leprosum*, foi realizada no Laboratório de Geoquímica Orgânica –UFPI, as mostras foram submetidas a Cromatógrafo Líquido Ultra Rápido (Shimadzu Prominence), equipamento de injetor automático SIL-20A (Shimadzu), desgaseificador DGU-20A3 (Shimadzu), bomba binária LC-20AD (Shimadzu) e forno CTO-20A e detector UV PDA SPDM-20A (Shimadzu); A coluna utilizada nas análises da rutina e do extrato etanólico das folhas foi C<sub>18</sub> Shim-pack XR-ODS (30 mm x 2 mm), tamanho de partícula de empacotamento de 2,2 µm e a fase móvel utilizada foi uma mistura de metanol: água acidificada (0,1% de HCOOH) a uma taxa de fluxo de 0,2 mL min<sup>-1</sup>, com o gradiente crescente de metanol: 5% de metanol de 0 a 2 min; aumentando para 19% de metanol em 4 min e mantidos até 30 min de análise cromatográfica e 100% de metanol de 30 a 35 min mantidos por 10 min, correspondendo a um total de 45 min de análise. O forno operando a 40 °C, o comprimento de onda de detecção foi selecionado em 352 nm e o volume de injeção foi de 5,0 µL.

O padrão *epi*-catequina e as soluções do EECCl, foram analisadas no mesmo equipamento UFLC (Shimadzu Prominence), com a coluna C<sub>18</sub> Phenomenex GEMINI-NX (150 mm x 4,60 mm), tamanho da partícula de 5 µm, a fase móvel utilizada foi uma mistura de metanol: água acidificada (0,1% de HCOOH) a uma taxa de fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>. O método de análise ocorreu no modo isocrático: 15% de metanol de 0 a 40 min; aumentando para 100% de metanol em 45 min mantidos 15 min, correspondendo a um total de 60 min de análise. O forno estava operando a 30 °C, o comprimento de onda de detecção foi selecionado em 278 nm e o volume de injeção foi de 2,0 µL.

O padrão rutina e as soluções dos EECCl e EEFCl, foram previamente submetidos à *clean-up*, utilizando o cartucho para extração em fase sólida C18ec (Chromabond<sup>®</sup>). O processo de *clean-up* da rutina, EEFCl e EECCl, consistiu na ambientação do cartucho com 15 mL de MeOH, 15 mL de H<sub>2</sub>O destilada e 15 mL do eluente MeOH/H<sub>2</sub>O (8:2, v/v), cerca de 30 mg do extrato, foi solubilizado em 1 mL de MeOH, seguida de eluição com 15 mL da mistura MeOH/H<sub>2</sub>O (8:2, v/v). Foram concentradas em evaporador rotativo e armazenadas em dessecador para posterior pesagem.

A identificação da *epi*-catequina e rutina análise nas soluções dos EECCI e EEFCI, respectivamente, foi realizada na concentração de 10 mg mL<sup>-1</sup>. Os padrões rutina e *epi*-catequina na concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup>, foram analisados e posteriormente foi realizado a co-injeção da rutina com o EEFCI e co-injeção da *epi*-catequina com o EECCI. Ambas as soluções foram previamente filtradas em filtro de PTFE de 0,20 µm.

### 3.7.2 Construção da curva analítica do padrão rutina e do padrão *epi*-catequina

Para a quantificação de rutina e de *epi*-catequina nos extratos, foram construídas curvas analíticas dos padrões. A curva analítica da rutina foi feita pelo método de adição de padrão. A curva analítica foi construída a partir de um gráfico que correlaciona à área do sinal *versus* ao volume adicionado de padrão de rutina. Foram preparadas três soluções estoques de rutina (1 mg mL<sup>-1</sup>) e com auxílio de micropipetas (TERMO SCIENTIFIC; faixa de volume 20-200 µL e 100-1000 µL) foram transferidos quantitativamente os volumes de 0, 40, 60, 80, 100, 120 e 140 µL à *vials* que continham 500 µL de extrato etanólico das folhas de *C. leprosum* (10 mg mL<sup>-1</sup>) previamente solubilizados com MeOH grau HPLC. Toda a metodologia foi realizada em triplicata, dessa forma, foram obtidos a equação da reta e o coeficiente de correlação linear (r) pelo método matemáticos mínimos quadrados. A concentração de rutina foi determinada a partir da extrapolação da curva e a quantidade foi expressa em g/ grama de EEFCI.

Para a quantificação de *epi*-catequina também foi construída uma curva analítica a partir de um gráfico que correlaciona à área do sinal *versus* a concentração de padrão de *epi*-catequina. Foi preparada uma solução estoque de *epi*-catequina na concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup>, com auxílio de micropipeta (TERMO SCIENTIFIC; faixa de volume: 100-1000 µL), esta foi diluída com MeOH grau HPLC em *vials*, para obter as concentrações de 100, 200, 300, 400, 500, 600 e 700 ppm. Após a construção da curva, foi injetada em triplicata uma solução do EECCI na concentração de 10 mg mL<sup>-1</sup>. Toda a metodologia foi realizada em triplicata. A partir disso, foram obtidos a equação da reta e o coeficiente de correlação linear (r), pelo método matemáticos mínimos quadrados. A concentração de *epi*-catequina no extrato foi expressa em g/ grama de EECCI.

## 3.8 Determinação de fenólicos e flavonoides totais

### 3.8.1 Determinação de fenólicos totais

O teor de fenólicos totais (TF) foi determinada utilizando o método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleto e Rossi (1965) com algumas modificações<sup>27,142</sup>. Para a reação, adicionou-se 2 mL de água destilada com 250 µL de reagente Folin-Ciocalteu e 250 µL de extrato/fração (240 µg/mL). Após o período de encubamento da mistura sob proteção de luz por 5-8 min, adicionou-se 100 µL de solução de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) a 10%. A mistura foi incubada durante uma hora à temperatura ambiente (24 °C) sob proteção de luz. Posteriormente a absorvância da amostra foi medida a 760 nm em um detector espectrofotométrico UV-Vis (Biospectro SP-220, EQUIPAR Ltda., Curitiba, Brasil). Para a determinação do teor de fenólicos totais das amostras, foi construída uma curva de calibração do padrão de ácido gálico (10-160 µg/mL). A absorvância da amostra foi aplicada na equação da reta do padrão ( $0,004631x - 0,02465$ , com coeficiente de correlação de  $r^2 = 0,9994$ ) para estimar a concentração dos fenólicos totais expresso como mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de peso seco de extrato. A estimativa dos fenólicos totais foi realizada em triplicata.

### 3.8.2 Determinação de flavonoides totais

O teor de flavonoides totais foi determinado de acordo com a metodologia de Nunes, com pequenas modificações<sup>143</sup>. Usando tubos de vidro tarado, foram misturados 1000 µL de cada amostra (500 µg/mL, diluído em etanol) com um volume igual de cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>) a 2% (diluído em etanol). Após o período de uma hora sob proteção de luz à temperatura ambiente (24°C), a absorvância foi medida a 420 nm no mesmo detector espectrofotométrico. Para a determinação dos flavonoides totais das amostras foi construída uma curva de calibração ( $Y = 0,0053x + 0,0043$ ;  $r^2 = 0,9999$ ) com o padrão de rutina (10-160 µg/mL) para estimar o resultado em mg de equivalente de rutina (ER) por g de peso seco. As amostras foram analisadas em triplicata.

### 3.9 Ensaios Antioxidantes (*in vitro*)

#### 3.9.1 Método de DPPH

Na avaliação da atividade antioxidante foi utilizado a metodologia de Santos com algumas modificações<sup>144</sup>. O método consistiu no monitoramento do consumo do radical livre DPPH<sup>•</sup> dos extratos e frações (intervalo de concentração 5-2000 µg/mL), através da medida do decréscimo da absorbância. Em um tubo de ensaio com 2 mL da solução do DPPH (40 µg/mL diluído em EtOH), adicionou-se 200 µL da amostra na concentração de 2000 µg/mL e deixou reagir à temperatura ambiente por 30 minutos sob proteção de luz. O experimento foi realizado com as amostras nas demais concentrações utilizando o mesmo procedimento. Após o período de encubamento, os valores das absorbâncias foram medidos a 516 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem total de atividade antioxidante (AA%) e pelo parâmetro do IC<sub>50</sub> (quantidade de antioxidante necessária para reduzir a 50% a concentração inicial de DPPH). O ensaio foi realizado em triplicata e como controle positivo foi utilizado o ácido gálico. O cálculo da inibição do radical foi feito conforme a Equação 1. Após o cálculo da inibição total do radical DPPH, foi construída uma curva de calibração com a porcentagem de inibição de cada concentração versus a concentração dos extratos utilizados para obter o IC<sub>50</sub>.

$$\%AA = \frac{[Abs_{DPPH} - (Abs_{amostra} - Abs_{branco})]}{Abs_{DPPH}} \times 100 \quad (\text{eq. 1})$$

A porcentagem de inibição obtida para as amostras de extrato e frações foram expressas como valores de concentração inibitória média (IC<sub>50</sub>), mg/mL (a concentração da amostra necessária para reduzir a concentração inicial de DPPH em 50%).

#### 3.9.2 Método de ABTS

A atividade antioxidante foi também avaliada através da atividade redutora frente ao radical ABTS<sup>•+</sup>, a partir da metodologia descrita por Boroski<sup>145</sup>. O método consistiu no monitoramento do consumo do radical livre ABTS<sup>•+</sup> dos extratos e frações (intervalo de concentração 5-2000 µg/mL), através da medida do decréscimo da absorbância. O radical ABTS<sup>•+</sup> foi obtido pela reação de ABTS (7 mM) com persulfato de potássio (2,45 mM) e mantida em temperatura ambiente na ausência de luz por 16 horas. O radical formado foi

diluído com etanol até obter a absorvância 734 nm. Em 2 mL do radical ABTS<sup>•+</sup>, previamente diluído, adicionou-se 20 µL da amostra. Após 20 min de reação na ausência de luz, efetuou-se a leitura da absorvância (734 nm) no do espectrofotômetro. O potencial antioxidante de cada amostra foi determinado por meio da curva de calibração do antioxidante sintético de referência, trolox. Os resultados obtidos (em triplicata) foram expressos como capacidade antioxidante dos extratos equivalente ao Trolox (mg de CAET). A percentagem de inibição obtida para as amostras de extrato e frações foram expressas como valores de concentração inibitória media (IC<sub>50</sub>), mg/mL (a concentração da amostra necessária para reduzir a concentração inicial de ABTS em 50%).

### 3.10 Atividade Citogenotóxica

#### 3.10.1 Teste de *Allium cepa*

Os testes de citotoxicidade e genotoxicidade realizados com *A. cepa* foram baseados no protocolo estabelecido por Leme com pequenas adaptações<sup>25</sup>. As sementes de *A. cepa* (cultivar: Vale-Ouro IPA-11) foram adquiridas e colocadas para germinar em placas de Petri contendo água destilada, à 25 °C até atingir aproximadamente cerca de 2 cm de comprimento. Em seguida, estas raízes foram separadas e expostas em placas de Petri para cada controle (positivo e negativo) e para concentração (100, 250, 500, 1,000 e 2000 µg/mL) dos extratos da casca e da folha durante um período de 24 h. O controle positivo<sup>101</sup> foi feito com metilmetanosulfonato (MMS), na concentração de 10 mg de L<sup>-1</sup> e o controle negativo (NC) com água destilada.

Após o período de exposição, as raízes foram coletadas, fixadas com etanol / ácido acético (3: 1) e mantidas sob refrigeração. Para o preparo das lâminas, as raízes foram lavadas por 3 banhos, de 5 minutos cada, em água destilada. A hidrólise das raízes foi feita em frascos contendo HCl a 1 M, aquecidos em Banho Maria, na temperatura de 60 °C por 10 minutos. Após a hidrólise, as raízes passaram novamente por três banhos de água destilada, transferida para frasco de vidro âmbar, contendo o reagente de Schiff, onde permanecerão por 2 horas em local escuro.

As raízes foram lavadas novamente e as regiões meristemáticas foram cortadas, cobertas com lamínulas e cuidadosamente esmagadas em uma gota de 2% de carmim acético. Esperou-se a secagem do meio e fez a leitura das lâminas com o microscópio de luz. A citogenotoxicidade foi avaliada pela contagem, em microscópio de luz (aumento de 400 x), de 5.000 células meristemáticas (500 células/por lâmina de um total de 10 lâminas analisadas)



para cada tratamento e para os controles (negativo e positivo). Foram avaliadas: índice mitótico (citotoxicidade); índice de alterações cromossômicas (genotoxicidade) e o índice de mutagenicidade (micronúcleos).

### 3.10.1 Teste de Micronúcleo em sangue periférico

Os animais utilizados foram camundongos machos Swiss (*M. musculus*) com aproximadamente 12 semanas de vida, pesando aproximadamente entre 25-35 g de peso corpóreo<sup>101</sup>, provenientes do Biotério da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual do Piauí/UESPI. Os animais foram mantidos em temperatura ambiente controlada ( $23 \pm 2$  °C) com ciclo claro-escuro de 12 horas, e em caixas de polipropileno adequadas à sua manutenção, água e comida oferecidas *ad libitum*. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UESPI) sob o protocolo 5117/2017. Os camundongos foram tratados *in vivo* uma única vez, caracterizando um tratamento agudo.

Os experimentos foram realizados em 8 grupos (cinco animais por grupo). Os grupos de animais foram divididos da seguinte forma: Grupo 1 (controle negativo) – foi administrado aos animais água destilada; Grupo 2 (controle positivo) - foi utilizada a ciclofosfamida (Fosfaseron®) 50 mg/kg ; Grupos 3, 4 e 5 (tratamentos) – receberam respectivamente as concentrações do extrato etanólico das casca de *C. leprosum* nas doses de 250, 500 e 750 mg/mL; Grupos 6, 7 e 8 (tratamentos) – receberam respectivamente as concentrações do extrato etanólico das folhas de *C. leprosum* nas doses de 250, 500 e 750 mg/mL. A administração de água destilada e dos extratos etanólicos (cascas e folhas) aos camundongos foi agudamente por via oral - gavagem (0,1 mL da solução/10 g pc), enquanto a ciclofosfamida (50 mg/kg pc) foi via intraperitoneal. Para analisar a frequência de micronúcleos (MN), foram coletadas cerca de 10 microlitros do sangue periférico para preparo das lâminas dos grupos após 24, 48 e 72 horas do tratamento com os controles (positivo e negativo), EECCI e EEFCI.

O sangue coletado foi colocado em uma das extremidades de uma lâmina de vidro e, com auxílio de outra lâmina encostada foi espalhado uniformemente (esfregaço). As lâminas foram deixadas à temperatura ambiente por 24 horas, fixadas em metanol absoluto por 5 minutos, coradas com Giemsa durante 15 minutos e lavadas com água corrente e secas naturalmente. Um total de 2000 eritrócitos normocromáticos (ENC), foram analisados (1000/lâmina) para o registro da frequência de eritrócitos micronucleados. Todas as análises

foram feitas em microscópio óptico de luz comum na objetiva 1000 sob óleo de imersão. As lâminas foram fotografadas e observadas para posterior análise.

### 3.11 Análise Estatística

Todas as análises estatísticas dos testes antioxidantes foram realizadas em triplicata e expressos em média  $\pm$  desvio padrão, como valores de  $IC_{50}$ , utilizando Graph Pad Prism 5.0 (Graph Pad Prism Software Inc., San Diego, CA, EUA). A construção das curvas analíticas e o tratamento dos dados de quantificação foram feitas usando os *softwares* *LC Solutions* e *Microcal Origin 8.0*. Nos ensaios de *Allium cepa* e Micronúcleo em camudongo, as avaliações estatísticas foram expresso em média e os dados foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste “a posteriori” de Student – Newman – Keuls ( $p < 0,05$ ). Todas as análises foram realizadas com auxílio do software BioEstat 5.3.

# Capítulo 4

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Perfil químico dos extratos e frações das cascas e folhas de *C. leprosum*.

#### 4.1.1 Prospecção preliminar fitoquímica

A investigação das classes dos compostos de *C. leprosum* pela triagem fitoquímica preliminar dos extratos etanólicos (folhas e cascas) foram realizadas com base na mudança de coloração em tubo de ensaio<sup>141</sup>. Os resultados (Tabela 3) revelaram a presença de metabólitos secundários, como flavonoides, esteroides, taninos, saponinas e triterpenos. Não foram identificados a classe de alcalóides em ambos os extratos. Estes compostos fitoquímicos encontrado podem ser responsáveis pelo vasto valor medicinal do *C. leprosum*<sup>146</sup>.

**Tabela 3.** Resultados da triagem fitoquímica em extratos etanólico da folhas e cascas.

Classes	<i>C. leprosum</i> casca	<i>C. leprosum</i> folha
Flavonoides	+	+
Esteroides	+	+
Taninos	+	+
Saponinas	+	+
Triterpenos	+	+
Alcaloides	-	-

(+) Presente; (-) Ausente.

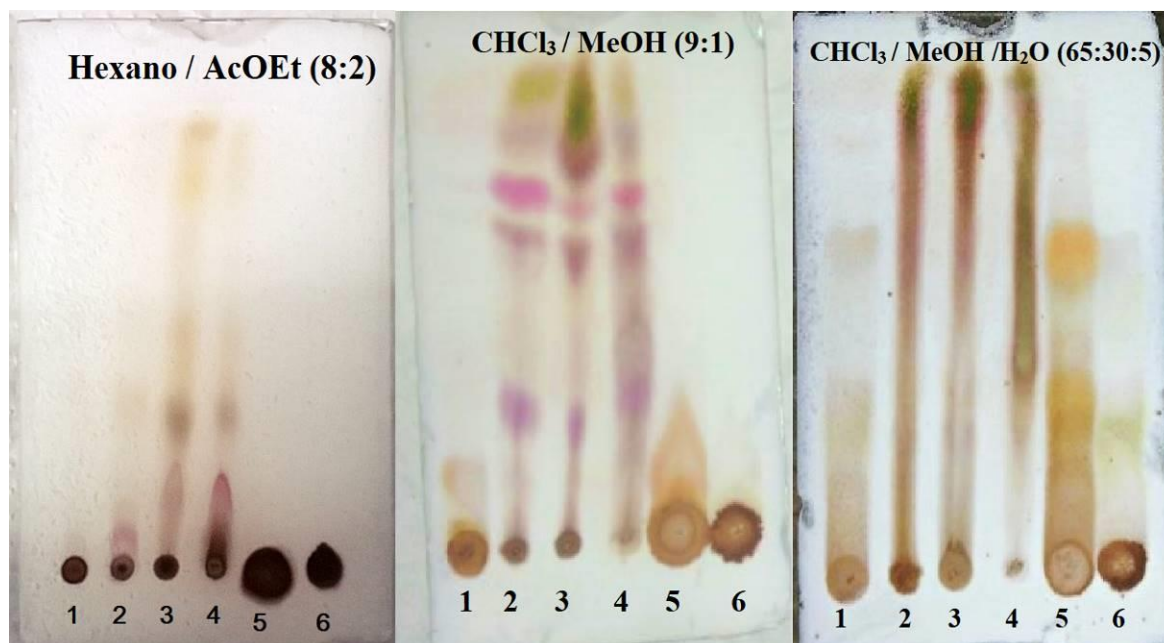
Estudos comparativos com a espécie *C. racemosum*, revelou que o extrato das folhas desta espécie apresentou alcalóides, esteróides, saponinas e taninos<sup>147</sup>. No extrato das folhas da espécie *C. Platypetalum* constatou-se a presença de alcaloides, terpenoides, saponinas, flavonoides e antraquinonas<sup>148</sup>. Testes fitoquímicos das casca e folhas do *C. roxburghii* mostrou a presença de flavonoides, taninos e saponinas<sup>149</sup>. Com isso, fica evidente que as espécies do gênero apresentaram algumas classes de compostos identificadas na espécie *C. leprosum*, com exceção dos alcaloides.

### 4.1.2 Cromatografia de camada delgada (CCD)

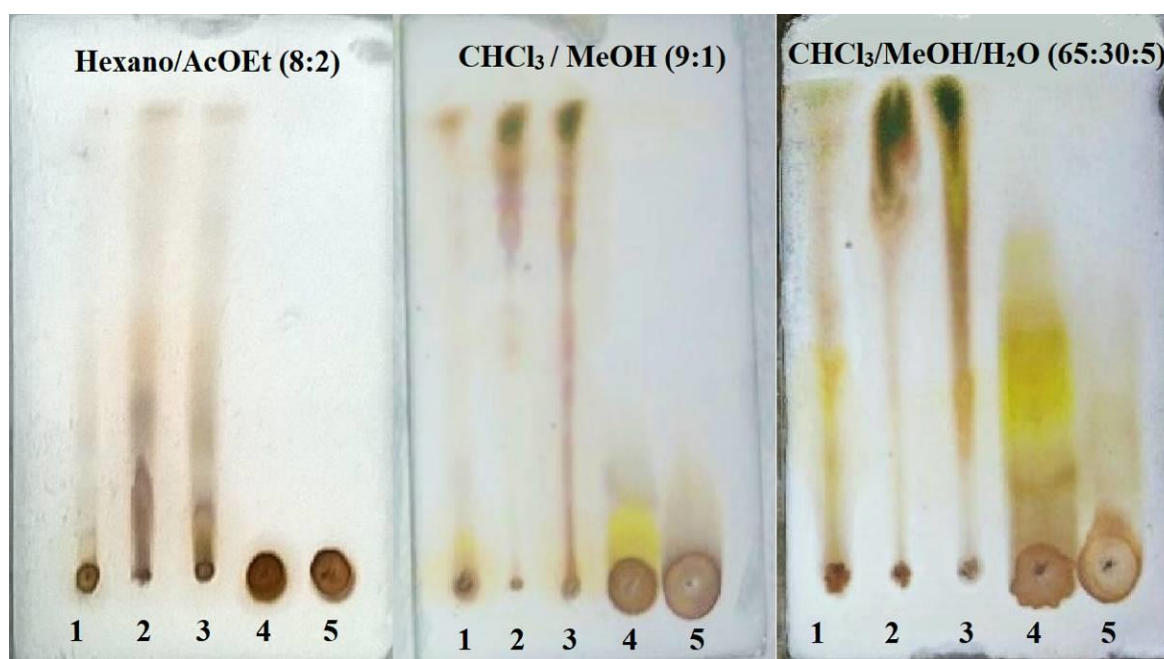
A triagem fitoquímica é um método realizado para permitir a localização e o isolamento direcionado de constituintes<sup>149</sup>. Este procedimento permite o reconhecimento de metabólitos conhecidos em extratos ou nas fases iniciais de separação e, portanto, o procedimento é necessário como ferramenta preliminar a triagem rápida CCD. Foram analisados todos os extratos e frações, verificando supostamente a presença de metabólicos secundário.

Nas amostras das cascas (Figura 15), no eluente Hexano/AcOEt (8:2), não foi possível detectar a presença de compostos, pois apresentaram manchas de baixa intensidade. No eluente  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (9:1), foi possível verificar supostamente a presença de triterpenos e esteroides com as cores característico de rosa e lilás nas frações intermediária (2), hexânica (3) e clorofórmica (4). Em ambas as placas, com o eluente  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (9:1) e  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (65:30:5) o extrato etanólico (1) e a fração acetato de etila (5) apresentaram manchas de grande intensidade de cor laranja, sugerindo o flavonoide catequina.

Nas amostras das folhas (Figura 16), quando eluída com os eluentes  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (9:1) e  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (65:30:5) é possível observar no extrato etanólico (1) e na fração de Acetato de etila. (4) a presença de manchas de cores amarela, indicativo de compostos da classe dos flavonoides. No sistema de solvente  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  os extratos etanólico e a fração acetato de etila de ambas as amostras (casca e folhas), apresentaram machas com maior intensidade, quando comparado com o eluente  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , (9:1) devido os constituintes químico mais abundantes possuírem maior polaridade.



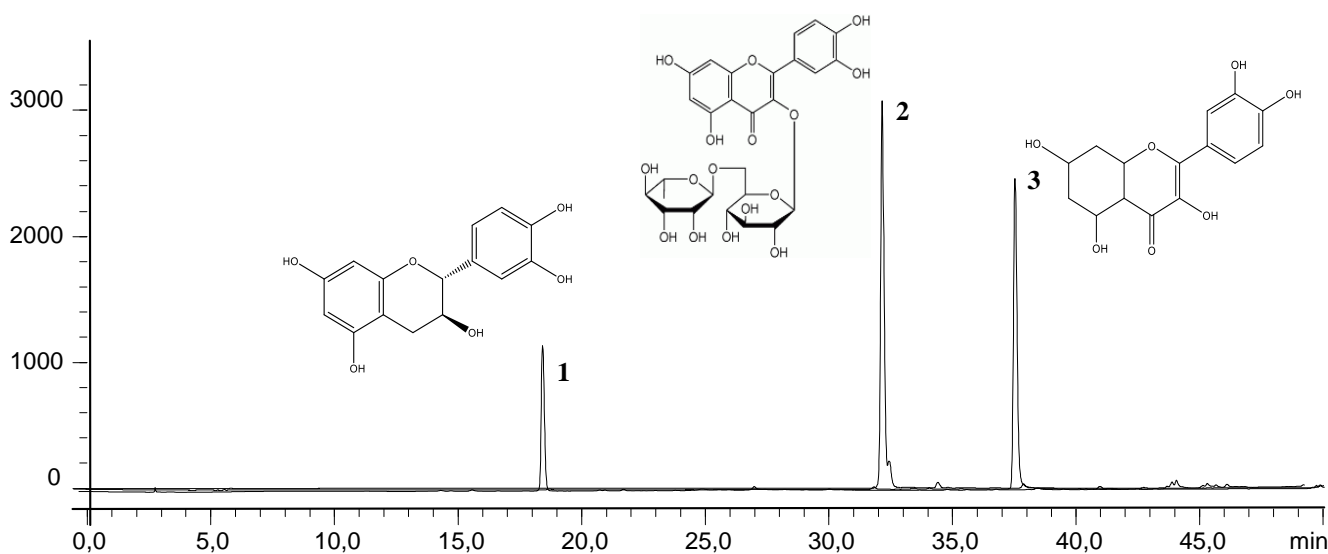
**Figura 15.** Placas dos extratos e frações das cascas de *C. leprosum* reveladas. 1: extrato etanólico; 2: fração intermediário; 3: fração hexânica; 4: fração clorofórmica; 5: fração Acetato de etila, 6: fração hidrometanólica. **Fonte: Autor**



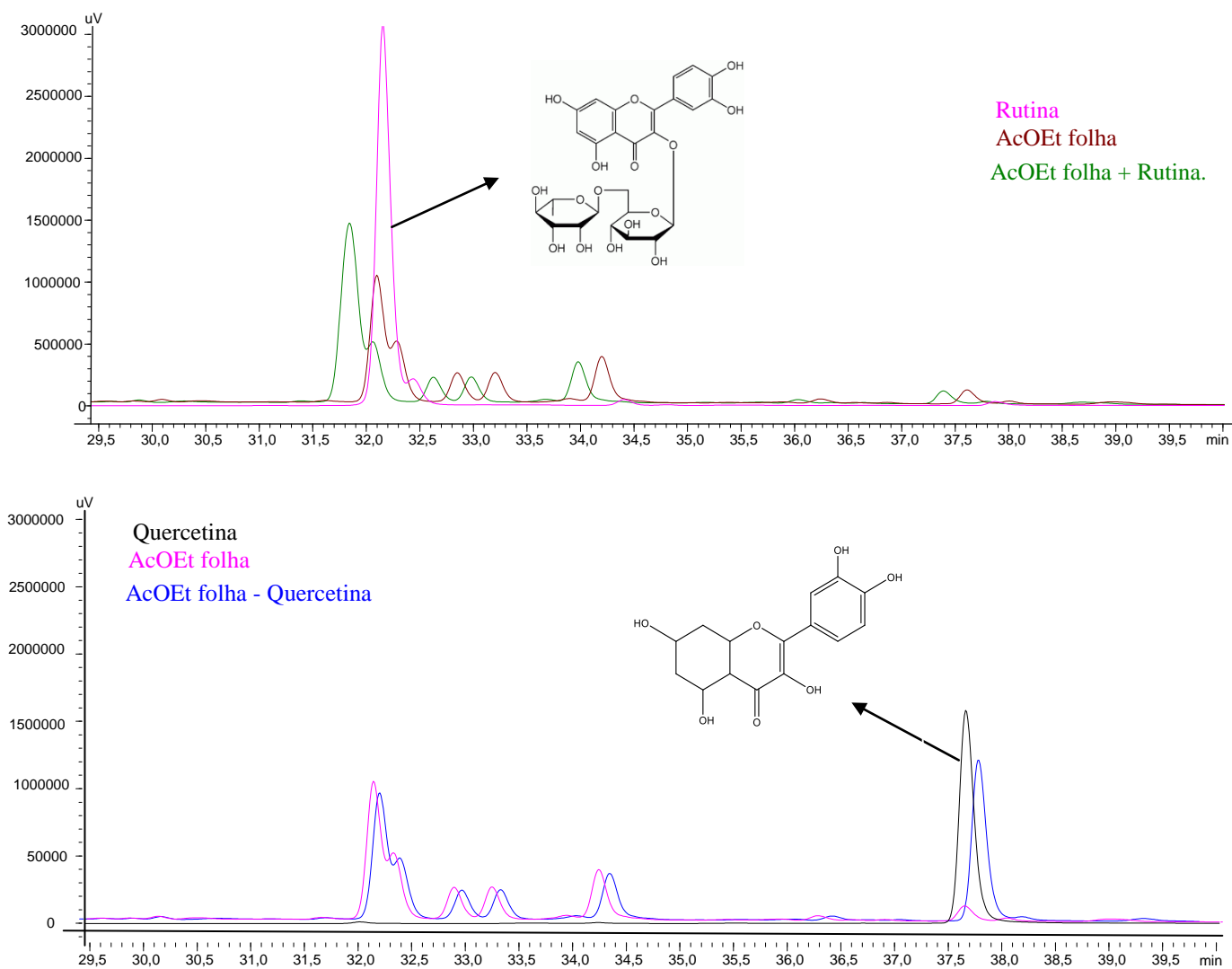
**Figura 16.** Placas dos extratos e frações das folhas de *C. leprosum* reveladas. 1: extrato etanólico; 2: fração hexânica; 3: fração clorofórmica; 4: fração acetato de etila; 5: fração hidrometanólica. **Fonte: Autor**

### 4.1.3 Perfil das frações AcOEt por cromatografia líquida de alta eficiência

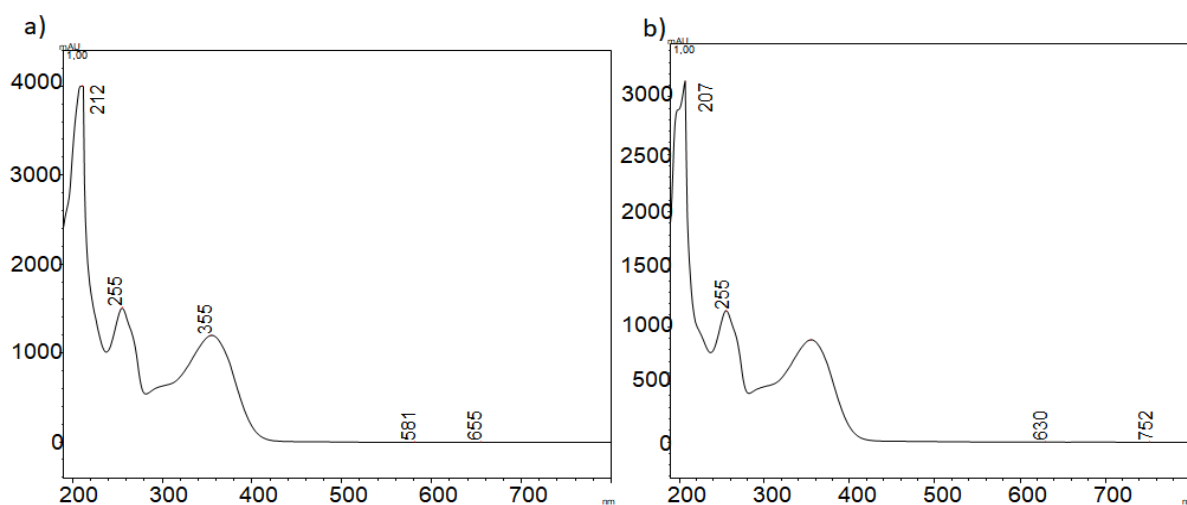
O método desenvolvido para a identificação por CLAE forneceu uma análise rápida dos extratos etanólicos e frações de acetato de etila das folhas e cascas do *C. leprosum*. A condição experimental utilizadas levou a uma boa separação dos picos que puderam ser identificados no cromatograma os flavonoides: rutina (Rt = 32,15), quercetina (Rt = 37,64) e *epi*-catequina (Rt = 18,2) (Figura 17). Estes compostos orgânicos foram identificados nas frações por comparação com o cromatograma dos padrões (rutina, quercetina e *epi*-catequina – Sigma), nas mesmas condições a partir dos valores do tempo de retenção, espectro de absorção Uv/Vis referentes aos picos. Os compostos quercetina e rutina, puderam ser detectados na fração acetato de etila das folhas a partir do pico referente ao composto observado no tempo de retenção 32,15 e 37,64 min respectivamente, quando comparadas com padrões. A co-injeção mostrou que os flavonoides rutina e quercetina, são os constituintes majoritários na fração acetato de etila da folha (Figura 18), Os espectros UV-Vis fornecidos pelo detector, indicaram os máximos de absorção de 255 e 355 nm para a rutina e 255 e 370 nm para quercetina (Figuras 19), sendo dois compostos majoritários. Nas análises realizadas com a fração acetato de etila das casca, foi possível obter os espectros na região do ultravioleta para o composto *epi*-catequina, com o tempo de retenção de 18,2 min (Figura 20), evidenciada pelas absorções entre 278 – 279 nm nos espectros na região do UV-Vis (Figura 21). Nos cromatogramas após enriquecimento com os padrões foi possível observar a intensificação dos picos majoritários e conseqüentemente o aumento na área destes.



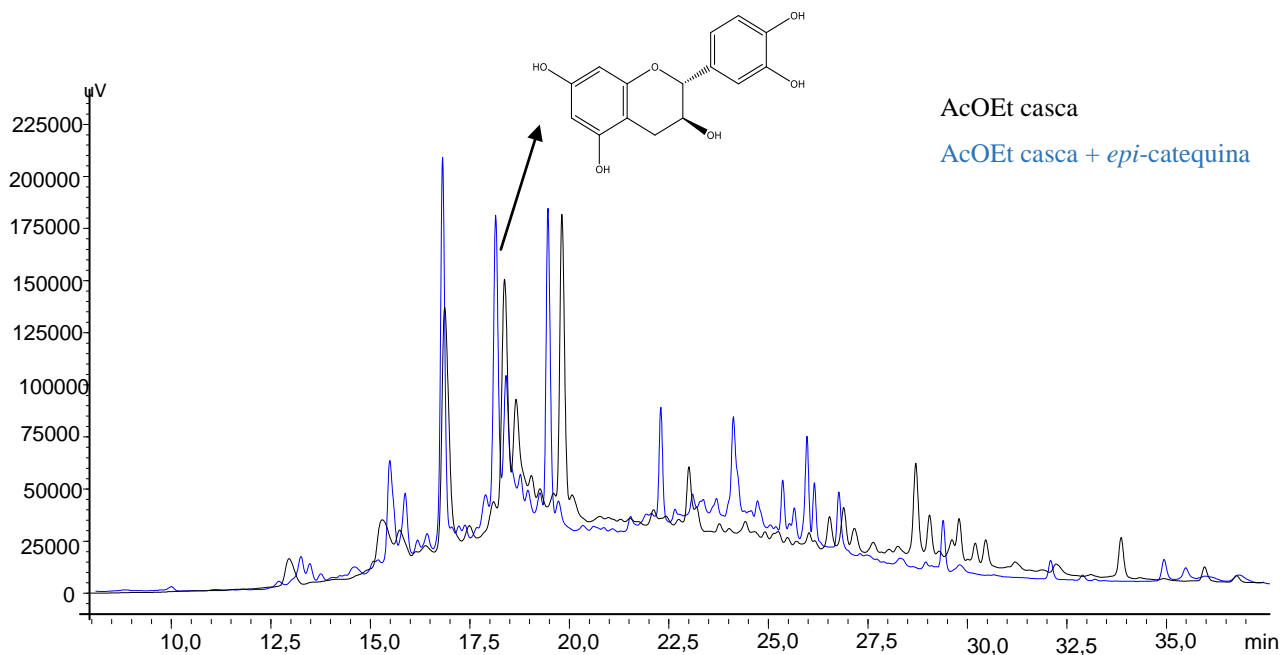
**Figura 17:** *Epi*-catequina (**1**- $t_R=18,41$ min), rutina (**2** - $t_R=32,15$ min) e quercetina (**3** -  $t_R=37,64$  min) e Fase Móvel: MeOH-H<sub>2</sub>O/AcOH (0,2%), vazão 1,0 mL min<sup>-1</sup>; gradiente,  $\lambda=254$  nm



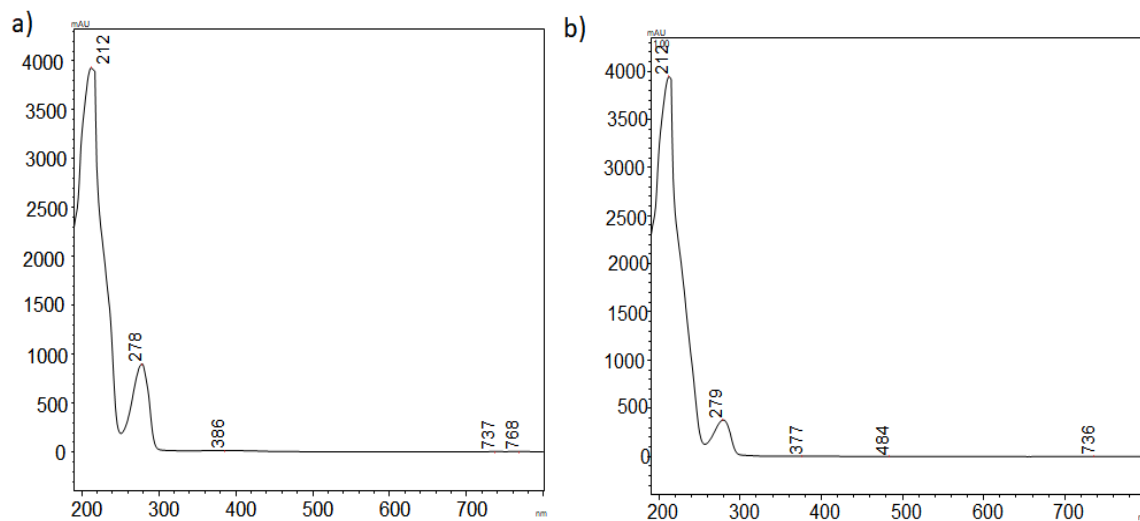
**Figura 18.** Cromatograma da fração acetato de etila das folhas de *C. leprosum*, co-injeção da fração com os padrões rutina ( $t_R=32,15$  min) e quercetina ( $t_R=37,64$  min); Fase Móvel: MeOH-H<sub>2</sub>O/AcOH (0,2%), vazão 1,0 mL min<sup>-1</sup>; gradiente,  $\lambda=254$  nm



**Figura 19.** Espectros de absorção molecular no UV-Vis das bandas registradas no cromatograma da fração acetato de etila das folhas de *C. leprosum* referente a rutina e quercetina



**Figura 20.** Cromatograma da fração acetato de etila das casca de *C. leprosum*, co-injeção da fração acetato de etila das casca com *epi*-catequina ( $t_R=18,41\text{min}$ ); Fase Móvel: MeOH-H<sub>2</sub>O/AcOH (0,2%), vazão 1,0 mL min<sup>-1</sup>; gradiente,  $\lambda=254\text{ nm}$



**Figura 21.** Espectros de absorção molecular no UV-Vis da *epi*-catequina atribuída a bandas registradas no cromatograma da fração acêto de etila da casca de *C. leprosum*



## 4.2 Identificação e Quantificação de flavonoides rutina e *epi*-catequina nos extratos das folhas e cascas do *C. leprosum*

Os extratos etanólico das folhas e cascas das espécies *C. leprosum* foram submetidos a técnica UHPLC para identificação de flavonoides. A detecção de polifenólicos pode ser revelada em duas bandas de absorção UV características, com um máximo na faixa de 240 a 285 e 300 a 550 nm. As várias classes de flavonoides podem ser reconhecidas pelos seus espectros de UV, evidenciada pelas absorções entre 230-280 e 320-380 nm, observadas nos espectros na região do UV-Vis de flavonoides individuais incluindo os efeitos do número de grupos hidroxilas de aglicona, padrão de substituição glicosídica e natureza de grupos acila aromáticos<sup>150</sup>.

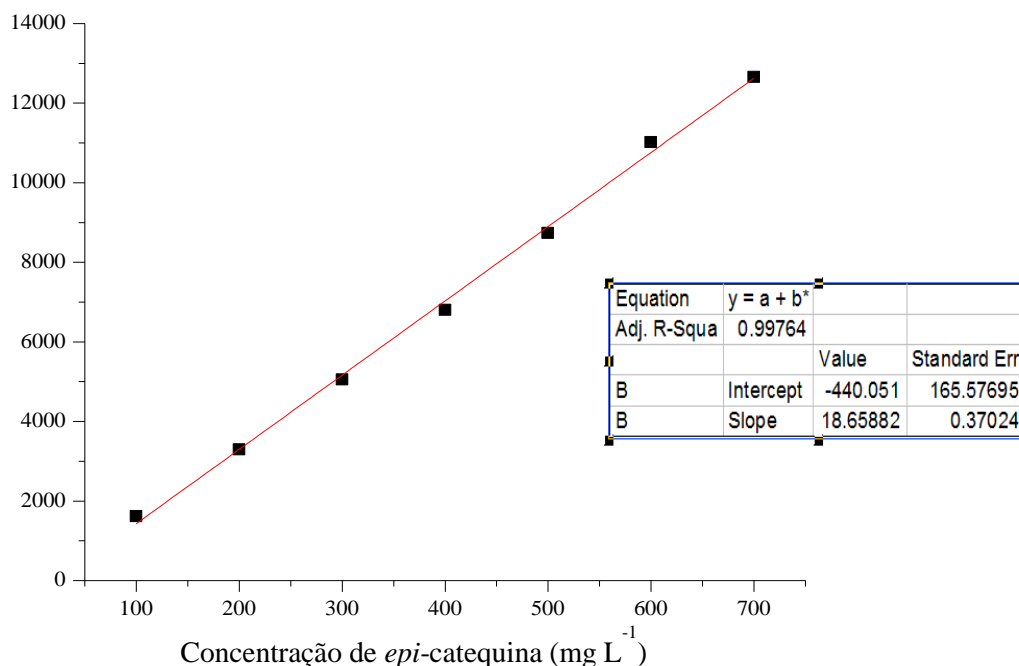
Desta forma, com os resultados obtidos a partir da análise por CLAEUHPLC pode ser caracterizada o tipo de flavonoide nos extratos. O método utilizado para obtenção das equações de regressão linear na forma foi  $y=ax+b$ , onde  $y$  é área do pico e  $x$  é a concentração do padrão em  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Tabela 4).

**Tabela 4:** Parâmetros para a equações de regressão das curvas analíticas, coeficientes de correlação dos flavonoides *epi*-catequina e rutina.

Parâmetros	Rutina	<i>Epi</i> -catequina
$\lambda(\text{nm})$ da curva analítica	352	278
Equação da regressão linear	Área = 527,85x + 13004,83	Área = 18,66x – 440,05
Inclinação (a)	527,85	18,66
Intercepto (b)	13004,83	-440,05
Coefficiente de correlação (r)	0,9988	0,9988

### 4.2.1 Quantificação de *epi*-catequina no extrato etanólico das cascas de *C. leprosum*;

Após confirmar da presença de *epi*-catequina como composto presente nos extratos das casca, foi possível quantificar a partir da curva analítica construída com o padrão de *epi*-catequina (Figura 22) e do extrato.



**Figura 22.** Curva de calibração construída com padrão *epi*-catequina em 278 nm.

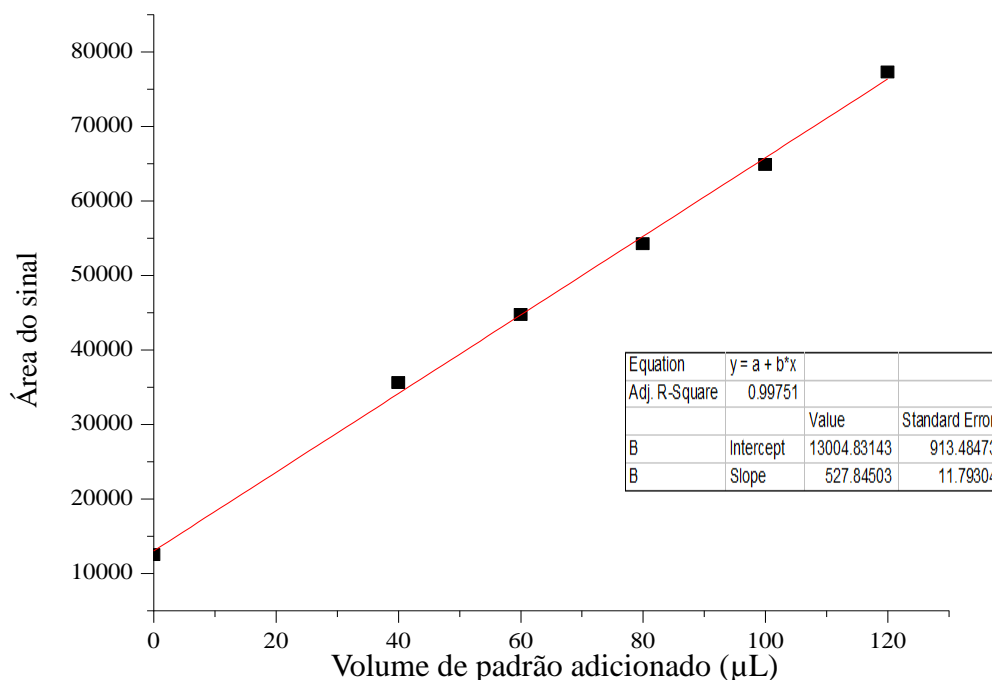
A análise do EECCL, verificou um perfil cromatográfico representado na Figura 24. A afirmação da *epi*-catequina na amostra foi comprovada a partir da verificação dos picos com tempos de retenção semelhantes, correspondente a 25 minutos (Figura 24-a). Pode-se confirmar também através da observação do aumento do pico no cromatograma após a dopagem da amostra de extrato (Figura 24-b). Vale ressaltar que esta substância (*epi*-catequina) já foi identificada anteriormente nas amostras de cascas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)<sup>45</sup>.

O conteúdo dos flavonoides (*epi*-catequina) nos extratos etanólico das cascas de *C. leprosum* apresentou cerca de 0,065 mg de *epi*-catequina/g de extrato. COMPLEMENTAR

#### 4.2.2 Quantificação de rutina no extrato etanólico das folhas de *C. leprosum*;

Para confirmar a presença de rutina e quantificá-la como substância presente nos extratos etanólico de folhas, foi construída uma curva analítica (Figura 23) correlacionando a área do sinal *versus* o volume adicionado de padrão de rutina (adição padrão na soluções de extrato). A identificação dos comprimentos de onda para quantificação da rutina foi realizada

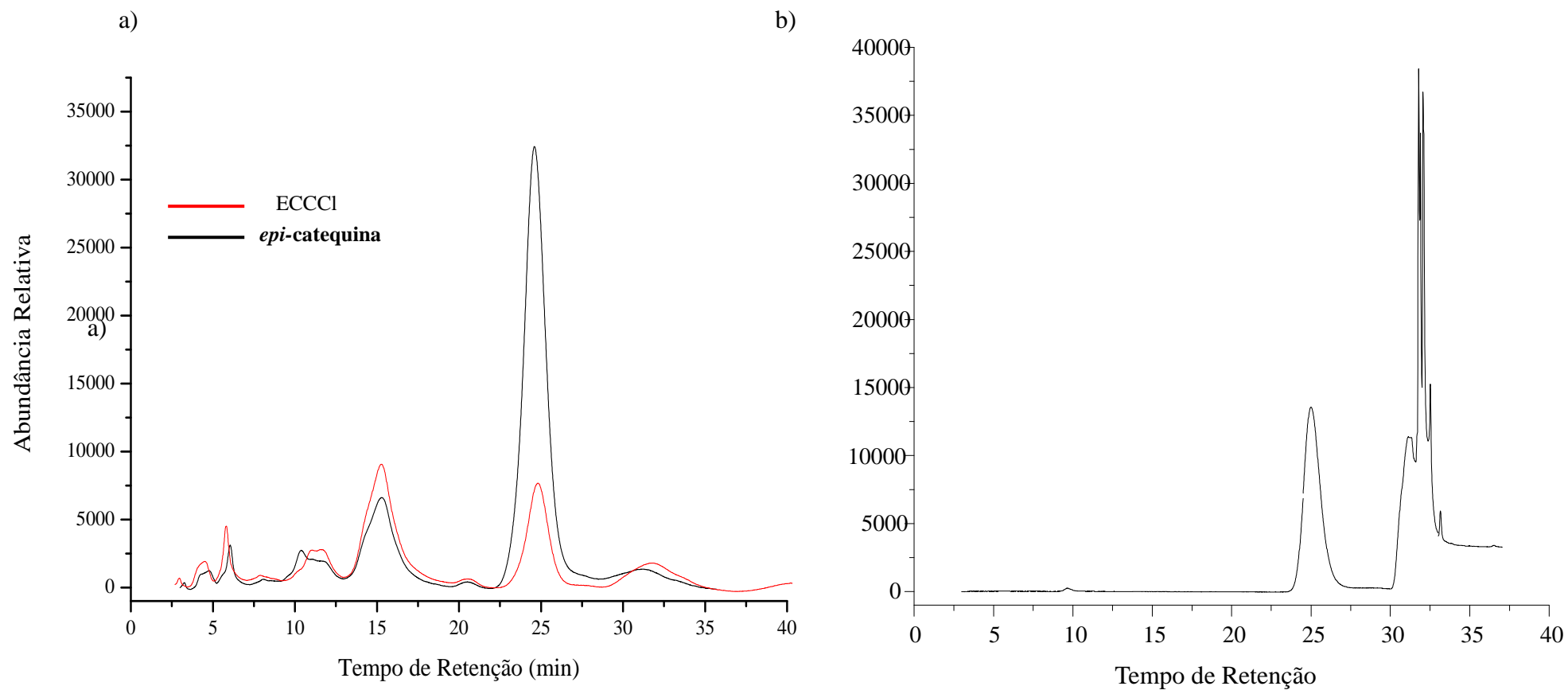
por monitoramento da faixa de comprimento de onda a 352 nm a partir da injeção dos padrões de rotina.



**Figura 23.** Curva de calibração construída com a adição de padrão rotina em 352 nm.

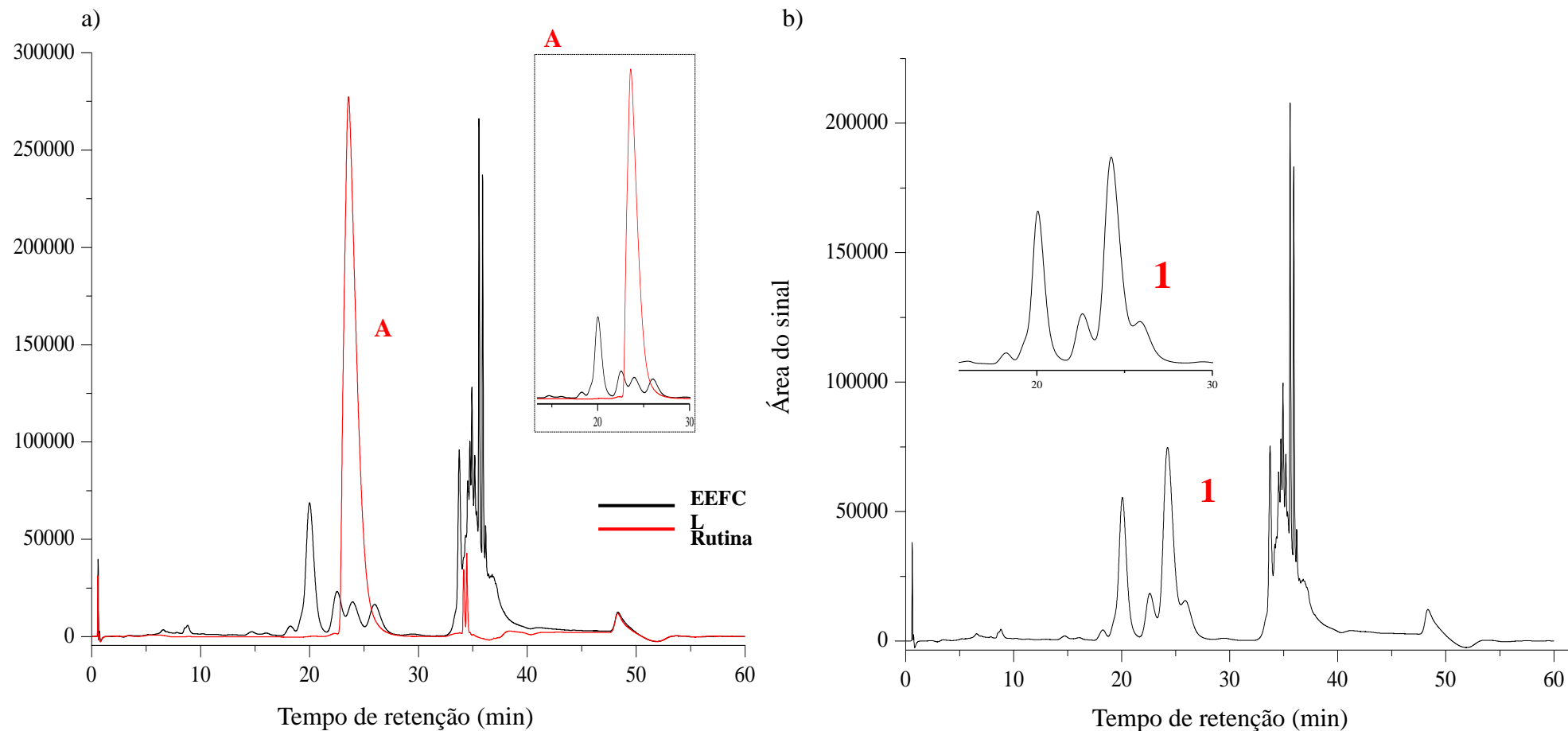
A identificação da rutina foi confirmada por meio da comparação das análises do padrão com as análises do extrato etanólico das folhas, nas mesmas condições, observando os picos com tempos de retenção semelhante representada na Figura 25 (a) e com o aumento da intensidade do pico com dopagem do padrão na amostra, representada na Figura 25 (b).

O conteúdo de flavonoide rutina no extrato etanólico das folhas de *C. leprosum* foi de 3,33 mg/g de extrato. De acordo com as análises pode-se observar mais de um pico, sendo possível identificar a rutina ( $T_r = 24,75$ ), no comprimento de onda de absorção em 352 nm. Os outros picos presentes são flavonoides derivados de rutina baseada na semelhança espectral com o padrão. Comparando os extratos das folhas e cascas, o método comprova que o extrato da folha apresenta maiores teores de flavonóis, concordando com o conteúdo de flavonoides totais determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, confirmando que o extrato etanólico das folhas possuem mais teores.



**Figura 24.** a) Sobreposição dos cromatogramas do extrato etanólico das cascas de *C. leprosum* (ECCC1) com o padrão *epi*-catequina em 278 nm.

b) Cromatograma do extrato etanólico das cascas de *C. leprosum*, no comprimento de onda de 278 nm dopado com 120  $\mu$ L de *epi*-catequina.

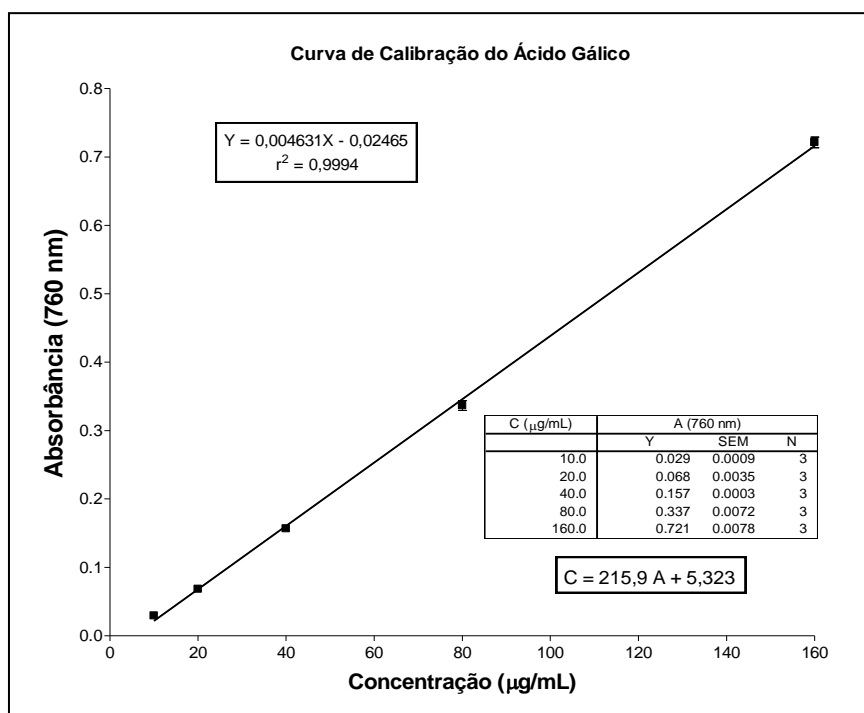


**Figura 25.** a) Sobreposição dos cromatogramas do extrato etanólico das folhas de *C. leprosum* (EEFC) com o padrão rutina em 352 nm, A: expansão da região da dopagem, mostrando o sinal da rutina no extrato. b) cromatograma do extrato etanólico das folhas de *C. leprosum*, no comprimento de onda de 352 nm dopado com 120 µL de rutina, 1: sinal referente a rutina adicionada ao extrato no volume de 120 µL.

### 4.3 Determinação de fenólicos e flavonoides totais

#### 4.3.1 Determinação de fenólicos totais

O método de Folin-Ciocalteu é considerado bem aceito, simples, reprodutível e amplamente utilizado para avaliar o teor de compostos fenólicos em vegetais<sup>90</sup>. Desta forma, este método foi utilizado para estimar o conteúdo fenólico dos extratos etanólicos das cascas e das folhas de *C. leprosum*. A quantificação de fenólicos totais no extrato (240 µg/mL), foi realizada a partir da construção de uma curva de calibração de padrão de ácido gálico em diferentes concentrações (Figura 26). É possível observar a linearidade dos dados com o valor de coeficiente de regressão ( $r^2$ ) próximo de 1. A partir da reta obtida, realizou-se o cálculo do concentração de compostos fenólicos totais.<sup>62</sup>



**Figura 26.** Curva de calibração de padrão de ácido gálico em diferentes concentrações.

Os dados das absorvâncias das amostras foram diretamente aplicados na equação da reta para a determinação da concentração de compostos fenólicos totais, expressa em equivalente de ácido gálico por grama dos extrato e frações. A avaliação de fenólicos totais das amostras (Tabela 5) pelo método de Folin-Ciocalteu, mostrou que o maior teor fenólico presente nas cascas foi na fração acetato de etila, seguida da fração intermediário e fração hidrometanólica. Dentre as amostras das folhas, a fração acetato de etila apresentou maior teor fenólico, seguido do extrato etanólico e fração hidrometanólica. Desta forma, é evidente que

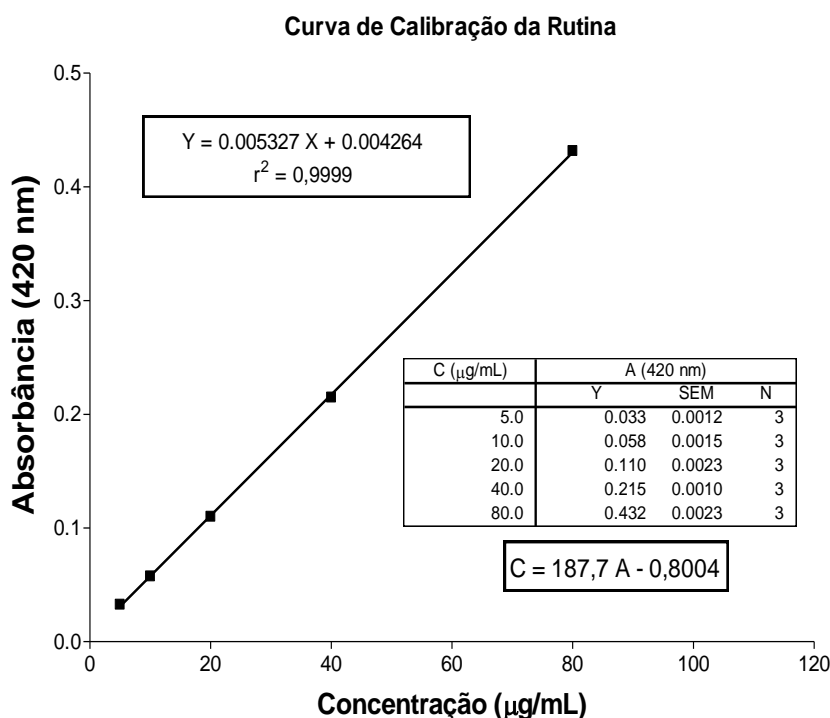
as amostras que apresentaram grande teor fenólico, possivelmente apresentam flavonoides, taninos e outras substâncias fenólicas<sup>42</sup>.

O teor de fenólicos totais, para o extrato etanólico de *C. Leprosum* das folhas foi de 212,59 mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de amostra, apresentando maior teor de fenois quando comparado com as amostras de *C. braetosum* (189 mg GAE/g),<sup>151</sup> *C. woodii* (211 mg GAE/g)<sup>151</sup> e *C. micranthum* (37,08 mg GAE/g)<sup>145</sup>, porém apresentou menor teor comparado com o *C. padoides* (467 mg GAE/g)<sup>151</sup> e *C. vendae* (445 mg GAE/g)<sup>151</sup>. Em relação as frações das folhas, um estudo relatou as concentrações de fenólicos da espécie *C. platypetalum* utilizando uma substância padrão diferente em relação a espécie alvo. As frações acetato de etila e hexânica de *C. platypetalum* apresentaram respectivamente 429,33 e 234,89 µg de equivalente de catequina/g)<sup>148</sup>, concentração alta de fenólicos quando comparadas com as mesmas frações do *C. leprosum* (79,15 e 225,49 mg GAE/g) .

O extrato etanólico das cascas (232,1 ± 3,6 mg GAE/g) apresentou um maior teor fenólico quando comparado com o *C. hartmannianum* (42,44 µg GAE/mg)<sup>152</sup>. Geralmente extratos e frações que apresentam teor fenólico elevado tendem a apresentar maior atividade antioxidante<sup>153</sup>(Tabela 6).

### 4.3.2 Determinação de flavonoides totais

A quantificação de flavonoides totais no extrato (240 µg/mL), foi realizada a partir da construção de uma curva de calibração de padrão de rutina em diferentes concentrações (Figura 27).



**Figura 27.** Curva de calibração de padrão de Rutina em diferentes concentrações.

As amostras das folhas apresentaram teores de flavonoides maiores quando comparado com as amostras das cascas. A fração acetato de etila e o extrato etanólico das folhas do *C. leprosum* apresentaram maiores teores de flavonoides com  $238,91 \pm 1,73$  e  $102 \pm 12,0$  mg de rutina por grama de amostra, respectivamente (Tabela 5). Dentre as amostras da casca, a fração hexânica ( $124,28 \pm 56$ ) apresentou maior teor de flavonoides em relação às demais amostras.

O teor de flavonoides totais, para o extrato etanólico das folhas de *C. leprosum* foi de 102 mg de equivalentes de Rutina/ por grama de amostra, apresentando teor maior de flavonoides quando comparado com o *C. braetosum* (17 mg GAE/g)<sup>151</sup>, *C. woodii* (14,7 mg GAE/g)<sup>151</sup>, *C. padoides* (40,95 mg GAE/g)<sup>151</sup> e *C. vendae* (15,33 mg GAE/g)<sup>151</sup>. Em relação as frações, observou-se que as frações de acetato de etila e hexânica das folhas de *C. platypetalum* apresentaram maiores teores de flavonoides (375 e 99.62)<sup>148</sup>, quando comparado com as mesmas frações do *C. leprosum* (238,9 e 76,86 mg GAE/g)(Tabela 6).



#### 4.4 Atividade antioxidante de *C. leprosum* pelo método de DPPH e ABTS

O potencial antioxidante de extratos vegetais é melhor avaliada com base nos resultados obtidos por ensaios com medidas espectrofotométricas empregando a utilização de diferentes métodos antioxidantes<sup>153</sup>. O uso de pelo menos dois métodos é recomendável para fornecer resultados confiáveis da AA em alimentos<sup>154</sup>. Com base nisso, optou-se por avaliar as amostras de extratos e frações empregando os ensaios colorimétricos *in vitro* abrangendo a faixa de baixa até alta inibição da oxidação dos radicais DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup>. O resultado da atividade de eliminação de DPPH pelo extratos etanólicos e frações de *C. leprosum* em comparação com o do ácido gálico.

Após partição do extrato etanólico das amostras das folhas, a atividade antioxidante (AA) foi maior na fração acetato de etila evidenciando a redução do radical DPPH em 50% (IC<sub>50</sub>), conforme apresentado na Tabela 5. Os valores da IC<sub>50</sub> das amostras das folhas obedecem a seguinte ordem de potencial antioxidante: fração acetato de etila > extrato EtOH > fração hidrometanólica > fração hexano > fração clorofórmio. Dentre as amostras das cascas, o intermediário (hexano) obteve maiores AA%, seguido do extrato etanólico > fração acetato de etila > fração hidrometanólica > fração hexano > fração clorofórmio. Para o DPPH, fez uso do padrão Catequina com valor de IC<sub>50</sub> de 28,5 µg/mL. É possível correlacionar os resultados dos ensaios de fenólicos e flavonoides totais com o teste de DPPH, evidenciando que esses compostos, possivelmente são os principais contribuintes da atividade antioxidante.

Os resultados da análise de fenóis e flavonoides totais evidenciam uma correlação com a ação antioxidante. O mecanismo de reação para a inibição do radical livre com os compostos antioxidantes também dependem da conformação estrutural dos compostos, pois alguns reagem rapidamente, enquanto que outros lentamente. A literatura comprova esta correlação com as amostras de algumas espécies vegetais<sup>100</sup>. O maior conteúdo de flavonoides e fenóis total foi encontrado nas frações de acetato de etila, hidrometanólica e extrato bruto por apresentar grande potencial antioxidante. O AA% de catequina foi notavelmente maior que as outras amostras, mas a diferenças significativas entre eles parecem ser menos visíveis em concentrações mais elevadas. Os potenciais redutores do extrato *C. leprosum* e da catequina também foram dependentes das concentrações.

É comprovado que alguns fatores influenciam diretamente na AA de compostos fenólicos, em especial a posição da substituição e o número de grupos hidroxila no anel aromático, a possibilidade de formação de ligações de hidrogênio e as propriedades de outros grupos substituintes. Em relação a posição dos substituintes no anel aromático, a presença do

grupo hidroxila em posição “orto” e/ou “para” no anel contendo heteroátomo oxigênio, potencializa a AA por efeito de ressonância entre o par de elétrons do tipo “p” do oxigênio e o radical fenóxil formado<sup>93</sup>. Para os flavonoides, a AA provém de diversas características estruturais. No anel B do núcleo flavonoídico, a posição “para” do grupo hidroxila (C4') e a presença de um segundo grupo OH no anel B favorece a ação antioxidante. Além da presença da diss substituição hidroxil no anel B (C3' e C4'), a conjugação da dupla ligação C2-C3 com o grupo 4-oxo (C4), grupo hidroxila na posição 3 do anel heterocíclico C é essencial à AA<sup>95</sup>.

Estudos comparativos mostraram que os extratos da casca *C. racemosum* (2,9 µg/ml)<sup>147</sup>, apresentaram maior atividade antioxidante comparado com o extrato etanólico das cascas de *C. leprosum* (29,5 µg/ml). Os extratos etanólicos das folhas do *C. celastroide* (5,0 µg/ml)<sup>147</sup> e *C. racemosus* (3,0 µg/ml)<sup>147</sup> também foi maior a atividade antioxidante, quando comparado com o extrato etanólico das folhas de *C. leprosum* (85 µg/ml), que pode ser justificada pela presença de alcaloides e maior teores de compostos fenólicos. Estudos comparativo com as amostras das frações hexano das folhas, mostrou que o *C. bacteosum* (85,04 µg/ml)<sup>151</sup>, *C. padoides* (12,65 µg/ml)<sup>151</sup> e *C. apiculatim* (17,3 µg/m)<sup>153</sup> contem maior atividade antioxidante comparado com a fração hexânica da folha do *C. leprosum* (915 µg/ml). As amostras das frações acetato de etila do *C. vendal* (1,02 µg/ml)<sup>151</sup>, *C. woodi* (1,24 µg/ml)<sup>151</sup> e *C. apiculatum* (3,9 µg/m)<sup>153</sup> apresentaram maior atividade antioxidante comparado com a fração AcOEt das folhas de *C. leprosum* (40 µg/m), enquanto a fração do *C. rupicola* (239 µg/ml)<sup>155</sup> foi menos ativa (Tabela 7).

A atividade antioxidante dos extratos de teste foi determinada pela medida da taxa do radical ABTS<sup>+</sup> descolorido como a percentagem de inibição a uma absorvância de 734 nm<sup>64</sup>. A atividade de eliminação do radical e a inibição da peroxidação tem sido amplamente utilizada como um parâmetro rápido e confiável para avaliar o antioxidante geral das plantas<sup>156</sup>.

A atividade de eliminação radical nos resultados do teste de ABTS (Tabela 5) nas amostras das folhas mostrou que a fração hidrometanólica, extrato etanólico das folhas e fração acetato de etila, apresentaram maiores atividades de inibição de radicais, com valores de IC<sub>50</sub> de 81,136 e 140 µg/mL, enquanto nas amostras da casca o intermediário (hexano), extrato etanólico e a fração acetato de etila apresentaram menores concentrações inibitórias (27,5; 31 e 37 µg/mL). Estes valores indicam que provavelmente outros compostos presentes no extrato e fração, em parte, são responsáveis pela atividade, como compostos fenólicos e flavonoides, cuja atividade é bem conhecida. Os valores da IC<sub>50</sub> das amostras das folhas obedecem a seguinte ordem: fração hidrometanólica > extrato EtOH > fração Acetato de etila

> fração clorofórmio > fração hexano. Dentre as amostras da casca, a amostra que obteve maior potencial foi o Intermediário (hexano), seguidos do extrato etanólico > fração acetato de etila > fração hidrometanólica > fração hexano > fração clorofórmio com percentagem de inibição do radical livre dependente da concentração. O potencial para eliminar o radical ABTS<sup>+</sup> das frações e os extratos bruto de *C. leprosum* apresentou mesmo sequenciamento crescente do percentual de antioxidante de eliminação do radical DPPH.

Estudos comparativos mostraram que os extratos etanólicos das folhas *C. micranthum* (16,37  $\mu\text{mol}$ )<sup>145</sup> obtiveram maior atividade antioxidante comparado com o *C. leprosum* (136  $\mu\text{g/mL}$ ), as amostras das frações hexânica das folhas, mostrou que o *C. erythrophyllum* (0,216  $\mu\text{g/mL}$ )<sup>35</sup>, *C. bacteosum* (1709  $\mu\text{g/mL}$ )<sup>151</sup>, *C. padoides* (12,65  $\mu\text{g/ml}$ )<sup>151</sup> e *C. vendal* (17,3  $\mu\text{g/mL}$ )<sup>151</sup> contem maior atividade antioxidante comparando com a fração hexânica das folhas do *C. leprosum* (1815  $\mu\text{g/ml}$ ). As amostras das frações acetato de etila do *C. vendal* (1,20  $\mu\text{g/mL}$ )<sup>151</sup>, *C. erythrophyllum* (0,040  $\mu\text{g/mL}$ )<sup>35</sup>, *C. woodi* (1,30  $\mu\text{g/mL}$ )<sup>151</sup> e *C. bracteosum* (7,38  $\mu\text{g/mL}$ )<sup>151</sup> apresentaram maior atividade antioxidante comparado com a amostra de *C. leprosum* (140  $\mu\text{g/mL}$ ) (Tabela 7).

Portanto, os espectros de antioxidantes determinados por DPPH e ABTS são parcialmente diferentes. A vantagem do radical ABTS é sua alta reatividade e, portanto, provavelmente a capacidade de reagir com uma gama mais ampla de antioxidantes. Por outro lado, a preparação do reagente ABTS é mais difícil e sua estabilidade é menor em comparação com DPPH<sup>24</sup>.

Tabela 5. Teor de fenólicos total, teor de flavonoides totais e atividade antioxidante (ensaios de DPPH e ABTS) dos extratos etanólicos das folhas e casca do *C. leprosum*.

<b>Amostras</b>	<b>Fenólicos Totais</b> (mg EAG/g amostra)	<b>Flavonoides Totais</b> (mg Rutina/g amostra)	<b>DPPH</b> ( $\mu\text{g/mL}$ ) - $\text{IC}_{50}$	<b>ABTS</b> ( $\mu\text{g/mL}$ ) - $\text{IC}_{50}$
<b>EECCI</b>	232,1 $\pm$ 3,6	17,0 $\pm$ 2,55	29,5 $\pm$ 0,50	31 $\pm$ 0,36
<b>FHCCI</b>	74,06 $\pm$ 4,61	124,28 $\pm$ 56	252 $\pm$ 0,83	250 $\pm$ 0,65
<b>FICCI</b>	338,83 $\pm$ 8,58	29,0 $\pm$ 5,81	28,5 $\pm$ 0,60	27,5 $\pm$ 0,90
<b>FCCCI</b>	81,55 $\pm$ 2,38	29,0 $\pm$ 2,84	415 $\pm$ 0,34	532 $\pm$ 0,35
<b>FActCCI</b>	411,40 $\pm$ 15,38	20,0 $\pm$ 0,94	32 $\pm$ 1,01	37 $\pm$ 0,98
<b>FHMCCI</b>	250,97 $\pm$ 3,63	18,67 $\pm$ 0,75	38 $\pm$ 0,75	48 $\pm$ 0,72
<b>EEFCI</b>	212,59 $\pm$ 10,84	102,0 $\pm$ 11,99	85 $\pm$ 0,90	136 $\pm$ 1,07
<b>FHFICI</b>	79,15 $\pm$ 4,43	76,86 $\pm$ 1,50	915 $\pm$ 0,66	1815 $\pm$ 1,09
<b>FCFCI</b>	57,26 $\pm$ 1,55	67,10 $\pm$ 1,50	1220 $\pm$ 0,92	1780 $\pm$ 0,41
<b>FActFCI</b>	225,49 $\pm$ 9,47	238,91 $\pm$ 1,73	40 $\pm$ 0,56	140 $\pm$ 0,73
<b>FHMFCI</b>	135,0 $\pm$ 4,25	11,66 $\pm$ 1,20	87 $\pm$ 0,32	81 $\pm$ 1,4
<b>Catequina</b>	NT	NT	28,5	NT
<b>Trolox</b>	NT	NT	NT	224

**EGA**- Equivalente de ácido gálico; **IC<sub>50</sub>** - 50% de inibição; **NT** - Não Testado; **EECCI** - Extrato etanólico da casca do *C. leprosum*; **FHCCI** - Fração hexânica das cascas de *C. leprosum*; **FICCI** - Fração intermediária das cascas de *C. leprosum*; **FCCCI** - Fração clorofórmica das cascas de *C. leprosum*; **FActCCI** - Fração acetato de etila das cascas de *C. leprosum*; **FHMCCI** - Fração hidrometanólica das cascas de *C. leprosum*; **EEFCI** - Extrato etanólico das folhas de *C. leprosum*; **FHFICI** - Fração hexânica das folhas de *C. leprosum*; **FIFICI** - Fração intermediária das folhas de *C. leprosum*; **FCFCI** - Fração clorofórmica das folhas de *C. leprosum*; **FActFCI** - Fração acetato de etila das folhas de *C. leprosum*; **FHMFCI** - Fração hidrometanólica das folhas de *C. leprosum*.

**Tabela 6.** Tabela comparativa de espécies do gênero *Combretum*. (Teor de fenólicos e flavonoides totais)

		<b>Fenólicos Totais</b>	<b>Flavonoides Totais</b>	<b>Referências Bibliográficas</b>		
		<b>(mg EAG/g amostra)</b>	<b>(mg Rutina/g amostra)</b>			
		<b>Amostras</b>				
Folhas		<i>C. padoides</i>	467 mg	40,95 mg	(AHMED,2014)	
		<i>C. vendae</i>	445 mg	15,33 mg	(AHMED,2014)	
		<b><i>C. leprosum</i></b>	<b>212,59 mg</b>	<b>102 mg</b>		
		<i>C. braetosum</i>	Extrato etanólico	189 mg	17 mg	(AHMED,2014)
		<i>C. woodii</i>		211 mg	14,7 mg	(AHMED,2014)
		<i>C. micranthum</i>		37,08 mg	----	(BOROSKI,2015)
		<i>C. platypetalum</i>		429,33 mg	375 mg	(UMOH,2016)
		<b><i>C. leprosum</i></b>	Frações acetato de etila	<b>225,49 mg</b>	<b>238,9 mg</b>	
		<i>C. platypetalum</i>		234,89 mg	99,62 mg	(UMOH,2016)
		<b><i>C. leprosum</i></b>	Fração hexano	<b>79,15 mg</b>	<b>76,86 mg</b>	
Cascas		<b><i>C. leprosum</i></b>	<b>232,1 ± 3,6 mg</b>	-----		
		<i>C. hartmannianum</i>	Extrato etanólico	42,44 mg	-----	(MUDDATHIR,2017)

**Tabela 7 :** Tabela comparativa de espécies do gênero *Combretum* ( Atividade antioxidante – DPPH e ABTS )

	AMOSTRAS	DPPH	ABTS	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
	<i>C. celastroide</i>	5,0 µg/mL	---	(MANGA, 2012)	
	<i>C. racemosum</i>	3,0 µg/mL	---	(MANGA, 2012)	
	<i>C. micranthum</i>	Extrato etanólico	---	16,37 µmol (BOROSKI, 2015)	
	<b><i>C. leprosum</i></b>	<b>85 µg/mL</b>	<b>136 µmol</b>		
FOLHAS	<i>C. bacteosum</i>	85,04 µg/mL	1709 µg/mL	(AHMED, 2014)	
	<i>C. erythrophyllum</i>	--	0,216 µg/mL	(MTUNZI, 2017)	
	<i>C. vendal</i>	--	---	(AHMED, 2014)	
	<i>C. padoides</i>	Fração hexano	12,65 µg/mL	12,65 µg/mL (AHMED, 2014)	
	<i>C. apiculatim</i>		17,3 µg/mL	---	(ADEROGBA, 2012)
	<b><i>C. leprosum</i></b>		<b>915 µg/mL</b>	<b>17,3 µg/mL</b>	
	<i>C. vendal</i>		1,02 µg/mL	1,20 µg/mL	(AHMED, 2014)
	<i>C. woodi</i>	Frações acetato de etila	1,24 µg/mL	1,30 µg/mL	(AHMED, 2014)
	<i>C. apiculatum</i>		3,9 µg/mL	--	(ADEROGBA, 2012)
	<b><i>C. leprosum</i></b>		<b>40 µg/mL</b>	<b>140 µg/mL</b>	
	<i>C. rupicola</i>	239 µg/mL	--	(SANTOS, 2013)	
CASCAS	<b><i>C. leprosum</i></b>	<b>29,5 µg/mL</b>	--		
	<i>C. racemosum</i>	Extrato etanólico	2,9 µg/mL	-- (MANGA, 2012)	

## 4.5 Teste de Citogenotoxicidade

### 4.5.1 Teste de *Allium cepa*

O sistema *A. cepa* é um dos métodos mais eficazes na identificação de alterações na divisão celular (citotoxicidade) e alterações cromossômicas (genotoxicidade)<sup>104</sup>. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos citogenotóxicos em diferentes concentrações (100, 250, 500, 1,000 e 2000 µg/mL) dos extratos etanólicos das cascas (EECCI) e folhas (EEFCL) do *C. leprosum* no teste *A. cepa*. Os valores das concentrações das amostras foram selecionadas a partir dos testes antioxidantes realizados no presente estudo.

O índice mitótico (IM) de células meristemáticas de *A. cepa* expostas as diferentes concentrações dos EECCI e EEFCL, não apresentaram diferenças significativas em nenhuma das concentrações testadas quando comparados ao controle negativo (CN) (Tabela 8), pois não interferiram no processo de síntese de DNA ou no bloqueio da fase G2/M do ciclo celular, permitindo a divisão celular. Esses efeitos podem ser atribuídos aos compostos fitoquímicos (flavonoides, esteroides, taninos, saponinas e triterpenos) presente nos extratos. Não interferindo na progressão do ciclo celular, permitindo assim que as células de *A. cepa* entrassem em divisão<sup>103,157</sup>.

Segundo Stange<sup>158</sup>, as análises fitoquímicas comprovam que a presença de taninos e flavonoides (compostos fenólicos) são os possíveis responsáveis pela ausência desses efeitos citotóxicos, devido suas propriedades antioxidantes. Os compostos fenólico apresentam estruturas químicas conjugadas em anel β, ricas em grupos hidroxilas, que tem potenciais ações antioxidantes por reagirem e inativarem ânions superóxido, oxigênio singlete, radicais peróxido de lipídios e estabilizando radicais livres, impedindo os danos e morte celular<sup>159</sup>. Além disso, alguns flavonoides podem complexar-se com metais, tais como o Fe<sup>3+</sup> e o Cu<sup>2+</sup>, atuando contra os prooxidantes na degradação do DNA e diminuindo a formação de radicais hidroxila<sup>160</sup>. Esses metais em altas concentrações no solo ou meio aquático constituem um grave problema ambiental, devido aos seus efeitos deletérios, como alta toxicidade, capacidade de bioacumulação e potencialidade de induzir danos ao material genético (genotoxicidade e mutagenicidade)<sup>161</sup>.

Segundo Sawadogo, os triterpenos, saponinas e alcaloides, apresentam atividade citotóxica, justificada pela presença de grupos reativo como tioil, histidilo e carboxilo, orientação de seus anéis de indol e quinolona, que proporcionam aumento dos níveis de radicais que podem causar danos às proteínas<sup>162,163</sup>. De acordo com Herrero, o índice mitótico

não deve ser inferior a 50% do valor de controle, para obter uma análise confiável de aberrações cromossômicas<sup>164</sup>.

No ensaio de genotoxicidade, as raízes de *A. cepa* com o MMS, como controle positivo, apresentou níveis significativos na média total de AC e MN (Tabela 8) como observados na literatura. Em comparação com a média total das alterações cromossômicas (AC) de todas as concentrações dos extratos não foram significativas quando comparadas ao CN (Tabela 8), evidenciando ausência de efeito genotóxico. Entre as aberrações analisadas individualmente, verificou-se que nenhuma foi significativa para as amostras da casca, porém entre as amostras das folhas, foi significativo para broto nuclear somente nas concentrações de 2,0 mg/mL (1,98±1,70). Este resultado mostra que os fitoquímicos dos extratos nas concentrações avaliadas, possivelmente, não interferiram nos processos de condensação de cromatina, polimerização das fibras do fuso, segregação mitótica e/ou quebras cromossômicas<sup>157,165</sup>.

Além disso, a detecção não significativa de perdas cromossômicas, quebras, brotos nucleares e/ou pontes cromossômicas no presente estudo também enfatiza a obtenção de valores médios não significativos para MN, pois estes surgem devido à ocorrência dessas alterações cromossômicas.

Dentre as anormalidades observadas, as que tiveram maior frequência foram os micronúcleos, pontes e quebras cromossômicas. Foram observadas células com núcleo e citoplasma com alterações morfológicas, além de tamanhos celulares acima da normalidade. Pode-se observar que na maioria das células que apresentava ponte de ligação era acompanhada de micronúcleo ou broto celulares. Segundo Saleri<sup>166</sup>, muito dos compostos secundários como alcaloide e alguns tipos de flavonoides são responsáveis pela perturbação das fibras do fuso em diferentes estágios da divisão mitótica, possibilitando o aparecimento de anormalidades.

Outro fator ligado a indução da genotoxicidade são os flavonoides (sequestradores de radicais livres ou oxigênios ativos), devido às suas propriedades antioxidantes e a capacidade de modular várias enzimas e receptores celulares, dependendo do número e posição dos grupos hidroxílicos no anel A e B, podem estar relacionados com a ausência das aberrações nos resultado da avaliação dos extratos do *C. leprosum*. As atividades bioquímicas dos flavonoides e de seus metabólitos dependem de sua estrutura e da orientação relativa de várias partes na molécula para poder agir<sup>167</sup>. Portanto, nenhuma das concentrações testadas apresentou citogenotoxicidade significativa em relação ao CN.



**Tabela 8.** Média do índice mitótico e das alterações cromossômicas em células meristemáticas de *Allium cepa*, após a exposição por 24 h ao extrato etanólico das cascas de *C. leprosum*.

Tratamento	Concentração (mg/mL)	Índice Mitótico (Média ± DP)	Alterações Cromossômicas (Média ± DP)						Alterações Cromossômicas (Média ± DP) Total
			MN	BN	QC	PC	PT	AC	
CN	H <sub>2</sub> O	156,44 ± 42,73	0,18 ± 0,56	0,09 ± 0,28	0,09 ± 0,28	0,7 ± 0,47	0,18 ± 0,39	0,00 ± 0,00	0,91 ± 1,98
CP	10,0	182,36 ± 29,15	20,57 ± 6,71**	2,05 ± 1,18**	1,69 ± 0,78**	1,75 ± 1,29**	1,16 ± 0,87*	0,70 ± 1,00	27,92 ± 11,83**
	0,100	172,15 ± 31,91	0,18 ± 0,57	0,09 ± 0,29	0,08 ± 0,25	0,09 ± 0,29	0,73 ± 0,90	0,08 ± 0,25	1,25 ± 2,55
	0,250	172,84 ± 14,69	0,31 ± 0,53	0,19 ± 0,40	0,26 ± 0,61	0,08 ± 0,26	0,26 ± 0,41	0,00 ± 0,00	1,1 ± 2,21
	0,500	181,98 ± 30,32	0,70 ± 0,80	0,17 ± 0,35	0,27 ± 0,61	0,08 ± 0,26	0,08 ± 0,25	0,00 ± 0,00	1,3 ± 2,27
EECCI	1,0	149,02 ± 29,14	0,54 ± 0,97	0,10 ± 0,31	0,29 ± 0,64	0,19 ± 0,40	0,26 ± 0,42	0,00 ± 0,00	1,38 ± 2,74
	2,0	150,40 ± 26,13	0,17 ± 0,36	0,18 ± 0,38	0,27 ± 0,44	0,18 ± 0,57	0,09 ± 0,28	0,17 ± 0,36	1,06 ± 2,39
EEFCI	0,100	140,41 ± 31,73	0,24 ± 0,54	0,48 ± 0,70	0,08 ± 0,26	0,51 ± 0,71	0,18 ± 0,58	0,00 ± 0,00	1,49 ± 2,79
	0,250	160,43 ± 51,50	0,60 ± 0,82	0,43 ± 0,46	0,09 ± 0,28	0,27 ± 0,44	0,09 ± 0,28	0,09 ± 0,28	1,57 ± 2,56
	0,500	148,71 ± 30,44	0,19 ± 0,41	0,18 ± 0,37	0,17 ± 0,35	0,14 ± 0,30	0,09 ± 0,28	0,00 ± 0,00	0,77 ± 1,71
	1,0	163,02 ± 32,54	0,45 ± 0,90	0,58 ± 0,89	0,18 ± 0,57	0,08 ± 0,27	0,08 ± 0,26	0,00 ± 0,00	1,37 ± 2,89
	2,0	151,24 ± 41,52	0,50 ± 0,80	1,98 ± 1,70**	0,25 ± 0,40	0,08 ± 0,26	0,00 ± 0,00	0,08 ± 0,27	2,89 ± 3,43

CN: Água. CP: metilmetanosulfonato(MMS). EECCI: Extrato etanólico da casca do *C. leprosum*. EEFCI: Extrato etanólico das folhas de *C. leprosum*. MN: Micronúcleo. BN: Broto nuclear. QC: Quebra cromossômica. PC: Perca Cromossômica. PT: Ponte Cromossômica. AC: Aderência cromossômica. \* Significativo no teste de Kruskal-Wallis com teste de Student-Newman-Keuls a posterior (\*\*p<0,01; \*<0,05). Os resultados referem-se de 5.000 células por tratamento.

#### 4.5.2 Teste de Micronúcleo em sangue periférico

Células micronucleadas podem refletir danos genômicos, portanto a detecção de uma frequência elevada de micronúcleos (Figura 27) em alguns tecidos e/ou órgãos indica aumento do risco de câncer. Verificando as diferentes alterações mutagênicas em células, este estudo avaliou o potencial mutagênico dos extratos das folhas e cascas de *C. leprosum in vivo*, utilizando o teste do micronúcleo em sangue periférico.

Com base na média de micronúcleos verificada nessas células (Tabela 9), foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, cujos resultados não houve diferenças significativas entre os grupos, nas diferentes concentrações de extratos (250, 500 e 750 mg/kg), em comparação com o controle negativo. Nos ensaio com uso da ciclofosfamida, apresentou MN significativos como esperado<sup>168</sup>. As células apresentaram valores de micronúcleos menores comparado ao controle positivo, mostrando a ausência de mutagenicidade dos extrato nas três doses analisadas. Os resultados indicam que os fitoquímicos não alteraram a polimerização das fibras do fuso (alterações de origem aneugênica) e/ou não promoveram quebras cromossômicas (origem clastogênica) que poderiam dar origem aos MN em quantidades significativa.

Os extratos mostraram efeito de inibição, possibilitando ao tratamento a capacidade de remover danos no DNA. Esse efeito protetor pode estar associado ao alto nível de compostos antioxidantes como compostos fenólicos comprovados.<sup>169</sup> Os mecanismos antioxidantes envolvem inibição direta da geração de ROS ou a eliminação do radical livre. Segundo Dini,<sup>170</sup> os mecanismos antioxidantes dos metabólitos envolvem propriedade antirradical e redutora, que está relacionada à atividade quelante de íons metálicos e à inibição da peroxidação lipídica<sup>171</sup>. Além disso, as saponinas e flavonoides podem exercer efeito de sequestro indireto sobre os tecidos induzidos por radicais livres, ativando a função de enzimas antioxidantes endógenas.

A baixa incidência de células micronucleadas no sangue periférico reflete a pequena extensão da clastogênese nas células, que podem se originar durante a anáfase de cromossomos acíclicos atrasados ou fragmentos de cromátides causados por má conservação, reparo das quebras de DNA<sup>172</sup>, mal segregação de cromossomos inteiros na anáfase, defeitos em proteínas cinetócoras ou de montagem, fuso disfuncional e genes defeituosos de checkpoint de anáfase<sup>172</sup>. Podendo supor a baixa genotoxicidade, dano no DNA, pela

capacidade de reparo dentro de um período de tempo. Concluiu que o efeito antimutagênico pode ser devido à presença de flavonoides, compostos de reconhecida atividade antioxidante<sup>173</sup>.

A mutagenicidade de certas substâncias também pode ser avaliada observando-se as aberrações cromossômicas, incluindo alterações estruturais (lacuna, quebra e troca) e numéricas (aneuploidia e poliploidia) em atividades clastogênicas/aneugênicas, que levam ao aumento da frequência de MN e sugerem efeitos mutagênicos no nível cromossômico<sup>174,175</sup>. No entanto, esses resultados não foram diferentes dos obtidos pelo teste de *A. cepa*, para ambos os extratos, não demonstrou alterações na frequência de efeitos citotóxico, genotóxico e mutagênicos, sugerindo uma ação benéfica em células vegetais e animais.

**Tabela 9.** Média de eritrócitos micronucleados em células sanguíneas de camundongos machos (*M. musculus*) após tratamento com três diferentes concentrações dos extratos etanólicos das cascas e folhas do *C. leprosum*, por 24, 48 e 72 h.

Tratamentos	Dose (mg/kg)	Células Analisadas	Eritrócitos Micronucleados (Média ± Desvio Padrão)		
			24 h	48 h	72 h
CN	Água	10000	5,3±2,63	5,3±1,95	4,8±1,40
CP	Ciclofosfamida	10000	32,4±9,23 **	33,1±7,62**	34,1±10,16**
		250	5,1±2,38	4,6±1,90	4,4±1,78
EECCI	500	10000	5,5±1,96	4,1±1,97	4,2±1,55
	750	10000	4,5±1,90	3,3±2,16	3,8±2,39
EEFCI	250	10000	4,625±1,41	5±1,77	5,5±2,45
	500	10000	4,4±1,35	5,7±3,06	3,0 ±1,05
	750	10000	3,33 ±1,94	3,3±1,70	2,6±1,26

<sup>1</sup>Controle Negativo: Água. <sup>2</sup>Controle Positivo: ciclofosfamida (50 mg/Kg). EECCI: extrato etanólico da casca do *C. leprosum*. EEFCI : extrato etanólico das folhas de *C. leprosum*. <sup>3</sup>Concentrações do tratamento. \*Significativo no teste de Kruskal-Wallis com teste de Student-Newman-Keuls a posteriori(\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ). Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ; médias seguidas pela mesma letra minúscula não são significativamente diferentes. Os resultados referem-se à análise de 10.000 células por tratamento.

# Capítulo 5

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

Os extratos e frações das folhas e das cascas de *C. leprosum* apresentaram atividade antioxidante considerável pelo método fotolorimétrico DPPH e ABTS *in vitro*. Foi possível estimar as quantidades de fenólicos e flavonoides totais, que possivelmente são principais responsáveis pela atividade biológica de interesse. Foram identificados e quantificados 2 compostos fenólicos por UHPLC-MS/MS. Dentre as amostras, as frações acetato de etila e hidrometanólica apresentaram concentrações de fenólicos totais e maior potencial antioxidante. No teste de citogenotoxicidade (*Allium cepa* e Micronúcleos em sangue periférico), nenhuma das concentrações testadas apresentou potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico. Desta forma, este estudo evidencia a importância de novos estudos para esta espécie para isolar possíveis substâncias inéditas utilizando outras técnicas e métodos modernos de separação acoplado ao de detecção.

# REFERÊNCIAS

---

- <sup>1</sup> DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological research**, v. 112, p. 4-29, 2016.
- <sup>2</sup> STEFANELLO, S. et al. Levantamento do uso de plantas medicinais na universidade federal do Paraná, Palotina-PR, Brasil. **Extensão em Foco**, v. 1, n. 15, 2018.
- <sup>3</sup> DOS SANTOS SOUZA, J. S. et al. Uso de plantas medicinais por comunidades do município de Curitiba. **Diversas**, v. 10, n. 2, p. 91-97, 2018.
- <sup>4</sup> ZENI, A. L. B. et al. Utilização de plantas medicinais como remédio caseiro na Atenção Primária em Blumenau, Santa Catarina, Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, p. 2703-2712, 2017.
- <sup>5</sup> SAMUELSSON, G.; BOHLIN, L. **Drugs of natural origin: a treatise of pharmacognosy**. CRC Press Inc., 2017.
- <sup>6</sup> SANTOS, S. N. et al. Endophytic fungi from *Combretum leprosum* with potential anticancer and antifungal activity. **Symbiosis**, v. 58, n. 1-3, p. 109-117, 2012.
- <sup>7</sup> FORZZA, R. C. et al. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil-Vol. 1**. JBRJ, 2010.
- <sup>8</sup> LOIOLA, M. I. B. et al. Flora da Paraíba, Brasil: Combretaceae. **Acta Botanica Brasílica**, v. 23, p. 330-342, 2009.
- <sup>9</sup> DE MORAIS LIMA, G. R. et al. Bioactivities of the genus *Combretum* (Combretaceae): a review. **Molecules**, v. 17, n. 8, p. 9142-9206, 2012.
- <sup>10</sup> ELOFF, J.; KATERERE, D.; MCGAW, L. The biological activity and chemistry of the southern African Combretaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, n. 3, p. 686-699, 2008.
- <sup>11</sup> PIETROVSKI, E. F. et al. Antinociceptive properties of the ethanolic extract and of the triterpene 3 $\beta$ , 6 $\beta$ , 16 $\beta$ -trihidroxilup-20 (29)-ene obtained from the flowers of *Combretum leprosum* in mice. **Pharmacology biochemistry and behavior**, v. 83, n. 1, p. 90-99, 2006.
- <sup>12</sup> VIAU, C. M. et al. Structural aspects of antioxidant and genotoxic activities of two flavonoids obtained from ethanolic extract of *Combretum leprosum*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, 2016.

- 13 DÉBORA, H. et al. Ação dos compostos fenólicos na aterosclerose: uma revisão. **Visão Acadêmica**, v. 19, n. 1, 2018.
- 14 SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. **Journal of functional foods**, v. 18, p. 820-897, 2015.
- 15 EVARISTO, F. F. V. et al. Antibacterial effect on mature biofilms of oral streptococci and antioxidant activity of 3 $\beta$ , 6 $\beta$ , 16 $\beta$ -trihydroxylup-20 (29)-ene from *Combretum leprosum*. **Medicinal Chemistry Research**, v. 26, n. 12, p. 3296-3306, 2017.
- 16 BIRBEN, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 1, p. 9, 2012.
- 17 GORRINI, C.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. **Nature reviews Drug discovery**, v. 12, n. 12, p. 931, 2013.
- 18 CHEN, X. et al. Reactive oxygen species regulate T cell immune response in the tumor microenvironment. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, 2016.
- 19 UCHÔA, V. T. et al. Free radical scavenging ability of *Ximenia americana* L. stem bark and leaf extracts. **J App Pharm Sci**, v. 6, n. 02, p. 091-096, 2016.
- 20 NIKI, E. Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 4, p. 503-515, 2010. ISSN 0891-5849.
- 21 WOJDYŁO, A.; OSZMIAŃSKI, J.; CZEMERYŚ, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. **Food Chemistry**, v. 105, n. 3, p. 940-949, 2007. ISSN 0308-8146.
- 22 DA SILVA, R. P. et al. Os riscos em potencial do uso indiscriminado de plantas medicinais. 2010.
- 23 MERINO, F. et al. Análise fitoquímica, potencial antioxidante e toxicidade do extrato bruto etanólico e das frações da espécie *Senecio westermanii* Dusén frente à *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, n. a00101s1, p. 1031-1040, 2015. ISSN 1516-0572.
- 24 ODEH, I. et al. Effect of harvesting date and variety of date palm on antioxidant capacity, phenolic and flavonoid content of date palm (*Phoenix dactylifera*). **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 2, n. 8, p. 499-505, 2014.
- 25 LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009. ISSN 1383-5742.

- 26 BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F. D.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Rev Bras Farmacogn**, v. 17, n. 3, p. 444-7, 2007.
- 27 COSTA, D. A. et al. Constituintes químicos, fenóis totais e atividade antioxidante de *Sterculia striata* St. Hil. et Naudin. **Acta Amazonica**, v. 40, n. 1, p. 207-212, 2010.
- 28 FRANÇA, I. S. X. D. et al. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 61, n. 2, 2008.
- 29 PEREIRA, R. P. et al. Antioxidant effects of different extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus*. **Neurochemical research**, v. 34, n. 5, p. 973-983, 2009.
- 30 CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.
- 31 LEAL-COSTA, M. V. et al. Avaliação da qualidade das plantas medicinais comercializadas no Mercado Municipal de Campos dos Goytacazes-RJ. **Revista Fitos Eletrônica**, 2018.
- 32 FOGLIO, M. A. et al. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **Construindo a história dos produtos naturais**, v. 7, p. 1-8, 2006.
- 33 PUPO, M. T.; GALLO, M. B. C.; VIEIRA, P. C. Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1446, 2007.
- 34 DE ALMEIDA, E. S.; NAVAS, R.; GONÇALVES, E. M. Compostos fenólicos totais e características físico-químicas de frutos de jabuticaba. **Gaia Scientia**, v. 12, n. 1, 2018.
- 35 MTUNZI, F. M. et al. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*.
- 36 BRASIL; BÁSICA, D. D. S. S. D. A. À. S. D. D. A. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica**: Ministério da Saúde Brasília^ eDF DF 2012.
- 37 DAR, M. S.; JOO, G. N.; GANAIE, S. A. Medicinal plants used by tribal and rural community of Sata Pokhran area of tehsil Pampore of district Pulwama, Jammu and Kashmir-India. 2018.
- 38 KOHZADI, S. et al. Concentration, Source, and Potential Human Health Risk of Heavy Metals in the Commonly Consumed Medicinal Plants. **Biological Trace Element Research**, p. 1-10, 2018.

- 39 VIAU, C. M. et al. The natural triterpene  $3\beta$ ,  $6\beta$ ,  $16\beta$ -trihydroxy-lup-20 (29)-ene obtained from the flowers of *Combretum leprosum* induces apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 14, n. 1, p. 280, 2014.
- 40 FACUNDO, V. A. et al. Triterpenes and flavonoids from *Combretum leprosum*. **Phytochemistry**, v. 32, n. 2, p. 411-415, 1993.
- 41 ALVES FILHO, F. D. C. et al. Long-lasting endothelium-dependent relaxation of isolated arteries caused by an extract from the bark of *Combretum leprosum*. **Einstein (São Paulo)**, v. 13, n. 3, p. 395-403, 2015.
- 42 LACOUTH-SILVA, F. et al. The effect of  $3\beta,6\beta,16\beta$ -trihydroxylup-20 (29)-ene lupane compound isolated from *Combretum leprosum* Mart. on peripheral blood mononuclear cells. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, n. 1, p. 420, 2015. ISSN 1472-6882.
- 43 MAIA, G. N. **Caatinga árvores e arbustos e suas utilidades**. Leitura & Arte, 2004. .
- 44 SOARES NETO, R. L.; CORDEIRO, L. S.; LOIOLA, M. I. B. Flora of Ceará, Brazil: Combretaceae. **Rodriguésia**, v. 65, n. 3, p. 685-700, 2014.
- 45 LOPES, L. et al. Antinociceptive effect on mice of the hydroalcoholic fraction and (-) *epi*-catechin obtained from *Combretum leprosum* Mart & Eich. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 12, p. 1184-1192, 2010..
- 46 LONGHI-BALBINOT, D. T. et al. Anti-inflammatory effect of triterpene  $3\beta$ ,  $6\beta$ ,  $16\beta$ -trihydroxylup-20 (29)-ene obtained from *Combretum leprosum* Mart & Eich in mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 142, n. 1, p. 59-64, 2012.
- 47 DA SILVA HORINOUCI, C. D. et al. *Combretum leprosum* Mart. (Combretaceae): potential as an antiproliferative and anti-inflammatory agent. **Journal of ethnopharmacology**, v. 145, n. 1, p. 311-319, 2013.
- 48 NUNES, P. et al. Antiulcerogenic activity of *Combretum leprosum*. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 64, n. 1, p. 58-62, 2009.
- 49 FACUNDO, V. A. et al. Arjunolic acid in the ethanolic extract of *Combretum leprosum* root and its use as a potential multi-functional phytomedicine and drug for neurodegenerative disorders: anti-inflammatory and anticholinesterasic activities. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6B, p. 1309-1312, 2005. I
- 50 DO NASCIMENTO-NETO, L. G. et al. Effect of the triterpene  $3\beta$ ,  $6\beta$ ,  $16\beta$ -trihydroxylup-20 (29)-ene isolated from the leaves of *Combretum leprosum* Mart. on cutaneous wounds in mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 171, p. 116-120, 2015.



- 51 DELLA-PACE, I. D. et al. Triterpene 3 $\beta$ , 6 $\beta$ , 16 $\beta$  trihidroxilup-20 (29)-ene protects against excitability and oxidative damage induced by pentylenetetrazol: The role of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity. **Neuropharmacology**, v. 67, p. 455-464, 2013.
- 52 BARROS, N. B. et al. Liposomal-lupane system as alternative chemotherapy against cutaneous leishmaniasis: Macrophage as target cell. **Experimental parasitology**, v. 135, n. 2, p. 337-343, 2013.
- 53 MORAES, L. S. et al. Medicinal plant *Combretum leprosum* mart ameliorates motor, biochemical and molecular alterations in a Parkinson's disease model induced by MPTP. **Journal of ethnopharmacology**, v. 185, p. 68-76, 2016.
- 54 FERNANDES, F. F. et al. Counteraction of Bothrops snake venoms by *Combretum leprosum* root extract and arjunolic acid. **Journal of ethnopharmacology**, v. 155, n. 1, p. 552-562, 2014.
- 55 LONGHI-BALBINOT, D. T. et al. Spinal antinociception evoked by the triterpene 3 $\beta$ , 6 $\beta$ , 16 $\beta$ -trihydroxilup-20(29)-ene in mice: evidence for the involvement of the glutamatergic system via NMDA and metabotropic glutamate receptors. **European journal of pharmacology**, v. 623, n. 1-3, p. 30-36, 2009.
- 56 DA SILVA LOPES, L. et al. Mechanisms of the antinociceptive action of (-) *epi*-catechin obtained from the hydroalcoholic fraction of *Combretum leprosum* Mart & Eic in rodents. **Journal of biomedical science**, v. 19, n. 1, p. 68, 2012.
- 57 DE SOUSA LIRA, S. R. et al. Preliminary studies on the analgesic properties of the ethanol extract of *Combretum leprosum*. **Pharmaceutical biology**, v. 40, n. 3, p. 213-215, 2002.
- 58 EVARISTO, F. F. V. et al. Antimicrobial effect of the triterpene 3 $\beta$ , 6 $\beta$ , 16 $\beta$ -trihydroxilup-20(29)-ene on planktonic cells and biofilms from Gram positive and Gram negative bacteria. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.
- 59 DE LIMA, É. R. et al. Avaliação da bioatividade do extrato etanólico e triterpeno lupano obtidos de *Combretum leprosum* contra microorganismos. **Saber Científico**, v. 3, n. 1, p. 53-69, 2011.
- 60 TELES, C. B. et al. Activity of the Lupane isolated from *Combretum leprosum* against *Leishmania amazonensis* promastigotes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 5, p. 936-942, 2011.
- 61 TELES, C. B. G. et al. A lupane-triterpene isolated from *Combretum leprosum* Mart. fruit extracts that interferes with the intracellular development of *Leishmania (L.) amazonensis* in vitro. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, n. 1, p. 165, 2015.
- 62 ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. 2010.

- 63 NASCIMENTO, J. É. C. et al. Avaliação do potencial antioxidante e anti-*Helicobacter pylori* in vitro de extratos de plantas medicinais utilizadas popularmente na região amazônica. 2017.
- 64 SOUSA, C. D. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.
- 65 SUCUPIRA, N. R. et al. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **Journal of Health Sciences**, v. 14, n. 4, 2015.
- 66 MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarín J. Sci. Technol**, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.
- 67 GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of toxicology**, v. 86, n. 3, p. 345-391, 2012.
- 68 RODRIGUES, L. S.; DA SILVA, A. R. A.; MACÊDO, A. A. M. Noni (*Morinda citrifolia* Linn.): Determinação Fitoquímica e Potencial Antioxidante pelo Método DPPH. **Conexões-Ciência e Tecnologia**, v. 11, n. 4, p. 47-54, 2017.
- 69 OLIVEIRA, G. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 17, n. 1, p. 36-44, 2015.
- 70 BHANDARI, K. et al. Chemometrics Based Extraction of polyphenolics from fresh tea leaves and processed tea showing in-silico docking and anti-oxidative theronostic dietary adjuvant in Alzheimer. **Indo Global J Pharm Sci**, v. 5, n. 3, p. 171-191, 2015.
- 71 CIEŚLA, Ł. et al. Approach to develop a standardized TLC-DPPH test for assessing free radical scavenging properties of selected phenolic compounds. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 70, p. 126-135, 2012.
- 72 DENG, J.; CHENG, W.; YANG, G. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. **Food Chemistry**, v. 125, n. 4, p. 1430-1435, 2011.
- 73 MUSA, K. H. et al. A novel high throughput method based on the DPPH dry reagent array for determination of antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 141, n. 4, p. 4102-4106, 2013.
- 74 OLIVEIRA, G. Determination in vitro of the antioxidant capacity of natural products by the DPPH• method: review study. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 17, n. 1, p. 36-44, 2015.
- 75 FIDYASARI, A.; WULANDARI, S.; SARI, M. I. Secondary Metabolite And Antioxidant Activity of Soursop (*Annona Montana*) Fruit Extract. **International Journal of Technology and Sciences**, v. 1, n. 2, 2017.

- 76 TOMEI, R. R.; SALVADOR, M. J. Metodologias analíticas atuais para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais. **Encontro Latino Americano de Iniciação Científica**, v. 11, p. 1963-1967, 2007.
- 77 RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.
- 78 SHALABY, E. A.; SHANAB, S. M. Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. 2013.
- 79 CANO, A.; ARNAO, M. B. ABTS/TEAC (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) /Trolox®-Equivalent Antioxidant Capacity) radical scavenging mixed-mode assay. **Measurement of Antioxidant Activity and Capacity: Recent Trends and Applications**, p. 117, 2018.
- 80 MERINO, F. et al. Phytochemical analysis, antioxidant potential and toxicity of crude ethanol extract and fractions of the species *Senecio westermanii* Dusén against *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 1031-1040, 2015.
- 81 CARVALHO, A. A. et al. Phenolic derivatives and antioxidant activity of polar extracts from *Bauhinia pulchella*. **Química Nova**, v. 41, n. 4, p. 405-411, 2018.
- 82 DALL, L. H.; ARCHELA, E. Determinação de compostos fenólicos em vinho: uma revisão. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 34, n. 2, p. 193-210, 2014.
- 83 PIETTA, P.-G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of natural products**, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.
- 84 DORNAS, W. C. A. et al. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. 2007.
- 85 MARTELLI, F.; NUNES, F. M. F. Radicais livres: em busca do equilíbrio. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 3, p. 54-57, 2014.
- 86 RONSEIN, G. E. et al. Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 563-568, 2006.
- 87 DE BRITO, B. N. et al. **Determinação de Fenóis Totais em Produtos Derivados de Frutas do Cerrado**. Anais do Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão da UEG (CEPE)(ISSN 2447-8687), 2018. p.
- 88 DA SILVA COUTO, C. V. M. et al. Compostos fenólicos e antocianinas: relação com o estresse oxidativo, mecanismos de citoproteção e tumorigênese. **Tópicos especiais em Ciência Animal VI**, p. 109, 2017.

- 89 DEY, T. B. et al. Antioxidant phenolics and their microbial production by submerged and solid state fermentation process: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 53, p. 60-74, 2016.
- 90 VÁZQUEZ, C. V. et al. Total phenolic compounds in milk from different species. Design of an extraction technique for quantification using the Folin–Ciocalteu method. **Food Chemistry**, v. 176, p. 480-486, 2015.
- 91 DA SILVA, N. L. A.; MIRANDA, F. A. A.; DA CONCEIÇÃO, G. M. Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia Plena**, v. 6, n. 2, 2010.
- 92 LORDÊLO CARDOSO SILVA, M. et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, 2010.
- 93 DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão acadêmica**, v. 5, n. 1, 2004.
- 94 DORNAS, W. et al. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 3, p. 241-249, 2009.
- 95 PEIXOTO SOBRINHO, T. J. D. S. et al. Optimization of analytic methodologies for quantifying flavonoids of *Bauhinia cheilantha* (bongard) steudel. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 288-291, 2010.
- 96 BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. D. L. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. 2006.
- 97 CHEN, G.-L. et al. Total phenolic contents of 33 fruits and their antioxidant capacities before and after in vitro digestion. **Industrial Crops and Products**, v. 57, p. 150-157, 2014.
- 98 ROVER, M. R.; BROWN, R. C. Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin–Ciocalteu method. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 104, p. 366-371, 2013.
- 99 OLIVEIRA, A. C. D. et al. Vegetals as natural sources of antioxidants. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.
- 100 WOOTTON-BEARD, P. C.; MORAN, A.; RYAN, L. Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after *in vitro* digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 217-224, 2011.

- 101 SCHMIDT, P.; GONZÁLEZ ORTEGA, G. Passionsblumenkraut-Bestimmung des Gesamtflavonoidgehaltes von Passiflorae herba. **Deutsche Apotheker Zeitung**, v. 133, n. 47, p. 17-28, 1993.
- 102 MARCUCCI, M. C.; WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. **Mensagem doce**, v. 46, n. 3, p. 234-239, 1998.
- 103 SILVA, J. B. et al. Quantificação de fenóis, flavonoides totais e atividades farmacológicas de geoprópolis de Plebeia aff. Flavocincta do Rio Grande do Norte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 9, p. 874-880, 2016.
- 104 PERES, T. B. Noções básicas de cromatografia. **Revista Biológica, São Paulo**, v. 64, n. 2, p. 227-229, 2002.
- 105 RIBEIRO, C. M. R. et al. A Videoaula “Cromatografia em Camada Delgada” e a Motivação da Aprendizagem nas Disciplinas Experimentais de Química Orgânica dos Cursos de Química, Engenharia Química e Farmácia da UFF. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 3, p. 1030-1055, 2015.
- 106 COLLINS, C. H. Michael Tswett e o “nascimento” da cromatografia. **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 1, p. 07-20, 2009.
- 107 DE OLIVEIRA, G. A.; SILVA, F. C. Cromatografia em papel: reflexão sobre uma atividade experimental para discussão do conceito de polaridade. **Química Nova Escola**, v. 39, n. 2, p. 162-169, 2017.
- 108 CHAVES, M. H. Analysis of extracts of plants by tlc: a methodology applied in the "organic chemistry" discipline. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 560-562, 1997.
- 109 COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. Introdução a métodos cromatográficos. In: (Ed.). **Introdução a métodos cromatográficos**, 1988.
- 110 SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p. 435-440, 2010.
- 111 SILVA, R. S. et al. Óleo essencial de limão no ensino da cromatografia em camada delgada. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2234-2237, 2009.
- 112 TOUCHSTONE, J. C. **Practice of thin layer chromatography**. John Wiley & Sons, 1992.
- 113 DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, v. 7, p. 21-25, 1998.
- 114 KOCISIS, L. et al. Effect of the preparation conditions on the surface-enhanced Raman-spectrometric identification of thin-layer-chromatographic spots.

- Journal of Chromatography A**, v. 845, n. 1-2, p. 197-202, 1999. ISSN 0021-9673.
- 115 KUMAR, S. D.; KUMAR, D. H. Importance of RP-HPLC in analytical method development: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 3, n. 12, p. 4626, 2012.
- 116 TONHI, E. et al. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, 2002.
- 117 SAHU, P. K. et al. An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2017.
- 118 SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to modern liquid chromatography**. John Wiley & Sons, 2011.
- 119 COSKUN, O. Separation techniques: chromatography. **Northern clinics of Istanbul**, v. 3, n. 2, p. 156, 2016.
- 120 BONATO, P. S.; COLLINS, C.; BRAGA, G. Fundamentos de Cromatografia. **Campinas, SP: Editora da Unicamp**, 2006.
- 121 JANDERA, P.; HÁJEK, T. Mobile phase effects on the retention on polar columns with special attention to the dual hydrophilic interaction–reversed-phase liquid chromatography mechanism, a review. **Journal of separation science**, v. 41, n. 1, p. 145-162, 2018.
- 122 THAMMANA, M. A review on high performance liquid chromatography (HPLC). **Department of Pharmacy, Vignan Institute of Pharmaceutical Technology, Duvvada, India**, v. 25, 2016.
- 123 SILVA, C. G. A. D.; COLLINS, C. H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Química Nova**, 2011.
- 124 PINHO, D. D. et al. Avaliação da atividade mutagênica da infusão de *Baccharis trimera* (Less.) DC. em teste de *Allium cepa* e teste de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 165-170, 2010.
- 125 NEVES, C. S. *Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen (ginseng brasileiro): citogenotoxicidade no ensaio de *Allium cepa* L. 2013.
- 126 LESSA, L. R.; DA SILVA, M. C. C.; CARIELLO, F. D. M. R. Fundamentos e aplicações do *Allium cepa* como bioindicador de mutagenicidade e citotoxicidade de plantas medicinais. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 10, n. 3, 2017.

- 127 TEDESCO, M. et al. Assessment of the antiproliferative and antigenotoxic activity and phytochemical screening of aqueous extracts of *Sambucus australis* Cham. & Schltdl.(ADOXACEAE). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 3, p. 2141-2154, 2017.
- 128 FELICIDADE, I. et al. Mutagenic and antimutagenic effects of aqueous extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) on meristematic cells of *Allium cepa*. **Genet Mol Res**, v. 13, n. 4, p. 9986-9996, 2014.
- 129 PRAJITHA, V.; THOPPIL, J. Genotoxic and antigenotoxic potential of the aqueous leaf extracts of *Amaranthus spinosus* Linn. using *Allium cepa* assay. **South African Journal of Botany**, v. 102, p. 18-25, 2016.
- 130 GUIDOTI, D. G. G. et al. Potencial mutagênico do extrato aquoso de *Allium cepa* L. em células hematopoiéticas de ratos Wistar. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 12, n. 1, p. 42, 2014.
- 131 Menon, G. S.; Vichare, V.; Gharge, S. Evaluation of cytotoxic effect of smokeless tobacco extract Using *Allium Cepa* abberation assay. 2018.
- 132 PASTORI, T. et al. Genotoxic and antiproliferative action of *Polygonum punctatum* Elliott (Polygonaceae) on the cell cycle of *Allium cepa* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 2, p. 186-194, 2015.
- 133 FENECH, M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 392, n. 1, p. 11-18, 1997.
- 134 DE OLIVEIRA MENEGUETTI, D. U. et al. Adaptação da técnica de micronúcleo em *Allium cepa*, para futuras análises de mutagenicidade dos rios da região do Vale do Jamari, Rondônia, Amazônia Ocidental/Adaptation of the technique of micronucleus in *Allium cepa* for future analysis of. **Revista Pesquisa & Criação**, v. 10, n. 2, p. 181-187, 2011.
- 135 SLESINSKI, R. et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the genotoxic potential of 2-ethyl-1, 3-hexanediol. **Toxicology**, v. 53, n. 2-3, p. 179-198, 1988.
- 136 MACGREGOR, J. T. et al. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 189, n. 2, p. 103-112, 1987.
- 137 DE SOUZA FREIRE, I. et al. Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and hematotoxicity of the recombinant spore-crystal complexes Cry1Ia, Cry10Aa and Cry1Ba6 from *Bacillus thuringiensis* in Swiss mice. **Toxins**, v. 6, n. 10, p. 2872-2885, 2014.
- 138 FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent—Trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 6, p. 1680-1686, 2009.

- 139 VARGAS, C. et al. Efecto citotóxico del hipoclorito de sodio (NaClO), en células apicales de raíces de cebolla (*Allium cepa* L.). 2017.
- 140 DE CARVALHO, L. G. et al. Análises citológicas do inseticida Deltametrina usando o Teste de Micronúcleo. **Revista da Biologia**, v. 17, n. 1, p. 1-5, 2017.
- 141 MATOS, F. D. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. edições UFC, 1997.
- 142 SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.
- 143 NUNES, P. H. M. et al. Gastric antiulcerogenic and hypokinetic activities of *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc.(Combretaceae). **BioMed research international**, v. 2014, 2014.
- 144 DO SANTOS, R. C. et al. Antioxidant, anti-rheumatic and anti-inflammatory investigation of extract and dicentrinone from *Duguetia furfuracea* (A. St.-Hil.) Benth. & Hook. f. **Journal of ethnopharmacology**, v. 211, p. 9-16, 2018.
- 145 BOROSKI, M. et al. **Antioxidantes: princípios e métodos**: Appris 2015.
- 146 GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in *Allium*: A report of the US Environmental Protection Agency gene-tox program. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 99, n. 3, p. 273-291, 1982.
- 147 MANGA, F. N. et al. Vascular effects and antioxidant activity of two *Combretum* species from Democratic Republic of Congo. **Journal of ethnopharmacology**, v. 142, n. 1, p. 194-200, 2012.
- 148 UMOH, S. et al. 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical Effect and Phytochemical Constituents of *Combretum platypetalum* Welw. ex. MA Lawson subsp. oatesii (Rolfe) Exell Leaf.
- 149 BHATNAGAR, S. et al. Phytochemical analysis, Antioxidant and Cytotoxic activity of medicinal plant *Combretum roxburghii* (Family: Combretaceae). **International journal of drug development and research**, v. 4, n. 1, p. 193-202, 2012.
- 150 FOSSEN, T.; ANDERSEN, Ø. M. Spectroscopic techniques applied to flavonoids. **Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications**, p. 37-142, 2006.
- 151 AHMED, A. S. et al. Polarity of extracts and fractions of four *Combretum* (Combretaceae) species used to treat infections and gastrointestinal disorders in southern African traditional medicine has a major effect on different relevant in vitro activities. **Journal of ethnopharmacology**, v. 154, n. 2, p. 339-350, 2014.



- 152 MUDDATHIR, A. et al. Anti-tyrosinase, total phenolic content and antioxidant activity of selected Sudanese medicinal plants. **South African Journal of Botany**, v. 109, p. 9-15, 2017.
- 153 ADEROGBA, M. et al. Isolation of antioxidant constituents from *Combretum apiculatum* subsp. *apiculatum*. **South African Journal of Botany**, v. 79, p. 125-131, 2012.
- 154 KAROU, D. et al. Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 8, p. 823-828, 2005.
- 155 SANTOS, S. N. et al. Antitumoral, antioxidant and antimicrobial molecules from *Combretum rupicola*. **Embrapa Meio Ambiente-Artigo em periódico indexado**, 2013.
- 156 SCHAICH, K.; TIAN, X.; XIE, J. Reprint of “Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays”. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 782-796, 2015.
- 157 BIANCHI, J.; FERNANDES, T. C. C.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of mitotic and chromosomal abnormalities on *Allium cepa* cells by pesticides imidacloprid and sulfentrazone and the mixture of them. **Chemosphere**, v. 144, p. 475-483, 2016.
- 158 STANGE, V. S. et al. Avaliação do efeito mutagênico do extrato hidroalcoólico bruto, por meio de bioensaios *in vivo* e prospecção fitoquímica de *Cecropia glaziovii* Sneth (embaúba), Cecropiaceae. **Rev. Bras. Farmacog**, v. 19, n. 2B, p. 637-642, 2009.
- 159 MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n. 4, p. 673-751, 2000.
- 160 JABEEN, E. et al. Radical scavenging propensity of Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> complexes of flavonoids and in-vivo radical scavenging by Fe<sup>3+</sup>-primuletin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 171, p. 432-438, 2017.
- 161 JACACOBOWSKI, A. C. et al. Efeito mutagênico do edetato de cobre ([Cu (EDTA)]<sup>-2</sup>) livre e nanoencapsulado em camundongos e peixes. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 8, n. 1, p. 13-19, 2013.
- 162 SAWADOGO, W. R. et al. Traditional West African pharmacopeia, plants and derived compounds for cancer therapy. **Biochemical pharmacology**, v. 84, n. 10, p. 1225-1240, 2012.
- 163 BÄCKER, C. et al. Inhibition of DNA–Topoisomerase I by Acylated Triterpene Saponins from *Pittosporum angustifolium* Lodd. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 6, n. 2, p. 141-147, 2016.

- 164 HERRERO, O. et al. Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the *Allium cepa* test. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 743, n. 1, p. 20-24, 2012.
- 165 BIANCHI, J.; MANTOVANI, M. S.; MARIN-MORALES, M. A. Analysis of the genotoxic potential of low concentrations of Malathion on the *Allium cepa* cells and rat hepatoma tissue culture. **Journal of Environmental Sciences**, v. 36, p. 102-111, 2015.
- 166 SALERI, F. D. et al. Comparative analysis of saponins from different phytolaccaceae species and their antiproliferative activities. **Molecules**, v. 22, n. 7, p. 1077, 2017.
- 167 MACHADO, H. et al. Flavonóides e seu potencial terapêutico. 2008.
- 168 ARALDI, R. P. et al. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: a review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 72, p. 74-82, 2015.
- 169 DE MÉLO, M. E. B. et al. Ação mutagênica do inseticida organofosforado temefós em células de medula óssea de camundongos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 67, n. 3, p. 196-201, 2008.
- 170 DINIZ, P. A. Análise da frequência de micronúcleos frente à utilização de colutórios bucais. 2011.
- 171 MARTINS NETTO, J.; DINIZ, H. **Perspectivas de redução de íons metálicos nas águas subterrâneas a partir de processos de desincrustação química em poços tubulares profundos—estudo de um caso em Ribeirão Preto, SP. Livro de Resumos. XII Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas, Florianópolis, ABAS/DNPM/UFSC-PPGEA,-2002, CD-ROM, 2002. p.**
- 172 NEPOMUCENO, J. C.; SILVA, A. Avaliação da frequência de micronúcleos em eritrócitos periféricos de mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) do rio Paranaíba. **Perquirere.[Internet]**, v. 7, n. 1, p. 167-79, 2010.
- 173 VARANDA, E. A.; MONTI, R.; TAVARES, D. C. Inhibitory effect of propolis and bee venom on the mutagenicity of some direct-and indirect-acting mutagens. **Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis**, v. 19, n. 6, p. 403-413, 1999.
- 174 MENDONÇA, E. D. et al. Genotoxic, mutagenic and antigenotoxic effects of *Cecropia pachystachya* Trécul aqueous extract using in vivo and in vitro assays. **Journal of ethnopharmacology**, v. 193, p. 214-220, 2016.
- 175 CHE, J.-H. et al. Genotoxicity and subchronic toxicity of Sophorae radix in rats: hepatotoxic and genotoxic potential. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 71, n. 3, p. 379-387, 2015.