

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ

CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA,
ISOLAMENTO, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
CITOGENOTÓXICA DO EXTRATO ETANÓLICO E
FRAÇÕES DE FOLHAS DE *Heliotropium elongatum*
(LEHM) I.M. JOHNST.**

POLIANA PAULA SALES

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

Co-ORIENTADOR(A): PROF. DR. Joaquim Soares da Costa Júnior

Teresina – PI

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ

CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA,
ISOLAMENTO, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
CITOGENOTÓXICA DO EXTRATO ETANÓLICO E
FRAÇÕES DE FOLHAS DE *Heliotropium elongatum*
(LEHM) I.M. JOHNST.**

POLIANA PAULA SALES

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 Síntese Orgânica e Bioprospecção Fitoquímica.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Marcos de Almeida

Teresina – PI

2023

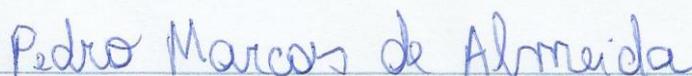
**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA, ISOLAMENTO, ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE E CITOGENOTÓXICA DO EXTRATO ETANÓLICO E
FRAÇÕES DE FOLHAS DE *Heliotropium elongatum* (LEHM) I.M.
JOHNST.**

POLIANA PAULA SALES

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 **Síntese Orgânica e Bioprospecção Fitoquímica**.

Aprovado em 21 de agosto de 2023.

Membros da Banca:



Prof. Dr. Pedro Marcos de Almeida

(Presidente da Banca – UESPI)



Prof(a). Dr(a). Valdíleia Teixeira Uchôa

(Membro Titular – UESPI)



Prof(a). Dr(a). Ana Paula Peron

(Membro Titular – UTFPR)



Prof. Dr. José Rafael da Silva Araujo

(Membro Suplente – IFRN)

Teresina – PI

2023

Dedico:

A Deus;

Aos meus filhos Julyanna e João Pedro;

Aos meus pais Francisco Rodrigues de Sales (in memoriam) e Maria de Nazaré Araújo Paula, às minhas irmãs e suas famílias: Taciana, Fabiana e Rosana.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela fé e coragem que me fortalecem diariamente. Aos meus filhos pelo amor, motivação, compreensão e amizade. Aos meus familiares pelo incentivo e credibilidade. Essas são as bases de sustentação para minhas vitórias.

Ao meu orientador prof. Dr. Pedro Marcos de Almeida pelos ensinamentos, apoio, amizade, colaboração, compreensão e por me encaminhar as pessoas certas. Professor, Deus me encaminhou a você e toda a pesquisa se fez! Ao Prof. Dr. Francisco Artur e Silva Filho pelos conhecimentos transmitidos, amizade, paciência e oportunidade de explorar ainda mais nossa pesquisa. A doutoranda Maria das Dores Alves de Oliveira do IFPI pela colaboração e mentoria do início ao fim deste trabalho.

À instituição UESPI, ao programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ). Aos professores do PPGQ, aos colegas de turma com quem tiver a oportunidade e o prazer de conviver, eles colaboram muito, mesmo a distância, fiz amizades que levarei para a vida. Aos Laboratórios de Produtos Orgânicos e de Alimentos dos IFPIs, foram experiências enriquecedoras. As agências de fomento que contribuíram com o financiamento da pesquisa FAPEPI, CAPES e CNPq.

Aos meus empregadores Seduc-MA e PML em especial as minhas chefes imediatas professora Maria Luiza Machado Lima e Antônia Laiana da Costa Fenelon que declararam minha disponibilidade para fazer o curso. Aos meus alunos pela inspiração e motivação. A todos aqueles que, de alguma forma, colaboraram com efetivação desse projeto profissional e pessoal: o mestrado.

Epígrafe

“Deus colocou as plantas nas nossas vidas para que sirva de alimento
(Gênesis 1:29). Seus frutos serão comestíveis e suas folhas servirão de remédio

(Ezequiel 47:12) ”

(Bíblia sagrada)

RESUMO

SALES, P.P. **Caracterização Fitoquímica, Isolamento, Atividade Antioxidante e Citogenotóxica do Extrato Etanólico e Frações de Folhas de *Heliotropium elongatum* (Lehm) I.M. Johnst.** 2023. 86 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual do Piauí. Teresina.

Heliotropium elongatum (Lehm.) I.M. Johnst., conhecida popularmente como fedegoso, é utilizada para inflamação, tosse e gripe. O objetivo deste estudo foi caracterizar o perfil fitoquímico, isolar biocompostos, avaliar o teor de compostos fenólicos (TCF), atividade antioxidante e citogenotóxica do extrato etanólico (EE) e frações das folhas de *H. elongatum*. Na prospecção fitoquímica, foi detectado ácidos orgânicos, açúcares redutores, flavonoides, saponinas, antraquinonas, esteroides/triterpenos e dipsídeos/depsídonas no EE e/ou frações Hexânica/FH, Clorofórmica/FC, Acetato de Etila/FAE e Hidrometanólica/FHM. O maior TCF e maior atividade antioxidante (DPPH e ABTS) foi observada na FHM. Na FH, foram identificados 16 compostos por CG-EM e o ácido ursólico foi identificado por RMN ¹H e RMN ¹³C. A CLAE-DAD do EE, FAE e FHM mostrou comprimentos de ondas característicos para flavonoides, flavonóis, flavonas e antraquinonas. A análise por ESI-IT/MSⁿ do EE, FAE, FC e FHM revelou 17 metabólitos nas classes de alcaloides, esteroides, terpenoides, flavonoides e ácidos fenólicos. Em *Allium cepa* L não houve efeito citotóxico nas concentrações 62,5 a 1000 µg/mL do EE, em 1000 µg/mL da FHM e 62,5 µg/mL da FAE. As concentrações 62,5 a 500 µg/mL da FHM e 125 a 1000 µg/mL da FAE apresentou citotóxicidade. A genotoxicidade foi evidenciado no EE 500 e 1000 µg/mL e em todas as concentrações 62,5 a 1000 µg/mL da FHM, caracterizado pela presença significativa de MN e BN. A FAE não apresentou genotoxicidade. Os resultados confirmaram compostos de interesse medicinal, atividade antioxidante e alterações citogenotóxicas (EE e/ou FAE e FHM), evidenciando cautela para fins medicinais e a necessidade de ampliar estudos toxicológicos.

Palavras-Chave: *A. cepa*, alterações cromossômicas, metabólitos secundários, plantas medicinais.

Abstract

SALES, P. P. Phytochemical characterization, Isolation, Antioxidant and Cytogenotoxic Activity of Ethanolic Extract and Fractions of *Heliotropium elongatum* Leaves (Lehm) I.M. Johnst. 2023. 86 p. Dissertation (Master in Chemistry) – State University of Piauí. Teresina.

Heliotropium elongatum is used to treat inflammation, cough, and flu. This study aimed to characterize the phytochemical profile and evaluate the total phenolic content (TPC), antioxidant and cytogenotoxic activity of the ethanolic extract (EE), and fractions of *H. elongatum* leaves. In the phytochemical prospection, organic acids, reducing sugars, flavonoids, saponins, anthraquinones, steroids/triterpenes, and depsides/depsidones were detected in the EE and/or fractions Hexanic/FH, Chloroformic/FC, Ethyl Acetate/FAE, and Hydromethanolic/FHM. The highest TPC and highest antioxidant activity (DPPH and ABTS) was observed in FHM. In FH, 16 compounds were identified by GC-MS, and Ursolic acid was isolated by ¹H NMR and ¹³C NMR. HPLC-DAD from EE, FAE, and FHM showed characteristic wavelengths for flavonoids, flavonols, flavones, and anthraquinones. ESI-IT/MSⁿ analysis of EE, FC, FAE, and FHM revealed alkaloids, steroids, terpenoids, flavonoids, and phenolic acids. In *Allium cepa*, there was no cytotoxic effect in EE 62.5 to 1,000 µg/mL, FHM 1,000 µg/mL, and FAE 62.5 µg/mL. Genotoxicity was evidenced only in EE 500 and 1,000 µg/mL, and FHM 62.5 to 1,000 µg/mL) with the presence of MN and BN. The results confirmed compounds of medicinal interest, with antioxidant activity, and causing cytogenotoxic changes, evidencing the need for caution when using them for medicinal purposes.

Keywords: *A. cepa*, chromosomal alterations, secondary metabolites, medicinal plants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Planta <i>Heliotropium elongatum</i>	22
Figura 2.2 Estrutura química básica de flavonoides.....	25
Figura 2.3 Reação entre o radical DPPH• e um antioxidante.....	26
Figura 2.4 Estabilização do radical ABTS ⁺ por um antioxidante.....	27
Figura 2.5 Alterações cromossômicas de efeitos aneugênico e clastogênico.....	29
Figura 3.1 Fluxograma de partição líquido-líquido do extrato etanpolico e frações das folhas de <i>H. elongatum</i>	32
Figura 3.2 Cromatografia em coluna da FH das folhas de <i>H. elongatum</i>	37
Figura 4.1 Espectro de I.V. de FHHE-1 com pastilhas de KBr	47
Figura 4.2 Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, C ₅ D ₅ N) de FHHE-1.....	48
Figura 4.3 Espectro de RMN ¹³ C-CPD (75 MHz, C ₅ D ₅ N) de FHHE-1.....	49
Figura 4.4 Espectro de RMN ¹³ C, DEPT 135° (75 MHz, C ₅ D ₅ N) de FHHE-1	50
Figura 4.5 Espectro de massa de FHHE-1 (i.e. a 70 eV).....	51
Figura 4.6 Rota de fragmentação do ácido ursólico	52
Figura 4.7 Estrutura química do ácido ursólico.....	53
Figura 4.8 Cromatograma do EE das folhas de <i>H. elongatum</i> obtido através de análise exploratória com MeOH/H ₂ O	55
Figura 4.9 Espectros no ultravioleta dos compostos majoritários do cromatograma obtido através da análise exploratória de MeOH/H ₂ O do EE de <i>H. elongatum</i>	56
Figura 4.10 Cromatograma da FAE das folhas de <i>H. elongatum</i> obtido através de análise exploratória com MeOH/H ₂ O.....	57
Figura 4.11 Espectros no ultravioleta dos compostos majoritários do cromatograma obtido através da análise exploratória de MeOH/H ₂ O da FAE das folhas de <i>H. elongatum</i>	57
Figura 4.12 Cromatograma de identificação por CLAE-DAD de compostos da FHM das folhas de <i>H. elongatum</i> obtido através de análise exploratória com MeOH/H ₂ O	58
Figura 4.13 Espectros no ultravioleta dos compostos majoritários do cromatograma obtido através da análise exploratória de MeOH/H ₂ O da FHM das folhas de <i>H. elongatum</i>	58

Figura 4.14 Cromatograma de íons totais detectado por GC-MS da fração hexânica das folhas de *H. elongatum* nos tempos de 4 a 20 (A), 20 a 75 (B) e 40 a 90 min. (C).....60

Figura 4.15 Orbitrap MS fingerprinting das frações obtidas da extração líquido-líquido do extrato das folhas do etanólico de *Heliotropium*.....66

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Principais metabólitos secundários pertencente a classe dos terpenos.....	24
Tabela 4.1. Resultado da triagem fitoquímica do extrato etanólico e frações das folhas de <i>H. elongatum</i>	42
Tabela 4.2. Atividade antioxidante do extrato etanólico (EE); fração hexânica (FH), clorofórmica (FH), acetato de etila (FAE) e hidrometanólica (FHM) das folhas de <i>H. elongatum</i>	44
Tabela 4.3 Comparação dos dados de RMN 13C de FH-1 (75 MHz, C ₅ D ₅ N) com os do ácido ursólico (75 MHz, DMSO-d ₆).....	54
Tabela 4.4 Identificação de compostos do extrato etanólico (EE), fração Acetato de etila (FAE) e hidrometanólica (FHM) das folhas de <i>H. elongatum</i> por CLAE-DAD	59
Tabela 4.5. Compostos identificados por CG-MS na FH das folhas de <i>H. elongatum</i> distribuídas pelo tempo de retenção	62
Tabela 4.6 Efeito citogenotóxico do extrato etanólico (EE), fração hidrometanólica (FHM) e fração acetato de etila (FAE) das folhas de <i>H. elongatum</i> nas células meristemáticas de <i>A. cepa</i>	68
Tabela 4.7 Média das alterações cromossômicas em células meristemáticas de <i>A. cepa</i> após exposição ao extrato etanólico (EE), fração hidrometanólica (FHM) e fração acetato de etila (FAE) das folhas de <i>H. elongatum</i>	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA% – Atividade antioxidante

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

ABTS^{•+} – Radical do ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfônico

AC – Alteração cromossômica

BN – Broto nuclear

CAET – Capacidade antioxidante equivalente Trolox

CB: Célula binucleada

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CCD – Cromatografia de camada delgada

Cm: C-metáfase.

CN – Controle negativo

CP – Controle positivo

CP: Célula poliploide

CS – Controle de solvente

CG-EM – Cromatografia gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

CE₅₀ – Concentração eficaz para inibir 50% do radical

DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

DP: Desvio-padrão

DMSO – Dimetilsulfóxido

ESI-IT/MS – Espectrometria de massas com ionização por eletrospray

EE – Extrato etanólico

FH – Fração hexânica

FC – Fração clorofórmica

FAE – Fração acetato de etila

FHM – Fração hidrometanólica

FHHE-1 – Fração hexânica *Heliotropium elongatum* 1

GAE – Equivalentes de ácido gálico

IM – Índice mitótico

MMS – Metilmetanosulfonato

MeOH/H₂O – metanol e água

MN – Micronúcleo

OMS – Organização Mundial de Saúde

PC: Perda cromossômica

PT: Ponte cromossômica

QC: Quebra cromossômica

RMN ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN ¹³C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13

TCF – Teor dos compostos fenólicos

Uv/Vis – Espectroscopia no ultravioleta visível

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....	16
1.2 Objetivos	18
1.2.1 Gerais	18
1.2.2 Específicos.....	18
CAPÍTULO 2 – REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1 Uso Tradicional de Plantas Medicinais.....	20
2.2 Boraginaceae: Gênero <i>Heliotropium</i>	21
2.3 <i>Heliotropium elongatum</i> (LEHM) I.M. JOHNST	21
2.4 Caracterização Fitoquímica de Plantas Medicinais	22
2.4.1 Estresse Oxidativo e Avaliação da Atividade Antioxidante.....	26
2.4.2 Métodos de Cromatografia e espectroscopia na análise de compostos	27
2.5 Teste de citogenotoxicidade <i>A. cepa</i>	28
CAPÍTULO 3 – METODOLOGIA EXPERIMENTAL	31
3.1 Coleta e identificação da planta	31
3.2 Preparo e fracionamento do extrato	31
3.3 Prospecção fitoquímica	32
3.3.1 Teste para açúcares redutores.....	32
3.3.2 Teste para ácidos orgânicos	33
3.3.3 Teste para flavonoides	33
3.3.4 <i>Flavonóis, flavanonas, favanóis e xatonas</i>	33
3.3.5 <i>Teste para fenois e taninos</i>	33
3.3.6 Teste para alcaloides	33
3.3.7 Testes para esteroides e triterpenoides	34
3.3.8 Teste para antraquinonas	34
3.3.9 Teste para saponinas	34
3.3.10 <i>Depsídeos/depsidonas</i>	34
3.4 Teor dos Compostos Fenólicos (TCF).....	34
3.5 Atividade Antioxidante	35
3.5.1 <i>DPPH</i> . (2,2-difenil-1-picril-hidrazina).....	35

3.5.2 ABTS ⁺ (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)	36
3.6 Análise Cromatográfica	36
3.6.1 <i>Cromatografia de Camada Delgada (CCD)</i>	36
3.6.2 <i>Cromatografia em Coluna</i>	37
3.7 Análise Espectrométrica	38
3.7.1 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN 1H) e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 ((RMN 13C)	38
3.7.2 Espectrometria do Infravermelho	38
3.7.3 Análises por Cromatografia Líquida de alta eficiência CLAE-DAD	38
3.7.4 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)	39
3.7.5 Análise por espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-IT/MS) das folhas de <i>H. elongatum</i>	39
3.8 <i>Bioensaio A. cepa</i>	39
3.9 <i>Análise estatística</i>	41
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1 Prospecção fitoquímica	42
4.2 Teor dos Compostos Fenólicos (TCF).....	44
4.3 Atividade Antioxidante	45
4.4 Análise Cromatográfica	46
4.5 Análise Espectrométrica.....	47
4.5.1 <i>Determinação estrutural da FHHE-1</i>	47
4.5.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD)	55
4.5.3 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) da FH das folhas de <i>H. elongatum</i>	59
4.5.4 ESI(+) Orbitrap-MS fingerprinting of the extract and its fraction of the leaves from <i>H. elongatum</i>	65
4.6 <i>Bioensaio A. cepa</i>	67
CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
CAPÍTULO 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

1.1 Introdução

O uso de plantas medicinais e seus derivados para fins terapêuticos é uma prática popular antiga, utilizada por todas as civilizações do mundo, que vem sendo repassadas de modo empírico entre várias gerações. Há milhares de anos, as pessoas se utilizam de recursos da flora no tratamento de diversas patologias ¹. Além disso, são utilizadas como matéria prima para o preparo de produtos tradicionais fitoterápicos e medicamentos fitoterápicos ². Os princípios ativos de origem vegetal têm sido foco de vários estudos químicos e farmacológicos que visam elucidar dúvidas em relação a utilização de plantas medicinais como medida terapêutica ³. As pesquisas sobre os benefícios e riscos no uso dessas plantas constituem de estratégias para contribuir com evidências para ações de educação e promoção da saúde ⁴, e como incentivo ao planejamento do desenvolvimento sustentável de novos medicamentos da indústria farmacêutica ⁵.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 80% da população em países em desenvolvimento usa ervas medicinais para cuidados primários em saúde, contudo o uso inadequado e as diferentes formas de preparo aumentam os efeitos colaterais e intoxicações desses fitocompostos ⁶. Assim, investigações científicas compreendem uma maneira de controle para comprovar a segurança dessas plantas, bem como verificar a forma de preparo, que envolvem questões que misturam o conhecimento popular ao científico ⁷.

No Brasil, o uso de plantas medicinais e fitoterápicos passaram a ser regulamentados desde 2006 com a implantação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), seguida pela Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) ⁸. Desde então, essas plantas e os seus derivados vêm ganhando importância no âmbito da política nacional de saúde e para

muitas comunidades e/ou regiões essa é a alternativa mais acessível para o tratamento e controle de doenças, por não ter acesso a medicação moderna ⁹.

Heliotropium elongatum (Lehm.) I.M. Johnst. (Boraginaceae) é conhecida popularmente por crista de galo, fedegoso e crista-de-peru¹⁰, ocupando ambientes úmidos (leito de rios e riachos, margens de açudes e barragens, além de áreas sujeitas a inundações temporárias), solos arenosos e argilosos ¹¹. É uma planta tipicamente de vegetação estacional, semidecídua, savana arbórea, savana estépica, complexo vegetal do litoral, zona e vegetação sob influência fluvial e/ou lacustre ¹². *H. elongatum* encontra-se registrada na Bolívia, Paraguai, Argentina, Uruguai e em todas as regiões do Brasil, com ocorrência confirmada no Norte (Pará, Tocantins), Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe), Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) e Sul (Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina) do Brasil ¹³.

Na medicina tradicional, raízes, talos e/ou folhas, flores ou frutos de *H. elongatum* são utilizados para tratar diversos sintomas, como: doenças respiratórias ⁹, dor de garganta, atraso menstrual, dormência e derrame ¹⁴, transtornos hepáticos ¹⁵, ferimentos, bronquite, erupção dentária e diarreias^{9,16,17}. Apesar do registro de consumo, do reconhecimento cultural e social de *H. elongatum*, ainda há uma carência sobre as propriedades químicas e toxicológicas, a fim de assegurar a eficácia e segurança do uso medicinal desta espécie. A avaliação desses parâmetros é primordial para qualquer extrato oriundo de planta medicinal que está destinado ao uso por seres humanos, seja a curto e/ou longo prazo ^{18,19}.

A caracterização fitoquímica é um importante passo na detecção de compostos, como flavonoides, fenóis, taninos e antraquinonas, que possuem atividade antioxidante ²⁰. Os estudos fitoquímicos são essenciais para o controle de qualidade de plantas medicinais, no intuito de proporcionar a segurança e a efetividade, garantindo a autenticidade, pureza e integridade das ervas ²¹. Enquanto, para avaliar alterações toxicogénicas, o bioensaio *Allium cepa* L. é bastante utilizado e possui diversas vantagens, como baixo custo, confiabilidade e concordância com outros testes de genotoxicidade, como em camundongos ^{22,23}.

O teste *A. cepa* é reconhecido pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA) como um bioensaio confiável ²⁴, que permite avaliar o potencial citotóxico

(índice mitótico), genotóxico (alterações cromossômicas) e antígenotóxico de extratos e/ou isolados medicinais,^{25,26,27}. Além disso, o *A. cepa* evita a manipulação e o sacrifício de animais, justificando o seu uso extensivo em bioensaios toxicogenéticos^{28,29}.

Considerando a importância medicinal de *H. elongatum* para a população, o presente estudo tem como objetivo caracterizar o perfil fitoquímico e isolamento de compostos, avaliar atividade antioxidante e citogenotóxica do extrato etanólico e/ou frações das folhas de *H. elongatum*.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

- Caracterizar o perfil fitoquímico, isolar compostos, avaliar atividade antioxidante, teor de compostos fenólicos e citogenotóxica do extrato etanólico (EE) e frações hexânica (FH), clorofórmica (FC), acetato de etila (FAE) e hidrometanólica (FHM) das folhas de *H. elongatum*.

1.2.2 Objetivos específicos

- Realizar análise fitoquímica qualitativa preliminar do EE e frações: FH, FC, FAE e FHM das folhas de *H. elongatum*;
- Determinar o teor total de compostos fenólicos do EE e das frações: FH, FC, FAE e FHM das folhas de *H. elongatum*;
- Investigar a atividade antioxidante do EE e das frações: FH, FC, FAE e FHM das folhas de *H. elongatum* pelos métodos DPPH e ABTS;
- Traçar o perfil químico do EE e frações FAE e FHM das folhas de *H. elongatum* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD);
- Identificar compostos da FH por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM).
- Isolar compostos da FH por cromatografia em coluna clássica.

- Determinar a estrutura química de compostos isolados na cromatografia em coluna por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 (RMN ^{13}C).
- Avaliar o potencial citogenotóxico da FH, FE e FA.

Capítulo 2

REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Uso Tradicional de Plantas Medicinais

As plantas medicinais constituem uma fonte importante de produtos naturais ativos que diferem em termos de estrutura química e propriedades biológicas³⁰, sendo fábricas químicas vivas para a biossíntese de metabólitos secundários³¹. Essas plantas têm sido amplamente usadas para melhorar sintomas como tosse, fraqueza, distúrbios digestivos, ansiedade³², sono, estresse, resfriados, gripe, asma, artrite reumatoide, enxaqueca, fadiga crônica, irritabilidade, etc.³³.

Ainda hoje, muitos países subdesenvolvidos não tem acesso a medicina moderna de origem sintética, e, portanto, grandes áreas do mundo continuam a usar a medicina tradicional baseada no uso direto de plantas medicinais devido ao seu baixo custo³⁴. Evidências mostram que a prática da fitoterapia na China, Índia, Egito e Síria remontam a mais de 5.000 anos³⁵. Cerca de 80% da população mundial dependem principalmente da medicina tradicional de plantas³⁶ e 40 a 45% das drogas comumente usadas são extraídas principalmente de fontes naturais³⁷.

O Brasil possui a maior Biodiversidade do mundo, compreendendo mais de 45.000 espécies de plantas superiores (20-22% do total existente no planeta), o que incentiva o uso das mesmas como alternativa medicinal e com maior potencialidade para o desenvolvimento de novos medicamentos, além do baixo custo, fácil acesso e menos efeitos colaterais³⁸. Em todo o país, seja nas regiões mais pobres ou até mesmo regiões de grandes concentrações urbanas, temos a comercialização livre de plantas medicinais em feiras, mercados populares, farmácias, e até mesmo em quintais de residenciais³⁹. Há incentivo regulamentados como a Política Nacional de Assistência Farmacêutica que estimula o uso de plantas medicinais e de medicamentos fitoterápicos⁴⁰.

2.2 Boraginaceae: Gênero *Heliotropium*

A família Boraginaceae engloba cerca de 130 gêneros e 2.500 espécies em cinco subfamílias ⁴¹ e está distribuída por todo o mundo, principalmente na região mediterrânea, Américas do Norte (México), Central e do Sul ⁴². As espécies pertencentes a Boraginaceae apresentam grande valor econômico e medicinal ⁴³ com vários constituintes ativos como, alcaloides pirrolizidínicos, flavonoides, terpenoides, naftoquinonas e fenóis ³⁷.

Dos 130 gêneros, destaca-se o *Heliotropium* possuindo cerca de 325 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais, predominantemente, em regiões áridas e semiáridas ⁴⁴. No Brasil, esse gênero ocorre nas Regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul, em margens de rios, matas ciliares, várzeas, pastagens e em áreas sujeitas a inundações periódicas, em solos arenosos ¹⁰, em ambientes litorâneos, cerrado, campos rupestres, mas, principalmente, nas caatingas e campos sulinos ⁴⁵.

Heliotropium possui importâncias medicinais no tratamento de diferentes doenças. Na história das drogas tradicionais fornecem medicamentos para artrite, inflamação, doenças de pele, disfunção menstrual, reumatismo e picadas nocivas ^{37,43}. As espécies desse gênero são ervas, subarbustos/arbustos, anuais ou perenes. Apresentam folhas alternas, pecioladas; flores sésseis e cálice lobado; fruto esquizocárpico, mitriforme, costado e sementes trígonas ¹⁰.

Alguns espécies com reconhecimento literário para cura ou tratamento de doenças são: *Heliotropium indicum* L., *Heliotropium ovalifolium* Forssk., *Heliotropium bacciferum* Forssk., *Heliotropium gillianum* R., *Heliotropium sclerocarpum* Phil., *Heliotropium baluchistanicum* K., *Heliotropium biannulatum* B., *Heliotropium európio* L., *Heliotropium strigosum* Willd., *Heliotropium glutinosum* Phil., *Heliotropium eichwaldi* Steud., *Heliotropium subulatum* Hochst., *Heliotropium sinuatum* Miers., e *Heliotropium foertherianum* .D. ³⁷. Os compostos das espécies de *Heliotropium* exibem propriedades antibacterianas, antifúngicas, antivirais, antitumorais, antioxidantes, anti-inflamatórias, antiplaquetárias, cicatrizantes, cardiotônicas, contraceptivas e prostaglandinas ³⁷. O gênero *eliotropium* apresenta propriedades medicinais adstringente e diuréticas, antimicrobiana e antioxidante ⁴⁶.

2.3. *Heliotropium elongatum* (LEHM) I.M. JOHNST.

A *H. elongatum* (Figura 2.1), popularmente conhecida como “fedegoso ou crista de galo”, pertence à família Boraginaceae⁴⁰. *H. elongatum* é usada empiricamente no preparo de soluções caseiras (infusões e lambedores), no tratamento de dores nos dentes¹⁷, gripe⁴⁷, diarreias, tosse, anti-inflamatório⁴⁸, doenças respiratórias^{9; 16}, perda de peso⁴⁹, ferimentos, bronquite¹⁶, artrite, reumatismo, antisséptico, febrífugo, colagogo, anti-inflamatório e cicatrizante⁵⁰.



Figura 2.1: *Heliotropium elongatum* (Fonte: próprio autor)

2.4 Caracterização Fitoquímica de Plantas Medicinais

As plantas produzem uma diversa ordem de componentes orgânicos divididos em metabólitos primários e secundários⁵¹, que desempenham um papel importante na evolução dos vegetais e na interação com os seres vivos⁵².

Nos metabólitos primário, as moléculas (aminoácidos, nucleotídeos, açúcares e lipídios) são comuns a todas as células e são necessárias para o funcionamento básico da planta^{53, 54}. Os secundários são compostos naturais com objetivo principal de proteção a estresses abióticos e bióticos, além de possuírem valores nutricionais e farmacológicos importantes na nutrição humana e aditivos aromáticos e corantes⁵². Atuam na adaptação das plantas aos seus ambientes, como defesa contra microrganismos, parasitas, proteção contra herbívoros e apresentam grande importância ecológica, uma vez que podem atuar na atração de polinizadores⁵⁵.

A variedade biológica de metabolitos secundários na planta apresenta relação com o potencial efeito medicinal para os seres humanos. Metabólitos secundários nas plantas podem ser divididos em três grupos distintos quimicamente: terpenos, compostos fenólicos e componentes contendo nitrogênio (N) e enxofre (S) ⁵⁶.

Os terpenos são hidrocarbonetos naturais derivados de isoprenos (C₅H₈) e podem ser classificados de acordo com a quantidade de isoprenos que sua estrutura possui ⁵⁷.

Os diferentes terpenos incluem hemiterpenos (C₅), monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀), sesterpenos (C₂₅), triterpenos (C₃₀), tetraterpenos (C₄₀) e politerpenos (> C₄₀) ⁵⁸ (Tabela 2.1). Os terpenos representam mais de 55.000 moléculas, constituindo a maior e mais complexa classe de produtos naturais ⁵².

As plantas produzem uma grande variedade de compostos fenólicos que contêm um grupo fenol ⁵² com uma grande diversidade química e funções variadas nos vegetais. Taninos, ligninas, flavonoides e alguns compostos fenólicos simples servem como defesa contra herbívoros e patógenos. Além disso, atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras que tem importante papel na prevenção de doenças como diabetes, doenças cardíacas, artrite, aterosclerose e câncer ⁵⁹. Os compostos fenólicos podem ser classificados em dois grupos principais: flavonoides e não flavonoides ⁶⁰.

Tabela 2.1: Principais metabólitos secundários pertencente a classe dos terpenos

Classificação	Bloco de isopreno	Quantidade de carbono	Exemplo
Hemiterpenos	1	5	Isopreno (monômero empregado na fabricação de borracha), prenol (odor frutado e utilizado na fabricação de perfumes) e ácido isoaléico (aroma característico de “queijo velho/chulé”).
Monoterpenos	2	10	Limoneno (aroma característico de fruta cítrica) e α -terpineol (aroma característico floral/pinho).
Sesquiterpenos	3	15	Farneseno (“diesel da cana”), nootkatona (aroma característico de toranja) e bisabolol (essência de camomila).
Diterpenos	4	20	Esteviosídeo (produção de adoçante natural a base de stevia) e sclareol (proveniente da sálvia - <i>Salvia sclarea</i>)
Triterpenos	6	30	Esqualeno (encontrado no óleo de fígado de tubarão).
Tetraterpenos	8	40	Carotenoides como o β -caroteno (pigmento da cenoura) e a zeaxantina (pigmento predominante em vegetais amarelos).
Politerpenos	> 8	>40	Látex (borracha natural)

Fonte ⁵⁷

Flavonoides são estruturas químicas presentes nas plantas que agem na polinização, proteção contra insetos, raios ultravioletas e outras funções no desenvolvimento da planta. São abundantes em frutas e vegetais e respondem por quase dois terços dos compostos fenólicos e dietéticos, e, como grupo, são os mais

bioativos⁶⁰. Nos seres humanos, os flavonoides apresentam benefícios a saúde, com destaque para ação antioxidante. Abundantes em frutas e vegetais, sua estrutura está baseada no núcleo flavilium (Figura 2.2). Apresenta um grupo ceto em C4, uma ligação dupla entre C2 e C3, e um anel B está ligado a C2 ⁶¹. Os flavonoides são formados da combinação de derivados sintetizados da fenilalanina, via metabólica do ácido chiquímico e ácido acético.

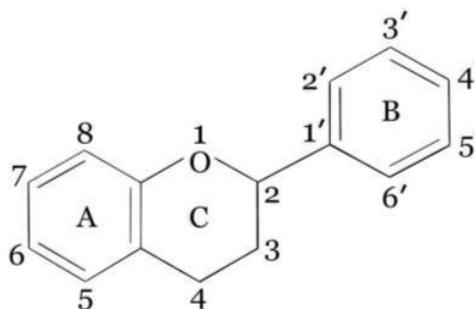


Figura 2.2. Estrutura química básica dos flavonoides ⁶²

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 ⁶³ (Figura 2.2).

Dos compostos fenólicos não flavonoides o grupo mais importante são os ácidos, que contêm um único grupo fenil substituído por um carboxílico grupo e um ou mais grupos OH. Os ácidos fenólicos podem ser divididos em ácidos hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinâmicos e outros ácidos hidroxifenil (acético, propanoico e pentaenoico), diferindo entre eles no comprimento da cadeia contendo o grupo carboxílico ⁶⁰. Estes ácidos existem nas plantas, usualmente na forma de ésteres, a exemplo do ácido clorogênico, éster do ácido quínico, cuja molécula é constituída pelo ácido quínico esterificado ao ácido caféico. Também são encontrados na forma de glicosídeos ou ligados a proteínas e a outros polímeros da parede celular e, raramente, como ácidos livres ⁶³.

A detecção dos constituintes de uma planta se mostra importante para identificar substâncias biologicamente ativas. Assim é possível determinar efeitos

benéficos com mais exatidão e quantificar as doses máximas e mínimas que podem ser ingeridas, a fim de oferecer eficácia sem riscos de toxicidade. A prospecção fitoquímica consiste em identificar e quantificar os compostos presentes numa espécie vegetal por métodos que variam desde testes qualitativos a técnicas cromatográficas, espectroscópicas e espectrométricas ⁶⁴. A caracterização fitoquímica é um importante passo na avaliação dos compostos que podem ser responsáveis pelos benefícios medicinais, como flavonoides, fenóis, taninos e açúcares redutores, que possuem atividade antioxidante ao neutralizar as espécies reativas de oxigênio ²⁰.

2.4.1 Estresse Oxidativo e Avaliação da Atividade Antioxidante.

Os metabólitos antioxidantes são substâncias capazes de proteger as células de efeitos prejudiciais causados por radicais livres produzidos pelo próprio organismo. Os radicais promovem um estresse oxidativo que pode resultar tanto no aumento da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), quanto da redução da capacidade antioxidante celular, o que pode resultar no aparecimento de doenças cardíacas, Parkinson e câncer ⁶⁵. Há diversas técnicas que permitem avaliar a capacidade antioxidante de extratos de plantas e/ou substâncias puras propostas na literatura ⁶⁶. Um dos métodos 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 comumente utilizados para avaliar a atividade antioxidante de alimentos e produtos naturais ⁶⁷.

O DPPH consiste na redução do radical livre devido a interação com substância antioxidante, que doa um átomo de hidrogênio ou elétron livre para o DPPH. Os mecanismos de transferência de hidrogênio e elétrons para o radical DPPH• podem ser vistos na equação 1 e 2 (Figura 2.3), respectivamente, sendo este um processo reversível.

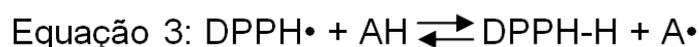
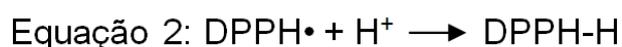
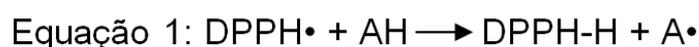


Figura 2.3: Reação entre o radical DPPH• e um antioxidante ⁶⁸.

Enquanto, o ABTS⁺ (Figura 2.4) é um radical livre protonado utilizado para avaliar o quanto uma substância é capaz de reduzi-lo ⁶⁹.

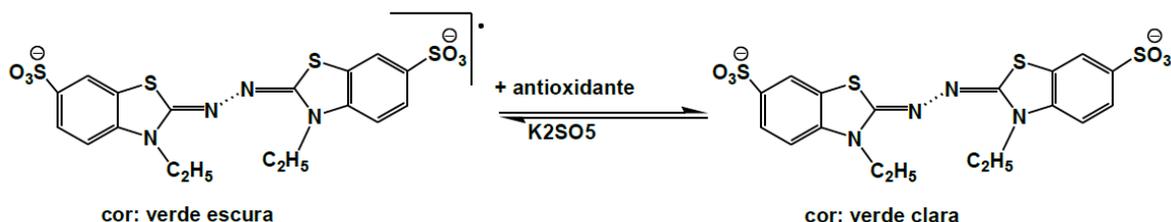


Figura 2.4: Estabilização do radical ABTS⁺ por um antioxidante ⁷⁰.

A quantificação de compostos fenólicos totais e de flavonoides também são muito importantes, pois esses compostos atuam como agentes redutores, doadores de hidrogênio e neutralizadores de radicais livres e apresentam uma boa correlação com a atividade antioxidante de extratos de plantas medicinais ⁷¹.

2.4.2 Métodos de Cromatografia e espectroscopia na análise de compostos

A cromatografia permite a detecção e identificação, bem como a determinação quantitativa da substância teste com alta precisão ⁷². Esse método se baseia em processos físico-químicos, no qual os componentes da mistura se separam por migração com diferentes interações entre duas fases de contato: estacionária e móvel. A fase estacionária pode ser sólida ou líquida disposta 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 ⁷³.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica de separação que bombeia uma mistura de amostra (analito) em um solvente (fase móvel) em um fluxo que contém a fase estacionária. A separação da mistura acontece com base na interação do analito com a fase móvel e a fase estacionária. A CLAE tem sido o método preferido devido sua versatilidade, precisão, relativo baixo custo e ausência de interferentes ⁷⁴.

A espectroscopia é uma técnica que registra interações de radiação eletromagnética e a matéria, quantificando-se a radiação emitida ou absorvida por

moléculas ou átomos. A espectroscopia no infravermelho médio tem sido comumente utilizada para a identificação estrutural ou determinação qualitativa da “impressão digital” de compostos orgânicos, pois alguns grupos de átomos exibem frequências de absorção de vibração características na região infravermelha do espectro eletromagnético ⁷⁵.

Espectrometria de massas (EM) é uma técnica instrumental para a separação de espécies eletricamente carregadas, consiste em identificar os compostos, átomos e moléculas, por meio da relação massa/carga (m/z) dos íons de analitos no estado gasoso. Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray ESI-IT-MS é uma ferramenta de caracterização e identificação a ser usada na investigação de metabólitos secundários de alta e média polaridade ⁷⁶. Para que a análise por EM seja aplicada é necessário à remoção ou adição de um próton em uma molécula neutra a fim de produzir íons que o equipamento será capaz de detectar ²⁵.

2.5. Teste de citogenotoxicidade *A. cepa*

No uso de plantas medicinais, deve ser considerado os possíveis efeitos toxicogénéticos, sendo indispensável avaliar as concentrações e como os extratos podem interagir com as fibras do fuso mitótico e/ou com o DNA, resultando em alterações aneugénicas e/ou clastogénicas (Figura 2.5), respectivamente ³⁰.

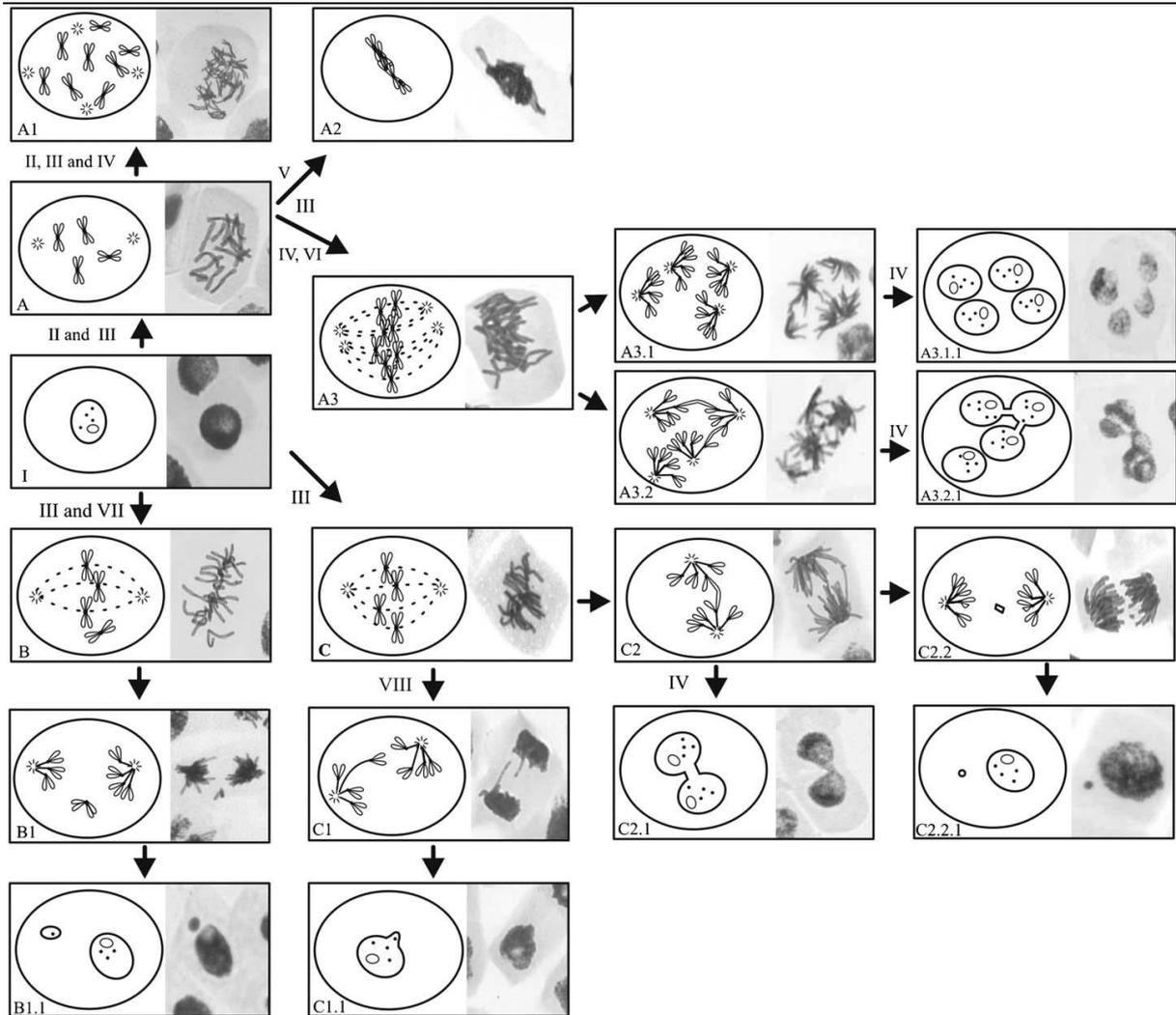


Figura 2.5: Alterações cromossômicas de efeitos aneugênico e clastogênico.

(A) C-metáfase; (A1) C-metáfase poliploide; (A2) célula com aderência cromossômica; (A3) metáfase poliploide com centrossomos supranumerários; (A3.1) anáfase multipolar; (A3.1.1) célula polinuclear; (A3.2) anáfase multipolar com pontes e aderência das cromátides; (A3.2.1) célula com núcleo lobado; (B) metáfase com ausência parcial de polimerização do fuso; (B1) perda cromossômica; (B1.1) célula micronucleada; (C) metáfase normal; (C1) atraso cromossômico na anáfase; (C1.1) broto nuclear; (C2) anáfase com ponte cromossômica; (C2.1) núcleo lobado; (C2.2) quebra cromossômica; (C2.2.1) célula micronucleada; (I) ação do herbicida nas células; (II) ausência total do fuso mitótico; (III) replicação do material genético; (IV) falta de citocinese; (V) contração cromossômica contínua e atração intercromossômica; (VI) restabelecimento da polimerização do fuso; (VII) ausência parcial de polimerização do fuso; (VIII) despolicimerização diferencial entre os fusos ⁷⁷.

A falta de informações e o uso indiscriminado de plantas medicinais pela população, principalmente na forma de infusões e chás podem provocar mais efeitos nocivos do que benéficos, pois as substâncias químicas presentes nas espécies vegetais podem ser tóxicas, mutagênicas, carcinogênicas e teratogênicas quando ingeridas sem restrições e indiscriminadamente ⁷⁸. Para avaliar alterações toxicogênicas, o bioensaio *A. cepa* L. (cebola) é bastante utilizado para avaliar níveis de toxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e antigenotoxicidade (efeito protetor) de plantas medicinais^{79,80,81}.

O teste *A. cepa* apresenta algumas vantagens como: baixo custo, fácil de manusear, possui cromossomos relativamente grandes e em número reduzido ($2n=16$), é eficiente e apresenta concordância com outros testes de genotoxicidade, como em camundongos^{28,82,23}. Além disso, o teste é reconhecido pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA) como um bioensaio confiável ²⁴.

O potencial tóxico é estimado mediante avaliação do crescimento radicular de *A. cepa*, enquanto o efeito citotóxico pelo índice mitótico ⁸⁰. A genotoxicidade é quantificada pela análise das alterações cromossômicas (AC), que podem ser resultantes de efeitos aneugênicos (C-metáfases, metáfase com aderências cromossômicas, perdas cromossômicas, anáfases multipolares, células binucleadas, metáfases poliploides, dentre outras) e/ou clastogênicos (fragmentos cromossômicos e pontes cromossômicas)⁸³.

Capítulo 3

METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.1 Coleta e identificação da planta

Folhas de *H. elongatum* foram coletadas na comunidade Assentamento Palmares, zona rural de Luzilândia- PI (coordenadas: latitude 3°27'32.5"s e longitude 42°21'10.3"w). A exsicata foi identificada pela botânica Ivanilza Moreira de Andrade, encontra-se tombada no acervo do Herbário Delta do Parnaíba (HDELTA) sob o número de voucher 7431. O material foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) com o número A8CA7E7.

3.2 Preparo e fracionamento do extrato

Folhas foram secas em temperatura ambiente por oito dias e trituradas até a obtenção de um pó fino. As folhas pulverizadas (1015 g) foram submetidas a extração com etanol PA (Dinâmica) na razão de 1:4 de material foliar/solvente (m/v) por 15 dias. A fase orgânica (sobrenadante) foi filtrada no intervalo de 24 h e o extrato etanólico (EE) foi concentrado em evaporador rotativo (Fisatom, 550) a uma temperatura máxima de 40°C e liofilizado (Thermo, modulyod-115), com rendimento de 7,16% (72,65 g) de extrato etanólico. Parte do extrato etanólico (66,52 g, 91,56%) foi suspenso em H₂O e submetido a partição 6x200 ml para cada solvente: hexano, clorofórmio e acetato de etila, respectivamente. A última fase foi diluída em metanol (1:1), a fim de se obter a fração hidrometanólica. As fases orgânicas foram secas em rotaevaporador e em seguida, liofilizadas (Thermo, modulyod-115), obtendo-se as frações: hexânica (FH: 26,76 g, 40,22%); clorofórmica (FC: 0,5276 g, 0,79%), acetato de etila (FAE: 0,6716 g, 1%) e hidrometanólica (FHM: 6,37 g, 9,57%). Tanto o EE quanto as frações foram armazenados a 4°C. O fluxograma (Figura 3.1) ilustra os procedimentos de preparo do extrato e frações.

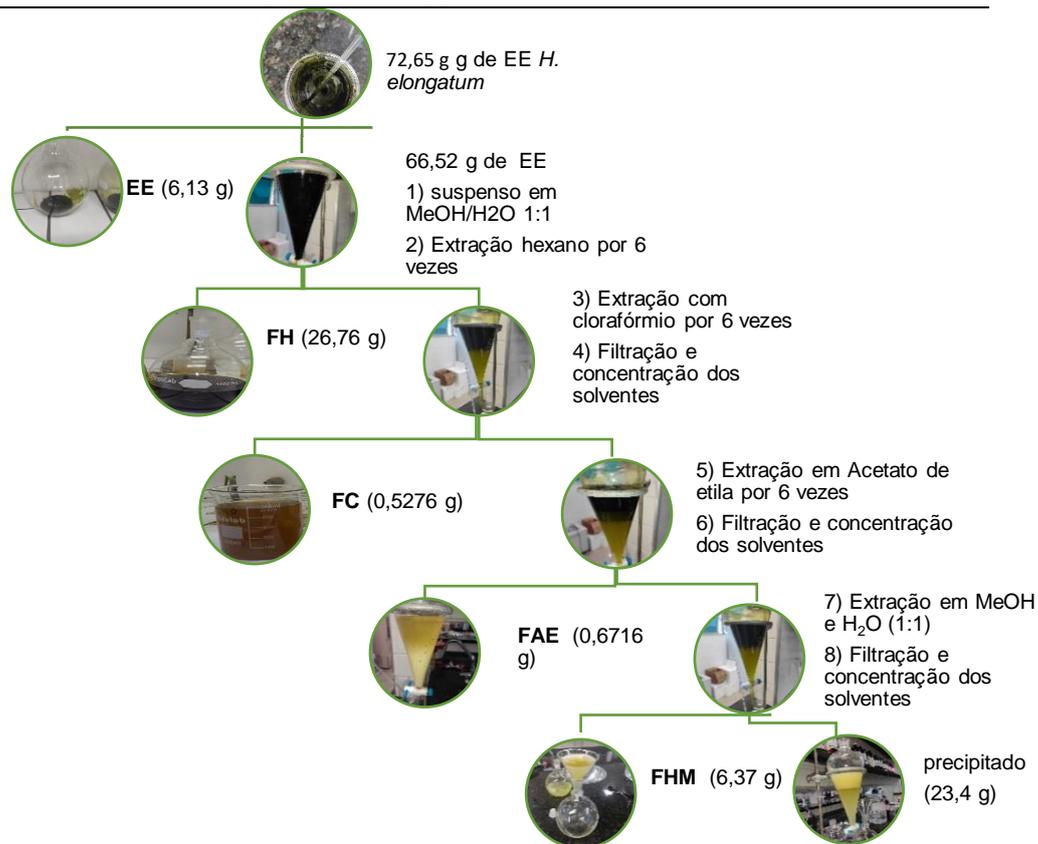


Figura 3.1: Fluxograma de partição líquido-líquido do extrato etanólico e frações das folhas de *H. elongatum*. Fonte: autor

3.3 Prospecção Fitoquímica

A prospecção fitoquímica foi realizada como método preliminar para verificar as classes de metabólitos secundários, como flavonoides; flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas; fenóis e taninos; alcaloides; esteroides e triterpenoides; antraquinonas; saponinas e depsídeos/depsidonas presente nas folhas. O EE, FH, FC, FAE e FHM foram submetidos a testes químicos qualitativos no Laboratório de Química do Instituto Federal do Piauí (IFPI). Os experimentos foram feitos em triplicatas de acordo com a metodologia de ⁸⁴.

3.3.1 Teste para açúcares redutores

Dissolveu-se 1,0 mg do EE ou fração (FH, FC, FAE e FHM) seco em 5 mL de água destilada. Adicionou-se 2 mL do reativo de Fehling A e 2 mL do reativo de Fehling B. A solução foi aquecida em banho maria em ebulição por 5min. O aparecimento de um precipitado vermelho tijolo indica a presença de açúcares redutores.

3.3.2 Teste para ácidos orgânicos

Dissolveu-se 1,0 mg do EE ou fração (FH, FC, FAE e FHM) seco em 5 mL de água destilada. Transferiu-se 2 mL de cada solução para um tubo de ensaio, adicionou-se gotas do Reativo de Pascová, com a descoloração do reativo, a reação é positiva.

3.3.3 Teste para flavonoides

Dissolveu-se 1,0 mg do EE ou fração (FH, FC, FAE e FHM) seco em 10 mL de metanol. Adicionou-se 5 gotas de HCl concentrado 6 M e raspas de magnésio e o surgimento de uma coloração rósea na solução indica reação positiva.

3.3.4 Flavonóis, flavanonas, flavanonóis, flavanonóis e xantonas

Transferiu-se para um tubo de ensaio, 3 mL da mesma solução usada no teste anterior e acrescentou-se alguns miligramas de magnésio em raspas e 0,5 mL de HCl concentrado. Após o término da efervescência, observou-se por comparação mudança na coloração em relação aos tubos acidificados dos testes anteriores. O aparecimento ou intensificação da cor vermelha é indicativo da presença dos metabólitos citados acima.

3.3.5 Teste para fenóis e taninos

Dissolveu-se 1,0 mg do EE ou fração (FH, FC, FAE e FHM) seco em 5 mL de água destilada, adicionou-se 1 a 2 gotas de solução alcoólica de FeCl_3 a 1%. Qualquer mudança na coloração ou formação de precipitado é indicativo de reação positiva, quando comparado com o teste em branco (água + solução de FeCl_3). Coloração inicial entre o azul e o vermelho é indicativo da presença de fenóis, quando o teste em branco for negativo. Precipitado escuro de tonalidade azul indica a presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis) e verde a presença de taninos catéquicos.

3.3.6 Teste para alcaloides

Dissolveu-se 1,0 mg do EE ou fração (FH, FC, FAE e FHM) seco em 5 mL de solução de HCl a 5%. Separou-se 2 mL de cada solução em tubos de ensaio, para

adicionar gotas do Reativo de Bouchardat (precipitado laranja avermelhado) e do Reativo de Dragendorff (precipitado vermelho tijolo).

3.3.7 Testes para esteroides e triterpenoides

Dissolveu-se 1,0 mg do EE ou fração (FH, FC, FAE e FHM) seco em clorofórmio e filtrou com carvão ativado. Adicionou-se 1 mL de anidrido acético e agitou-se suavemente, em seguida, acrescentou-se 3 gotas de H₂SO₄ concentrado com agitação contínua e suave. O desenvolvimento rápido de cores que vão do azul evanescente ao verde persistente indicam resultado positivo.

3.3.8 Teste para antraquinonas

Dissolveu-se 1,0 mg do EE ou fração (FH, FC, FAE e FHM) seco em 5 mL de tolueno. Adicionou-se 2 mL de solução de NH₄OH a 10%, sob agitação suave. A coloração rósea, vermelha ou violeta na fase aquosa indica reação positiva.

3.3.9 Teste para saponinas

Dissolveu-se 1,0 mg do EE e FHM seco em 5 mL de água destilada. Em seguida, diluiu para 15 mL e agitando vigorosamente por 2 min em tubo fechado. O surgimento de camada de espuma por mais de 30 min. é considerado positivo.

3.3.10 Depsídios/depsidonas

Dissolveu-se 1,0 mg do EE ou fração (FH, FC, FAE e FHM) seco em 5 mL de éter etílico. O éter foi evaporado em banho-maria, juntou-se ao resíduo 3 mL de metanol. Sob agitação suave, adicionou-se 3 gotas de solução de FeCl₃ a 1%. A coloração verde, azul ou cinza indica reação positiva.

3.4 Teor dos Compostos Fenólicos (TCF)

A determinação do teor de compostos fenólicos totais do EE e das frações (FH, FC, FAE e FHM) seguiu a metodologia descrita por Swain and Hillis ⁶¹. Inicialmente, as amostras foram solubilizadas em água destilada. Das soluções preparadas, foram retirados uma alíquota de 0,5 ml e transferidos para tubos de

ensaio, adicionado 8 mL de água destilada e 0,5 ml do reagente *Folin Ciocalteu* 20% (v:v).

Em seguida, a solução foi homogeneizada em agitador tipo vortex, após 3 minutos, acrescido 1 ml de solução de carbonato de sódio (Na₂CO₃) a 20% (m:v) e após 1 h em banho maria a 37°C foram realizadas as leituras das densidades óticas em espectrofotômetro à 720 nm. Utilizou-se como padrão de referência o ácido gálico marca Sigma®, para construção da curva de calibração. A absorbância das amostras foi aplicada à equação de linha padrão ($Y = 0,0048x - 0,0442$, $R^2 = 0,9955$), onde y = absorbância e x = concentração de ácido gálico.

A partir da equação da reta obtida na curva de calibração, realizou-se o cálculo do TCF, expresso em mg EAG (equivalente ao ácido gálico)/g de amostra. Todas as análises foram realizadas em triplicatas. Para análise estatística utilizou-se o programa GraphPad Prism 7.0®.

3.5 Ensaio Antioxidante (*in vitro*)

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

Para realização do teste, adicionou-se 1,5 mL da solução etanólica do radical DPPH· (6×10^{-5} M) e uma alíquota de 0,5 mL das amostras contendo diferentes concentrações do EE ou frações. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 517 nm, após 30 minutos do início da reação. As análises foram feitas em triplicatas, com um controle negativo (sem antioxidante) e dois controles positivos (padrões: ácido ascórbico e Trolox®, natural e sintético respectivamente). A diminuição na leitura da densidade ótica das amostras foi correlacionada com o controle (somente o radical), estabelecendo-se a porcentagem de descoloração do radical DPPH· conforme a fórmula a seguir (Brand-Williams *et al.* 1995; SOUSA *et al.* 2011).

$$\% \text{ de inibição do radical DPPH}^{\bullet} = [(Abs_{\text{controle}} - Abs_{\text{amostra}}) / Abs_{\text{controle}}] \times 100$$

ABS – absorbância.

Além do percentual de inibição do radical também foi calculada a concentração eficaz para inibir 50% do radical DPPH· (CE₅₀), que corresponde à concentração de extrato necessária para reduzir a concentração do radical inicial em 50% (CE₅₀)⁸⁸.

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

O radical ABTS⁺ foi gerado a partir da reação de 7 mM de ABTS com 2,45 mM de persulfato de potássio, sendo reservados à temperatura ambiente e na ausência de luz, por 12-16 horas. Transcorrido esse período, a solução foi diluída em etanol P.A. até obter-se uma solução com absorvância de 0,70 (\pm 0,01). Adicionou-se 40 μ l das amostras diluídas (em etanol) a 1960 μ l da solução contendo o radical, determinando-se a absorvância em espectrofotômetro a 734 nm, após 30 minutos de reação ⁸⁹.

Como solução padrão, usou-se o antioxidante sintético Trolox[®] análogo da vitamina E, para construção de uma curva de calibração. A absorvância das amostras foi aplicada à equação de linha padrão ($y = 0,841x - 0,0258$, $R^2 = 0,9955$), onde y = absorvância e x = concentração do trolox. Todas as leituras foram realizadas em triplicatas, e os resultados foram expressos em CAET – Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox[®] (mM de Trolox[®] por mg/amostra).

3.6 Análise Cromatográfica

3.6.1 Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

As frações FH, FC, FAE e FHM foram submetidas a cromatografia de camada delgada (CCD) no Laboratório de Biologia da Universidade Estadual do Piauí, Campus Parnaíba. Utilizou-se cromatofolhas de gel de sílica 60 (\varnothing μ m 2-25) sobre alumínio da marca Macherey-Nagel, Düren[®] (com indicador de fluorescência na faixa de 254 nm). Foram utilizados os eluentes hexano, clorofórmio, diclorometano, acetato de etila e metanol, puros ou combinados em proporções crescentes de polaridade. A revelação das substâncias nas cromatoplasmas analíticas foi obtida por exposição à luz ultravioleta em dois comprimentos de onda (254 e 365 nm), realizada em aparelho Spectroline modelo ENF 240 C/F; por contato com vapores de iodo (I₂), e por aspersão com solução de vanilina (C₈H₈O₃) e ácido perclórico (HClO₄) em etanol (C₂H₅OH), seguida de aquecimento em chapa aquecedora a 100°C por aproximadamente 5 minutos.

3.6.2 Cromatografia em Coluna

A cromatografia em coluna foi realizada no Laboratório de Biologia da Universidade Estadual do Piauí, Campus Parnaíba. Foram utilizados 2 gramas da FH para a cromatografia em coluna clássica, a FH foi adsorvida em aproximadamente 2,40 g de gel de sílica 60, pulverizada em gral de porcelana e acondicionada sobre 40 g de gel de sílica 60 ($\varnothing \mu\text{m}$ 63-200) em coluna cromatográfica de 3,5 cm de diâmetro. Utilizou-se como eluentes: hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol de forma pura ou misturas binárias, em ordem crescente de polaridade (Figura 3.2).

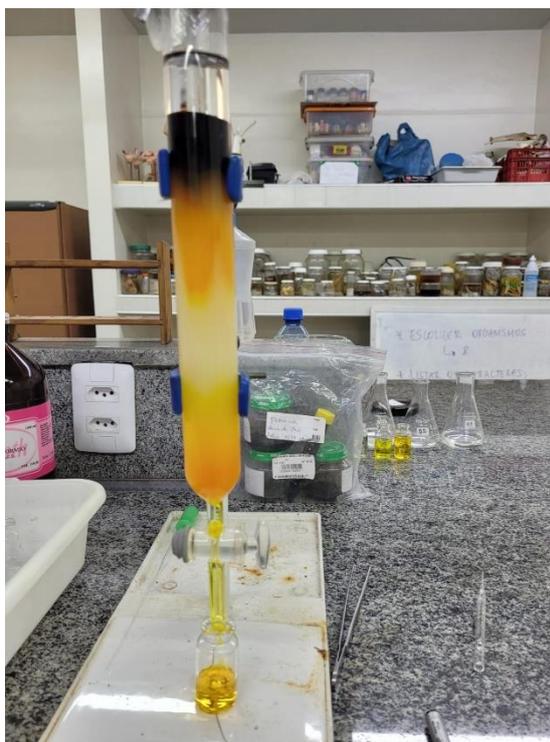


Figura 3.2: cromatografia em coluna da FH das folhas de *H. elongatum*. Fonte: autor

A cromatografia em coluna forneceu 70 frações, que posteriormente foram reunidas por similaridade após análise em CCD. A FH (16-26) 16,8 mg mostrou-se como um pó branco amorfo e homogêneo em CCD, a qual foi denominada de FHHE-1.

3.7 Análise Espectrométrica

3.7.1 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H) e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 (RMN ¹³C)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H) e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 (RMN ¹³C), uni e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetros Bruker®, modelo Advance DPX-300, usando piridina deuterada (C₅D₅N) como solvente de análise.

3.7.2 Espectrometria do Infravermelho

O espectro na região do infravermelho obtido em Espectrômetro Perkin Elmer®, modelo FT-IR Spectrum 1000, utilizando pastilhas de KBr para análises das amostras.

3.7.3 Análise por Cromatografia Líquida de alta eficiência CLAE-DAD

A análise por Cromatografia Líquida de alta eficiência CLAE-DAD foram realizadas em um equipamento da Shimadzu com detector ultravioleta em arranjo de diodos (DAD). Modelo Analítico; um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência – CLAE, SHIMADZU®, modelo LC-20 A. Controlador CBM-20A, detector UV-Vis com arranjo de diodos (DAD), modelo SPD- M20 A, coluna C-18 Phenomenex Luna (250 x 4.60 mm; 5 µm; 110Å) no modo analítico.

O tratamento dos dados foi obtido utilizando o software Shimadzu LC solution (versão 1.23 SP1). O EE e as frações (FAE e FHM) foram analisadas por CLAE-DAD em modo gradiente linear exploratório em um sistema de solvente adequado para cada fração. As amostras foram preparadas para análise via CLAE-DAD (*clean-up*). Antes das análises, as amostras foram solubilizadas em CH₃OH: H₂O (95:05) e submetidas a um “*clean up*”, utilizando cartuchos de sílica C-18 acoplado em membrana Millipore® (0,45 µm). Após este procedimento, aproximadamente (1,0 mg mL⁻¹) das amostras foram armazenadas em frascos, para posterior injeção. As frações FH e FC não foram submetidas ao teste por apresentarem menor polaridade.

3.7.4 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

A análise da Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) foi realizada em cromatógrafo a gás *Shimadzu* QP - 5000 com injetor automático 5000 e coluna capilar SPB - 5 (5% fenil polimetil siloxano) Supelco de 30 m x 0,25 mm x 0,1µm acoplado ao espectrômetro de massas quadrupolar, faixa de massas: 50 a 500 daltons, e base de dados NIST 62™ *Library*.

3.7.5 Análise por espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-IT/MS) das folhas de *H. elongatum*

As amostras em concentrações de 500 ppm, foram analisadas por espectrometria de massas de ultra-alta resolução utilizando um equipamento Q Exactive hybrid Quadrupole-Orbitrap (Thermo Scientific- San Jose, USA) acoplado a fonte de electrospray (ESI). As amostras foram injetadas utilizando uma bomba seringa com um fluxo de 5,0 µl min⁻¹, com a faixa de detecção de *m/z* 150-1500. Todas as análises foram realizadas no modo positivo de ionização. As condições gerais de análises por ESI (+), bem como os parâmetros utilizados na aquisição dos espectros foram os seguintes: voltagem do spray 3,0 kV; temperatura do capilar 275 °C; S-lens 100; o gás auxiliar foi estabelecido em 2,0 e o sheath gás em 0 para todas as amostras. A resolução do equipamento foi definida em 140.000 (FWHM em *m/z* 200). O teste foi realizado no Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia.

3.8 Bioensaio *A. cepa*

Os testes de citotoxicidade e genotoxicidade realizados com *A. cepa* foram baseados no protocolo estabelecido por Almeida com pequenas adaptações⁸⁰. Cem sementes de *A. cepa* por placa de Petri foram germinadas com água destilada em incubadora (BOD SL - 224®) com fotoperíodo de 12 h e temperatura de 25° C por 4 dias. Após a germinação, as sementes com raízes entre (1-2 cm) foram submetidas a diferentes tratamentos para avaliar a citogenotoxicidade do EE, FAE e FHM, segundo Mauro²³ e Rocha⁹⁰.

Para avaliar a citogenotoxicidade, as sementes com raízes foram transferidas para o controle negativo (CN) (Dimetilsulfóxido - DMSO a 1% em água destilada), controle do solvente (CS) (água destilada), controle positivo MMS I (Metilmetanosulfonato 10 µg/ml dissolvido em DMSO a 1%), MMS II (dissolvido apenas em água destilada) e nas concentrações de 62,5; 125; 250; 500 e 1000 µg/mL, do EE ou frações (FAE e FHM) dissolvidas em DMSO a 1%, uma placa por concentração com 30 sementes e exposição por 48 h. O MMS é um agente alquilante que induz alterações cromossômicas, como quebras, pontes e perdas cromossômicas e micronúcleos (MN) ^{91, 92,93,26}.

Após a exposição por 48 h, as raízes foram coletadas, fixadas com metanol/ácido acético (3:1) e mantidas a 4°C. Para o preparo das lâminas, as raízes foram lavadas por 3 banhos, de 5 minutos cada, em água destiladas. A hidrólise das raízes foi feita em frascos contendo HCl a 1M em banho maria, na temperatura de 60°C por 10 min. Após a hidrólise, as raízes passaram novamente por três banhos de água destilada, transferida para frasco de vidro âmbar, contendo o reativo de Schiff, onde permanecerão por 2 h em local escuro. As raízes foram então lavadas, até a total retirada do reativo, transferidas para lâminas, onde as regiões meristemáticas foram cortadas, coberta com lamínulas e cuidadosamente esmagadas em uma gota de carmim acético a 2% e montadas com Entellan® ^{80,25,94}.

A citotoxicidade e genotoxicidade foram avaliadas pela contagem de 5.000 células meristemáticas por tratamento (500 células/lâmina, com um total de 10 lâminas analisadas por tratamento) em microscópio de luz (Zeiss Primo Star com câmera Axiocam 105 color) com aumento de 400x. O experimento foi realizado em triplicata ^{80, 25,95}.

Para cada tratamento e controles, foram avaliados o índice mitótico (IM, citotoxicidade), que corresponde ao número de células nas diferentes fases da mitose (prófase, metáfase, anáfase e telófase) dividido pelo número total de células.

. Nas alterações cromossômicas (genotoxicidade), foram quantificadas as lesões diretas incluindo alterações aneugênica (C-metáfase, aderências cromossômicas, perdas cromossômicas, anáfases multipolares e metáfases poliploides) e/ou clastogênica (fragmentos de cromossomos na metáfase ou anáfase e pontes cromossômicas) comparando as fases do ciclo celular e o tipo de aberração aos controles negativos e positivos. Micronúcleos foram contabilizados indicando mau

funcionamento do fuso mitótico caracterizado por perda cromossômica, multipolaridade e alterações associadas⁹⁶.

3.9 Análise estatística

Atividade antioxidante (DPPH e ABTS) e o teor de fenóis totais foram determinados utilizando-se o programa GraphPad Prism 6.0®. Os dados do bioensaio *A. cepa* foram analisados pelo teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* com o teste “a posteriori” de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$), no programa BioEstat 5.3, para realizar a comparação entre as médias dos controles e tratamentos ⁹⁷. Adicionalmente, se os dados citados apresentarem distribuição normal e homogeneidade de variâncias, os mesmos serão analisados pelo teste paramétrico de Tukey ($p < 0,05$) no programa BioEstat 5.3 ⁹⁷.

Capítulo 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Prospecção fitoquímica

A análise fitoquímica preliminar do EE e das frações (FH, FC, FAE e FHM) (Tabela 4.1) foram analisadas com base na mudança da coloração ⁸⁴. No EE e em todas as frações (FH, FC, FAE e FHM) foi detectada a presença esteroides e triptenos. O EE, FAE e FHM foram positivo para flavonoides. Apenas a FHM exibiu a presença de saponinas e depsídeos/depsidonas. Antraquinonas foram detectadas no EE e na FAE, enquanto fenóis e alcaloides não foram observados no EE nem nas frações analisadas.

Tabela 4.1. Resultado da triagem fitoquímica do extrato etanólico e frações das folhas de *H. elongatum*.

Classe de metabólitos	EE	FH	FC	FAE	FHM
Flavonoides	+	-	-	+	+
Fenóis	-	-	-	-	-
Saponinas	-	-	-	-	+
Antraquinonas	+	-	-	+	-
Esteroides e triterpenos	+	+	+	+	+
Depsídeos/depsidonas	-	-	-	-	+
Alcaloides	-	-	-	-	-

(+) positivo; (-) negativo. EE: extrato etanólico. FH: fração hexânica. FC: fração clorofórmica. FAE: fração acetato de etila. FHM: fração hidrometanólica.

De forma geral, os testes revelaram a presença de flavonoides, esteroides e triterpenos, saponinas, antraquinonas e depsídeos/depsidonas (Tabela 4.1). Essas classes de compostos dão indícios dos potenciais efeitos medicinais atribuído a planta^{9,98}. Os flavonoides são metabólitos secundários com várias propriedades, como anti-inflamatória⁹⁹, antioxidante e anticancerígeno¹⁰⁰. Os flavonoides foram detectados em plantas do mesmo gênero, como *H. indicum*¹⁰¹, *H. glutinosum*⁴⁶, *H. sinuatum*⁵⁰ e *H. Strigosum*¹⁰².

Resultados similares foram encontrados em espécimes do mesmo gênero. A triagem fitoquímica de vários extratos de folhas, caule ou raízes de *H. bacciferum* revelou a presença de esteroides, taninos, alcaloides, saponinas, glicosídeos, terpenoides, fenóis, e flavonoides¹⁰³. Flavonoides, glicosídeos, fenóis, hormônios, terpenoides, saponinas e taninos foram observados nos extratos metanólico, etanólico, acetato de etila e clorofórmico de *H. crispum*, enquanto alcaloides, quinonas e cumarinas em apenas alguns desses extratos³⁵. No estudo fitoquímico, verificou-se que as folhas de *H. indicum* apresentaram sete dos oito grupos de metabólitos secundários avaliados (alcaloides, glicosídeos cardiotônicos, cumarinas, flavonoides, taninos, derivados antracênicos, triterpenos e esteroides), exceto saponinas¹⁰¹. As diferenças observadas entre as espécies de *Heliotropium* podem estar associadas a variação em muitas características de interesse biológico, incluindo fisionomia, preferências de habitat e características morfológicas⁵⁰.

Há uma variedade de constituintes identificados e isolados de diferentes espécies do gênero *Heliantropium* que são quimicamente ativos e têm efeitos terapêuticos significativos⁴⁶. Os ácidos orgânicos possuem ação biológica sobre diferentes gêneros de bactérias Gram negativas, sendo também utilizados na indústria de alimentos como aditivos¹⁰⁴. As antraquinonas são conhecidas por apresentarem efeito neuroprotetor¹⁰⁵, anticancerígena e/ou antibacteriana¹⁰⁶. Depsídeos e depsidonas são considerados precursores com propriedades importantes para o organismo, agindo como agentes antioxidantes, anti-tumorais, anti-pirético e anti-nociceptivo¹⁰⁴. Nas plantas, as saponinas são geralmente consideradas como parte dos sistemas de defesa devido a ação antimicrobiana, fungicida, alelopática, inseticida e moluscicida¹⁰⁷. As saponinas são de crescente interesse para a produção de drogas¹⁰⁷, por apresentar efeito citotóxico¹⁰⁸, fitoprotetor¹⁰⁹, antifúngico¹¹⁰ e antimoral¹¹¹.

4.2 Teor dos Compostos Fenólicos (TCF)

O TCF do EE, FH, FC, FAE e FHM das folhas de *H. elongatum* foram determinados pelo método de *Folin-Ciocalteu*. Os dados das absorvâncias das amostras revelaram que a fração FHM e FH apresentaram o maior teor de compostos fenólicos, seguido do EE, FC e da FAE (Tabela 4.2).

Tabela 4.2. Atividade antioxidante do extrato etanólico (EE); fração hexânica (FH), clorofórmica (FC), acetato de etila (FAE) e hidrometanólica (FHM) das folhas de *H. elongatum*.

Extrato/Frações	TCF (mg EAG/g)*	DPPH CE ₅₀ (mg/ml)	ABTS (TEAC#)
EE	24,40±1,88 ^c	1,35±0,01 ^c	88,47±5,20 ^a
FH	41,63±3,17 ^b	1,13± 0,02 ^c	100,95±1,81 ^a
FC	18,85±0,55 ^{dc}	1,41± 0,02 ^c	166,15±2,09 ^b
FAE	8,71 ± 1,03 ^e	1,73± 0,01 ^c	66,86±9,03 ^c
FHM	49,96±2,62 ^a	0,27±0,00 ^{ba}	298,33±5,53 ^d
Ácido Ascórbico	-	0,023±0,00 ^a	-
Trolox	-	0,015±0,00 ^a	-

CE₅₀: concentração eficaz para inibir 50% do radical DPPH•. *Teor de compostos fenólicos totais expresso em mg de equivalente de ácido gálico (EAG) por de peso seco de extrato de *H. elongatum*. #TEAC – capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (mM de Trolox por g da amostra). Letras diferentes nas colunas indicam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Foi possível determinar o TCF em todas as frações (Tabela 4.2), embora não tenha sido detectada a presença de fenóis na análise qualitativa. Isso se deve a presença de outras substâncias fenólicas encontradas nas outras frações como flavonoides, depsídeos e depsídonas²⁵. Sendo que o teor de compostos fenólicos depende do tipo, polaridade e pureza do solvente usado para extração¹¹².

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos tem sido atribuída a presença de hidroxilas fenólicas e suas propriedades de redução de oxigênio⁹⁵. O TCF reforça os resultados do teste da CLAE-DAD, que apresentam comprimentos de ondas

característico para fenóis no EE nos tempos 19,73 e 27,01 min com 225/393 e 277/401 nm, respectivamente, e na FHM nos tempos 3.05 a 7.01 min com comprimentos de ondas, variando de 236/389 nm (Tabela 4.4).

4.3 Atividade Antioxidante

No teste DPPH, o EE, FH, FC e FAE não mostraram diferenças significativas entre si, já a FHM apresentou a maior atividade antioxidante, revelando valores que não diferem estatisticamente dos controles, ácido ascórbico (Tabela 4.2).

No teste de ABTS, os resultados foram expressos em capacidade antioxidante equivalente Trolox (CAET). Quanto maior o valor da CAET, maior é o potencial antioxidante da amostra. A FHM mostrou melhor resultado para atividade antioxidante na eliminação do radical ABTS⁺, seguidos pela FC, FH, EE e FAE (Tabela 4.2).

Os dados do DPPH e ABTS (Tabela 4.2) mostraram que a FHM apresentou a maior atividade antioxidante para ambos os testes. Nestas duas frações, houve relação entre a capacidade antioxidante e o TCF, demonstrando a contribuição dos fenóis na capacidade antioxidante. Além disso, a presença de flavonoides também foi detectado nestas frações (teste qualitativo e CLAE), evidenciando que esses compostos, possivelmente são os principais contribuintes da atividade antioxidante. Pois quanto maior o teor total de polifenóis e flavonoides em um extrato vegetal, maior a atividade antioxidante¹¹³. Já na FH, FC e no EE não houve uma relação direta entre o TCF e atividade antioxidante (ABTS).

Possivelmente, a presença flavonoides e/ou fenóis no EE, FH e FC, bem como a quantidade destes compostos poderiam explicar ação intermediária destas frações quanto atividade antioxidante no ABTS. Além disso, na FH, atividade antioxidante pode ser atribuída também ao beta-sitosterol monometil éter, principal composto detectado na CG-MS no presente estudo, que pertence a classe de fitoquímicos antioxidantes importantes para o sistema cardiovascular, como os esteróis, principalmente o beta-sitosterol, que, assim como as gorduras monoinsaturadas, também é encontrado no azeite e no abacate ¹¹⁴. Outros compostos identificado na CG-MS, incluindo o 7,11,15-Trimetil-3-metilenohexadec-1-eno (3,17%) onde Vázquez ¹¹⁵ relataram potencial antioxidante. Enquanto que a lipofilicidade do 1,3,4-Oxadiazol desempenha um papel importante na bioatividade antimicobacteriana ¹¹⁶. O ácido ursólico isolado da FH por cromatografia clássica no presente estudo também pode

ter contribuído, pois segundo Sridhar e Charles¹¹⁷ esse composto apresenta capacidade antioxidante, antiproliferativa e propriedades anticancerígenas.

Enquanto no DPPH, não houve diferença significativa entre as frações (FH, FC e FAE) e EE (Tabela 4.2), ou seja, os valores do TCF observados não foram suficientes para resultar em diferenças no DDPH. Esse resultado pode ser explicado em parte pelas diferentes estruturas estereoquímicas dos radicais ABTS⁺ e DPPH, bem como a solubilidade dos extratos, a polaridade e a capacidade de quelação de metais desses antioxidantes que podem estar relacionado com essas discrepâncias¹¹⁸. Além disso, o método ABTS demonstrou maior sensibilidade na diferença entre as frações e o EE, possivelmente por ser um teste utilizado tanto para amostras hidrossolúveis quanto lipossolúveis⁶⁶, enquanto o DPPH[•] é aplicável ao estudo de compostos naturais hidrossolúveis¹¹⁹.

A maior sensibilidade do EE e frações no teste ABTS^{•+} em relação ao teste DPPH[•] reside no fato de apresentarem maior capacidade antioxidante na eliminação do radical ABTS^{•+}. Ressalta-se que segundo Floegel¹²⁰, a atividade antioxidante do teste com o radical ABTS, possui uma maior sensibilidade se comparado a metodologia com o radical DPPH para extratos, e esse maior efeito pode ser devido à presença de flavonoides, bem como compostos fenólicos. Além disso, conforme a literatura de¹²¹, o ensaio ABTS^{•+} é mais sensível para identificar a atividade antioxidante, pois possui cinética de reação mais rápida e maior resposta aos antioxidantes.

No estudo de Ghori⁴⁶ a FH (CE₅₀ 0,03553 mg/ml), FAE (CE₅₀ 0,03034 mg/ml) e a FHM (CE₅₀ 0,02051 mg/ml) das folhas de *H. strigosum* apresentaram melhor atividade antioxidante quando comparados aos resultados do presente estudo. Enquanto, o EE e a FC de *H. strigosum* não mostraram qualquer atividade antioxidante. Extrato bruto das flores de *H. bacciferum* exibiu excelente atividade de eliminação de radicais em todas as concentrações (25–225 µg/ml)³³.

4.4 Análise Cromatográfica

Na triagem preliminar qualitativa por CCD, foram analisadas as frações FH, FC, FAE e FHM com objetivo de identificar o melhor eluente no processo de separação dos componentes químicos das frações e as similaridades entre elas. Após várias tentativas foi possível identificara a mistura binária hexano/AcOEt (4:1) como melhor

eluente na separação dos componentes das frações em análise de CCD. Após análise foi possível identificar similaridade, como também permitiu a escolha da FH como a fração mais promissora para o processo de cromatografia em coluna da qual foi isolado 16,8 mg de FHHE-1.

4.5 Análise Espectrométrica

4.5.1 Determinação estrutural da FHHE-1

O espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 4.1) de FHHE-1 (subfração da FH) apresentou uma banda em 3416 cm^{-1} compatível com deformação axial de ligação O-H; absorção em 2927 cm^{-1} característica de deformação axial de ligação $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$, uma banda em 1715 cm^{-1} associada ao estiramento da ligação C=O da carbonila de um ácido carboxílico. Uma banda em 1690 cm^{-1} foi associada a vibrações de deformação axial C=C de alcenos e as bandas em 1277 a 1042 cm^{-1} foram relacionadas às vibrações de deformação axial da ligação C-O.

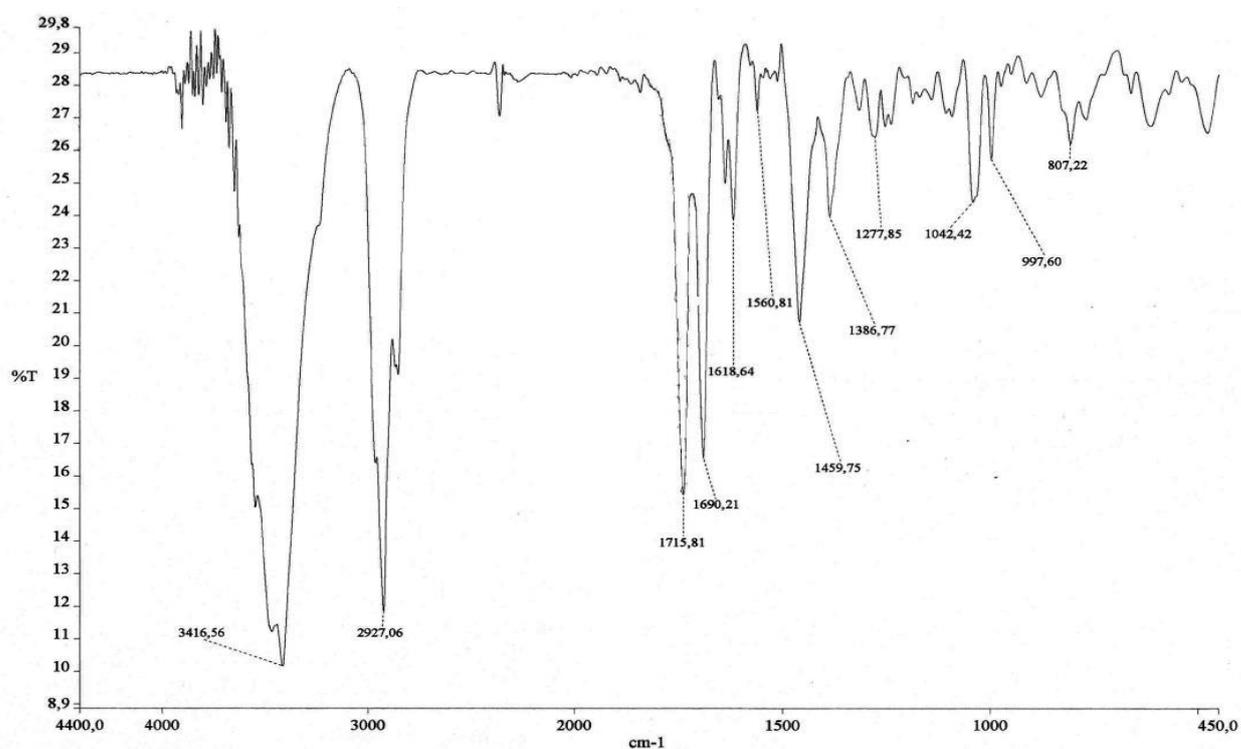


Figura 4.1. Espectro de I.V. de FHHE-1 com pastilhas de KBr

O espectro de RMN ^1H de FHHE-1 (300 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) (Figura 4.2) revelou a presença de uma ligação dupla trissubstituída, devido ao sinal de hidrogênio olefínico

em δ_H 5,51 (sl). O sinal em δ_H 3,46 (ddl, $J=8,9$ Hz) foi atribuído a um hidrogênio ligado a um carbono alifático oxigenado. Foi observado ainda um duplete em δ 2,65 ($J=11,3$ Hz), um tripleto de duplete em δ 2,35 ($J=13,3$ e $4,5$ Hz), além de multipletos entre δ 2,19 e 1,30 referentes aos vários grupos de hidrogênios metilênicos e metínicos. Sete simpletos intensos, atribuídos a hidrogênios de grupamentos metila, foram observados em: δ 1,26; 1,25; 1,07; 1,04; 1,01; 0,98; 0,91. Os dados obtidos neste espectro, acrescidos daqueles observados no espectro de I.V., permitiram sugerir a ocorrência de um esqueleto terpenoide para FHHE-1.

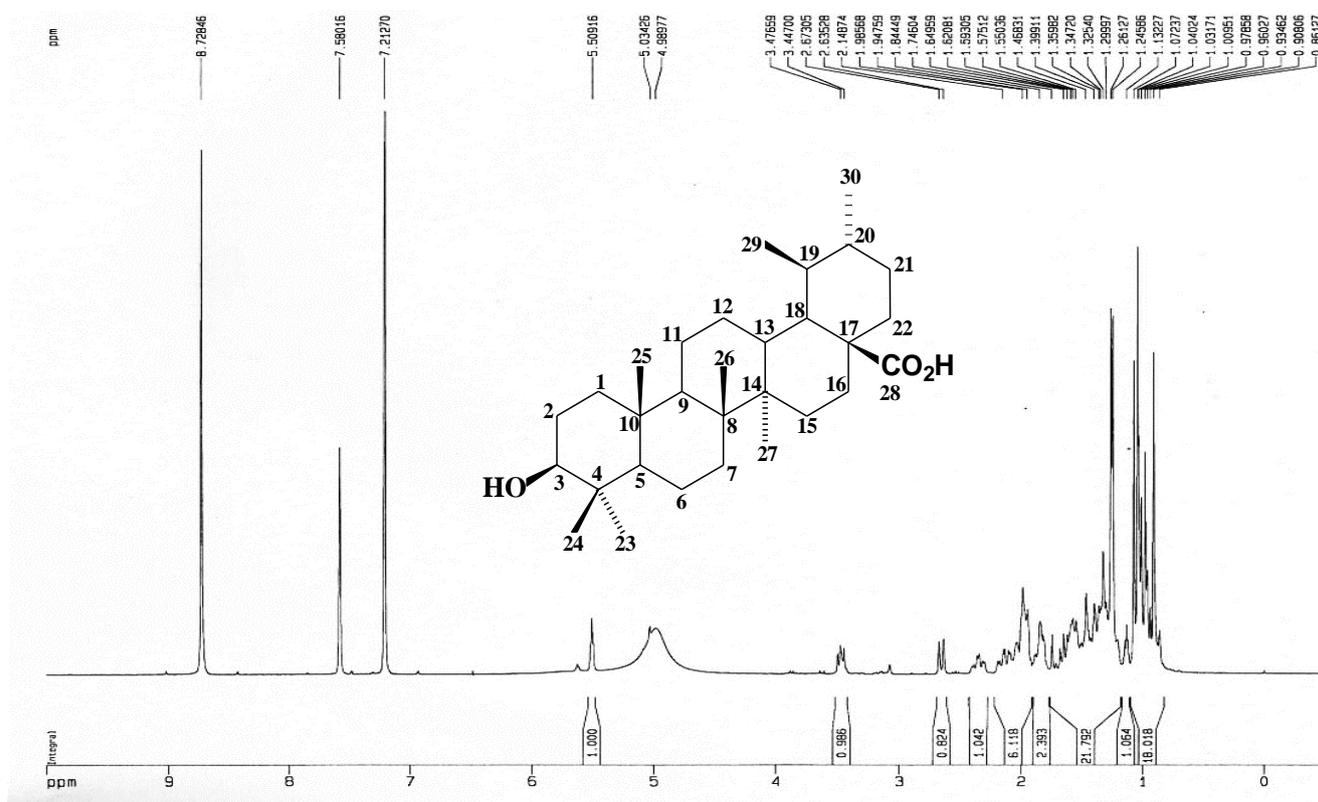


Figura 4.2: Espectro de RMN ¹H (300 MHz, C₅D₅N) de FHHE-1

O espectro de RMN ¹³C-BB (75 MHz, C₅D₅N) (Figura 4.3) apresentou 30 linhas espectrais majoritárias, confirmando a proposição de um esqueleto triterpênico. O sinal em δ_C 180,3 confirmou a presença de um grupo funcional ácido carboxílico. Os dois sinais observados em δ_C 139,7 e 126,1 foram atribuídos a carbonos olefínicos, sendo que este último foi relacionado a um carbono metínico após a comparação do espectro RMN ¹³C-BB com o espectro DEPT 135° (Figura 4.4). Um carbono carbinólico em δ_C 76,6, sinal com efeito retirador do átomo de oxigênio. Outros sinais

foram observados entre δ 56,3 e 16,1, os quais foram relacionados a carbonos metínicos, metilênicos e metílicos, como se observa na tabela 4.3.

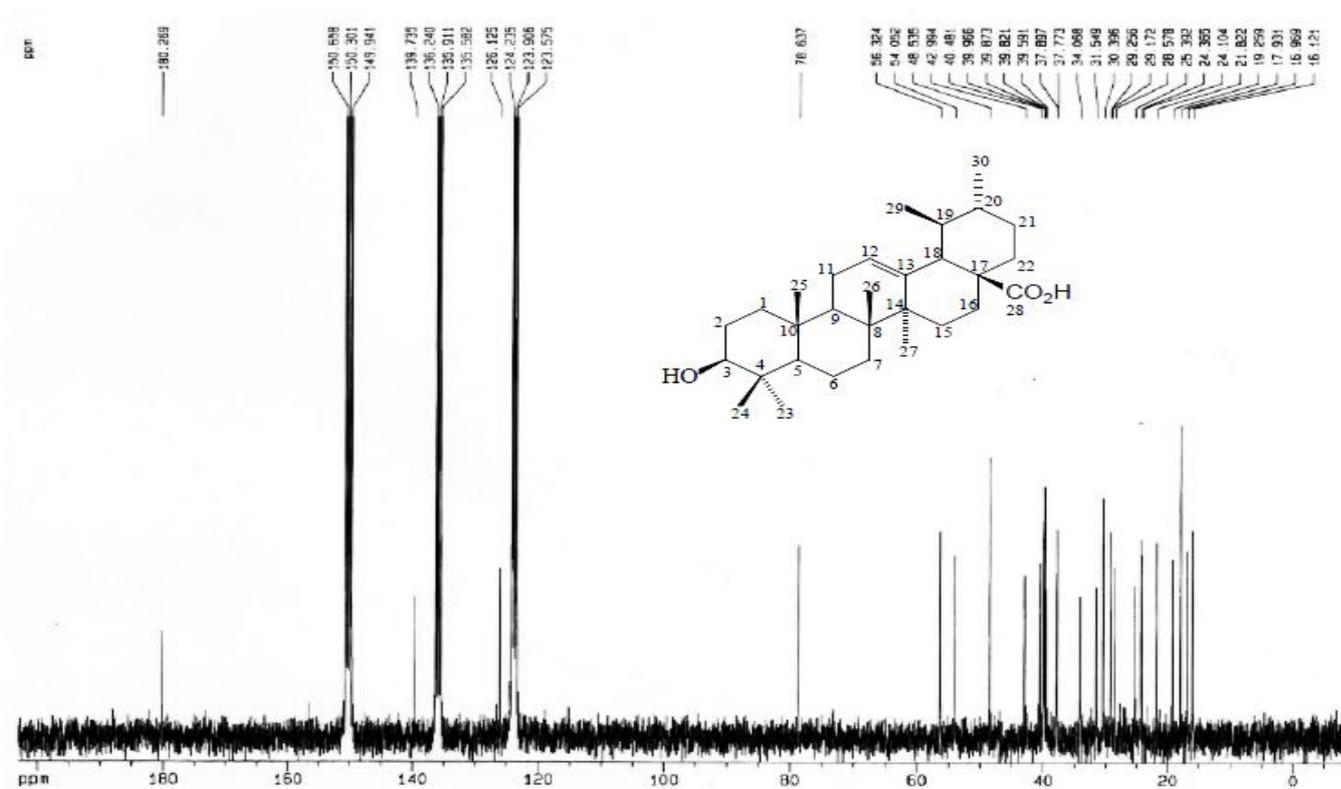


Figura 4.3: Espectro de RMN ^{13}C -CPD (75 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de FHHE-1.

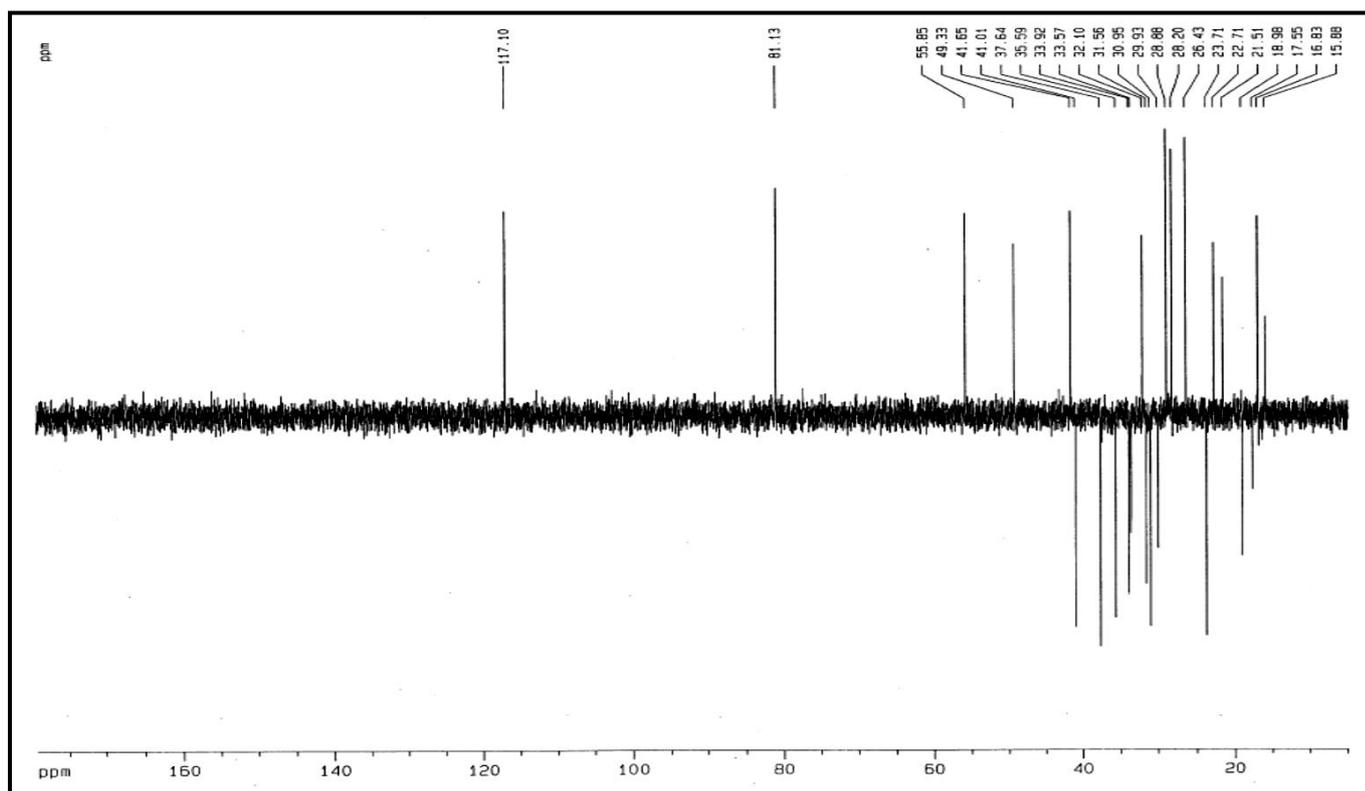


Figura 4.4: Espectro de RMN ¹³C, DEPT 135° (75 MHz, C₅D₅N) de FHHE-1.

O espectro de massa de FHHE-1 (Figura 4.5), obtido por impacto eletrônico a 70 eV, apresentou pico do íon molecular em m/z 456 daltons, confirmou a fórmula molecular C₃₀H₄₈O₃. O índice de deficiência de hidrogênio igual a sete indicou duas ligações duplas C=C e C=O, e um esqueleto triterpênico com cinco anéis fundidos. Estes dados, quando confrontados com dados espectroscópicos presentes na literatura para triterpenos, permitiram propor que FHHE-1 se tratava do triterpeno pentacíclico denominado de Ácido Ursólico ¹²² (Tabela 4.3, Figura 4.6).

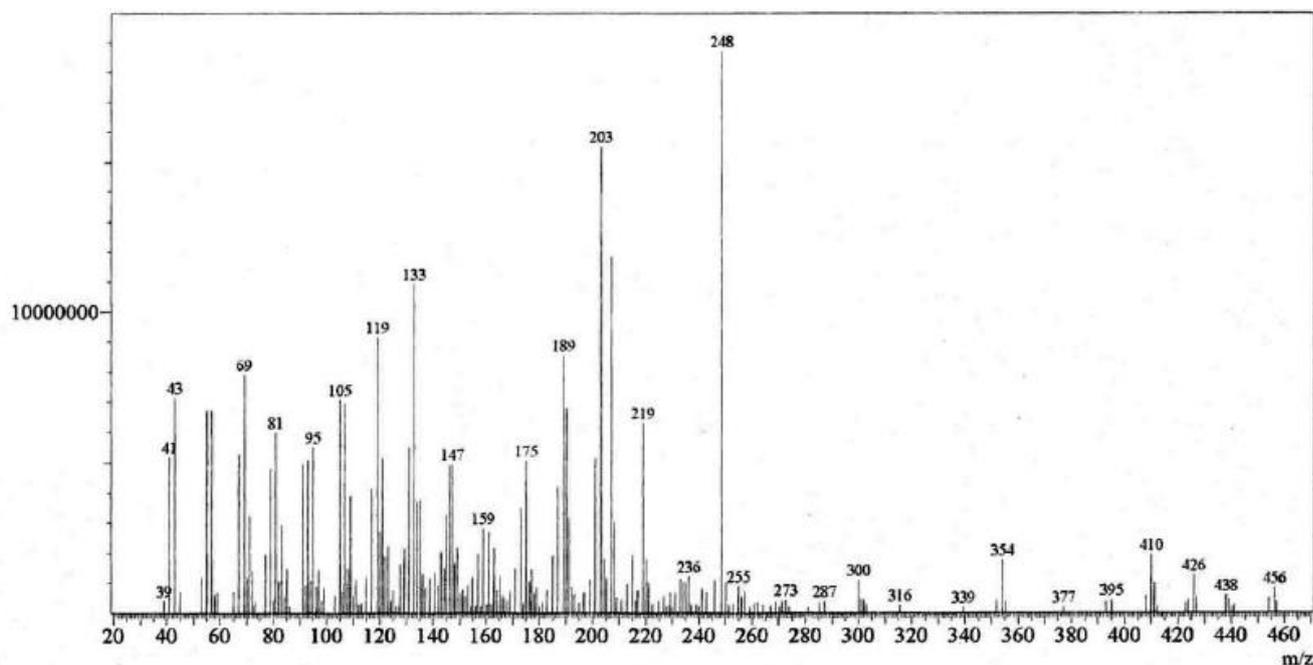


Figura 4.5: Espectro de massa de FHHE-1 (i.e. a 70 eV).

Embora na Figura 4.5 seja possível identificar o pico associado ao M^+ do ácido ursólico, avaliando o padrão de fragmentação para o ácido ursólico verifica-se que há fragmentos associados aos picos, tais como: em $m/z = 248$ que pode ser atribuído ao fragmento cuja mecanística de formação é do tipo Retro-Diels-Alder (RDA) (Figura 4.6). Ainda ao avaliar a Figura 4.5 observa-se pico em $m/z = 203$ [$248-COOH$] que pode ser oriundo do fragmento descrito anteriormente formado por perda do grupo carboxila (Figura XX) e pico em $m/z = 207$ oriundos do fragmento correlato a $m/z = 456$ (Figura XX). Também, verificam-se picos em $m/z 189$ e 133 que são provenientes de fragmentos oriundos do fragmento de sinal $m/z = 203$ segundo Ogunkoya¹²³, característico de ácido ursólico.

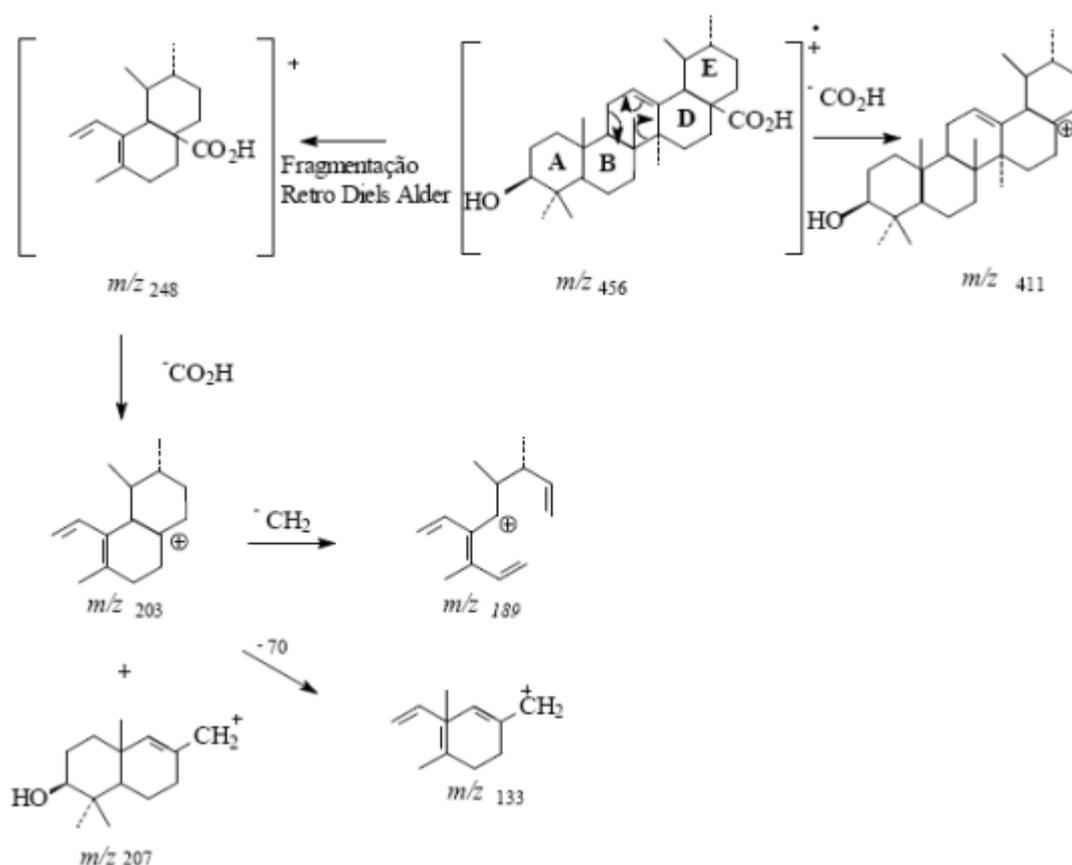


Figura 4.6: Rota de fragmentação do ácido ursólico.

O composto ácido ursólico (Figura 4.7; Tabela 4.3). Este está presente em muitas ervas medicinais e outras plantas, incluindo ginseng (*Panax ginseng*), calêndula (*Callendula officinalis*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), melaleuca (*Melaleuca leucadendron*), maçã (*Malus domestica*), pera (*Pyrus pyrifolia*), ameixa (*Prunus domestica*), cipó da mata (*Cuspidaria pulchra*) entre outras ¹²⁴. Segundo Maurya ¹²⁵, o ácido ursólico tem sido objeto de interesse para estudos anticancerígenos, apresenta atividade anti-inflamatória ¹²⁶, hepatoprotetora, analgésica, cardiotônica, sedativa, tônica e tripanossomicida ^{127,128} antitumoral e antimicrobiana ¹²⁹, com potencial antineoplásico ¹³⁰. É um triterpenoide ¹²⁶ com atividade antioxidante ¹³¹, fato que pode ter contribuído com os resultados intermediários no ABTS desse estudo para a FH.

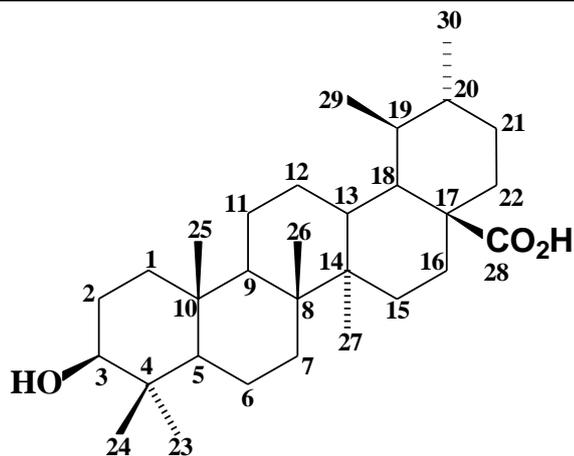


Figura 4.7: Estrutura química do ácido ursólico.

Tabela 4.3: Comparação dos dados de RMN 13C de FH-1 (75 MHz, C₅D₅N) com os do ácido ursólico (75 MHz, DMSO-d₆)¹²².

C	FHHE-1 (δ_c)	Ácido ursólico (δ_c)
1	37,9	37,4
2	28,6	28,0
3	78,6	77,9
4	39,8	39,4
5	56,3	55,8
6	19,3	19,0
7	34,1	33,7
8	40,5	40,1
9	48,5	48,1
10	37,8	37,6
11	24,1	23,9
12	126,1	125,6
13	139,7	139,2
14	43,0	42,7
15	29,2	28,6
16	25,4	24,8
17	48,5	47,9
18	54,1	53,4
19	40,0	39,6
20	39,9	39,5
21	31,5	31,2
22	39,6	39,3
23	29,3	29,3
24	16,1	16,2
25	17,9	17,9
26	18,0	18,0
27	24,4	24,3
28	180,3	179,3
29	17,0	17,1
30	21,8	22,1

4.5.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD)

A análise exploratória do EE e das frações (FAE e FHM) pela CLAE-DAD foi realizada com detecção em 254 nm. Verificou-se a presença de picos de média e alta intensidade com tempos de retenção na faixa de 10,91 a 38,55 min (Figura 4.7; 4.8; Tabela 4.4), aproximadamente, no EE o que sugeriu a presença de flavonoides, flavonóis, flavonas, fenóis e antraquinonas, por comparação com comprimentos de onda característicos de cada classe de metabólitos secundários em comparação com a literatura.

Flavonoides foram detectados a partir de dados UV-Visível na faixa de 229/322 nm, 256/351 nm, 243/350 nm para os picos com tempos de retenção de 10,91 min, 27,01 min e 38,55 min para amostras do EE (Figura 4.7). De acordo com (Nasional 2007), a presença de duas bandas bem definidas em 240-285 nm (banda II – anel A) e 300-400 nm (banda I – anel B) são indicativas da classe dos flavonoides. Os tempos 10,91 e 27,01 minutos apresentaram espectro UV com máximo de absorção entre 581 e 655 nm sugerindo a presença de antraquinonas (Figura 4.8). Picos avaliados nos comprimentos de onda de 640 e 490 nm seletivos para corantes do tipo solvente azul (SA-14) e solvente vermelho 24 (SV-24), apresentam grupos antraquinonas ¹³³.

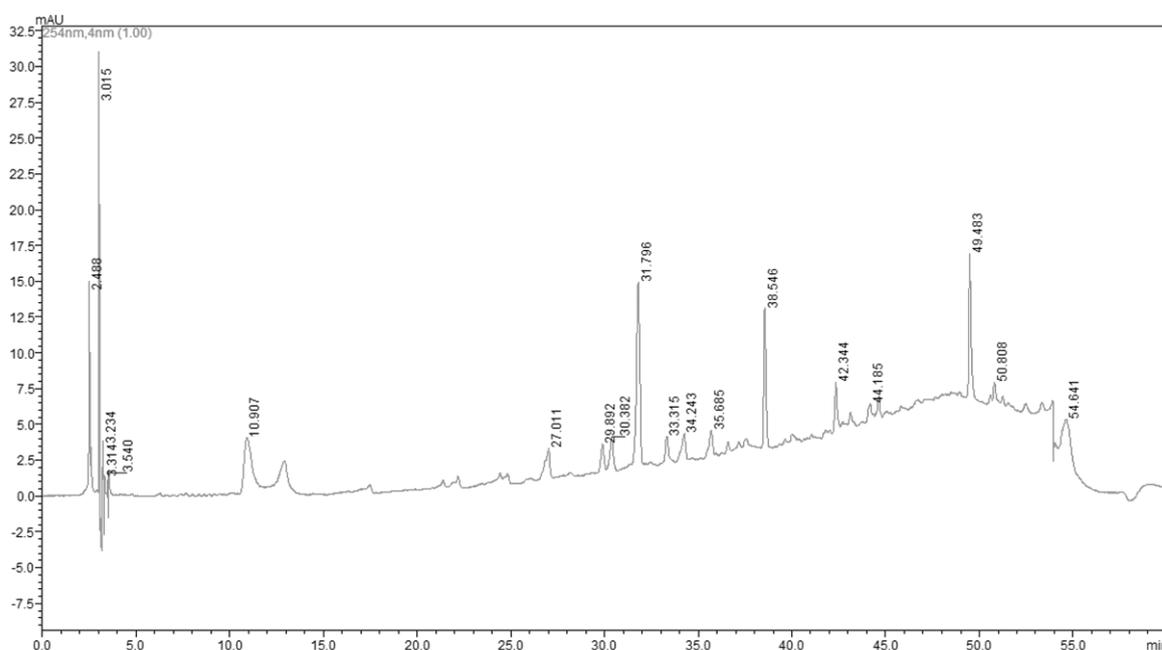


Figura 4.8: Cromatograma do EE das folhas de *H. elongatum* obtido através de análise exploratória com MeOH/H₂O.

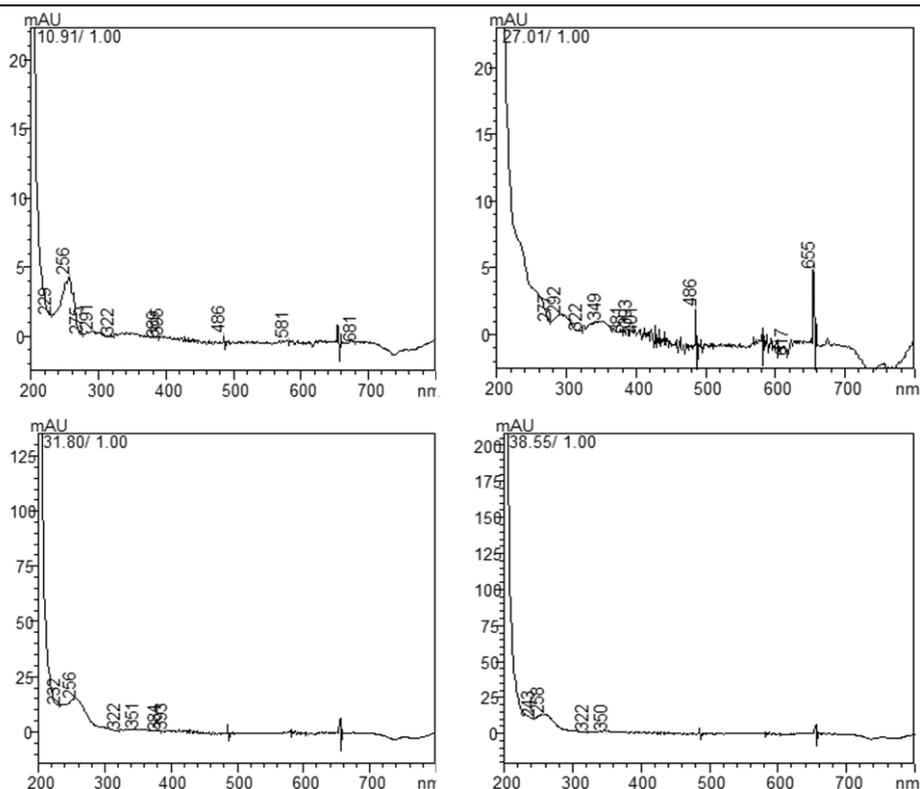


Figura 4.9: Espectros no ultravioleta dos compostos majoritários do cromatograma obtido através da análise exploratória de MeOH/H₂O do EE de *H. elongatum*.

A FAE reforça os comprimentos de onda (225/317) característico dos flavonoides em 11.55 min (Figura 4.9; 4.10; Tabela 4.4). Os comprimentos de ondas (232 a 389) se repetem na FHM nos tempos de 3.05, 4.36, 4.60, 5.74, e 7.01 para os compostos fenólicos e flavonoides (Figura 4.11; 4.12; Tabela 4.4). Os tempos 18.27 e 33.34 da FAE e 39,58 min. da FHM supõe a presença de saponinas com intervalos de 284/350, 248/381 e 262/392 como apresentado na tabela 4.4.

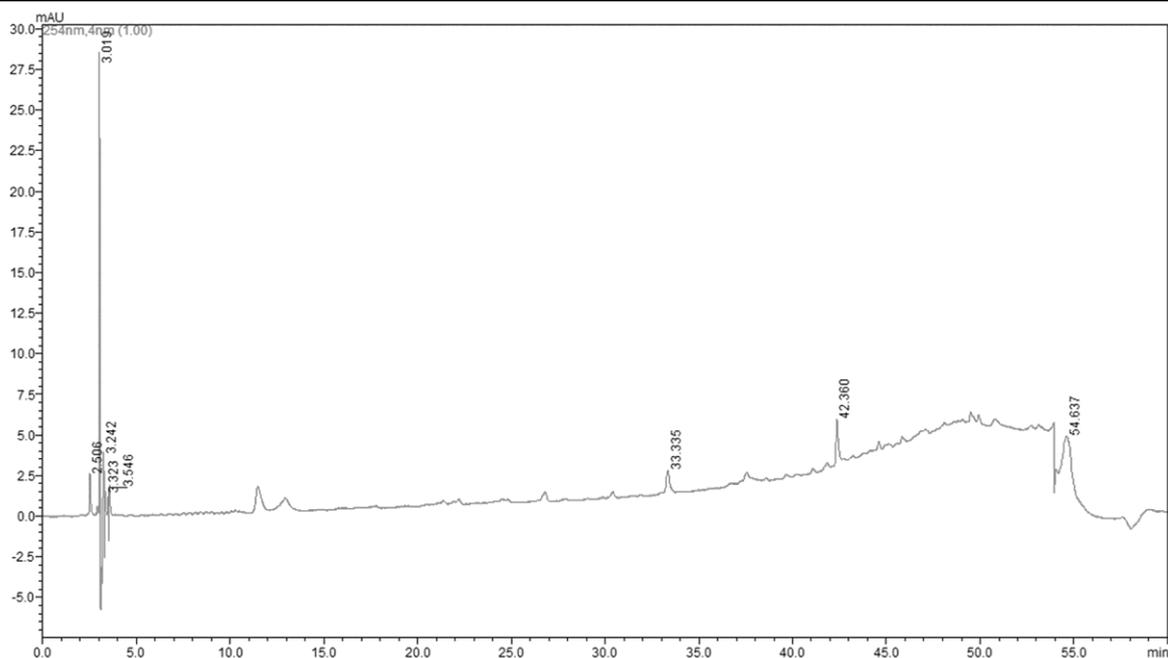


Figura 4.10: Cromatograma da FAE das folhas de *H. elongatum* obtido através de análise exploratória com MeOH/H₂O.

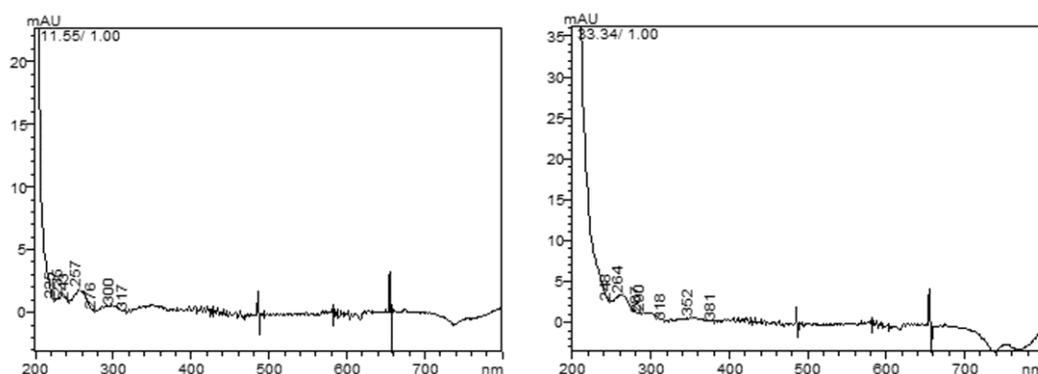


Figura 4.11: Espectros no ultravioleta dos compostos majoritários do cromatograma obtido através da análise exploratória de MeOH/H₂O da FAE das folhas de *H. elongatum*.

Indicativos de fenóis são observados nos tempos 19,73 e 27,01 min com comprimentos de ondas no intervalo de 277/401 e 225/393 nm e comprimentos de onda de 280 e 520 nm para os fenólicos¹³⁴. As saponinas apresentam absorvância com comprimento de onda no espectro de 200 a 400 nm¹³⁵. Para a FAE os tempos 18,27 e 33,34 min e FHM tempo de 39,58 min houve picos de absorvância nesse intervalo de 284/350, 248/381 e 262/392 nm, respectivamente, que supõe a presença de saponinas nesses intervalos como apresentado na Tabela 4.4.

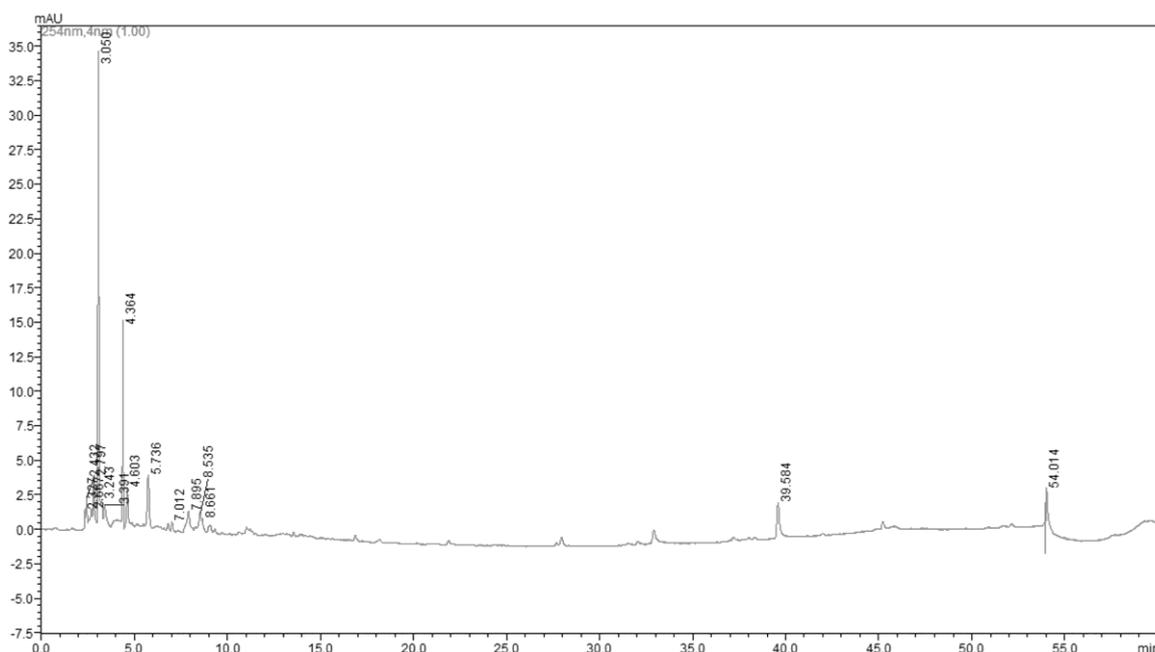


Figura 4.12: Cromatograma de identificação por CLAE-DAD de compostos da FHM das folhas de *H. elongatum* obtido através de análise exploratória com MeOH/H₂O.

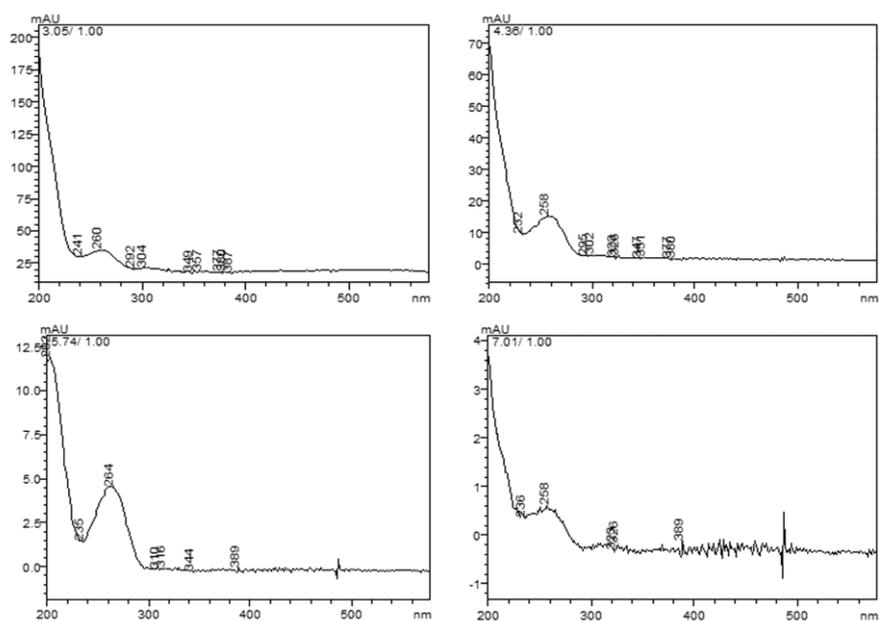


Figura 4.13: Espectros no ultravioleta dos compostos majoritários do cromatograma obtido através da análise exploratória de MeOH/H₂O da FHM das folhas de *H. elongatum*.

Tabela 4.4 Identificação de compostos do extrato etanólico (EE), fração Acetato de etila (FAE) e hidrometanólica (FHM) das folhas de *H. elongatum* por CLAE-DAD.

<i>H. elongatum</i>	Tr (Min)	λ Max	Classe de Composto	Referência
EE	10,91	229/322	Flavonoides	134
	10,91	581/681	Antraquinonas	133
	27,01	617/655		
	19,73	225/393	Fenóis	134
	27,01	277/401		136
	31,80	256/351	Flavonóis e Flavonas	137
FAE	38,55	243/350	Flavonóis	138
	11,55	225/317	Flavonoides	134
	33,34	248/381	Saponinas	135
	3,05	241/387	Fenóis	139
	4,36	232/380	Flavonoides	139
FHM	4,60	236/387		
	5,74	235/389		
	7,01	236/389		
	39,58	262/392	Saponinas	135

4.5.3 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) da FH das folhas de *H. elongatum*.

Os metabólitos detectados na fração FH geralmente são encontrados em misturas de difícil separação e elucidação estrutural. A identificação destas substâncias pode então ser realizada por CG-EM, pois permite a identificação rápida de grande quantidade de constituintes sem a necessidade de isolar estas substâncias.

A identificação dos compostos da FH por CG-EM foi realizada a partir da comparação dos tempos de retenção, considerando-se percentuais de similaridade de no mínimo 80% e comparação dos espectros de massas obtidos para cada pico na análise com aqueles das bibliotecas NIST e WILEY, através do software GCMS solutions. Os dados do cromatograma (Figuras 4.13) permitiram identificar 16 compostos na FH de *H. elongatum*. Os compostos identificados abrangem diversas

classes químicas dentre as quais: 4 ácidos carboxílicos, 2 hidrocarbonetos, 1 álcool, 1 aldeído, 1 amina, 1 nitrocomposto, 1 cetona, 1 haleto orgânico, 1 éter, 1 ester, 1 esteroide e 1 amino éster.

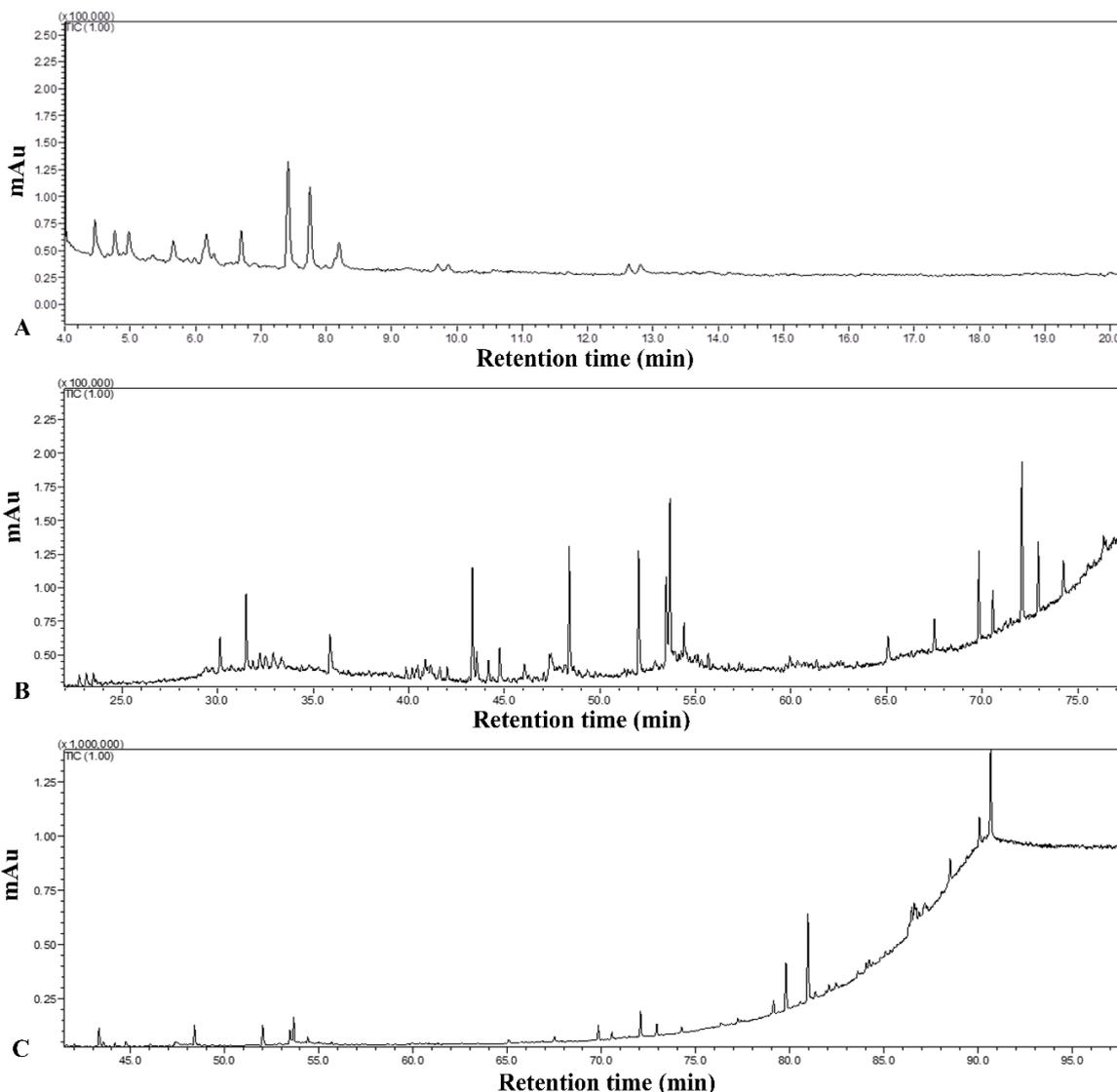


Figura 4.14: Cromatograma de íons totais detectado por GC-MS da fração hexânica das folhas de *H. elongatum* nos tempos de 4 a 20 (A), 20 a 75 (B) e 40 a 90 min. (C).

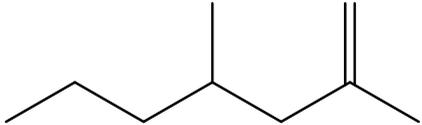
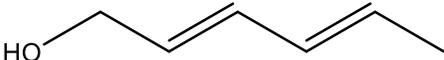
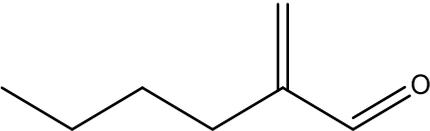
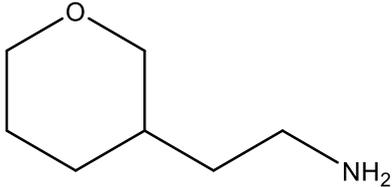
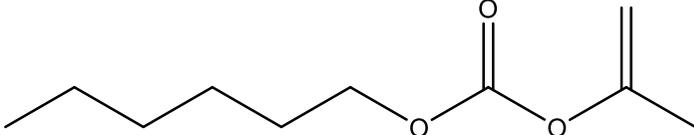
A abundância relativa (%), íon e fórmula molecular e tempo de retenção dos compostos identificados na FH por análise de CG-EM são mostrados na Tabela 4.5. Os compostos majoritários foram: β -Sitosterol monometil éter (14,64%), ácido 11-(3-Etenilciclopentil) undec-10-enóico (4,38%), pentil tetradecil éter (3,43%), 7,11,15-

Trimetil-3-metilenohexadec-1-eno (3,17%), henicossanoato de etila (2,90%), 2-Nitrohexano (2,24%), ácido undec-10-inóico (2,21%) e Triacotano, 1-iodo (1,92 %).

Análise foi realizada utilizando os tempos de retenção e interpretação dos espectros de massas íon molecular [M⁺] e pico base em comparação com os espectros de massas dos compostos isolados, bibliotecas computacionais e literatura. É possível observar a partir do cromatograma da fração FH (Figura 4.13) que diversos compostos, inclusive com picos de intensidade maiores foram detectadas, mas não foram identificadas com base na biblioteca. Isso se deve ao fato desses picos não possuírem similaridades suficientes com os bancos de dados do equipamento, o que não garante a identificação completa.

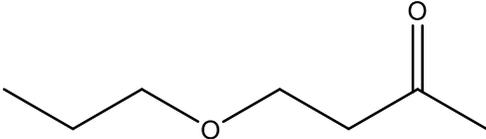
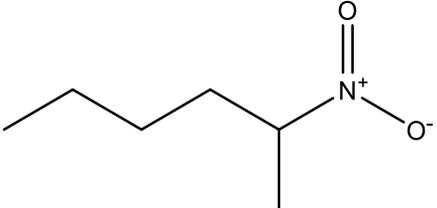
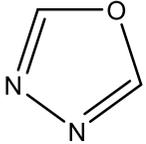
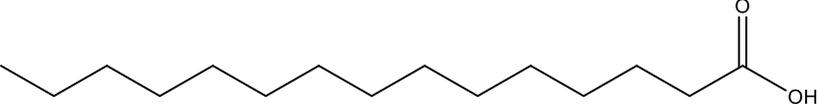
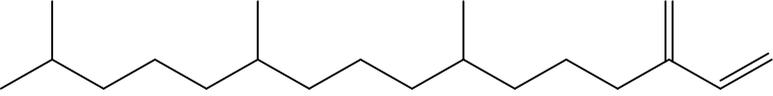
Dos 16 metabólitos identificados na CG-MS (Tabela 4.5), o composto de maior área β -Sitosterol monometil éter (14,64%) é um fitosteroide ¹⁴⁰. Os fitoesteróis ocorrem nas plantas em cinco formas comuns: álcool livre (FS), ésteres de ácidos graxos (SE), glicosídeos esterílicos (SG) e como glicosídeos esterílicos acilados (ASG) e conjugados de fitoesteróis unindo as três formas (SE, SG e ASG)¹⁴¹. É uma classe de compostos conhecidos por seu efeito de redução do colesterol LDL ¹⁴². Outro composto com atividade biológica reconhecida foi o 7,11,15-Trimetil-3-metilenohexadec-1-eno (3,17%), conhecido como neofitadieno (C₂₀H₃₈), isolado de *Turbinaria ornata*, que inibe com sucesso a expressão de citocinas pró-inflamatórias ¹¹⁵, e o 1,3,4-Oxadiazol (1,68%) de considerável importância medicinal ¹⁴³. Oxadiazóis são compostos aromáticos heterocíclicos da família dos azóis, com várias atividades biológicas, como antivirais, inibidores de tirosinase, antimicrobianos, inibidores da catepsina K, fungicidas e propriedades antineoplásicas^{116,144}.

Tabela 4.5. Compostos identificados por CG-MS na FH das folhas de *H. elongatum* distribuídas pelo tempo de retenção.

Tr (min)	Nome do composto	Área (%)	Classificação	Estrutura	Principais fragmentos [m/z (X%)]
4,46	2,4-Dimetilhept-1-e	0,53	hidrocarboneto		43 (100); 70 (75), 126 (M+)
4,76	2,4-Hexadien-1-ol	0,46	álcool		41 (100); 55 (65); 83(50) 98(M+)
4,97	2-n-Butilacroleína	0,46	aldeído		41 (100); 70(65); 81 (70); 112 (M+)
5,66	2-(Oxan-3-il) etanamina	0,40	amina		44 (100); 55 (40); 129 (M+)
6,16	ácido hexil prop-1-en-2-il éster	0,78	ácido carbônico		43(100); 58 (75); 85 (23); 186 (M+)

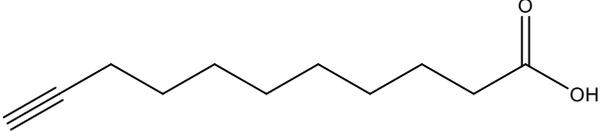
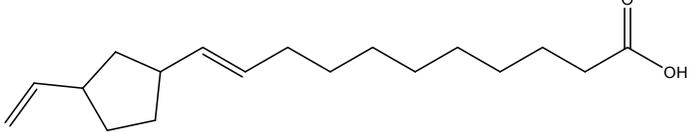
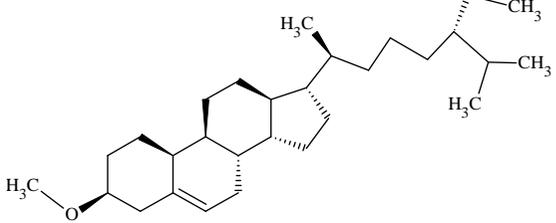
Error! Use the Home tab to apply Título to the text that you want to appear here. - Error! Use the Home tab to apply Título 1 to the text that you want to appear here.

63

6,69	4-propóxi-2-butanona	0,59	cetona e éter		43 (100);71 (75); 87(23); 130(M+)
7,41	2-Nitrohexano	2,24	nitrocomposto		43 (100); 55 (21); 85 (55);131 (M+)
7,75	1,3,4-Oxadiazol	1,68	heterocíclico		43 (100); 58 (21); 100 (15);172 (M+)
35,87	ácido pentadecanóico	1,54	ácido carbônico		43 (100);60(90) 102 (65); 143 (23); 284 (M+)
43,32	7,11,15-Trimetil-3-metilenohexadec-1-eno	3,17	hidrocarboneto		68 (100);82(90) 95 (50); 123 (23); 278 (M+)

Error! Use the Home tab to apply Título to the text that you want to appear here. - Error! Use the Home tab to apply Título 1 to the text that you want to appear here.

64

48,39	henicosanoato de etila	2,90	éster		57 (100); 95 (66); 111 (55); 352 (M+)
52,01	pentil tetradecil éter	3,43	éter		71 (100); 43 (66); 97 (21); 287 (M+)
53,45	ácido undec-10-inóico	2,21	ácido		60 (100); 43 (66); 73 (90); 129(50) 256 (M+)
53,65	ácido 11-(3-Etenilciclopentil) undec-10-enóico	4,38	ácido carbônico		108(100); 79 (80); 93 (85); 306 (M+)
69,82	triacontano, 1-iodo	1,92	haleto orgânico		57 (100); 85 (80); 99 (25); 207(15) 548 (M+)
80,95	β -Sitosterol monometil éter	14,64	éter		44 (100); 71 (80); 107 (85); 428(M+)
Total identificado		16			

4.5.4 ESI(+) Orbitrap-MS fingerprinting do extrato das folhas de *H. elongatum*.

A análise dos espectros por ESI-IT/MSⁿ do EE e suas frações revelou uma diversidade de fitocompostos pertencentes principalmente às classes químicas dos alcaloides, esteroides, terpenoides, flavonoides e ácidos fenólicos. Foram identificados 17 metabólitos secundários através do modo de ionização positiva e similaridade espectral com bancos de dados e ferramentas de desreplicação como GNPS e MetFrag.

A observação estrutural dos metabólitos por meio de busca na biblioteca espectral revelou a presença dos flavonoides Naringenina (m/z 273,0684), Luteolina (m/z 287,0477), Kaempferol (m/z 286,0477), Quercetina (m/z 303,0426), Pinocembrina (m/z 257,0735), Hesperetina (m/z 303,0790), Ramnocitrina (m/z 301,0633) e Eriodictiol (m/z 289,0633), com as principais diferenças estruturais sendo substituintes hidroxila (uma diferença de 16 Da), metoxilação e grau de insaturação^{145,146}. Foram identificados ainda ácidos fenólicos como ácido ferúlico (m/z 195,0579), ácido 4-O-metoxiferúlico (m/z 209,0579) e ácido 4-hidroxicinâmico (m/z 165,0473)¹⁴⁶. Além disso, alcaloides pirrolizidínicos como Europine, Supinine e Heliotrine foram detectados em m/z 330,1838 (C₁₆H₂₇NO₆), 284,1783 (C₁₅H₂₅NO₄) e 314,1889 (C₁₆H₂₇NO₅), respectivamente. A maioria dos compostos foi detectada como agliconas, com apenas o iridóide Nepetaside de fórmula molecular C₁₆H₂₆O₈ (m/z 347,1627) sendo identificado como um heterosídeo. Da classe dos terpenoides e esteroides, foram observados apenas os compostos Lupeol e β-Sitosterol, respectivamente. A fim de estudar a influência do componente bioativo extraído em cada fração, avaliamos o número de acertos detectados nas frações FAE (64 acertos), FC (53 acertos) e FHM (47 acertos) (Figura 4.14), confirmando a variedade de fitoquímico nessas amostras.

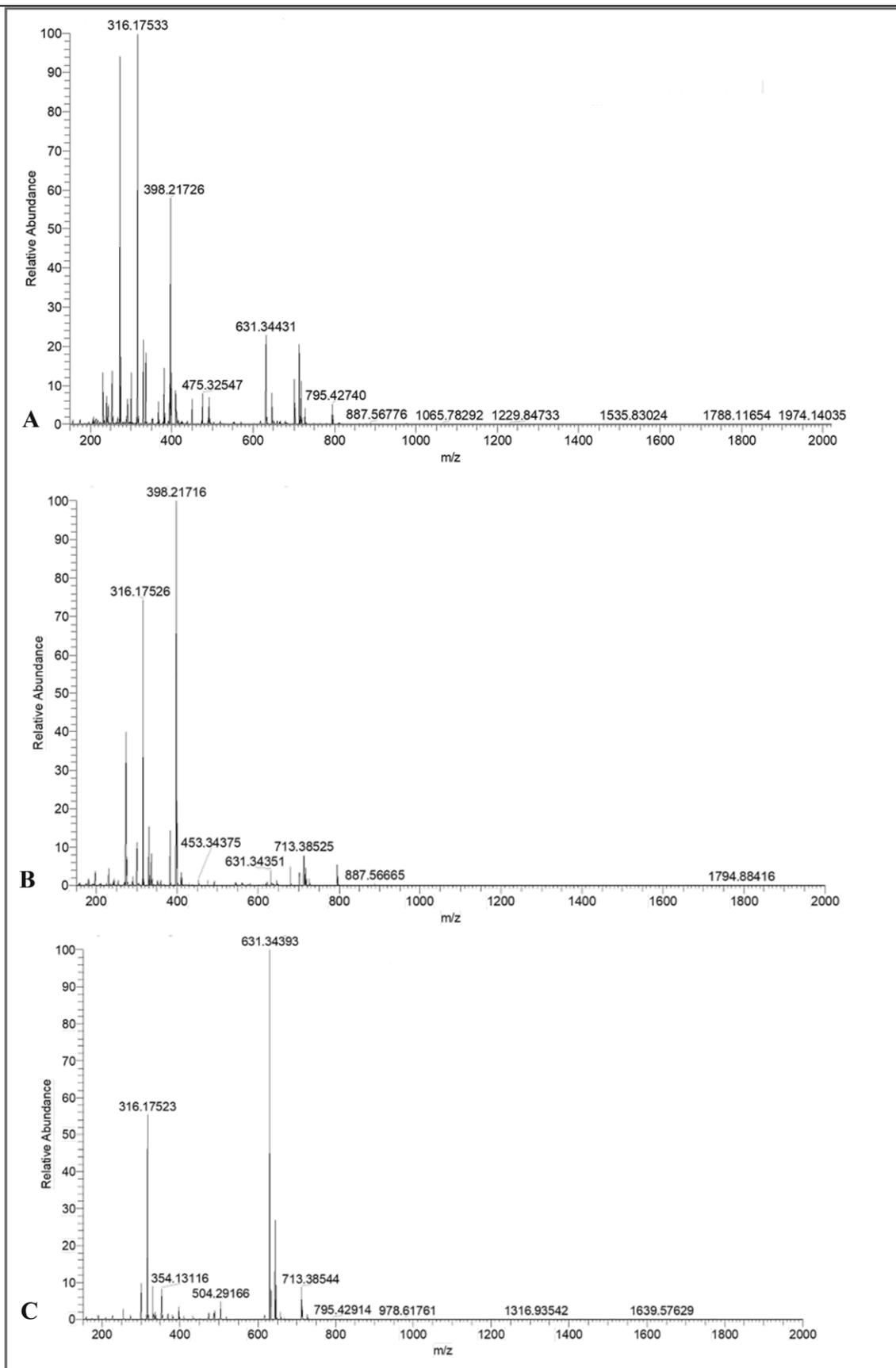


Figura 4.15: Orbitrap-MS fingerprinting das frações obtidas da extração líquido-líquido do extrato das folhas do etanólico de *H. elongatum*.

4.6 Bioensaio *A. cepa*

O efeito citotóxico não foi observado em nenhuma das concentrações (62,5 a 1000 µg/ml) do EE, da FHM (1000 µg/ml) e na menor concentração (62,5 µg/ml) da FAE, pois não houve diferença significativa do índice mitótico (IM) das células meristemáticas de *A. cepa* em relação ao controle negativo em DMSO a 1% em água destilada (CN). Enquanto na FHM (62,5 a 500 µg/ml) e na FAE (125 a 1000 µg/ml) houve redução significativa do IM, mostrando o efeito citotóxico das frações nestas concentrações. Para o EE não houve diferença significativa das diferentes fases do ciclo celular (prófase, metáfase, anáfase e telófase), enquanto na FHM (62,5 a 500 µg/ml) e FAE (125 a 1000 µg/ml) houve redução significativa apenas das prófases (Tabela 4.6).

O efeito genotóxico foi evidenciado com o aumento significativo da média total das alterações cromossômicas no EE (500 e 1000 µg/ml) e em todas as concentrações (62,5 a 1000 µg/ml) da FHM. Enquanto na FAE, nenhuma das cinco concentrações foram genotóxicas (Tabela 4.6). Em relação análise das alterações cromossômicas individuais, foi observado o aumento significativo de MN (250, 500 e 1000 µg/ml) e BN (500 e 1000 µg/ml) no EE, em todas as concentrações da FHM e redução apenas de BN (125 e 250 µg/ml) na FAE (Tabela 4.7).

Tabela 4.6 Efeito citogenotóxico do extrato etanólico (EE), fração hidrometanólica (FHM) e fração acetato de etila (FAE) das folhas de *H. elongatum* nas células meristemáticas de *A. cepa*.

Tratamento (µg/ml)	Fases da Mitose (%) (Média ± DP)				Índice Mitótico (%) (Média ± DP)	Média Total das Alterações Cromossômicas (Média ± DP)
	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase		
CN	22,88 ± 1,79	0,60 ± 0,37	0,80 ± 0,42	0,36 ± 0,22	24,60 ± 2,28	3,74 ± 1,31
MMS I	9,45 ± 0,68**	0,81 ± 0,32	1,25 ± 0,44	0,82 ± 0,13	12,33 ± 0,46**	22,00 ± 4,24**
EE						
62,5	19,46 ± 0,97	1,06 ± 0,57	1,61 ± 0,88	0,59 ± 0,48	22,71 ± 0,78	4,14 ± 1,34
125	20,03 ± 2,16	0,88 ± 0,55	1,63 ± 1,33	0,53 ± 0,32	23,07 ± 1,62	8,01 ± 4,93
250	20,30 ± 1,14	0,69 ± 0,44	0,93 ± 0,45	0,64 ± 0,33	22,55 ± 1,53	10,54 ± 4,11
500	22,95 ± 1,82	0,41 ± 0,18	0,55 ± 0,33	0,59 ± 0,42	24,50 ± 2,26	16,89 ± 4,85*
1000	22,41 ± 1,36	0,89 ± 0,75	1,11 ± 0,80	0,35 ± 0,32	24,77 ± 0,40	24,17 ± 3,88*
FHM						
62,5	11,16 ± 3,83**	0,64 ± 0,48	0,60 ± 0,49	0,28 ± 0,44	12,68 ± 4,44**	14,00 ± 2,55*
125	13,60 ± 4,42*	0,12 ± 0,18	0,08 ± 0,18	0,16 ± 0,17	13,96 ± 4,30*	14,20 ± 6,66*
250	11,36 ± 3,54**	0,48 ± 0,67	0,56 ± 0,36	0,24 ± 0,22	12,64 ± 4,48**	18,60 ± 4,72**
500	14,20 ± 5,01*	0,20 ± 0,35	0,08 ± 0,11	0,04 ± 0,09	14,52 ± 4,88*	13,00 ± 5,92*
1000	20,32 ± 7,23	0,40 ± 0,35	0,24 ± 0,26	0,16 ± 0,17	21,08 ± 3,77	14,80 ± 6,34*
FAE						
62,5	14,34 ± 1,23	0,72 ± 0,51	0,62 ± 0,71	0,64 ± 0,20	16,32 ± 1,45	5,99 ± 2,39
125	12,57 ± 1,32**	0,72 ± 0,22	1,01 ± 1,63	0,77 ± 0,34	15,05 ± 2,38*	4,70 ± 1,57
250	10,37 ± 1,53**	0,60 ± 0,54	0,76 ± 1,28	0,79 ± 0,49	12,52 ± 3,07**	2,30 ± 1,03
500	8,58 ± 0,42**	0,45 ± 0,40	0,85 ± 0,44	0,25 ± 0,35	10,12 ± 0,06**	1,24 ± 1,76
1000	6,68 ± 1,10**	0,46 ± 0,58	0,54 ± 0,41	0,03 ± 0,08	7,72 ± 1,79**	2,56 ± 1,85

CN: Controle Negativo (Dimetilsulfóxido - DMSO a 1% em água destilada). **MMS I:** Metilmetanosulfonato dissolvido em DMSO a 1%, **DP:** Desvio-padrão. *Significativo no teste de Kruskal-Wallis seguido de teste de Student-Newman-Keuls (* p < 0,05; **p < 0,01) quando comparado ao **CN**. Os resultados referem-se à análise de 5.000 células por tratamento. O DMSO 1% foi usado como controle negativo, mas como os resultados foram estatisticamente idênticos ao solvente (água destilada), os dados usando água foram omitidos. O MMS I e o MMS II (dissolvidos apenas em água destilada) também foram estatisticamente idênticos, os dados usando MMS II foram omitidos.

Tabela 4.7 Média das alterações cromossômicas em células meristemáticas de *A. cepa* após exposição ao extrato etanólico (EE), fração hidrometanólica (FHM) e fração acetato de etila (FAE) das folhas de *H. elongatum*.

Tratamento (µg/ml)	Alterações Cromossômicas (Média ± DP)							
	MN	BN	QC	AC	Cm	PC	PT	AM
CN	1,70 ± 0,47	1,48 ± 0,48	ND	0,18 ± 0,40	0,39 ± 0,43	ND	ND	ND
MMS I	12,40 ± 3,20**	5,40 ± 1,94*	1,00 ± 0,20*	1,00 ± 0,20*	0,80 ± 0,40	0,20 ± 0,15	1,20 ± 0,40**	ND
EE								
62,5	1,96 ± 1,03	0,89 ± 0,48	ND	0,54 ± 0,42	0,37 ± 0,33	ND	0,38 ± 0,52	ND
125	3,90 ± 1,12	2,67 ± 1,48	ND	0,36 ± 0,40	0,85 ± 0,50	0,23 ± 0,22	ND	ND
250	8,00 ± 3,42*	1,44 ± 1,50	0,30 ± 0,31	0,80 ± 0,68	ND	ND	ND	ND
500	10,80 ± 4,51**	4,98 ± 2,67*	ND	ND	0,23 ± 0,22	0,20 ± 0,14	0,48 ± 1,06	0,20 ± 0,44
1000	17,02 ± 5,17**	5,96 ± 2,81*	0,32 ± 0,24	0,52 ± 0,48	0,34 ± 0,27	ND	ND	ND
FHM								
62,5	10,40 ± 1,82*	2,00 ± 1,00	ND	ND	0,40 ± 0,45	0,40 ± 0,35	0,40 ± 0,55	0,40 ± 0,20
125	11,40 ± 4,72*	2,40 ± 0,89	ND	ND	0,20 ± 0,25	ND	0,20 ± 0,45	ND
250	14,40 ± 5,41**	2,20 ± 1,79	ND	ND	1,20 ± 1,17	ND	0,60 ± 0,89	0,20 ± 0,25
500	12,00 ± 5,52**	0,20 ± 0,25	ND	ND	0,60 ± 0,34	ND	0,20 ± 0,25	ND
1000	11,80 ± 3,83**	1,20 ± 0,84	ND	ND	1,00 ± 0,41	0,60 ± 0,49	ND	0,20 ± 0,25
FAE								
62,5	1,87 ± 1,88	0,76 ± 0,62	ND	1,06 ± 0,45	1,24 ± 1,10	1,06 ± 1,45	ND	ND
125	2,16 ± 1,34	ND*	0,18 ± 0,40	1,08 ± 0,80	0,75 ± 0,42	0,18 ± 0,40	0,37 ± 0,50	ND
250	0,19 ± 0,44	0,18 ± 0,21*	0,16 ± 0,37	0,88 ± 0,15	0,88 ± 0,27	ND	ND	ND
500	ND	0,83 ± 0,77	ND	ND	0,41 ± 0,59	ND	ND	ND
1000	1,29 ± 1,13	0,35 ± 0,28	ND	0,18 ± 0,21	0,74 ± 0,20	ND	ND	ND

CN: Controle Negativo (Dimetilsulfóxido - DMSO a 1% em água destilada). **MMS I:** Metilmetanosulfonato dissolvido em DMSO a 1%, **DP:** Desvio-padrão. **MN:** Micronúcleo. **BN:** Broto nuclear. **QC:** Quebra cromossômica. **AC:** Aderência cromossômica. **Cm:** C-metáfase. **PC:** Perda cromossômica. **PT:** Ponte cromossômica. **AM:** Anáfase multipolar. **DP:** Desvio padrão. **ND:** Não detectado. *Significativo pelo teste de Kruskal-Wallis com o teste de Student-Newman-Keuls a posteriori (*p < 0,05; **p < 0,01). Os resultados referem-se à análise de 5000 células por tratamento. O DMSO 1% foi usado como controle negativo, mas como os resultados foram estatisticamente idênticos ao solvente (água destilada), os dados usando água foram omitidos. O MMS I e o MMS II (dissolvidos apenas em água destilada) também foram estatisticamente idênticos, os dados usando MMS II foram omitidos.

O Dimetilsulfóxido (DMSO a 1%) utilizado como controle negativo (CN) não apresentou efeito citogenotóxico, pois não houve diferença significativa em relação a água destilada (controle do solvente). Os controles positivos, MMS I (Metilmetanosulfonato dissolvido em DMSO a 1%) e o MMS II (dissolvido em água destilada) também não apresentaram diferença significativa quando comparados um ao outro. Desta forma, os resultados usando água destilada e MMS II foram omitidos nas tabelas (Tabelas 4.6 e 4.7). Resultados similares foram observados em outros estudos com *A. cepa* utilizando o DMSO como solvente ^{79,147,94}.

Atividade não citotóxica do EE (62,5 a 1000 µg/ml), FHM (1000 µg/ml) e FAE (62,5 µg/ml) está relacionada com alteração não significativa das diferentes fases do ciclo celular, enquanto a redução significativa de prófases na FHM e FAE (dose-dependente), promoveu o efeito citotóxico (Tabela 4.6), assim como observado por ^{148,94}. Além disso, o efeito não citotóxico pode estar relacionado aos compostos naturais presentes nos extratos, que não interferiram no processo de síntese do DNA e bloqueio do ciclo celular em G2/M, permitindo que as células entrassem em mitose^{147,30}. Ressalta-se que nenhuma das concentrações do EE, FHM e nas três menores concentrações da FAE (62,5 a 250 µg/ml) apresentaram redução do IM menor do que 50% em relação ao CN (Tabela 4.6), indicando que não houve impacto letal ou subletal em *A. cepa*, não impedindo a entrada das células no ciclo celular e nem a interferência do surgimento de alterações cromossômicas¹⁴⁹. Contudo, nas maiores concentrações da FAE (500 e 1000 µg/ml), observou-se o contrário, o que pode ter comprometido o surgimento das alterações cromossômicas, que foram as menores em relação as outras concentrações (Tabela 4.6).

O efeito citotóxico observado na maioria das concentrações da FHM e FAE pode ser explicado pela presença de compostos fitoquímicos, como os triterpenos e/ou flavonoides, presentes na FAE e FHM, que interferiram na progressão do ciclo celular e/ou danos ao material genético das células, reduzindo o IM ^{150,151}. Mesmo o EE apresentando estes fitoquímicos, é provável que ação tóxica possa estar relacionada com a maior quantidade destes compostos nas frações. Resultados similares foram observados em diferentes classes de terpenos e flavonoides, compostos fenólicos (polifenóis) e catequinas que podem ser responsáveis pela redução do IM em *A. cepa* e em outros estudos *in vitro* ^{152,153,102}.

Ação citotóxica dos triterpenos pode ser justificada pela presença de grupos reativos tóxicos que aumentam os níveis de radicais prejudiciais ao DNA ^{154,155}.

Embora a citotoxicidade represente uma preocupação com relação a segurança do uso, esse efeito pode ser útil no potencial antitumoral¹⁵⁶. As substâncias predominantes nas amostras analisadas no presente estudo provavelmente foram responsáveis pela ação inibitória sobre a divisão celular. Os resultados observados são consistentes com estudos anteriores com ação antitumoral em diferentes espécies do gênero *Heliotropium* (Azeez *et al.* 2020). Os estudos de Khurm¹⁰² mostraram que o extrato diclorometano de toda a planta de *H. strigosum* Willd foi citotóxico. Assim como os estudos do extrato metanólico das folhas de *H. indicum* que demonstraram efeito citotóxico e genotóxico em *A. cepa*¹⁵⁷ e propriedade citotóxica no ensaio do MTT e *Artemia salina*¹⁵⁸.

O efeito genotóxico nas maiores concentrações do EE (500 e 1000 µg/ml) e em todas da FHM (62,5 a 1000 µg/ml) está principalmente relacionado com o aumento significativo de MN (Tabela 4.7). A presença de MN é um indicador de instabilidade cromossômica e está relacionado a presença de brotos nucleares, perda e/ou quebras cromossômicas^{159,94,25}. Enquanto na FAE, nenhuma das cinco concentrações foram genotóxicas (Tabela 4.6), bem como os diferentes tipos de alterações cromossômicas (Tabela 6). Nas maiores concentrações da FAE (500 e 1000 µg/ml), o IM abaixo de 50% pode ter comprometido o surgimento das alterações cromossômicas (Tabela 4.6).¹⁶⁰ e ¹⁶¹ argumentaram que o IM não deve ser inferior a 50% do valor do controle negativo para obter uma análise confiável das alterações cromossômicas. Além disso, nenhum outro tipo de alteração cromossômica, exceto MN e BN, apresentou valores significativos no EE e nas frações, o que evidencia que os seus metabólitos nas concentrações examinadas não interferiram no processo de condensação da cromatina, polimerização das fibras do fuso, segregação mitótica e/ou quebra cromossômica^{91,162}.

Capítulo 5

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A caracterização fitoquímica das folhas de *H. elongatum* pelas diferentes técnicas cromatográficas CG, CG-EM e CLAE mostrou uma variedade de compostos (flavonoides, ácidos fenólicos, alcaloides, terpenoides, saponinas, antraquinonas, esteroides e triterpenos, depsídeos/ depsidonas, β -sitosterol monometil éter e ácido ursólico), constatando o valor farmacológico associado ao conhecimento popular dado a espécie. Além disso, a FHM destacou-se pelo maior TCF e atividade antioxidante. Contudo, no bioensaio *A. cepa*, possivelmente, os metabólitos secundários promoveram a citotoxicidade na maioria das concentrações da FHM e FAE e efeito genotóxico no EE (500 e 1000 $\mu\text{g/ml}$) e em todas as concentrações da FHM, caracterizado pelo aumento da quantidade de MN. Assim, recomenda-se maior cuidado ao ser utilizado pela população pelos efeitos toxicogénicos observados e mais estudos nesta área.

REFERÊNCIAS

- 1 OLIVEIRA, J.C.G. de; LINHARES, M.G.; LINHARES, L.G.; CÂMARA, L.M.A.; BERTINI, L.M.; ALVES, L.A. Capacidade antioxidante e caracterização fitoquímica de *Mimosa caesalpiniaefolia*. **Res Soc Dev**. v. 9. p. e915986555. 2020.
- 2 SILVA, Á.D.F. da; FERREIRA G.L.; DIAS, A.J.A.; BARROS, N.B. de, SILVA, Z.P. do N. Use and effectiveness of medicinal plants action on cardiovascular diseases and Type 2 Diabetes: *Panax Ginseng*. **Brazilian J Dev**. v. 7, p. 86526–86549. 2021.
- 3 ROCHA, L.P.B. da; ALVES, J.V. de O; AGUIAR, I.F. da S; SILVA, F.H. da; SILVA, R.L. da; ARRUDA, L. G. de *et al*. Uso de plantas medicinais: Histórico e relevância. **Res Soc Dev**. v. 10, p. e44101018282, 2021.
- 4 SILVA, A. L. L. da. Formulário de Fitoterápicos, Brasileira F. 2º Edição. **Anvisa**, 223. 2021.
- 5 PEDROSO, R.D.S.; ANDRADE, G; PIRES, R.H. Medicinal plants: an approach to rational and safe use. **Physis**. v.31, p. 1–19. 2021.
- 6 YONEKUBO, B.T; ALVES, H. de M.; SOUZA M. E.; PERAZZO, F.F.; ROSA, P.C.P.; GAIVÃO, I.O. de M. *et al*. The genotoxic effects of fruit extract of *Crataegus oxyacantha* (hawthorn) in mice. **J Toxicol Environ Heal - Part A Curr Issues**. v. 81, p. 974–982. 2018.
- 7 VEIGA, V.F. da.; Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: Aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Rev Bras Farmacogn**. v. 18, p. 308–313. 2008.
- 8 MATTOS, G.; CAMARGO, A.; SOUSA, C.A. de; ZENI, A.L.B. Medicinal plants and herbal medicines in primary health care: The perception of the professionals. **Cienc e Saude Coletiva**. v. 23, p. 3735–3744. 2018.
- 9 RICARDO, L.M.; SOUZA, J. P. De; ANDRADE, A.; BRANDÃO, M.G.L. Plants from the Brazilian traditional medicine: Species from the books of the polish physician piotr czerniewicz (pedro luiz napoleão chernoviz, 1812–1881). **Rev Bras Farmacogn**. v. 27, p. 388–400. 2017
- 10 MELO, J.I.M. de; SEMIR, J. Taxonomia do gênero *Heliotropium* L. (Heliotropiaceae) no Brasil. **Acta Bot Brasilica**. v. 22, p.754–770. 2008.
- 11 MELO, J.I.M.de; SALES, M. F. De. *Heliotropium* L. (Boraginaceae - Heliotropioideae) de Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Rodriguesia**. v.55, p. 65–87. 2004.
- 12 PEREIRA, K.S.; IRANILDO, J.; MELO, M. De; ARLENE, M.; IRACEMA, M.; LOIOLA, B. Flora of Ceará, Brazil: Heliotropiaceae, **Rodriguésia**. v. 73, p.e02212020. 2022.

-
- 13 MELO, C.R.; LIRA, A.B.; ALVES, M.F.; LIMA, C.M.B. L.; O uso de plantas medicinais para doenças parasitárias. **Acta Bras.** v. 1, p. 28. 2017.
- 14 OFORI, A. P.; MWAURA, L; JAMNADASS, H. J.; REN, Y.F.; Medicinal plants used by residents of an area of thorny deciduous woodland, Ceará, Brazil. **Molecules.** v. 2, p. 1–12. 2020.
- 15 SCARPA, G.F. *Plantas Empleadas Contra Trastornos Criolla Del Chaco Noroccidental.* **Instituto de Botánica Darwinion.** v. 1, p. 1-14. 2002.
- 16 SILVA, C.G.; MARINHO, M.G.V.; LUCENA, M.F.A.; COSTA, J.G.M. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais em área de Caatinga na comunidade do ítio Nazaré, município de Milagres, Ceará, Brasil. **Rev Bras Plantas Med.** v.17, p. 133–142. 2015.
- 17 BAPTISTEL, A.C.; COUTINHO, J. M. C. P.; LINS NETO, E. M. F.; MONTEIRO, J. M. Plantas medicinais utilizadas na Comunidade Santo Antônio, Currais, Sul do Piauí: Um enfoque etnobotânico. **Rev Bras Plantas Med .** v. 16, p. 406–425. 2014.
- 18 SPONCHIADO, G.; ADAM, M. L.; SILVA, C. D.; SILVA, S. B.; MELLO S. C. de; CABRINI, Da *et al.* Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review. **J Ethnopharmacol.** v.178, p. 289–296. 2016.
- 19 SOUZA, M. T. M.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R.; O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Rev Bras Farmacogn.** v. 20, p. 435–440. 2010.
- 20 ACÉSIO, N. O.; CARRIJO, G. S.; BATISTA, T. H.; DAMASCENO, J. L.; CÔRREA, M. B.; TOZATTI, M. G. *et al.* Assessment of the antioxidant, cytotoxic, and genotoxic potential of the *Annona muricata* leaves and their influence on genomic stability. **J Toxicol Environ Heal - Part A Curr Issues.** v. 80, p. 1290–1300. 2017.
- 21 SOUZA, C. A. S.; ALMEIDA, L. N. de; CRUZ, E. dos S.; SILVA, C. M. L.; NASCIMENTO JÚNIOR, J. A. C.; SILVA, F. A. da; *et al.* Controle de qualidade físico-químico e caracterização fitoquímica das principais plantas medicinais comercializadas na feira-livre de Lagarto-SE. **Sci Plena.** v.13, p. 1–8. 2017.
- 22 FORMAGIO, A. S. N.; AUHAREK, S. A.; Antigenotoxic and antimutagenic effects of *Schinus terebinthifolius* Raddi in *Allium cepa* and Swiss mice: A comparative study. **Genetics and Molecular Research.** v. 13, p.3411–3425. 2014.
- 23 ROCHA, R. S.; APARECIDA, C.; KASSUYA, L.; SAMARA, A.; FORMAGIO, N.; MAURO, M. D. O. *et al.* Analysis of the anti-inflammatory and chemopreventive potential and description of the antimutagenic mode of action of the *Annona crassiflora* methanolic extract. **Pharmaceutical Biology.** v. 0209, p. 35-47. 2016.
- 24 MAITY, S.; CHATTERJEE, A.; GUCHHAIT, R. De S.; PRAMANICK, K. Cytogenotoxic potential of a hazardous material, polystyrene microparticles on *Allium cepa* L. **J Hazard Mater.** v. 385, p. 1-39. 2020.

-
- 25 FREIRE, J. dos S.; SANTOS, dos F. B. C.; SILVA, J. A. C. da.; SILVA, A. J. R. da; ALMEIDA, P. M. de, COSTA JÚNIOR, J. S. da, et al. Phytochemical and antioxidant characterization, cytogenotoxicity and antigenotoxicity of the fractions of the ethanolic extract of in *Poincianella bracteosa* (Tul.) L.P. Queiroz. **J Toxicol Environ Heal - Part A Curr Issues**. v. 83, p. 730–747. 2020.
- 26 VALE JUNIOR, E. P. D.; FERREIRA, M. V. R.; FERNANDES, B. C. S.; SILVA, T. T. D.; MARTINS, F. A.; ALMEIDA, P. M. de. Protective effect of kavain in meristematic cells of *Allium cepa* L. **An Acad Bras Cienc**. v. 94, p. 1-7. 2022.
- 27 COUTO, A. C. F.; PINHO, A. I. K. de; LOPES, A. P.; CASTELO BRANCO, C. L. M. F. M.; SANTOS, P. I. B.; SILVA, S. R. M. et al. Antimutagenic activity and identification of antioxidant compounds in the plant *poincianella bracteosa* (Fabaceae). **Rev Biol Trop**. v. 67, p. 1103–1113. 2019.
- 28 LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A.; *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutat Res - Rev Mutat Res**. v. 682, p. 71–81. 2009;
- 29 EL-KHOLY, A. S.; HAROUN, S. A.; LABEEB, M. Assessment of genotoxic effects of wastewater of Kitchener pool, Nile Delta Region, North Egypt, using *Allium* test. **Beni-Suef Univ J Basic Appl Sci**. v.1, p. 12-23. 2023.
- 30 SOUSA, H. G.; UCHÔA, V. T.; CAVALCANTI, S. M. G.; ALMEIDA, P. M.; CHAVES, M. H.; LIMA NETO, J. D. S et al. Phytochemical screening, phenolic and flavonoid contents, antioxidant and cytogenotoxicity activities of *Combretum leprosum* Mart. (Combretaceae). **J Toxicol Environ Heal - Part A Curr Issues**. v. 84, p. 399–417. 2021.
- 31 LI, Y.; KONG, D.; FU, Y.; SUSSMAN, M. R.; WU, H.; The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. **Plant Physiol Biochem**. v.148, p. 80–89. 2020.
- 32 KHAN, T.; KHAN, M. A.; MASHWANI, Z. ur R.; ULLAH, N.; NADHMAN, A. Therapeutic potential of medicinal plants against COVID-19: The role of antiviral medicinal metabolites. **Biocatal Agric Biotechnol**. v. 31, p. 101890. 2021.
- 33 AHMAD, S.; ABDEL-SALAM, N. M.; ULLAH, R. In Vitro Antimicrobial Bioassays, DPPH Radical Scavenging Activity, and FTIR Spectroscopy Analysis of *Heliotropium bacciferum*. **Biomed Res Int**. v. 2016, p. 1-12. 2016.
- 34 MANZANO, E. S.; CARDENAS, J. A. G.; AGUGLIARO, F. M. Worldwide research trends on medicinal plants. **Int J Environ Res Public Health**. v.17, p.1-20. 2020.
- 35 SHAHBAZ, A.; ABBASI, B. A.; IQBAL, J.; FATIMA, I.; ANBER, Z. S.; KANWAL, S. et al. Chemical composition of *Gastrocotyle hispida* (Forssk.) bunge and *Heliotropium crispum* Desf. and evaluation of their multiple in vitro biological potentials. **Saudi J Biol Sci** . v. 28, p. 6086–6096. 2021.

-
- 36 ROSSI, F.; JULLIAN, V.; PAWLOWIEZ, R.; ROINÉ, S. K.; HADDAD, M.; DARIUS, H. T. et al. Protective effect of *Heliotropium foertherianum* (Boraginaceae) folk remedy and its active compound, rosmarinic acid, against a Pacific ciguatoxin. **J Ethnopharmacol.** v. 143, p. 33–40. 2012.
- 37 FAYED, M. A. A.; *Heliotropium*; a genus rich in pyrrolizidine alkaloids: A systematic review following its phytochemistry and pharmacology. **Phytomedicine Plus.** v.1, p.100036. 2021.
- 38 DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacol Res.** v.112, p. 4–29. 2016.
- 39 GREGÓRIO, W.; OLIVEIRA, V. B. Análise quimiométrica de infusões medicinais utilizadas popularmente. **Sci Electron Arch.** v.14, p. 68–74. 2021.
- 40 MELO, J. I. M de; SALES, M. F.; SANTOS, F. A. R.; Morfologia polínica das espécies de *Heliotropium* L. (Boraginaceae) ocorrentes em Pernambuco, Brasil. **Ernstia.** v.16, p.69–79. 2006.
- 41 MELO, J. I. M. , LYRA-LEMOS, R. P. de; Sinopse taxonômica de Boraginaceae sensu lato A. Juss. no Estado de Alagoas, Brasil. **Acta Bot Brasilica.** 22: 701–710. 2008.
- 42 MIRANDA, de M. J. I.; Flora do Parque Nacional do Catimbau, Pernambuco, Brasil: Boraginaceae sensu lato. **Biotemas.** v. 25, p. 109–120. 2012.
- 43 DRESLER, S.; SZYMCZAK, G.; WÓJCIK, M. Comparison of some secondary metabolite content in the seventeen species of the boraginaceae family. **Pharm Biol.** v.55, p. 691–695. 2017.
- 44 FERNANDES, J. M. LUCIANA, M.; MELO, A. De, BATISTA, A.M.; SANTOS, G. S.; SILVA, B. M.; CELUTA, M. et al. Estudo Morfológico de *Heliotropium transalpinum* vell. (Boraginaceae): Uma Espécie Medicinal em Alta Floresta, Mato Grosso. **Enc.Bio. Cen. Cient. Conhecer.** V.1, p. 530–543. 2017.
- 45 MELO, J. I. M. de; SEMIR, J. Taxonomy of the genus *Euploca* Nutt. (Heliotropiaceae) in Brazil. **Acta Bot Brasilica.** v.24, p. 111–132. 2010.
- 46 GHORI, M. K.; GHAFARI, M.; HUSSAIN, S.; MANZOOR, M.; AZIZ, M.; SARWER, W.; Ethnopharmacological, phytochemical and pharmacognostic potential of genus *heliotropium* L. **Turkish J Pharm Sci.** v.13, p. 259–280. 2016.
- 47 ROQUE, A.; ROCHA, R.; LOIOLA, M. I.; Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (Nordeste do Brasil). **Rev Bras Plantas Med.** v.12, p.31–42. 2010.
- 48 PERES, R. S.; MENEZES, G. B.; TEIXEIRA, M. M.; CUNHA, F. Q.; Pharmacological opportunities to control inflammatory diseases through inhibition of the leukocyte recruitment. **Pharmacol Res.** v. 112, p. 37–48. 2016.

-
- 49 FERREIRA, F. N.; Conhecimento e Usos de Plantas Medicinais e Suas Interconexões Com a Saúde Pública do Município de Arauá/Se, 2017. Disponível em: <https://ri.ufs.br/handle/riufs/7854>; 4: 9–15.
- 50 GOYAL, N.; SHARMA, S. K.; Bioactive phytoconstituents and plant extracts from genus *Heliotropium*. **Int J Green Pharm.** v. 8, p. 217–225. 2014.
- 51 TERAMOTO, A.; MARTINS, M. C.; CUNHA, M. G. Avaliação de Métodos para Preservação de Isolados de *Corynespora cassiicola* (Berk. & M.A. Curtis) C.T. Wei. **Pesqui Agropecuária Trop.** v.41, p. 1-17. 2011.
- 52 KOCHHAR, S. L.; GUJRAL, S. K.; Secondary Plant Metabolites. **Plant Physiol.** v. 1, p. 590–610. 2020.
- 53 ÁVALOS, A.; ELENA, G. Efecto del pH sobre la proporción de sexos, el crecimiento y la sobrevivencia del guppy *Poecilia reticulata* Peters, 1859. **Hidrobiológica.** v. 8, p. 125–132. 1998.
- 54 AMMAL, R. M.; VIJI, G.; BAI, S. GC-MS Determination of Bioactive Constituents of *Heliotropium indicum* Leaf. **J Med Plants Stud Year.** v. 1, p. 1-4. 2013;
- 55 STEVENSON, P. C.; NICOLSON, S. W.; WRIGHT, G. A. Plant secondary metabolites in nectar: impacts on pollinators and ecological functions. **Funct Ecol.** v.31, p. 65–75. 2017.
- 56 SECA, A. M. L.; PINTO, D. C. G. A. Plant secondary metabolites as anticancer agents: Successes in clinical trials and therapeutic application. **Int J Mol Sci.** v. 19, p. 1-22. 2018.
- 57 FELIPE, O. L.; BICAS, L. J. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química Nov na Esc.** v.39, p. 120–130. 2017
- 58 BICAS L. J. FELIPE, L. O. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química Nov na Esc.** v. 39, p. 120-130. 2017.
- 59 FORNI, C.; FACCHIANO, F.; BARTOLI, M.; PIERETTI, S.; FACCHIANO, A. D'ARCANGELO D. et al. Beneficial role of phytochemicals on oxidative stress and age-related diseases. **Biomed Res Int.** v. 2019, p.1-17. 2019.
- 60 ROSA, L. A. de la; ESCAMILLA, J. O. M.; GARCÍA, J. R.; PARRILLA, E. R. Phenolic compounds. **Elsevier Inc.** v. 12, p. 253-271. 2018
- 61 HILLIS, B. W. E.; SWAIN, T. The Phenolic Constituents of *Prunus domestica* II- The Analysis of Tissues of the Victoria Plum Tree. **J. Sci. Food Agric.** v.10, p. 135–144. 1959.
- 62 MORAES, G. V.; JORGE, G. M.; GONZAGA, R. V.; SANTOS, D. A. dos. Potencial antioxidante dos flavonoides e aplicações terapêuticas. **Res Soc Dev.** v. 11, n.14, p. 1-12. 2022;

-
- 63 DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades Antioxidantes De Compostos Fenólicos. **Visão Acadêmica**. v. 5: p. 33–40. 2004.
- 64 JORGE, T. F.; MATA, A. T.; ANTÓNIO, C. Mass spectrometry as a quantitative tool in plant metabolomics. **Philos Trans R Soc A Math Phys Eng Sci**. v.374. p.1-26. 2016.
- 65 APAK, R.; ÖZYÜREK, M.; GÜÇLÜ, K.; ÇAPANOLU, E. Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays. **J Agric Food Chem**. v. 64. p.997–1027. 2016.
- 66 SUCUPIRA, N. R.; SILVA, A. B. Da, PEREIRA, G.; COSTA, J. N. Da. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**. v. 14. p. 263–269. 2014.
- 67 UCHÔA, V. T.; SOUSA, C. M. M.; CARVALHO, A. A.; SANT’ANA, A. E. G.; CHAVES, M. H.; Free radical scavenging ability of *Ximenia americana* L. stem bark and leaf extracts. **J Appl Pharm Sci**. v.6. p. 091–096. 2016.
- 68 OLIVEIRA, G. L. S.; Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: Estudo de revisão. **Rev Bras Plantas Med**. v. 17. p. 36–44. 2015.
- 69 DRAVIE, E. E.; KORTEI, N. K.; ESSUMAN, E. K.; TETTEY, C. O.; BOAKYE, A. A.; HUNKPE, G. Antioxidant, phytochemical and physicochemical properties of sesame seed (*Sesamum indicum* L). **Sci African**. v. 8. p.1-7. 2020.
- 70 SHENG, Y. A. N.; GUANG-NING, S. U.; PEI-CHAO, Z. QIANG, G. U. I.; ENGINEERING, E.; GRID, P. Uma Abordagem Sobre Métodos Analíticos Para Determinação Da Atividade Antioxidante Em Produtos Naturais. **Cent Cient Conhecer**. v. 39. P. 1–26. 2011.
- 71 MARINHO, T. A.; OLIVEIRA, M. G.; MENEZES FILHO A. C. P.; CASTRO, C. F. S.; OLIVEIRA, I. M. M.; BORGES, L. L. et al. Phytochemical characterization, and antioxidant and antibacterial activities of the hydroethanolic extract of *anadenanthera peregrina* stem bark. **Brazilian J Biol**. v. 82. p. 1–12. 2022.
- 72 JUSZCZAK, A. M.; KONCIC, M. Z.; TOMCZYK, M. Recent trends in the application of chromatographic techniques in the analysis of luteolin and its derivatives. **Biomolecules**.v.9: p.1-39.
- 73 PERES, T. B.; Noções básicas de cromatografia. **Biológico** 2002; v.64. p. 227–229.
- 74 DALL’ANTONIA, L. H.; ARCHELA, E. Determinação de Compostos Fenólicos em Vinho: Uma revisão. **Semin Ciências Exatas e Tecnológicas**.v. 34. p. 193. 2013.
- 75 NOH, C. H. C.; AZMIN, N. F. M.; AMID, A. Principal component analysis application on flavonoids characterization. **Adv Sci Technol Eng Syst**. v. 2p. 435–440. 2017.
- 76 RINALDO, D.; RODRIGUES, C. M.;MONTORO. P.; PICACENTE, S.;PIZZA,

-
- C.VILEGAS,W. *et al.* Caracterização por ESI-IT-MS n dos metabólitos secundários presentes na infusão de *Neea theifera* Oerst. (Nyctaginaceae) **Socied Bras de Química**. v.1, p. 1-2. 2005.
- 77 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. **Ecotoxicol Environ Saf**. v. 72, p. 1680–1686. 2009.
- 78 VERRI, A. M.; MOURA, A. D. A.; MOURA, V. M. De. Testes Citogenéticos na Avaliação da Genotoxicidade de Produtos Naturais Provindos de Plantas Medicinais. **Rev Uningá Ver**. v.30. p. 55–61. 2017.
- 79 ANACLETO, L. R.; ROBERTO, M. M.; MARIN-MORALES, M. A. Toxicological effects of the waste of the sugarcane industry, used as agricultural fertilizer, on the test system *Allium cepa*. *Chemosphere* 2017; **173**: 31–42.
- 80 ALMEIDA, P. M.; ARAÚJO, S. S.; SANTOS, I. R. M. R.; MARIN-MORALES, M. A.; BENKO-ISEPPON, A. M.; SANTOS, A. V. et al. Genotoxic potential of leaf extracts of *Jatropha gossypifolia* L. **Genet Mol Res** v. 15. p.1-8. 2016.
- 81 ARAÚJO, J. R. da S.; MORAIS, J. G. S.; SANTOS, C. M., ROCHA, K. C. A.; FAGUNDES, A. da C. A. R.; e SILVA FILHO, F. A. et al. Phytochemical prospecting, isolation, and protective effect of the ethanolic extract of the leaves of *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. **J Toxicol Environ Heal - Part A Curr Issues** v. 84. p. 743–760. 2021.
- 82 FEDEL-MIYASATO, L. E. S.; KASSUYA, C. A. L.; AUHAREK, S. A.; FORMAGIO, A. S. N.; CARDOSO, C. A. L.; MAURO, M. O. et al. Evaluation of anti-inflammatory, immunomodulatory, chemopreventive and wound healing potentials from *Schinus terebinthifolius* methanolic extract. **Rev Bras Farmacogn** v.24. p. 565–575. 2014.
- 83 ALMEIDA, P. M.; VIDAL, A. C. B.; MORALES, M. A. M.; ISEPPON, A. M. B.; Potencial Genotóxico do Extrato Foliar e do Látex de Pinhão-Roxo (*Jatropha gossypifolia* L). 2014. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/12336>: 113. Acesso em 10/09/2023.
- 84 MATOS, 2009. **Introdução a Fitoquímica Experimental**. African Arguments, 2009.
- 85 WILLIAMS, W. B.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C.; Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Sci Technol** v. 28. p. 25–30. 1995.
- 86 SOUSA, M. S. B.; VIEIRA L. M.; LIMA A. de. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de resíduos de polpas de frutas tropicais. **Brazilian J Food Technol**. v. 14. p. 202–210. 2011.
- 87 SERENO, A. B.; ANDRADE, M. T. P. de, BORGES, G. da S. C.; MONTRUCCHIO, D. P.; FERREIRA, S. M. R.; BERTIN, R. L. et al. Teor De Compostos Fenólicos E Capacidade Antioxidante Encontrados na Casca Do Maná-Cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal), Cultivado Na Mata Atlântica Brasileira. **Brazilian J Dev**. v.6. p.

-
- 93187–93199. 2020.
- 88 PEREIRA, V. P.; KNOR, F. J.; VELLOSA, J. C. R.; BELTRAME, F. L.; Determinação de compostos fenólicos e atividade antioxidante dos chás, verde, preto, e branco, de *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, Theaceae. **Rev Bras Plantas Med** v. 16. p.490–498. 2014.
- 89 MORALES, M. A. M. Evaluation of the antimutagenic activity and mode of action of the fructooligosaccharide inulin in the meristematic cells of *Allium cepa* culture. **Gen and Molec Research** v. 14. p. 1-13. 2014.
- 90 BIANCHI, J.; MANTOVANI, M. S.; MORALES, M. A. M. Analysis of the genotoxic potential of low concentrations of Malathion on the *Allium cepa* cells and rat hepatoma tissue culture. **J Environ Sci (China)**. V. 36. p. 102–111. 2015.
- 91 LUSTOSA, E. A.; NÓBREGA, E. de K.; SILVA, L. de B.; MARINHO, M. C. P.; ARAÚJO, O. S. M. de; ALVES, Y. R. de A. et al. Uso de plantas medicinais pelos professores, estudantes e seus familiares durante a pandemia da COVID-19: um relato de experiência. *Res Soc Dev*. v. 10. p. 1-8. 2021.
- 92 SILVA, M. C.; MATOS, A. F.; SANTOS, H. L. C. Dos; GOMES, J. V.; PASTURA, D. G. N.; PEREIRA, G. L. et al. *Laurus nobilis* L.: Assessment of the cytotoxic and genotoxic potential of aqueous extracts by micronucleus and *Allium cepa* assays. *Brazilian J Pharm Sci*. v. 56. p. 1–9. 2020.
- 93 DIAS, M. S.; JUNIOR, E. P. V.; SANTOS, B. C. Dos; MARTINS, F. A.; ALMEIDA, P. M.; PERON, A. P. Cytogenotoxicity and protective effect of piperine and capsaicin on meristematic cells of *allium cepa* . **An Acad Bras Cienc** v. 93. p. 1-15. 2021.
- 94 DIAS, W. L. F.; VALE, E. P.; DORES, M.; OLIVEIRA, A. De; BARBOSA, Y. L. P.; NASCIMENTO, J. et al. South African Journal of Botany Cytogenotoxic effect , phytochemical screening and antioxidant potential of *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill leaves. **South African J Bot**. v. 123. p. 30–35. 2019.
- 95 NEVES, C. S.; GOMES, S. S. L.; SANTOS, T. R. Dos, ALMEIDA, M. M.; SOUZA, Y. O.; GARCIA, R. M. G. et al. The phytoecdysteroid β -ecdysone is genotoxic in Rodent Bone Marrow Micronuclei and *Allium cepa* L. Assays. **J Ethnopharmacol**. v. 177. P. 81–84. 2016.
- 96 AYRES, M. et al. **Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Bio-Médicas**. BioEstat. 2007.
- 97 ALMEIDA, C. de F. C. B. R.; RAMOS, M. A.; AMORIM, E. L. C. De; ALBUQUERQUE, U. P. de. A comparison of knowledge about medicinal plants for three rural communities in the semi-arid region of northeast of Brazil. **J Ethnopharmacol** . v. 127. p. 674–684. 2010.
- 98 SERAFINI, M. PELUSO, I.; RAGUZZINI, A. Antioxidants and The Immune System Flavonoids as anti-inflammatory agents. **Proc Nutr Soc**. v.69. p. 273–278. 2010.

-
- 99 KHATER, M.; RAVISHANKAR, D.; GRECO F. OSBORN, H. M. I. Metal complexes of flavonoids: Their synthesis, characterization and enhanced antioxidant and anticancer activities. **Future Med Chem.** v. 11. p. 2845–2867. 2019.
- 100 BAENA, J. E. E.; RESTREPO, S. M. R.; CANO, B. S. C.; SANDOVAL, H. del R. D.; ESTRADA, H. A. G.; Perfil fitoquímico, actividad anti-Leishmania, hemolítica y toxicológica de *Cordia dentata* Poir. y *Heliotropium indicum* L. **Rev Cuba Plantas Med.** v.19. p.208-224 2014; **19**: 208–224.
- 101 KHURM, M.; CHAUDHRY, B.; UZAIR, M. JANBAZ, K. Antimicrobial, Cytotoxic, Phytotoxic and Antioxidant Potential of *Heliotropium strigosum* Willd. **Medicines.** V. 3. p.20. 2016.
- 102 AHMAD, S.; AHMAD, S.; BIBI, A.; ISHAQ, M. S.; AFRIDI, M. S.; KANWAL, F. et al. Phytochemical analysis, antioxidant activity, fatty acids composition, and functional group analysis of *Heliotropium bacciferum*. **Sci World J** v. 2014. P.1-8. 2014
- 103 CARLOS, A.; MENEZES, P. De; SANTOS, M. C.; FREDERICO, C.; Prospecção Fitoquímica, Físico-Química e Biológica do Extrato Hidroetanólico Floral de [*Tabebuia impetiginosa* (MART. ex DC.) STANDL.]. **Perspect online Biológicas Saúde.** v.11. p. 1–25. 2021.
- 104 PICKHARDT, M.; GAZOVA, Z.; VON BERGEN, M.; KHLISTUNOVA, I.; WANG, Y.; HASCHER, A. et al. Anthraquinones inhibit tau aggregation and dissolve Alzheimer’s paired helical filaments *in vitro* and in cells. **J Biol Chem.** v.280. p. 3628–3635. 2005.
- 105 GONG, H.; HE, Z.; PENG, A.; ZHANG, X.; CHENG, B.; SUN, Y. et al. Effects of several quinones on insulin aggregation. **Sci Rep.** V. 4. p. 1–8. 2014.
- 106 AUGUSTIN, J. M.; KUZINA, V.; ANDERSEN, S. B.; BAK, S. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. **Phytochemistry.** v. 72. p. 435–457. 2011.
- 107 PANDEY, H.; KUMAR, S.; Butylated hydroxytoluene and Butylated hydroxyanisole induced cyto-genotoxicity in root cells of *Allium cepa* L. **Heliyon.** v. 7.p. e07055. 2021.
- 108 FERNANDES, M. C.; CARVALHO, M. B. F.; SANTOLIN, G. O.; FARIAS, K. G.; COSTA, C. B. da; MENDONÇA, A. Relato de experiência sobre o potencial bioherbicida da *Cojoba arborea* na germinação e vigor de *Cassia fistula*. **Rev ELO – Diálogos em Extensão.** v. 11. p. 1–8. 2022.
- 109 MARQUI, S. R. De; LEMOS, R. B.; SANTOS, L. Á.; GAMBOA, I. C.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, S. et al. Saponinas Antifúngicas de *Swartzia langsdorffii*. **Quim Nova.** v.31. p. 828–831. 2008.
- 110 UPADHYAY, A.; SINGH, D. K. Efeitos farmacológicos do *sapindus mukorossi*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** v. 54. p. 273–280. 2012.
- 111 VIJAYALAKSHMI, G.; RAJA, M. M.; NAIK, M. L.; CARBONE, V.; RUSSO, G. L.;

-
- KHAN, P. S. S. V . Determination of antioxidant capacity and flavonoid composition of onion (*Allium cepa* L.) landrace 'Krishnapuram' bulb using HPLC-ESI-ITMS. **J Biosci.** v. 46. p. 1–7. 2021.
- 112 FAISAL, H.; HANDAYANI, S. Comparison of Antioxidant Activity of Ethanol Extract of Fruit and Okra Leaves (*Abelmoschus esculentus* L. Moench) with DPPH and ABTS Methods. **Indones J Pharm Clin Res.**v. 2. p. 6–13. 2019.
- 113 DIAS FILHO, D. G.; RODRIGUES, F. A. D.; RAMOS, A. M. B.; TEIXEIRA, F. I. S.; SOUZA, P. A.S. de. Revisão De Literatura Sobre a Atividade Antioxidante Do Açaí. **Rev Contemp.** v.3. p. 240–248. 2023.
- 114 BHARDWAJ, M.; SALI, V. K.; MANI, S.; VASANTHI, H. R.; Neophytadiene from *Turbinaria ornata* Suppresses LPS-Induced Inflammatory Response in RAW 264.7 Macrophages and Sprague Dawley Rats. **Inflammation.** v. 43, p. 937–950. 2020.
- 115 VÁZQUEZ, G. N.; SALINAS, G. M. M.; FAJARDO, Z. V. D.; VILLARREAL, J. V.; SOTO, S. E.; SALAZAR, F. G. et al. Synthesis and antimycobacterial activity of 4-(5-substituted-1,3,4-oxadiazol-2-yl) pyridines. **Bioorganic Med Chem.** v. 15, p. 5502–5508. 2007.
- 116 ODUN-AYO, F.; CHETTY, K.; REDDY, L.; Determination of the ursolic and oleanolic acids content with the antioxidant capacity in apple peel extract of various cultivars. **Brazilian J Biol.** v. 82. p. 1–6. 2022.
- 117 SRIDHAR, K.; CHARLES, A. L. In vitro antioxidant activity of Kyoho grape extracts in DPPH [rad] and ABTS [rad] assays: Estimation methods for EC₅₀ using advanced statistical programs. **Food Chem.** v. 275. p. 41–49. 2019.
- 118 RE R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; EVANS, C. R. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS radical cation decolorization assay. **EMPA Act** .v. 26, p. 51. 1999.
- 119 FLOEGEL, A. KIM, D. O.; CHUNG, S. J.; KOO, S. I.; CHUN, O. K.; Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **J Food Compos Anal.** V. 24. p. 1043–1048. 2011.
- 120 LE, K. J.; OH, Y. C., CHO, W. K.; MA, J. Y. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity Determination of One Hundred Kinds of Pure Chemical Compounds Using Offline and Online Screening HPLC Assay. **Evidence-based Complement Altern Med.** v. 2015. p. 15. 2015.
- 121 TUNDIS, R.; DEGUIN, B.; MENICHINI, F. Iridoids from *Putoria calabrica*. **Pergamon: Bioch Syst and Ecol** v. 30. v. 689–691. 2002.
- 122 BUDZIKIEWICZ, H. WILSON, J. M.; DJERASSI, C. Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical Problems. XXXII. Pentacyclic Triterpenes. **J Am Chem Soc** v. 85, p. 3688–3699. 1963.
- 123 ELOY, J. de O.; OLIVEIRA, E. C. V. de, OLIVEIRA, S. S. M.; SARAIVA, J.;

-
- MARCHETTI, J. M. Desenvolvimento e validação de um método analítico por CLAE para quantificação de ácido ursólico em dispersões sólidas. **Quim Nova**. v. 35. p. 1036–1040. 2012.
- 124 MAURYA, A.; SRIVASTAVA, S. K. Determination of ursolic acid and ursolic acid lactone in the leaves of *eucalyptus tereticornis* by HPLC. **J Braz Chem Soc**. v.23, p.468–472. 2012.
- 125 MAGALHÃES, W. S.; CORRÊA, C. M.; ALENCASTRO, R. B. De, NAGEM, T. J. Bases moleculares da ação anti-inflamatória dos ácidos oleanólico e ursólico sobre as isoformas da ciclo-oxigenase por docking e dinâmica molecular. **Quim Nova** v. 35. p.241–248. 2012.
- 126 VECHIA, L. D.; GNOATTO, S. C. B.; GOSMANN, G. Derivados oleananos e ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante. **Quim Nova** v. 32, p. 1245–1252. 2009.
- 127 GURGEL, E. P.; OLIVEIRA, F. F. M.; SILVA, M. D. S. da; SILVA, K. M. B. e, ALBUQUERQUE, C. C. de. Métodos de superação da dormência na emergência de *Cuspidaria pulchra* (Cham.) L. G. Lohmann (BIGNONIACEAE). **Rev Verde Agroecol e Desenvol Sustentável**. v.8, p. 65–69. 2013.
- 128 CARLA, J.; OLIVEIRA, A.; VEIGA, S. Propriedades do Alecrim. **Braz J of Natural Sciences**. v.2019, p.1–7. 2019.
- 129 FEITOZA, L. Q.; TERRA, F. de S.; GRASSELLI, C. da S. M. Plantas Medicinais e seus Compostos com Potencial Terapêutico no Tratamento do Câncer: Revisão Integrativa. **Rev Bras Cancerol**. v. 67. p.1–14. 2021.
- 130 CARVALHO, C. A. de; LOURENÇO, M. V.; BERTONI, B. W.; FRANÇA, S. D. C.; PEREIRA, P. S.; FACHIN, A. L. et al. Antioxidant activity of *Jacaranda decurrens* Cham., Bignoniaceae. **Rev Bras Farmacogn**. v.19, p. 592–598. 2009.
- 131 PACHÚ, C. O. ALSINA, O. L. S. de; SILVA, O. S da; Processamento de plantas medicinais para obtenção de extratos secos e líquidos. 2007; Disponível em: <http://dspace.sti.ufcg.edu.br:8080/xmlui/handle/riufcg/1780>. Acesso em 10/09/2023.
- 132 TRINDADE, M. A. G. T.; RINALDO, D.; VILEGAS, W.; ZANONI, V. B. et al. Determinação de Corantes Marcadores do Tipo Azo e Antraquinona em Combustíveis por Cromatografia Líquida com Detecção Eletroquímica. **Quim nova**. v. 33, p. 146–150. 2010.
- 133 GUSMÃO, D. E.; CHAVES, P. O; COELHO, R. M.; PEDRINHO, D. R.; Pereira, S. R.; CORRÊA, B. O. Avaliação do Efeito do Extrato Etanólico de *Piper umbellatum* L. no Controle Alternativo de *Rhizoctonia solani* e *Macrophomina phaseolina*. **Ensaios e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde**. v. 24. p. 516–522. 2021.
- 134 VIGO, C. L. S.; NARITA, E.; MARQUES, L. C.; Validação da metodologia de quantificação espectrofotométrica das saponinas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen - Amaranthaceae. **Rev Bras Farmacogn**. v. 13. p. 46–49. 2003.

-
- 135 LACORTE, D. H.; CARVALHO, M. D.; RODRIGUES, T. L.; MORAES, C. C.; ROSA, G. S. da. Fitoquímicos do Epicarpo do Araçá-Vermelho (*psidium catteyanum sabine*): Alternativa de Extração Verde. **XL Congr Bras de Sis Articulados**, v. 1, p.1–8. 2020.
- 136 BAKOUR, M.; CAMPOS, M. da G.; IMTARA, H.; LYOUSSI, B. Antioxidant content and identification of phenolic/flavonoid compounds in the pollen of fourteen plants using HPLC-DAD. **J Apic Res**, v. 59, p. 35–41. 2020.
- 137 MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. The Ultraviolet Spectra of Flavones and Flavonols. **Syst Identif Flavonoids**. v. 111, p. 41–164. 1970.
- 138 MENEZES FILHO, A. C. P. de. Avaliação fitoquímica e atividades biológicas do extrato do exocarpo do fruto de *Protium spruceanum*. **J Biotechnol Biodivers**, v. 10, p. 034–043. 2022.
- 139 SAEIDNIA, S. The Story of Beta-sitosterol- A Review. **European J Med Plants**. v. 4: p. 590–609. 2014.
- 140 MOREAU, R. A.; WHITAKER, B. D.; HICKS, K. B. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: Structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. **Prog Lipid Res**. v.41. p. 457–500. 2002.
- 141 DEMONTY, I. RAS, R. T.; VAN DER KNAAP, H. C. M.; DUCHATEAU, G. S. M. J. E.; MEIJER, L.; ZOCK, P. L. *et al.* Continuous dose-response relationship of the LDL-cholesterol-lowering effect of phytosterol intake. **J Nutr**. v. 139, p. 271–284. 2009.
- 142 KHALILULLAH, H.; J. AHSAN, M.; HEDAITULLAH, M.; KHAN, S.; AHMED, B. 1,3,4-Oxadiazole: A Biologically Active Scaffold. **Mini-Reviews Med Chem**. v.12, p.789–801. 2012.
- 143 ZAREEF, M.; IQBAL, R.; DOMINGUEZ, N. G. De, RODRIGUES, J.; ZAIDI, J. H.; ARFAN, M. et al. Synthesis and antimalarial activity of novel chiral and achiral benzenesulfonamides bearing 1, 3, 4-oxadiazole moieties. **J Enzyme Inhib Med Chem**. v.22, p. 301–308. 2007.
- 144 MODAK, B.; CONTRERAS, M. L. NILO, F. G.; TORRES, R. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from the resinous exudate of *Heliotropium sinuatum*. **Bioorganic Med Chem Lett**. v. p. 309–312. 2005.
- 145 JOHNST, P. I. M.; BARRIENTOS, R. E.; SIMIRGIOTIS, M. J.; PALACIOS, J. Characterization of Polyphenol Compounds from Endothelium-Dependent Vascular Relaxation Effect in Rat Aorta. **Molecules**. V. 25. p. 3105. 2020.
- 146 BIANCHI, J.; FERNANDES, T. C. C.; MORALES, M. A. M.; 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.
- 147 PİRDAL, G.; LIMAN, R. 2-Kloropiridin'in *Allium cepa* ana-telofaz ve komet testi kullanılarak sitotoksik ve genotoksik değerlendirilmesi. **Mediterr Agric Sci**. v. 32.

-
- p.193–199. 2019.
- 148 ÇELIK, T. A.; ASLANTÜRK, O. S. Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of *inula viscosa* leaf extracts with *Allium* test. **J Biomed Biotechnol.** v. 2010.p.1-8.
- 149 ZEID, M. A. M. A.; SAMIE, N. S. A.; FARGHALY, A. A.; HASSAN, E. M.; Flavonoid fraction of *Cajanus cajan* prohibited the mutagenic properties of cyclophosphamide in mice *in vivo*. **Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen.** v. 826. p. 1–5. 2018.
- 150 CONSTANTINESCU, T.; LUNGU, C. N.; LUNG, I.; Lipophilicity as a central component of drug-like properties of chalcones and flavonoid derivatives. **Molecules.** v. 24. p. 1–11. 2019.
- 151 AKINBORO, A.; MOHAMED, K. B.; ASMAWI, M. Z.; SULAIMAN, S. F.; SOFIMAN, O. A. Antioxidants in aqueous extract of *Myristica fragrans* (Houtt.) suppress mitosis and cyclophosphamide-induced chromosomal aberrations in *Allium cepa* L. cells. **J Zhejiang Univ Sci B.** v. 12. p. 915–922. 2011.
- 152 DEVAPPA, R. K.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. *Jatropha* diterpenes: A review. **J Am Oil Chem Soc.** v.88, p. 301–322. 2011.
- 153 SAWADOGO, W. R.; SCHUMACHER, M.; TEITEN, M. H.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Traditional West African pharmacopeia, plants and derived compounds for cancer therapy. **Biochem Pharmacol.** v. 84, p.1225–1240. 2012.
- 154 BÄCKER, C.; DRWAL, M. N.; PREISSNER, R.; LINDEQUIST, U. Inhibition of DNA–Topoisomerase I by Acylated Triterpene Saponins from *Pittosporum angustifolium* Lodd. **Nat Products Bioprospect.** v. 6, p. 141–147. 2016.
- 155 SILVA, E. M. F.; NASCIMENTO, R. B. C.; BARRETO, F. S.; MORAES FILHO, M. O.; GRIZ, S. A. S.; SANTOS, A. F. Dos.; MOUSINHO, K. C. Estudo *in vitro* do potencial citotóxico da *Annona muricata* L. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.** v. 36, p. 277–283. 2015.
- 156 AZEEZ, S. O.; AYO-LAWAL, R. A.; OLAWUNI, I. J.; ABRAHAM, O. G. Evaluation of the bio-toxicity and cytogenetic effects of methanolic leaf extract of *Heliotropium indicum* L. **Int J Biol Chem Sci.** v.14. p. 1–10. 2020.
- 157 OGBOLE, O. O.; SEGUN, P. A.; ADENIJI, A. J. *In vitro* cytotoxic activity of medicinal plants from Nigeria ethnomedicine on Rhabdomyosarcoma cancer cell line and HPLC analysis of active extracts. **BMC Complement Altern Med.** v. 17, p. 1–10. 2017.
- 158 LOPES, K. S.; SOUSA, H. G.; SILVA FILHO, F. A. e. SILVA NETA, E. R.; LIMA, S. G. de; ROCHA, M. Dos S. et al. Identification of bioactive compounds and cytogenotoxicity of the essential oil from the leaves of *Croton heliotropiifolius* Kunth. **J Toxicol Environ Heal - Part A Curr Issues.** v. 85, p. 1002–1018. 2022.
- 159 RANK, J.; NIELSEN, M. H. *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. **Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen.** v.390, p. 121–127.

-
- 1997.
- 160 HERRERO, O.; MARTÍN, J. M. P.; FREIRE, P. F.; LÓPEZ, L. C.; PEROPADRE, A.; HAZEN, M. J. Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the *Allium cepa* test. **Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen.** v. 743. p. 20–24. 2012.
- 161 PRAJITHA, V.; THOPPIL, J. E. Genotoxic and antigenotoxic potential of the aqueous leaf extracts of *Amaranthus spinosus* Linn. using *Allium cepa* assay. **South African J Bot.** v. 102, p. 18–25. 2016