

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**

JOSÉ RAFAEL DA SILVA ARAUJO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE, CITOTÓXICO E GENOTÓXICO
DO EXTRATO FOLIAR DE *AMBURANA CEARENSIS* (ALLEMAO) A.C.SM.**

**Recife
2018**

JOSÉ RAFAEL DA SILVA ARAUJO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE, CITOTÓXICO E GENOTÓXICO
DO EXTRATO FOLIAR DE *AMBURANA CEARENSIS* (ALLEMAO) A.C.SM.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Área de concentração Genética Humana, da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Genética.

Área de concentração: Genética Humana

Orientador: Profa. Dra. Ana Chistina Brasileiro Vidal

Coorientadores: Profa. Dra. Cláudia Sampaio de Andrade Lima e Prof. Dr. Pedro Marcos de Almeida

Recife

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Araujo, José Rafael da Silva

Avaliação do potencial antioxidante, citotóxico e genotóxico do extrato foliar de *Amburana Cearensis* (Allemão) A.C.S.M. / José Rafael da Silva Araujo. – 2018.

92 f. : il.

Orientadora: Ana Christina Brasileiro Vidal.

Coorientadora: Claudia Sampaio de Andrade Lima.

Coorientador: Pedro Marcos de Almeida.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Genética, Recife, 2018. Inclui referências e anexos.

1. Plantas medicinais 2. Toxicologia I. Vidal, Ana Christina Brasileiro (orientadora) II. Lima, Claudia Sampaio de Andrade (coorientadora) III. Almeida, Pedro Marcos de (coorientador) IV. Título.

581.634

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 - 180

JOSÉ RAFAEL DA SILVA ARAUJO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE, CITOTÓXICO E GENOTÓXICO
DO EXTRATO FOLIAR DE *AMBURANA CEARENSIS* (ALLEMAO) A.C.SM.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Área de concentração Genética Humana, da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Genética.

Aprovado em 22/02/2018

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Maria Benko Iseppon
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Ulysses Paulino de Albuquerque
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter oportunizado todos os acontecimentos (bons e ruins) que fizeram eu estar aqui hoje.

À família, especialmente à minha mãe, Claudya Mineya da Silva Quadros, que embora distante, apoiou esta etapa da minha vida com muito amor, carinho e vibrações positivas.

À equipe do LABGENE (Teresina - PI), bem como aos meus professores que me orientaram durante a graduação: Francielle Aline Martins e Pedro Marcos de Almeida. Ambos me prepararam e me deram o suporte necessário para alcançar o mestrado na UFPE. Além da coorientação do Profº Pedro durante o mestrado, que me auxiliou durante a escrita desta dissertação, melhorando sua qualidade. “Obrigado principalmente pelo cuidado e amizade!”

À orientação da Professora Ana Christina Brasileiro Vidal, que me auxiliou em todas as etapas desta dissertação. Agradeço também o carinho e cuidado, sua força em meus momentos mais difíceis, que me ergueu e me fortaleceu. Gratidão.

À professora Claudia Sampaio de Andrade Lima pela coorientação e contribuições nesta pesquisa, e por dispor seu laboratório para todas as análises químicas.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), bem como ao corpo docente, por terem contribuído na minha formação.

À professora Neide Santos por dispor seu laboratório para o desenvolvimento da atual pesquisa, por ter auxiliado na construção dos protocolos com cultura de células, por ter dado importantes contribuições na qualificação; também ao seu humor contagiante que tornou o convívio alegre e agradável, obrigado pelos momentos de gaitadas...

À Juliana Vieira de Barros, que dividiu comigo a construção dos novos protocolos de citotoxicidade e micronúcleo com PBMCs no laboratório. Dividimos alegrias, tristezas, doenças e saúde. Obrigado por me suportar e ter me dado um ombro amigo em meus momentos mais desequilibrados devido às circunstâncias da distância e por tantos momentos felizes durante o mestrado. Gratidão.

Ao Jorge José de Sousa Pereira, por ter nos auxiliado na construção dos protocolos com cultura de células (MTT). Incluo também nesta etapa a professora Jaqueline de Azevêdo Silva. Por tirar tantas dúvidas na construção do conhecimento, que comecei do zero com cultura de células. “Jorge, você é uma referência para muitas pessoas, inclusive para mim, obrigado”.

Às professoras Michelly Cristiny Pereira e Maria Galdino da Rocha Pitta pelas contribuições na construção do protocolo do nosso laboratório com cultura de PBMCs para o teste do MTT.

Ao Assis e à Eliane por nos indicar a localização da planta (*Amburana cearensis*) para coleta na cidade Brejo da Madre de Deus – PE. Ambos nos receberam de braços abertos e bastantes receptivos. Em especial, Seu Assis, que regou, por gentileza, um dos espécimes até florescer durante a época de floração. “Obrigado Seu Assis!”.

À professora Ana Maria Benko Iseppon e ao professor Marccus Alves por encaminhar e auxiliar a identificação taxonômica, respectivamente. Além disso, agradecer à professora Ana Benko pelas sugestões durante o decorrer desta pesquisa. “Obrigado pelos momentos de força e aprendizado!”.

Aos membros da banca de Qualificação e da banca examinadora final, por terem aceitado o convite e pelas contribuições para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao professor Rubens Queiroz da Universidade Federal da Paraíba por disponibilizar as fotos da espécie vegetal do atual estudo.

À Marília Grasielly de Farias Silva por me ensinar os testes antioxidantes e fenólicos totais, pelos momentos de descontração durante as longas análises na UV-VIS e pelos agachamentos alegres na chegada do Laboratório de Biofísica Química (LBQ), e principalmente pela amizade!

Ao “Povo da Química” do LBQ, em especial o meu querido Aracati Padilha (Rafael) pelas contribuições, ideias e paciência. Ao Edson Renan Barros de Santa, pelas análises fitoquímicas no HPTLC e pelo seu humor trágico-cômico sem fim. À Leylianne de Cássia pelas contribuições e pelos momentos de descontração, um ícone da alegria.

À equipe do Laboratório de Biofísica Química, pela receptividade e pelos momentos de descontração, em especial nossa Japa Paola e Suely, por

desenrolarem os momentos burocráticos da pesquisa, além de todas as pessoas do LBQ, estudantes e professores, que tornaram o ambiente alegre e agradável.

À toda equipe do Laboratório de Genética e Citogenética Animal e Humana pelas contribuições e momentos de descontração. Obrigado por todas as gaitadas durante minha estadia no laboratório.

Aos voluntários doadores Hugo, João e Jair. Sem o sangue de vocês esse trabalho não teria acontecido. Gratidão!

À Dominick Spindola, pelo carisma, carinho e consideração. Obrigado por ter me tirado do sufoco nos momentos de apertado durante a pesquisa e pela amizade. Você é uma referência Zen para mim. Namastê!

À Dijaná (Departamento de Bioquímica) e Darlene (Departamento de Genética) por quebrarem a cabeça comigo na construção do conhecimento. E pelos momentos de descontração!

À toda equipe do Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal, pela receptividade e pelos momentos nossos de descontração e perrengues diários. Vocês são massa! Em especial Jaysa e Vanessa, por desenrolarem também os processos burocráticos da pesquisa, “obrigado meninas!”

Aos funcionários do Departamento de genética: seu Romildo, Dona Zizi, André, Everaldo, por desenrolarem as broncas e pelos momentos de descontração e amizade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa, a qual permitiu minha estadia em Recife-PE durante o mestrado.

Obrigado!

A ciência está em contínuo processo de reformulação (progresso). Nenhum conceito, uma vez concebido, tem garantia de permanência indefinida ou de imutabilidade. Métodos de verificação são inventados e usados, e o apego teimoso a noções favoritas é um traço denunciador de decadência individual, que infelizmente pode contagiar legiões de prosélitos.

“Prof. Aluizio Bezerra Coutinho”

RESUMO

Amburana cearensis (família Fabaceae) é uma árvore utilizada na medicina popular como anti-inflamatório e para o tratamento de doenças respiratórias e febre. Para avaliar o potencial terapêutico de *A. cearensis* no combate ao estresse oxidativo, o presente estudo teve como objetivo analisar a atividade antioxidante, citotóxica e genotóxica do extrato foliar etanólico bruto (EEB) de *A. cearensis* e de suas frações diclorometano (Dic), ciclohexano (cHex), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) em células mononucleares do sangue periférico humano. O EEB e suas frações apresentaram atividade antioxidante, sendo a fração AcOEt, com maior conteúdo fenólico (83,55 mg de GAE/g), a mais efetiva tanto na captura de radicais DPPH (EC_{50} 43,37 μ g/mL) quanto no poder redutor (EC_{50} 89,80 μ g/mL). O EEB e as frações AcOEt e MeOH apresentaram classes de metabólitos secundários similares, como flavonoides e taninos. O EEB (entre 400 e 1000 μ g/mL) e as frações AcOEt ($\leq$ 150 μ g/mL) e MeOH (entre 200 e 600 μ g/mL) não foram citotóxicos para as células mononucleares do sangue periférico pelo teste do MTT. Adicionalmente, o teste de genotoxicidade para a fração AcOEt, mostrou que as concentrações avaliadas (200, 400 e 600 μ g/mL) não induziram danos genotóxicos significativos em linfócitos humanos. Desta forma, o extrato das folhas de *A. cearensis* é fonte de metabólitos com potencial ação antioxidante, podendo ser considerado um bom candidato no combate da senescência celular precoce ou de doenças relacionadas ao estresse oxidativo.

Palavras-chave: Antioxidante. Cumaru. Citotoxicidade. Genotoxicidade. Linfócitos. Radicais livres.

ABSTRACT

Amburana cearensis is a medicinal plant used in folk medicine to treat respiratory illnesses and fever, in addition to its anti-inflammatory action. To evaluate the therapeutic potential of *A. cearensis* against oxidative stress, the present study aimed to analyze the antioxidant, cytotoxic and genotoxic activity of *A. cearensis* crude extract (EEB) and its dichloromethane (Dic), cyclohexane (cHex), ethyl acetate (EtOAc) and methanol (MeOH) fractions in peripheral blood mononuclear cells. EEB and its fractions showed antioxidant activity, being EtOAc fraction, with the highest phenolic content (83.55 mg GAE / g), the most effective in the capture of DPPH radicals (EC_{50} 43.37 μ g / mL) and reducing power (EC_{50} 89.80 μ g/ml). In addition, EEB and EtOAc and MeOH fractions showed similar classes of secondary metabolites, such as flavonoids and tannins. EEB (between 400 and 1000 μ g / mL) and AcOEt ($\leq$ 150 μ g / mL) and MeOH (200 to 600 μ g / mL) fractions were not cytotoxic to peripheral blood mononuclear cells by the MTT test. In addition, the genotoxicity test for the AcOEt fraction showed that the concentrations evaluated (200, 400 and 600 μ g / mL) did not induce significant genotoxic damage in human lymphocytes. Thus, leaf extract of *A. cearensis* is source of metabolites with potential action as antioxidant, which could be considered a good candidate to combat early cellular senescence or diseases related to oxidative stress.

Keywords: Antioxidant. Cumaru. Cytotoxicity. Genotoxicity. Lymphocytes. Free radicals.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão de literatura

- Figura 1 - Pontos de ocorrência de *Amburana cearensis* (Allemão) A.C.Sm, de acordo com o “Global Biodiversity Information Facility database” 22**
- Figura 2 - *Amburana cearensis* (Allemão) A.C.Sm.: hábito arbóreo (A), disposição foliar (B), inflorescência (C) e tronco (D). Fonte: (A) Autor; (B, C e D) cedidas pelo Prof. Rubens T. Queiroz (UFPB)..... 23**
- Figura 3 - Diferentes vias de produção de espécies reativas de Oxigênio (ROS) e Nitrogênio (RNS). Fórmulas químicas em vermelho e azul representam radicais e não radicais, respectivamente. Oxidases: inclui NADPH, xantina e peroxidase. NOS: enzima óxido nítrico sintase. SOD: enzima superóxido desmutase. CAT: enzima catalase. GSH-Px: enzima glutathione peroxidase..... 35**
- Figura 4 - Produto da oxidação da Guanina. O radical hidroxila (OH[•]) apresenta maior reatividade com a base nitrogenada guanina, oxidando-a..... 36**
- Figura 5 - Formação de micronúcleos (MN) e pontes nucleoplasmáticas (PN), após teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese. Os MNs podem ser originados de cromossomos inteiros atrasados ou de fragmentos cromossômicos acêntricos. As PNs são originadas de**

cromossomos dicêntricos, que são puxados para pólos opostos da célula e não se rompem durante a anáfase. Esses eventos só podem ser observados em células que completam a divisão nuclear, que são reconhecidas por apresentarem células binucleadas (BN) após bloqueio da citocinese através da citocalasina B (Cyt-B)..... 40

ARTIGO I - EXTRATO FOLIAR DE *AMBURANA CEARENSIS*: POTENCIAL CONTRA O ESTRESSE OXIDATIVO

Figura 1 - Atividade antioxidante do extrato etanólico bruto (EEB) e as frações acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) das folhas de *A. cearensis*: (A) atividade de redução do DPPH; (B) atividade do poder redutor. Valores no gráfico correspondem à média e ao desvio padrão da porcentagem de redução do radical livre DPPH (A) e à absorbância em 700 nm para o poder redutor (B), ambos com n = 3. AA: ácido ascórbico..... 52

Figura 2 - Atividade citotóxica baseada na viabilidade celular pelo teste MTT das folhas de *A. cearensis*: (A) Extrato etanólico bruto (EEB); (B) Fração acetato de Etila (AcOEt); (C) Fração metanol (MeOH). Valores correspondentes à média e o desvio padrão da porcentagem de viabilidade celular (n = 5). CN: Controle Negativo (meio de cultura); CS: Controle Solvente (Metanol a 2%); CP: controle positivo (Triton-X a 1%). Médias estatisticamente diferentes quando comparadas com o controle negativo pelo teste Newman-Keuls: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ 55

LISTA DE APÊNDICES

Apendice A	Figura Suplementar 1. <i>Screening</i> de atividade antioxidante pelo teste do DPPH (2,2 difenil-1-picril-hidrazil) do extrato etanólico bruto (EEB) e suas frações diclorometano (Dic), ciclohexano (cHex), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH), em concentrações variando de 62,5 a 1000 µg/mL. Valores no gráfico correspondem à média e ao desvio padrão da porcentagem de redução do radical livre DPPH, ambos com n = 3. AA: ácido ascórbico.....	78
Apêndice B	QUÍMICOS UTILIZADOS E SUAS RESPECTIVAS MARCAS.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeitos biológicos dos extratos de casca, folhas e sementes de <i>Amburana cearensis</i>	24
Tabela 2 - Principais constituintes químicos de <i>Amburana cearensis</i> , com respectivos solventes extratores e partes vegetais	29
Tabela 3 - Modo de ação, local de produção e sistemas de neutralização de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células animais e vegetais	34

ARTIGO I - EXTRATO FOLIAR DE *AMBURANA CEARENSIS*: POTENCIAL CONTRA O ESTRESSE OXIDATIVO

Tabela 1 - Sistemas cromatográficos e reveladores utilizados para o perfil fitoquímico do extrato das folhas de <i>Amburana cearensis</i>	48
Tabela 2 - Atividade antioxidante <i>in vitro</i> das folhas de <i>A. cearensis</i>	53
Tabela 3 - Alterações nucleares em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) após exposição à fração AcOEt do extrato etanólico bruto das folhas de <i>A. cearensis</i> nas concentrações de 200, 400 e 600 µg/mL.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS e SIGLAS

Abs	Absorbância
AcOEt	Acetato de etila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APX	Enzima peroxidase ascorbato
BN	Broto nuclear
CAT	Enzima catalase
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
CS	Controle solvente
Cyt-B	Citocalasina-B
Cys	Aminoácido cisteína
Dic	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Dexoxirribonucleico)
DPPH	<i>2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl</i> (2,2 difenil-1-picril-hidrazil)
EAG	Equivalentes de Ácido Gálico
EEB	Extrato Etanólico Bruto
EtOAc	<i>Ethyl Acetate</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GSH-Px	Enzima glutationa peroxidase
HepG2	<i>Human-derived hepatoma cell line</i> (Linhagem celular de hepatoma humano)
cHex	Ciclohexano
His	Aminoácido histidina
HPTLC	<i>High-Performance Thin Layer Chromatography</i> (Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência)
HTC	Linhagem celular de hepatoma de ratos
LLC-MK2	<i>Rhesus Monkey Kidney Epithelial Cells</i> (Células epiteliais renais do macaco Rhesus)
MeOH	Metanol
MN	Micronúcleo

Met	Aminoácido metionina
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5- difeniltetrazólio
PBMCs	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> (Células Mononucleares do Sangue Periférico)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampão Fosfato Salino)
PN	Pontes nucleoplasmáticas
RNS	<i>Reactive Nitrogen Species</i> (Espécies Reativas de Nitrogênio)
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Espécies Reativas de Oxigênio)
SOD	Enzima Superóxido Dismutase
Trp	Aminoácido triptofano
Tyr	Aminoácido tirosina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 REVISÃO DA LITERATURA	19
1.1.1 Plantas medicinais	19
1.1.2 Família Fabaceae	20
1.1.3 <i>Amburana cearensis</i>	21
1.1.3.1 Efeitos biológicos de <i>A. cearensis</i>	23
1.1.4 Metabólitos secundários vegetais e suas propriedades biológicas	25
1.1.5 Radicais livres e estresse oxidativo	33
1.1.5.1 Antioxidantes originários de plantas medicinais	36
1.1.6 Avaliação da segurança do uso biológico de plantas mediante bioensaios	38
1.1.6.1 Teste com cultura de células humanas	38
1.1.6.1.1 Teste de citotoxicidade	39
1.1.6.1.2 Teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese, Cytokinesis-Block Micronucleus (CBMN) Assay	39
1.2 OBJETIVOS	41
1.2.1 Objetivo geral	41
1.2.2 Objetivos específicos	41
2 ARTIGO I: EXTRATO FOLIAR DE <i>AMBURANA CEARENSIS</i>: POTENCIAL CONTRA O ESTRESSE OXIDATIVO	42
3 CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS	67
APÊNDICE A - FIGURA SUPLEMENTAR 1	78
APÊNDICE B - QUÍMICOS UTILIZADOS E SUAS RESPECTIVAS MARCAS	79
ANEXO A - REGRAS PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA INDUSTRIAL CROPS AND PRODUCTS	80
ANEXO B - CURRÍCULO LATTES ATUALIZADO	91

1 INTRODUÇÃO

As espécies vegetais têm sido uma fonte inesgotável de recursos para uso medicinal, desempenhando um papel vital na descoberta de novos fitoquímicos mais eficazes e menos tóxicos aos organismos. Nesse sentido, a busca por compostos capazes de diminuir ou de reparar danos ocasionados por espécies reativas de oxigênio (ROS), relacionados a processos de senescência celular, mutação, doenças degenerativas e câncer, tem se elevado nos últimos anos. Dentre os compostos vegetais, destacam-se os compostos de natureza fenólica, derivados do metabolismo secundário de plantas, que, de um modo geral, são os principais responsáveis pelo amplo espectro terapêutico.

Para deliberação de novos fitofármacos, testes de genotoxicidade são necessários para a avaliação da potencialidade de aplicação clínica de um novo material para uso medicinal, tornando-se necessários para a identificação de concentrações e doses que possam, eventualmente, induzir possíveis efeitos adversos. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) preconiza testes *in vivo* e *in vitro* para avaliar danos ao DNA, destacando-se o ensaio de mutação reversa em bactéria e o ensaio do micronúcleo.

Dentre as espécies com potencial fitoterápico, destaca-se *Amburana cearensis* (Allemão) A. C. Smith, popularmente conhecida como cumaru ou amburana-de-cheiro. É uma árvore de ocorrência desde a região Nordeste até o Brasil Central, predominando em regiões da Caatinga. A casca desta espécie é amplamente utilizada na medicina popular, na forma de lambedor ou chá, no tratamento de doenças do trato respiratório, como resfriados, bronquites, gripes e asma. Apresenta ainda, comprovadas atividades anti-inflamatória, analgésica, antiespasmódica e broncodilatadora a partir do extrato hidroalcoólico. Enquanto as sementes são usadas após decocção ou na forma de xarope ou de maceração com aguardente por apresentar efeitos similares contra as afecções pulmonares.

Embora a maioria dos estudos se baseie em análises da casca do tronco e sementes, alguns dados na literatura demonstram o potencial antimicrobiano e antioxidante do extrato etanólico bruto das folhas de *A. cearensis* (Canuto *et al.*, 2012). No entanto, estudos sobre esse extrato ainda são incipientes, tanto em relação às atividades biológicas quanto aos possíveis efeitos colaterais. Desta

forma, pesquisas complementares são necessárias para evidenciar as propriedades pouco conhecidas das folhas desta espécie, uma vez que o extrativismo para fins terapêuticos da casca do tronco tem provocado impactos negativos nas populações nativas da espécie estudada (IUCN, 2018).

Considerando o potencial de *A. cearensis* para a geração de produtos farmacológicos e/ou biotecnológicos, estudos quanto à atividade biológica, avaliando os potenciais citotóxicos e genotóxicos tornam-se necessários para validar a eficácia e os riscos do uso dos extratos foliares desta espécie. Além disso, os referidos testes serão estratégicos não só para orientar o uso desses subprodutos na medicina popular, como também para o desenvolvimento futuro de compostos mais eficazes para a saúde humana, subsidiando a geração de novos produtos para a indústria cosmética e farmacêutica. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade antioxidante bem como o potencial citotóxico e genotóxico do extrato etanólico bruto e suas frações obtidos das folhas de *A. cearensis*.

1.1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1.1 Plantas medicinais

Na busca por novos medicamentos para o tratamento de diversas doenças, as plantas se revelam como uma importante fonte de recursos terapêuticos, sendo usadas desde formas mais simples na medicina popular (Van e Wink, 2017) até a forma industrial (Newman e Cragg, 2016). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 80% da população mundial depende de plantas medicinais para os cuidados de atenção básica à saúde (WHO, 2011), incluindo o Brasil (Dutra *et al.*, 2016). Devido à importância terapêutica dos fitocompostos, estima-se que o mercado global de fitoterápicos movimenta 83 bilhões de dólares anuais (Pelkonen *et al.*, 2014), destacando-se a Europa com aproximadamente 50% desse total. Em contrapartida, o Brasil apresenta cerca de 5% da movimentação mundial total (Dutra *et al.*, 2016).

Embora contribua com uma pequena parcela mundial na comercialização de produtos à base de plantas medicinais, o Brasil possui a flora mais diversa do mundo, com mais de 46 mil espécies de plantas (22% do total mundial) (Reflora, 2017), das quais muitas apresentam amplo uso terapêutico que atinge comunidades tradicionais e grupos indígenas (Bruning *et al.*, 2012; Pedrollo *et al.*, 2016). Adicionalmente, a comunidade científica brasileira apresenta uma crescente quantidade de estudos em relação às plantas e à saúde humana com mais de 10.000 artigos publicados entre 2011 e 2013 (Dutra *et al.*, 2016).

No Brasil, o plano de Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (Decreto no 5.813, 22 de junho de 2006) tem como medida fortalecer o desenvolvimento industrial e tecnológico nesta área e sobretudo garantir melhor acesso aos medicamentos pelos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS), mediante programas básicos de saúde, de forma a valorizar o conhecimento popular e incentivar a fitoterapia (Figueredo *et al.*, 2014).

Dentre as diversas plantas medicinais conhecidas, as espécies da família Fabaceae representam uma das mais ricas em compostos bioativos na terapêutica, apresentando potenciais antimicrobiano (Araya-Cloutier *et al.*, 2017), antiparasitário (Souza *et al.*, 2017), anticonvulsivo (Kumar *et al.*, 2012) e antioxidante (Dzoyem *et*

al., 2017), dentre outros. Além disso, diversas espécies da família Fabaceae têm servido como fonte de matéria-prima para a produção de fitoterápicos, tais como *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud., *B. variegata* L., *Bowdichia virgilioides* H.B.K., *Coumarona odorata* Aubl. e *Erythrina velutina* Willd (Almeida e Albuquerque, 2002; Albuquerque *et al.*, 2007; Bitu *et al.*, 2015).

1.1.2 Família Fabaceae

A família Fabaceae (ou Leguminosae) representa a terceira maior dentre as Angiospermas, com cerca de 750 gêneros e 19.000 espécies (Cronquist, 1981; LPWG, 2013; Christenhusz e Byng, 2016; MOBOT, 2017), inseridas em três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae (LPWG, 2013; 2017). É considerada uma das famílias botânicas de maior potencial econômico, superadas apenas pela família Poaceae (arroz, trigo, milho, cevada) (LPWG, 2017). Suas espécies estão distribuídas em todo o globo, dispersas nas regiões temperadas, frias e também tropicais (LPWG, 2013). No Brasil, cerca de 220 gêneros representam a família ($\pm 1/3$ do total) com aproximadamente 2.800 espécies (Lima *et al.*, 2017).

As leguminosas destacam-se na alimentação, como é o caso da ervilha (*Pisum sativum* L.), lentilha (*Lens culinaris* Medik), soja (*Glycine max* [L.] Merr.) e do feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) (Preti *et al.*, 2017); na indústria madeireira, como angelim-pedra (*Hymenolobium petraeum* Ducke) e cumaru (*Dipteryx odorata* [Aublet.] Willd) (Santos *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2015; Ribeiro *et al.*, 2016); como fonte de resinas, base de vernizes e tintas, como jatobá (*Hymenaea courbaril* L.), copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) e anil (*Indigofera suffruticosa* Mill.) (Bandeira *et al.*, 2015); como plantas forrageiras, com destaque para alfafa (*Medicago sativa* L.), trevo-amarelo (*Melilotus officinalis* L.) e trevo branco (*Trifolium repens* L.) (Annicchiarico *et al.*, 2015; Cornara *et al.*, 2016); e na medicina popular, como é o caso da pata-de-vaca (*Bauhinia forficata* Link.), da erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.), do cumaru (*Amburana cearensis*), dentre outros (Leal *et al.*, 2003; Salgueiro *et al.*, 2015; Salahdeen *et al.*, 2016). Adicionalmente, muitas espécies dessa família possuem importância na agricultura, sendo utilizadas para melhoria

de solos cultivados, principalmente, devido à sua capacidade de fixação de nitrogênio, através da simbiose dos nódulos radiculares com bactérias do gênero *Rhizobium* (Andrews *et al.*, 2011; Vitousek *et al.*, 2013; Andrews e Andrews, 2017).

As leguminosas apresentam diversificação quanto ao porte das espécies, incluindo ervas, arbustos, árvores e até mesmo lianas; são perenes ou anuais; cosmopolitas, com presença predominante em regiões tropicais e subtropicais, todas com grande diversidade quanto ao crescimento, reprodução e defesa (Joly, 1979; Polhill *et al.*, 1981). Caracterizam-se por possuir folhas compostas e alternas, geralmente com estípulas, podendo ter pulvino na base. As inflorescências são indefinidas, geralmente racemosas, com flores vistosas ou não, geralmente bissexuadas e de simetria variada. A prefloração é imbricada ou valvar; o ovário é súpero e unicarpelar, às vezes divididos por falsos septos. A placentação é marginal e o número de óvulos é variado (Cronquist, 1981; Souza e Lorenzi, 2005). Fruto é, em geral, legume, seco e deiscente (Joly, 1979).

1.1.3 *Amburana cearensis*

Amburana cearensis (syn. *Torresea cearensis* Fr. All) pertencente à subfamília Faboideae (ou Papilionoideae) (Carvalho, 2003), é popularmente conhecida como amburana-de-cheiro, imburana, cerejeira e cumaru, sendo o último mais utilizado, causando confusões com outra leguminosa homônima chamada *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd. (Zau *et al.*, 2014; Gouveia *et al.*, 2016). Já o termo imburana costuma provocar iguais equívocos na identificação, por se referir também à *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J.B.Gillett (Burseraceae) (Pereira *et al.*, 2017b).

Amburana cearensis é endêmica da América do Sul (Figura 1), sendo nativa da Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai e Peru (Lima, 2015; Jørgensen *et al.*, 2015). No Brasil, ocorre predominantemente na Caatinga nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco e Piauí, sendo relatada também em Goiás, Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro (Leite, 2005; Lima, 2015). Devido ao extrativismo de sua madeira e das sementes para várias finalidades comerciais, como carpintaria e perfumaria, *A. cearensis* foi considerada sob risco de extinção

pela União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN, 2018).

Amburana cearensis apresenta porte regular (Figura 2A), podendo atingir até 10 m de altura nas regiões da Caatinga e até 20 m na Zona da Mata (Cunha e Ferreira, 2003). As cascas são lisas, aromáticas, cor castanha a vermelho-pardacento, soltando lâminas finas e irregulares (Maia, 2012). As folhas são compostas, alternas, imparipenadas, com 7-11 folíolos, peciolados, ovados, arredondados no ápice e na base (Figura 2B). As flores são esbranquiçadas ou branco-amareladas, ou amarelo-pálido, aromáticas, pequenas, dispostas em racimos axilares, multiflora (Figura 2C), sendo o fruto vagem achatada, escura, quase preta, contendo uma semente alada e rugosa (Almeida *et al.*, 2010). No Nordeste, o período de floração ocorre no início da estação seca, entre maio e julho, e a frutificação acontece de agosto a outubro, após a perda de suas folhas (Maia, 2012).



Figura 1. Pontos de ocorrência de *Amburana cearensis* (Allemão) A.C.Sm, de acordo com o “Global Biodiversity Information Facility database. Fonte: (<http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Amburana+cearensis>). Acessado em: 11 de junho de 2017.

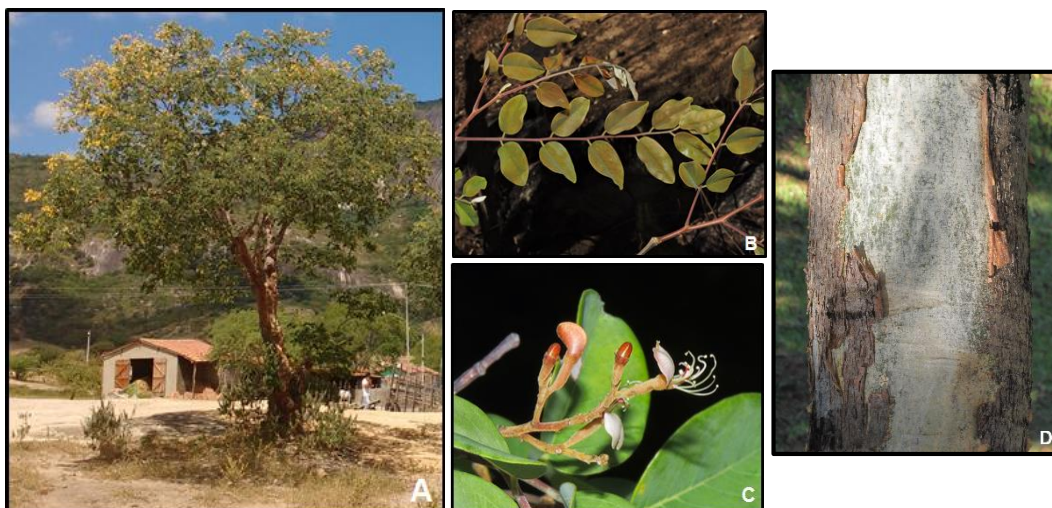


Figura 2. *Amburana cearensis* (Allemão) A.C.Sm.: hábito arbóreo (A), disposição foliar (B), inflorescência (C) e tronco (D). Fonte: (A) Autor; (B, C e D) cedidas pelo Prof. Rubens T. Queiroz (UFPB).

1.1.3.1 Efeitos biológicos de *A. cearensis*

Amburana cearensis tem sido utilizada na medicina popular com diferentes finalidades terapêuticas (Tabela 1). A casca é utilizada na forma de lambedor para tratar doenças que atingem o trato respiratório, como asma, gripe, tosse e bronquite (Albuquerque *et al.*, 2007; Agra *et al.*, 2008; Cartaxo *et al.*, 2010; Bitu *et al.*, 2015). Adicionalmente, o banho da infusão das cascas é aplicado em dores reumáticas e passado no rosto para aliviar sinusite e gripe (Maia, 2012), enquanto o pó da casca é aplicado diretamente sobre feridas para auxiliar na cicatrização (Agra *et al.*, 2008). Um grupo étnico da Bolívia (os Chacobo), que vive em região endêmica de casos de malária, também utiliza o decocto da entrecasca para aliviar os sintomas da febre (Bravo *et al.*, 1999).

A eficácia terapêutica do extrato bruto da casca foi comprovada cientificamente por Leal *et al.* (2000), que evidenciaram atividade analgésica, anti-inflamatória e broncodilatadora do extrato hidroalcoólico da casca de *A. cearensis*. A ausência do efeito tóxico e teratogênico também foi comprovada para o mesmo extrato (Leal *et al.*, 2003). Adicionalmente, sua casca possui atividades antimicrobiana, leishmanicida (Bravo *et al.*, 1999), anticolinesterásica (Trevisan e Macedo, 2003) e espasmolítica (Correa, 1984). Industrialmente, o xarope produzido a partir de sua casca é comercializado, apresentando atividade terapêutica

comprovada contra a asma (Carvalho *et al.*, 2012). Os Programas Farmácias Vivas e Farmácia-Escola/UFC, além de empresas privadas, como a Bionatus, são os principais responsáveis pela produção e venda do xarope (Canuto e Silveira, 2006).

Tabela 1. Efeitos biológicos dos extratos de casca, folhas e sementes de *Amburana cearensis*.

Efeito biológico do extrato	Parte vegetal	Referência
Acaricida	Folhas	24
Alelopático	Folhas, Casca do tronco, Sementes	11, 12, 25
Analgésico	Casca do tronco	8, 13
Antibacteriano	Casca do tronco, Folhas	7, 16, 19, 21
Anticolinesterase	Casca do tronco	10
Anti-inflamatório	Casca do tronco, Sementes	1, 3, 4, 6, 8, 9, 18, 20
Antifúngico	Folhas	26
Antioxidante	Sementes, Folhas	15, 22
Antitumoral	Sementes	14, 16
Asma	Casca do tronco	3, 17
Broncodilatador	Casca do tronco	8, 9
Cicatrização	Casca do tronco	18
Doenças respiratórias	Casca do tronco	3, 21
Dor dente	Sementes	5
Espasmolítico	Casca do tronco, Sementes	1, 3, 4
Febre	Casca do tronco	7
Inseticida	Sementes	2
Leishmanicida	Casca do tronco	7
Mutagênica	Sementes	20
Toxicidade	Casca do tronco	8

¹ Rocha (1945); ² Tigre (1968); ³ Braga (1976); ⁴ Correa (1984); ⁵ Kainer & Duryea (1992); ⁶ Leal *et al.* (1997); ⁷ Bravo *et al.* (1999); ⁸ Leal *et al.* (2000); ⁹ Leal *et al.* (2003); ¹⁰ Trevisan e Macedo (2003); ¹¹ Silva *et al.* (2010); ¹² Felix *et al.* (2007); ¹³ Oliveira *et al.* (2009); ¹⁴ Ferreira *et al.* (2011); ¹⁵ Rego-Junior *et al.* (2011); ¹⁶ Sá *et al.* (2011); ¹⁷ Carvalho *et al.* (2012); ¹⁸ Maia (2012); ¹⁹ Figueredo *et al.* (2012); ²⁰ Lima *et al.* (2013); ²¹ Sá *et al.* (2014); ²² Barberino *et al.*, (2015); ²³ Bitu *et al.* (2015); ²⁴ Dantas *et al.* (2016); ²⁵ Lessa *et al.* (2017); ²⁶ Peixinho *et al.* (2017).

As sementes também são reconhecidas na medicina popular por apresentarem efeitos similares contra as afecções pulmonares, sendo usadas na forma de cozimento, de xarope ou de maceração com aguardente (Maia, 2012). Também, são usadas *in natura* contra dores de dente (Kainer e Duryea, 1992), sendo matéria-prima para a produção do rapé por comunidades para descongestionar as vias nasais (Maia, 2012). Apresentam ainda potencial alelopático (Felix *et al.*, 2007), antioxidante (Rego-Junior *et al.*, 2011); antitumoral (Ferreira *et al.*, 2011) e inseticida (Tigre, 1968). Embora apresentem potencial terapêutico, o extrato aquoso das sementes apresentou atividade tóxica e mutagênica em células meristemáticas de *Allium cepa*, em concentrações acima de 100 µg/mL (Lima *et al.*, 2013).

O extrato bruto das folhas possui atividade alelopática (Silva *et al.*, 2010). Estudos *in vitro* realizados por Figueredo *et al.* (2012) demonstraram que o tratamento simultâneo do extrato foliar de *A. cearensis* e de antibióticos comerciais contra cepas multirresistentes de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* potencializou a atividade bactericida dos antibióticos. Ação acaricida e potencial antioxidante também foram relatados para as folhas (Barberino *et al.*, 2015; Dantas *et al.*, 2016). De um modo geral, as folhas de *A. cearensis* apresentam potenciais biológicos, sendo necessário mais ensaios que avaliem a eficácia e segurança quanto ao uso das folhas de *A. cearensis* na fitoterapia.

1.1.4 Metabólitos secundários vegetais e suas propriedades biológicas

Por definição, metabólitos ou pequenas moléculas orgânicas são compostos produzidos pelos organismos para manutenção da vida celular. Eles são classificados em metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários são moléculas como açúcares, aminoácidos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos que participam de vias metabólicas básicas como a respiração, fotossíntese e biossíntese de proteínas (Tissier *et al.*, 2014). Os metabólitos secundários, por sua vez, são constituintes químicos relacionados à interação com o ambiente, ao mecanismo de defesa contra herbivoria, patógenos e proteção contra a radiação solar (Tissier *et al.*, 2014; Brunton e Luengo, 2017). Ao contrário dos metabólitos

primários, eles não são encontrados em todas as espécies, podendo estar restritos a um grupo taxonômico ou até mesmo a uma única espécie vegetal, o que explica a diversidade de metabólitos secundários, com mais de 100 mil tipos encontrados nas plantas (Wink, 2015).

Os metabólitos secundários podem ser divididos em três grandes grupos segundo a sua natureza biossintética: (1) alcaloides; (2) terpenoides; e (3) compostos fenólicos (Crozier *et al.*, 2006; Tissier *et al.*, 2014). A maioria deles é capaz de interagir com outros organismos, inclusive com os seres humanos, apresentando ampla capacidade terapêutica (Wink, 2010; Newman e Cragg, 2016).

Os alcaloides são um grupo diversificado de compostos de baixo peso molecular, contendo nitrogênio derivado de aminoácidos (Zulak *et al.*, 2006; Knölker, 2016). Eles podem ser classificados principalmente de acordo com a estrutura química e a origem biossintética. Em termos de estrutura química, há duas grandes divisões de alcaloides: os alcaloides heterocíclicos (também conhecidos como alcaloides típicos), que contêm nitrogênio no heterociclo, e os alcaloides não heterocíclicos (também conhecidos como alcaloides atípicos ou protoalcaloides), que contêm nitrogênio em cadeia lateral. Os alcaloides heterocíclicos são tipicamente classificados de acordo com a sua estrutura de anel, enquanto os alcaloides não heterocíclicos são frequentemente divididos de acordo com a origem biossintética (Evans, 2009; Cushnie *et al.*, 2014).

Muitos alcaloides são reconhecidos por exibirem atividades biológicas importantes como o efeito analgésico da morfina; antimalárico da quinina; vasodilatadora da vincamina, além da ação de alívio da efedrina para a asma e efeitos estimulantes da cafeína (MacDermot *et al.*, 1926; Achan *et al.*, 2011; Galvalisi *et al.*, 2017; Han *et al.*, 2017; Marrone *et al.*, 2017). No entanto, alguns alcaloides possuem propriedades tóxicas, como a camptotecina, um famoso inibidor da topoisomerase I; a vimblastina e colchicina que interferem com o processo de polimerização dos microtúbulos, além dos alcaloides pirrolizidínicos, reconhecidos por suas propriedades hepatotóxicas, carcinogênicas, genotóxicas e teratogênicas (Wiedenfeld, 2011; Kadavath *et al.*, 2015).

Os terpenoides, a maior classe de compostos em plantas, são hidrocarbonetos formados por um conjunto de isoprenos (C_5H_8). São conhecidos

também como terpenos, apesar de que alguns autores considerarem terpenoides como um terpeno modificado pela adição de um oxigênio (Zwenger e Basu, 2008). Os terpenos estão envolvidos na defesa das plantas contra herbivoria e patógenos como bactérias (Irmisch *et al.*, 2014). São derivados do precursor pirofosfato de isopentenilo (IPP) e pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP). Ambos os precursores são sintetizados a partir da via do mevalonato (MEV) e a via do metileritritol-fosfato (MEP) (Tholl, 2015). São classificados de acordo com o número de isoprenos presentes na sua composição, sendo os principais monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos com 2, 3 e 4 isoprenos, respectivamente.

Muitos dos terpenoides são conhecidos comercialmente devido ao seu uso como sabores e fragrâncias em alimentos e cosméticos; como o mentol e esclareol (Bhatia *et al.*, 2008; Kamatou *et al.*, 2013), além de serem importantes para a qualidade dos produtos agrícolas, como o sabor das frutas e a fragrância das flores como o linalool (Raguso, 2016). Além disso, os terpenoides apresentam uma ampla quantidade de substâncias com poderes quimiopreventivos e anticancerígenos como o taxol (Thoppil e Bishayee, 2011; Huang *et al.*, 2012; Weaver, 2014). Apresentam ainda propriedades antimalárica; como a artemisinina (Mugweru *et al.*, 2016), e antimicrobiana, principalmente naqueles de natureza monoterpênica (Pauli e Schilcher, 2010).

Os compostos fenólicos pertencem a um grupo bastante diversificado de moléculas orgânicas e são amplamente distribuídos na natureza, ocorrendo desde moléculas simples (com baixo peso molecular e um anel aromático) até grandes estruturas complexas (polifenóis). Comumente são classificados em flavonoides e não flavonoides (ácidos fenólicos, hidroxicinamatos e estilbenos). Em plantas, eles atuam fornecendo proteção contra a radiação ultravioleta (especialmente UV-B e, em menor grau, UV-A), fornecendo também resistência contra agentes patogênicos (por exemplo, atuando como compostos antimicrobianos, como fitoalexinas) e para proteção contra predadores (aumentando a adstringência alimentar, tornando o sabor desagradável). Dentre os flavonoides, os isoflanoides destacam-se por atuar em raízes como sinais moleculares para formação de nódulos fixadores de nitrogênio (Mus *et al.*, 2016). Os flavonoides, estilbenos, hidroxicinâmicos e ácidos

fenólicos são sintetizados a partir da via do chiquimato/fenilpropanoide (Cheynier *et al.*, 2013).

De maneira geral, os compostos fenólicos estão intrinsecamente ligados à prevenção e até à cura de doenças degenerativas causadas por estresse oxidativo (Shahidi *et al.*, 2015). Jafari *et al.* (2014) afirmam que além da capacidade antioxidante, os compostos fenólicos atuam como quimiopreventivos contra o câncer modulando o ciclo celular. Grande parte dos compostos fenólicos atuam eliminando os produtos da peroxidação lipídica, impedindo danos oxidativos no DNA, além de remover as espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxilas (Zhang e Tsao, 2016). Estão relacionados ainda às atividades antimicrobiana, antifúngica, antiviral, hepatoprotetora, anti-inflamatória, antidiabética e cardioprotetora (Tanwar e Modgil, 2012).

Em *A. cearensis*, diferentes classes de metabólitos secundários foram isoladas ou identificadas qualitativamente principalmente de sementes e cascas do caule por diferentes solventes orgânicos (Tabela 2). De maneira geral, a espécie apresenta uma abundância em fenois e flavonoides. Essas duas classes extraídas das cascas do tronco de *A. cearensis* são responsáveis pela atividade terapêutica (Leal *et al.*, 2000, Costa-Lotufo *et al.*, 2003; Leal *et al.*, 2003). Foram isolados também a cumarina (1-benzopiran-2-ona) e muitos dos seus derivados predominando na casca e nas sementes (Canuto *et al.*, 2012). O campferol e isocampferídeo foram os flavonoides mais isolados das cascas do tronco de *A. cearensis*. Fitoesteroides como o β -sitosterol e estigmasterol foram também isolados de cascas e sementes. Embora muitos compostos tenham sido isolados de diferentes partes de *A. cearensis*, ainda não foi relatado o isolamento de metabólitos secundários das folhas da espécie. Figueredo *et al.* (2012) realizaram ensaios antimicrobianos dos metabólitos secundários das folhas de *A. cearensis* e relataram a presença de alcaloides, flavonoides e taninos.

Tabela 2. Principais constituintes químicos de *Amburana cearensis*, com respectivos solventes extratores e partes vegetais.

Grupo	Substância	Parte Vegetal	Solvente extrator	Referências
Ácidos graxos	Ácido oleico	Sementes	-	1, 15
	Ácido palmítico			
	Ácido esteárico			
	Ácido linoleico			
Alcaloides		Folhas	Etanol	16
Antraquinonas	Crisofanol	Casca do tronco	Acetato de etila	6,11
Catequinas		Folhas	Etanol	16
Cumarinas	Ácido (E)-o-cumárico glicosilado	Partes aéreas	Etanol e acetato	7
	(Z)-o-cumárico glicosilado	Xilopódio	Etanol e acetato	7, 11
			Água	14, 11
	(E)-o-cumárico glicosilado	Xilopódio	Água e metanol	12, 12
	Ácido <i>p</i> -cumárico	Folhas	Etanol	19
	Ácido o-cumárico glicosilado	Sementes	-	11
			Clorofórmio	2
			Diclorometano	3
		Casca do tronco	Etanol e acetato de etila	4, 9, 15
			Etanol, acetato de etila e metanol	6
	Cumarina		-	11
		Partes aéreas	Etanol, acetato de etila e diclorometano	12
		Partes aéreas, xilopódio, casca do tronco e sementes	Etanol	15
		Sementes	-	1, 15
Esteroides	Diidrocurmarina	Casca do tronco	Etanol, acetato de etila e metanol	6, 11
	Escopoletina	Casca do tronco	Etanol, acetato de etila e metanol	6
	3,4-dihidroxi-benzoato de 6-cumarila	Casca do tronco	-	11
	3-cumarina de metila	Sementes	-	20
	6-hidroxicumarina	Sementes	Etanol, hexano e acetato de etila	1, 9, 13, 15
	γ-sitosterol	Casca do tronco	Hexano	6, 11
	β-sitosterol	Sementes	-	1, 15, 21
		Casca do tronco	Etanol, acetato de etila e metanol	10, 15
	β-amirina			
	α-amirina	Casca do tronco	Hexano	6
	Araquidato de metila		Acetato de etila	6
	Campesterol	Sementes	Etanol	21
		Casca do tronco	Hexano	6

Grupo	Substância	Parte Vegetal	Solvente extrator	Referências
Esteroides	Estigmasterol	Casca do tronco	Etanol, acetato de etila e metanol	9, 15
		Sementes	-	21
	Esqualeno	Casca do tronco	Hexano	6
	Etil-hexadecanoato	Casca do tronco	Acetato de etila	6
	Eicosanoato de metila	Casca do tronco		12
	Oleato de metila		Hexano	6
	Octadecanoato de metila	Sementes	Etanol	21
	Octadecanoato de etila			
	Hexadecanoato de etila			
	D:C-friedoolean-3-ona	Casca do tronco	Hexano	6
	9-E-octadecanoato de etila	Sementes		21
	9-Z-octadecenoato de metil	Casca do tronco		12
	9-E-11-Z-octadecadienoato de metila	Sementes		21
	9,17-Z-octadecanodienal	Casca do tronco		9
	9,12-octadecadienoato de etila		-	21
	13-Z-octadecenoato de metila			21
	Palmitato de metila	Sementes		
	Palmitato de etila			
	24-metilenecicloartanol		1, 15	
	24,26-dimetilcolesta-5,22-dein-3β-ol	Casca do tronco		9
Fenol		Folhas	Etanol	20
		Partes aéreas e xilopódio	Etanol e diclometano	13
	Ácido Protocatecuico	Parte aérea, xilopódio, casca do tronco	Etanol	15
		Folhas	Etanol	19
		Casca do tronco	Etanol, acetato de etila e metanol	5
			Clorofórmio e acetato	9, 11
		Casca do tronco	-	11
	Ácido vanílico		Etanol, acetato e metanol	9, 11
		Sementes	Etanol, hexano e acetato de etila	9, 11
		Partes aéreas	Etanol, acetato de etila e diclorometano	13
	Ácido (E)-o-cumárico	Sementes	Etanol, hexano e acetato de etila	13, 15
	Ácido Z-o-cumárico	Parte aérea e xilopódio	Etanol	15
	Ácido 4-hidroxibenzoico	Casca do tronco	Clorofórmio	17
	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	Parte aérea	Etanol e acetato	7
			Etanol e diclometano	13

Grupo	Substância	Parte Vegetal	Solvente extrator	Referências
Fenol	Amburosídeo A	Sementes	-	11
		Casca do tronco	Diclorometano e Metanol	3, 15
			Etanol, acetato de etila e metanol	9, 15
		Xilopódio	Água e metanol	13
	Amburosídeo B	Sementes	Etanol, hexano e acetato de etila	13, 5
		Casca do tronco	Etanol, acetato de etila e metanol	5, 10
			-	7, 11
			Diclorometano e Metanol	3, 4
		Partes aéreas	Etanol, água e metanol	13
			Etanol e acetato	7
		Parte aérea e xilopódio, casca do tronco	Etanol	15
	Amburosídeo C, D, E, G, H	Sementes	Etanol e Acetato de etila	13, 15
	Catecol	Casca do tronco	Hexano	6, 11
	Guaiacol	Casca do tronco	Acetato de etila	6, 11
	Protocatecuato de 6-cumarila	Casca do tronco	Etanol e Acetato de etila	13, 15
	2,3-diidrobenzofurano	Casca do tronco	Hexano	6, 11
	3,4-hidroxi benzoato de metila	Casca do tronco	Acetato de etila	6, 11
	3-hidroxi-4-metoxibenzoato de metila	Casca do tronco	Acetato de etila	6, 11
	3-metoxi-4-hidroxi-cinamato de metila	Casca do tronco	Acetato de etila	6, 11
	4-hidroxi-benzenometanol	Casca do tronco	Hexano, cloroformio e metanol.	6, 11
	4-hidroxibenzoato de metila	Casca do tronco	Acetato de etila	6
	4-metoxi-3-metilfenol	Casca do tronco	Clorofórmio	18
	4-metoximetilfenol	Casca do tronco	Cloroformio e metanol	6, 12
	<i>E</i> -3,4-dimetoxi-cinamato de metila	Casca do tronco	-	11
	<i>E</i> -metil-3,4-dimetox-cinamato	Casca do tronco	Clorofórmio	6
	<i>Z</i> -3,4-dimetoxicinamato de metila	Casca do tronco	-	11
	<i>Z</i> -metil-3,4-dimetoxi cinamato	Casca do tronco	Hexano, clorofórmio e Acetato de etila	6
	α -etoxi- <i>p</i> -cresol	Casca do tronco	Metanol	6, 11
Flavonoides	4-metoxifisetina	Folhas	Etanol	16
		Casca do tronco	Etanol, acetato de etila e metanol	9, 15, 11
		Sementes	-	1, 15
	Afroformosina	Partes aéreas	Etanol e diclorometano	17
		Casca do tronco	Etanol, acetato de etila e diclorometano	9, 15
	Aiapina	Partes aéreas	Etanol, acetato de etila e diclorometano	13
		Parte aérea e xilopódio	Etanol	15

Grupo	Substância	Parte Vegetal	Solvente extrator	Referências
Flavonoides	Campferol	Casca do tronco	Etanol, acetato de etila e metanol	5, 9, 15
		Folhas	Etanólico	13
		Casca do tronco	Etanol, acetato e metanol	19
	Formononetina	Casca do tronco	Etanol, acetato de etila e metanol	4
		Casca do tronco	Etanol e Acetato de etila	13, 15
		Casca do tronco	Etanol, acetato de etila e metanol	5, 9, 11
	Isocampferídeo	Casca do tronco	Etanol e Acetato de etila	12, 15
		Partes aéreas	Etanol, acetato de etila e diclorometano	13
		Sementes	-	1, 15
Polifenol	Quercetina	Casca do tronco	Etanol, acetato de etila e metanol	9, 11, 15
	Epicatequina	Folha	Etanol	19
Saponinas		Casca do tronco	Clorofórmio e acetato	4
		Folhas	etanol	20
Sesquiterpenos	(Z,E)-Farnesol	Casca do tronco	Clorofórmio	18
	Longifoleno	Casca do tronco	Clorofórmio	18
Taninos		Casca do tronco	Etanol, acetato de etila e diclorometano	4
		Folhas	etanol	16
Terpenos	Triciclono	Casca do tronco	Clorofórmio	18
	α -pineno	Casca do tronco	Clorofórmio	
	β -pineno	Casca do tronco	Clorofórmio	
	Terpinoleno	Casca do tronco	Clorofórmio	
	<i>p</i> -mentatrieno	Casca do tronco	Clorofórmio	
		Folhas	etanol	20
Triterpenos	β -amirina	Sementes		21
	α -amirinas	Casca do tronco	-	11
	Lupeol			
	Escaleno			
Outros	3,4-dimetoxi-cinamato de metila	Sementes	-	1, 15
	Ácido gálico	Folhas	Etanol, Clorofórmio	19
	24,26-dimetilcolesta-5,22-dien-3 β -ol	Casca do tronco	Hexano	6
	<i>E</i> -Muurolo-4(14),5-dieno	Casca do tronco	Clorofórmio	18

¹ Bastos 1983; ² Leal *et al.* 1997; ³ Bravo *et al.* 1999; ⁴ Leal *et al.* 2000; ⁵ Costa-Lotufo 2003; ⁶ Negri *et al.* 2004; ⁷ Bezerra *et al.* 2005; ⁸ Leal *et al.* 2005; ⁹ Canuto e Silveira, 2006; ¹⁰ Leal *et al.* 2008; ¹¹ *Almeida *et al.* 2010; ¹² Canuto e Silveira, 2010; ¹³ Canuto *et al.* 2010; ¹⁴ Bandeira *et al.* 2011; ¹⁵ Canuto *et al.* 2012; ¹⁶ Figueredo *et al.* 2012; ¹⁷ Lopes *et al.* 2013; ¹⁸ Sá *et al.* 2014; ¹⁹ Gouveia *et al.* 2015; ²⁰ Santos *et al.* 2016; ²¹ Pereira *et al.* 2017a.

* Artigo de revisão - não relatado

1.1.5 Radicais livres e estresse oxidativo

Os radicais livres são átomos ou moléculas que apresentam pelo menos um elétron desemparelhado em seus orbitais mais externos, tornando-os capazes de reagir com outras moléculas e modificá-las pela retirada de seus respectivos elétrons (Halliwell and Gutteridge, 2010; Mittler, 2017). Dentre os radicais livres que apresentam maior reatividade, encontram-se as espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS). Dentro desses dois grupos são incluídos também compostos não radicais, que apresentam forte reatividade com outras moléculas (Valko *et al.*, 2007; Weidinger and Kozlov, 2015).

ROS/RNS são formados naturalmente como produtos do metabolismo de organismos aeróbicos (Venditti *et al.*, 2013; Vakifahmetoglu-Norberg *et al.*, 2017). Enquanto RNS são geralmente originados a partir da oxido nítrico sintase (Valko *et al.*, 2007), ROS pode ser gerado por uma variedade de enzimas e vias metabólicas, incluindo os complexos mitocondriais I e III na cadeia transportadora de elétrons (Pierre *et al.*, 2002; Murphy, 2009), NADPH oxidase (Bylund *et al.*, 2010; Manea, 2010), xantina oxidase (Harrison, 2004; Agarwal *et al.*, 2011), monoamina oxidase (Cadenas e Davies, 2000) e no citocromo P450 (Linhart *et al.*, 2014).

Dentre os radicais mais estudados, destaca-se o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que é gerado naturalmente por sistemas de oxidases como NADPH oxidase, xantina oxidase e peroxidases (Tabela 3). Uma vez produzido, o radical $O_2^{\cdot-}$ é rapidamente convertido ao não radical peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima superóxido dismutase (SOD) ou reage com o radical $NO^{\cdot}$ para formar o não radical peroxinitrito ($ONOO^-$). O H_2O_2 , um dos produtos mais tóxicos, pode ser neutralizado pela enzima glutatona peroxidase (GSH-Px) ou catalase (CAT) para formar água (H_2O) ou reagir na presença dos íons cobre (Cu^{1+}) ou ferro (Fe^{2+}) para formar o radical hidroxila ($OH^{\cdot}$) a partir da reação de Fenton. Já o oxigênio singlete (1O_2) ou estado excitado eletronicamente do oxigênio molecular pode ser formado por fotorreações envolvendo aminoácidos (Davies, 2003; Poprac *et al.*, 2017). Na figura 3, estão resumidas as vias de produção das ROS descritas acima.

Tabela 3. Modo de ação, local de produção e sistemas de neutralização de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células animais e vegetais.

ROS	Modo de ação	Local de produção	Sistemas de neutralização
Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	Reage com Proteínas de FE-S Dismuta para H_2O_2	Apoplasto (RBOHs) Cloroplasto Mitocôndria Peroxisomos Cadeia transportadora de elétrons	SOD, flavonoides, ascorbato
Hidroxila ($OH^{\cdot}$)	Extremamente reativo com todas as moléculas incluindo DNA, RNA, lipídios e proteínas	Todos os locais da célula onde haja disponibilidade de íons de ferro e H_2O_2	Flavonoides, prolina, açúcares, ascorbato
Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)	Reage com proteínas atacando os resíduos de cisteína e metionina. Reage com proteínas heme e DNA	Peroxisomos Cloroplastos Mitocôndria Citosol e apoplasto	APX, CAT, GSH-Px, PER, ascorbate, glutathiona
Oxigênio singlete (1O_2)	Oxida lipídios, proteínas (Resíduos de Trp, His, Tyr, Met e Cys) e Resíduos de Gua do DNA	Membranas Cloroplastos Núcleo	Carotenoides e α -tocoferol

APX: peroxidase ascorbato; CAT: catalase; GSH-Px: glutathiona peroxidase; PER: peroxidases; SOD: superóxido dismutase. Trp: triptofano; His: Histidina; Tyr: Tirosina; Met: Metionina; Cys: Cisteína. Modificado de Mittler, (2017).

Por décadas, os efeitos benéficos e deletérios dos radicais livres foram questionados (Valko *et al.*, 2007) sendo inclusive, proposta a teoria do radical livre em 1955, que os correlacionava com o envelhecimento celular (Harman, 1955). Em 1969, McCord & Fridovich demonstraram a existência, em sistemas biológicos, de uma enzima capaz de neutralizar o radical $O_2^{\cdot-}$, a qual denominaram de superóxido dismutase (SOD). Por sua vez, em 1977, Mittal and Murad revelaram que a presença do radical hidroxila ($OH^{\cdot}$) estimula a ativação da enzima guanilato ciclase, responsável por catalisar a reação que produz a guanosina monofosfato cíclico (cGMP) (McCord & Fridovich, 1969; Mittal & Murad, 1977). Essas descobertas evidenciaram que os radicais livres apresentam papéis relevantes na regulação de processos metabólicos em organismos vivos. Atualmente, é reconhecido que as ROS e RNS são coadjuvantes essenciais contra patógenos utilizados pelo sistema imunológico de plantas e de animais, além de atuarem como sinais em diversas vias metabólicas (Mittler, 2017; Poprac *et al.*, 2017). Ainda, em humanos,

desencadeiam o relaxamento dos vasos sanguíneos e atuam nos processos inflamatórios em geral (Bryan & Lancaster, 2017).

Por outro lado, quando em excesso, ROS/RNS são capazes de desencadear o estresse oxidativo ou ainda, estresse nitrosativo. Tais estresses contribuem para a degeneração de estruturas vitais para a sobrevivência celular tais como membranas e ácidos nucleicos, podendo ainda danificar proteínas (Poprac *et al.*, 2017). Esse processo pode ser desencadeado quando as enzimas responsáveis por neutralizar ROS e RNS têm suas capacidades comprometidas. Ou seja, quando existe um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e suas respectivas neutralizações. A ineficiência do complexo I, presente na cadeia transportadora de elétrons, também compromete esse equilíbrio dentro da célula, induzindo o estresse oxidativo (Perier *et al.*, 2005; Mittal *et al.*, 2014).

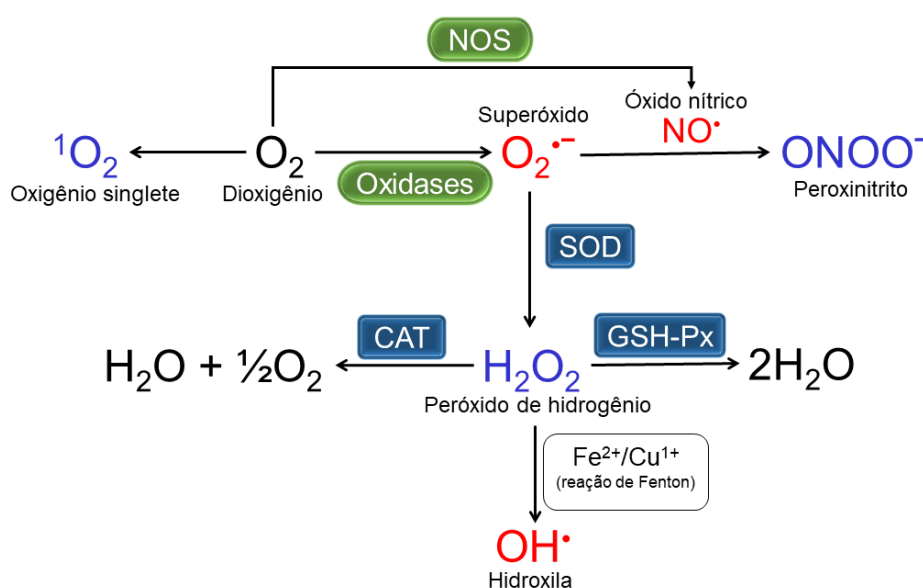


Figura 3. Diferentes vias de produção de espécies reativas de Oxigênio (ROS) e Nitrogênio (RNS). Fórmulas químicas em vermelho e azul representam radicais e não radicais, respectivamente. Oxidases: inclui NADPH, xantina e peroxidase. NOS: enzima óxido nítrico sintase. SOD: enzima superóxido desmutase. CAT: enzima catalase. GSH-Px: enzima glutatona peroxidase. Fonte: Compilado de Mittler (2017).

Fontes exógenas podem também induzir ao estresse oxidativo, como poluentes atmosféricos (ozônio, dióxido de enxofre, fumaça de cigarro) (Limón-Pacheco and Gonsebatt, 2009), o consumo de álcool (Albano, 2006), intoxicação por metais pesados (Jomova and Valko, 2011), inalação ou contato com solventes industriais (Malaguarnera *et al.*, 2012) e pesticidas (Mostafalou and Abdollahi,

antioxidantes não enzimáticos, capazes também de neutralizar espécies reativas. Os referidos antioxidantes podem ser produzidos intracelularmente, ou ainda, adquiridos por vias exógenas (Mirończuk-Chodakowska *et al.*, 2018).

As plantas medicinais constituem uma das grandes fontes de antioxidantes exógenos, devido à complexidade e à abundância dos diversos metabólitos secundários, podendo promover a prevenção de danos oxidativos por radicais livres. Dentre os metabólitos mais estudados capazes de neutralizar os radicais livres encontra-se a vitamina E (α -tocoferol) e carotenoides, que impedem a peroxidação lipídica das membranas celulares. Outro grupo de metabólitos secundários reconhecidos por suas propriedades de neutralização são os compostos fenólicos, mencionados anteriormente (Nimse e Pal, 2015; Zhang e Tsao, 2016).

Um dos métodos mais utilizados para detectar a capacidade antioxidante de extratos vegetais é pelo ensaio do DPPH. Esse método avalia a atividade antioxidante pelo sequestro do radical DPPH $\bullet$ (2,2 difenil-1-picril-hidrazil) (Blois, 1958; Brand-Willians, 1995). Nesse método ocorre a redução do radical DPPH $\bullet$, que ao fixar um H $\bullet$ (removido do antioxidante em estudo) leva a uma diminuição na sua absorbância. A porcentagem da atividade antioxidante corresponde à quantidade do radical DPPH $\bullet$ consumido pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial do radical DPPH $\bullet$ em 50% é denominada concentração efetiva (CE₅₀). Quanto maior o consumo de DPPH $\bullet$ por uma amostra, menor o CE₅₀ e maior é a atividade antioxidante (Chen *et al.*, 2013).

Destaca-se ainda, o ensaio do poder redutor (método ferrocianeto), que avalia o potencial antioxidante de um extrato ou composto pela redução do íon Fe³⁺/ferricianeto para a forma Fe²⁺/ferrocianeto. A intensidade da reação pode ser monitorada pela absorbância (700 nm) da coloração verde claro até azul intenso (azul da Prússia) após adição de íon férrico, proveniente do FeCl₃ (Apak *et al.*, 2016). Por este método, o EC₅₀ é a concentração que atinge 0,5 de absorbância (Djouahri *et al.*, 2017).

1.1.6 Avaliação da segurança do uso biológico de plantas mediante bioensaios

Os primeiros ensaios que devem ser realizados para validar a segurança de de fitoquímicos para uso medicinal são os de citotoxicidade e de genotoxicidade, identificando doses que possam, eventualmente, induzir efeitos adversos (Araújo *et al.*, 2015; Roeder *et al.*, 2015). No Brasil, para a segurança do uso de novos fitofármacos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) preconiza testes *in vitro* e *in vivo* para avaliar danos ao DNA, destacando-se o ensaio de mutação reversa em bactéria (teste de Salmonella - Ames) e o ensaio do micronúcleo (ANVISA, 2004).

1.1.6.1 Teste com cultura de células humanas

Os testes com cultura de células *in vitro* são um excelente modelo para o estudo de mutagênese e carcinogênese, pois permitem analisar substâncias com facilidade, rapidez, segurança e boa correlação com os resultados de estudos *in vivo* (Pinhatti, 2009). Funcionam também como um método preditivo dos efeitos de compostos tóxicos sobre os seres humanos, sendo utilizados no desenvolvimento e fabricação em grande escala de compostos biológicos, como vacinas e proteínas terapêuticas (Eisenbrand *et al.*, 2002; Alves e Guimarães, 2010; Breslin e O'Driscoll, 2013; Lovitt *et al.*, 2014).

Dentre os três tipos de cultivo celular (primária, contínua e transformada), as células da cultura primária apresentam características do tecido de origem e uma vida útil relativamente curta, como ocorre geralmente com as células do sangue periférico humano (Alves e Guimarães, 2010). Estas são interessantes para avaliação de agentes genotóxicos diretos (metabolização primária) e a facilidade em sua obtenção, simplicidade de seu cultivo e sensibilidade do teste, torna o sangue periférico o mais utilizado para diagnóstico citogenético (Gus, 2011).

Dentre as células do sangue periférico, as mononucleares (PBMCs; *Peripheral Blood Mononuclear Cell*; Células Mononucleares do Sangue Periférico) têm sido consideradas fundamentais na resposta à toxicidade de novos fármacos, pois participam do sistema imunológico humano e estão presentes na corrente sanguínea, sendo consideradas ferramentas críticas para estudos preditivos que

determinam o limite de dosagem de novos fármacos (Sinha *et al.*, 2014; Pourahmad e Salimi, 2015; Salgueiro *et al.*, 2015).

1.1.6.1.1 Teste de citotoxicidade

Ensaio de citotoxicidade permite avaliar mudanças na estrutura e na viabilidade celular após exposição a um determinado composto ou extrato. Tais testes usam em geral corantes ou reagentes que atuam como marcadores enzimáticos que verificam a integridade da membrana celular e/ou mitocondrial (Araújo *et al.*, 2015). Dentre os numerosos métodos para avaliação da citotoxicidade *in vitro*, destaca-se o teste MTT (Mosmann, 1983).

O MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5- difeniltetrazólio) é um sal tetrazólio amarelo que, após incubado com células expostas a determinadas concentrações de compostos, permite avaliar a viabilidade das células a partir da atividade mitocondrial. A enzima succinato desidrogenase, presente nas mitocôndrias, cliva o MTT em cristais de formazan, que são insolúveis em água e apresentam cor violeta quando dissolvidos em DMSO ou isopropanol. A quantidade de células viáveis é proporcional à intensidade da coloração, sendo mensurada em espectrofotômetro (540 nm) (Riss *et al.*, 2016).

1.1.6.1.2 Teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese, Cytokinesis-Block Micronucleus (CBMN) Assay

O teste de micronúcleo (MN) baseia-se na análise de células binucleadas induzidas por citocalasina-B (Cyt-B), um inibidor da citocinese, após um ciclo de divisão celular. Essa ferramenta molecular permite avaliar diferentes marcadores de danos como as pontes nucleoplasmáticas (PN) e os brotos nucleares (BN) além dos MNs (Fenech, 2011; Cheong *et al.*, 2013).

Os MNs são pequenas massas intracitoplasmáticas de cromatina com aspecto de um núcleo pequeno ao lado do núcleo principal, oriundos de quebras cromossômicas (clastogênese) ou de perdas cromossômicas (aneugênese) durante a divisão celular (Fenech, 2000; 2011; Hayashi, 2016). As PNs são originadas de cromossomos dicêntricos, que são puxados para pólos opostos da célula e não se rompem durante a anáfase. Os BNs são originados durante a fase

S, quando DNA amplificado são eliminados por brotação nuclear. Eles são caracterizados por apresentarem a mesma morfologia que um MN, com a exceção de estarem conectados ao núcleo por uma haste estreita ou larga (dependendo do estágio do processo de brotação) de material nucleoplasmático. Caso haja uma ruptura da haste, um MN também poderá ser formado (Figura 5) (Bonassi *et al.*, 2007; Fenech, 2011).

O teste do MN em cultura de células humanas tem se mostrado uma técnica eficaz, de simples análise e aplicabilidade tanto em testes *in vivo* como *in vitro*, para avaliar a potencialidade genotóxica de substâncias químicas (Heddle *et al.*, 1983; Fenech, 2000; Costa *et al.*, 2016). É recomendado pela *Food and Drug Administration* (FDA, 2012) para análise de novos compostos candidatos à terapia e pela Agência de Vigilância Sanitária para a análise da segurança de fitoterápicos (ANVISA, 2004).

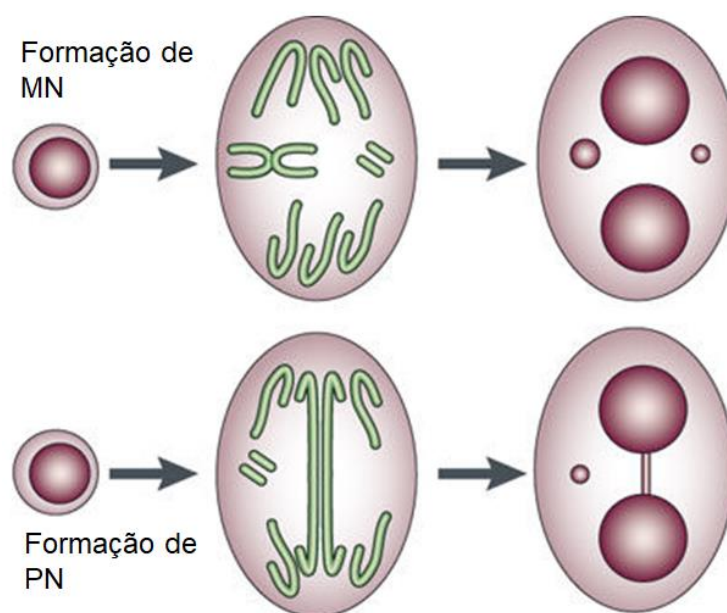


Figura 5. Formação de micronúcleos (MN) e pontes nucleoplasmáticas (PN), após teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese. Os MNs podem ser originados de cromossomos inteiros atrasados ou de fragmentos cromossômicos acêntricos. As PNs são originadas de cromossomos dicêntricos, que são puxados para pólos opostos da célula e não se rompem durante a anáfase. Esses eventos só podem ser observados em células que completam a divisão nuclear, que são reconhecidas por apresentarem células binucleadas (BN) após bloqueio da citocinese através da citocalasina B (Cyt-B). Fonte: adaptado a partir de Fenech (2007).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antioxidante, citotóxico e genotóxico do extrato foliar etanólico de *Amburana cearensis* e de suas frações em diferentes concentrações.

1.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o potencial antioxidante do extrato bruto etanólico e das frações diclometano, ciclohexano, acetato de etila e metanol pelo teste DPPH e poder redutor.
- Analisar a citotoxicidade do extrato bruto etanólico e das frações com maiores potenciais antioxidante, por meio do teste de viabilidade celular MTT em células mononucleares do sangue periférico humanos.
- Avaliar o potencial genotóxico da fração com maior atividade antioxidante mediante teste do micronúcleo utilizando cultura de células de linfócitos humanos.
- Identificar concentração segura do extrato e das frações com maior potencial antioxidante em cultura de células primária.

2 ARTIGO I: EXTRATO FOLIAR DE *AMBURANA CEARENSIS*: POTENCIAL CONTRA O ESTRESSE OXIDATIVO

José Rafael da Silva Araujo^a, Juliana Vieira de Barros^a, Marília Grasielly de Farias Silva^b, Edson Renan Barros de Santana^c, Neide Santos^a, Cláudia Sampaio de Andrade Lima^b, Pedro Marcos de Almeida^d, Ana Christina Brasileiro Vidal^a

^a Departamento de Genética, Programa de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE 50670-901, Brasil

^b Departamento de Bioquímica, Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE 50670-901, Brasil

^c Departamento de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE 50670-901, Brasil

^d Departamento de Ciências da Saúde, Faculdade de Ciências Médicas - Universidade Estadual do Piauí, Teresina, PI 64001-280, Brasil

Manuscrito a ser submetido ao Periódico Industrial Crops and Products
(Fator de Impacto: 3.181; Qualis Capes CB1: B1)

RESUMO

Amburana cearensis é uma planta endêmica da América do Sul, que é utilizada na medicina popular para tratar doenças respiratórias e febre, com atividade anti-inflamatória. Para avaliar o potencial terapêutico de *A. cearensis* no combate ao estresse oxidativo, este estudo teve como objetivo analisar a atividade antioxidante, citotóxica e genotóxica do extrato foliar etanólico bruto (EEB) de *A. cearensis* e de suas frações diclorometano (Dic), ciclohexano (cHex), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) em células mononucleares do sangue periférico. O EEB e suas frações apresentaram atividade antioxidante, sendo a fração AcOEt, com maior conteúdo fenólico (83,55 mg de GAE/g), a mais efetiva tanto na captura de radicais DPPH (EC_{50} 43,37 μ g/mL) quanto no poder redutor (EC_{50} 89,80 μ g/mL). Adicionalmente, o EEB, as frações AcOEt e MeOH apresentaram classes de metabólitos secundários similares, como flavonoides e taninos. O EEB (entre 400 e 1000 μ g/mL) e as frações AcOEt ($\leq$ 150 μ g/mL) e MeOH (entre 200 e 600 μ g/mL) não foram citotóxicos para as células mononucleares do sangue periférico pelo teste do MTT. Adicionalmente, o teste de genotoxicidade para a fração AcOEt, mostrou que as concentrações avaliadas (200, 400 e 600 μ g/mL) não induziram danos genotóxicos significativos em linfócitos humanos. Desta forma, as folhas de *A. cearensis* são fontes de metabólitos capazes de atuar também como antioxidantes naturais, sendo capazes de combater a senescência celular precoce ou doenças relacionadas ao estresse oxidativo.

Keywords: Cumaru; Citotoxicidade; Genotoxicidade; Linfócitos; Radicais livres; ROS.

1. Introdução

Estresse oxidativo é resultado do desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, levando a uma interrupção de sinalização e controle redox (Sies, 2015). Adicionalmente, pode causar danos em mecanismos celulares importantes, como em enzimas da cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias ou em enzimas antioxidantes, afetando componentes vitais nas células como lipídios, proteínas e DNA (Mittal et al., 2014). Dentre os oxidantes mais reativos destacam-se as espécies reativas de oxigênio (ROS): como hidroxila ($\text{OH}^\bullet$), superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$); bem como espécies reativas de nitrogênio (RNS) como óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$) e peroxinitrito (ONOO^-), que são naturalmente produzidos pelo metabolismo de organismos aeróbicos (Vakifahmetoglu-Norberg et al., 2017). Tais danos podem desencadear ou contribuir para desordens neurológicas (Lin e Beal, 2006), cardiovasculares (Ritchie et al., 2017) e para a senescência celular precoce, contribuindo para o desenvolvimento de doenças relacionadas ao envelhecimento (Malinin et al., 2011).

As células apresentam múltiplos mecanismos para manter o equilíbrio homeostático de espécies reativas, incluindo a ação de enzimas antioxidantes como a catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD) e a glutathiona peroxidase (GSH-Px), que impedem a oxidação de moléculas não alvo (Poprac et al., 2017). Antioxidantes não enzimáticos, como ferritina e albumina, por exemplo, também são capazes de neutralizar espécies reativas (Mirończuk-Chodakowska et al., 2018). Os referidos antioxidantes podem ser produzidos intracelularmente ou adquiridos por vias exógenas.

As plantas constituem uma das grandes fontes de antioxidantes exógenos, devido à complexidade e abundância dos diversos metabólitos secundários, que promovem a prevenção de danos oxidativos por radicais livres (Krishnaiah et al., 2011). *Amburana cearensis* (Allemão) A.C.Sm. (Fabaceae) é uma árvore endêmica da América do Sul, nativa da Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai e Peru, popularmente conhecida como cumaru ou amburana de cheiro (Maia, 2012). Estudos recentes com o extrato etanólico foliar de *A. cearensis* têm revelado sua potencialidade na proteção contra danos oxidativos, promovendo maior sobrevivência e crescimento de folículos ovarianos de caprinos (Gouveia et al., 2015; Barberino et al., 2015; Gouveia et al., 2016). O mesmo extrato tem sido

inclusive, sugerido como substituição de suplementos antioxidantes em meio de cultura, pela facilidade de obtenção e menor custo (Barberino et al., 2015). No entanto, suas propriedades antioxidantes ainda não foram investigadas em modelos *in vitro*.

Além disso, testes que avaliem extratos vegetais ou compostos ativos isolados de plantas quanto às suas propriedades toxicológicas em cultura de células são necessários para identificar possíveis riscos genotóxicos (Fenech et al., 2016), além de apresentarem alta correlação com os resultados de estudos *in vivo* (Groothuis et al., 2015). Dentre os testes de genotoxicidade, destaca-se o teste de micronúcleo *in vitro* (Fenech et al., 2016), que é recomendado pela *Food and Drug Administration* (FDA, 2012) para análise de novos compostos candidatos a uso terapêutico, em razão de sua sensibilidade e reprodutibilidade (Araldi et al., 2015; Riss et al., 2016).

Considerando a importância da busca de antioxidantes naturais no combate de doenças relacionadas ao estresse oxidativo e a ausência de informações sobre o potencial antioxidante, citotóxico e genotóxico sobre linfócitos humanos do extrato as folhas de cumaru, o presente trabalho visou: (1) avaliar se o extrato e frações das folhas de *A. cearensis* apresenta potencial antioxidante atuando neutralização de radicais livres e redução de íons metálicos; (2) caracterizar qualitativamente a presença de metabólitos secundários e as concentrações de fenólicos totais do extrato e de suas frações; (3) verificar se o extrato e as frações com maior potencial antioxidante apresenta citotoxicidade e genotoxicidade em linfócitos humanos usando o teste MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) e o teste do Micronúcleo, respectivamente.

2. Material e métodos

2.1 Material vegetal

Folhas de *A. cearensis* foram coletadas no município Brejo da Madre de Deus (Brasil) a 8°08'16.6" de latitude e 36°23'32.4" de longitude em dezembro de 2016. A planta foi identificada pelo Dr. Marccus Alves, e uma excicata foi depositada no Herbário Geraldo Mariz da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE, Recife, Brasil), sob o número de *Voucher* UFP 82.635.

2.2 Preparo do extrato etanólico e frações

Folhas de *A. cearensis* foram secas em estufa a 45-50 °C por quatro dias. Em seguida, o material foi triturado em moinho de facas para obtenção de um pó fino, e 339,8 g do pó obtido foi submetido à extração por maceração e percolação com renovação de álcool (quatro trocas) a 96% (1 L). O material foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo a vácuo ($\leq 45^{\circ}\text{C}$) e seco em dissecador para obter o extrato etanólico bruto (EEB) ($\eta = 39,59\%$). Para o preparo das frações, 85,57 g do EEB foi solubilizado com solventes por ordem crescente de polaridade (diclorometano, ciclohexano, acetato de etila e metanol). Cada solvente foi renovado a cada 12 h (quatro trocas cada) e concentrados em evaporador rotativo a vácuo ($<45^{\circ}\text{C}$). As frações diclorometano (Dic; $\eta = 1\%$), ciclohexano (cHex; $\eta = 5,8\%$), acetato de etila (AcOEt; $\eta = 7,47\%$) e metanólica (MeOH; $\eta = 76,17\%$) foram obtidas.

2.3 Atividade antioxidante *in vitro*

2.3.1 Ensaio de captura do radical DPPH

A atividade de captura do radical DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) foi realizada de acordo com Alonso-Carrillo et al. (2017) com algumas modificações. Para analisar o EEB e todas as frações, um *screening* inicial de atividade de captura de radical DPPH foi realizado em concentrações variando entre 62,5 e 1000 $\mu\text{g/mL}$. Como as frações cHex e Dic não foram efetivas em relação a EEB e às frações AcOEt e MeOH, além das concentrações acima de 200 $\mu\text{g/mL}$ terem apresentado porcentagem de redução do DPPH semelhantes (sem dose dependência), o ensaio DPPH assim como os demais ensaios antioxidantes foram realizados apenas para EEB e para as frações AcOEt e MeOH nas concentrações 25, 50, 75, 100, 150 e 200 $\mu\text{g/mL}$, a fim de verificar a dose dependência.

Para realização do ensaio, 2 mL dos extratos em diferentes concentrações foram adicionados a 2 mL de solução etanólica de DPPH $^{\bullet}$ (304 mM). As misturas foram agitadas e a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 517 nm após 30 min. As reações foram realizadas em triplicatas acompanhadas de um controle, que consistiu apenas do radical DPPH $^{\bullet}$ e a solução etanólica (branco). O controle positivo consistiu no ácido ascórbico nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 $\mu\text{g/mL}$. A porcentagem de descoloração do DPPH $^{\bullet}$, que indica a ação antioxidante, foi estabelecida de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ de redução do radical livre DPPH: } \frac{Abs \text{ controle} - Abs \text{ amostra}}{Abs \text{ controle}} \times 100$$

Adicionalmente, foi estimada a EC₅₀ (concentração do composto que causa 50% de redução dos radicais de DPPH) mediante plotagem das porcentagens de reduções em função das concentrações correspondentes (Chen et al., 2013).

2.3.2 Ensaio do poder redutor

No ensaio do poder redutor, foram testadas apenas as concentrações e as frações mais ativas no ensaio do DPPH: EEB e as frações AcOEt e MeOH nas concentrações de 25, 50, 75, 100, 150 e 200 µg/mL. O experimento foi realizado de acordo com Berker et al. (2010) com algumas modificações. Amostras contendo 1,25 mL de tampão fosfato (PBS 0,2 M; pH 6,6), 2,5 mL de ferricianeto de potássio (1%) e 1 mL de diferentes concentrações do extrato ou frações foram incubadas em banho-Maria a 50°C durante 30 min. Posteriormente, 1,25 mL de ácido tricloroacético (10%) foram adicionados e as amostras centrifugadas a 1500 rpm durante 10 min. Em seguida, 1,25 mL sobrenadante foi transferido para novo tubo, acrescido de 1,25 mL de água destilada e de 0,25 mL de cloreto férrico (0,1%). Após a adição do FeCl₃, as absorbâncias foram lidas no espectrofotômetro a 700 nm. As reações foram realizadas em triplicatas acompanhadas de um controle, que consistiu apenas de todos os reagentes e a solução etanólica (branco). O controle positivo consistiu no ácido ascórbico nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 µg/mL. A capacidade antioxidante foi mensurada pelo aumento das absorbâncias, que indicam um maior poder de redução. A concentração que apresenta 0,5 da absorbância (EC₅₀) foi calculada plotando as absorbâncias a 700 nm em função das concentrações correspondentes (Djouahri et al., 2017).

2.4 Análise fitoquímica

2.4.1 Caracterização fitoquímica

A presença qualitativa de diferentes metabólitos secundários do EEB e das frações (cHex, Dic, AcOEt e MeOH) das folhas de *A. cearensis* foi determinada através de sistema automatizado de análise por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance (HPTLC; *High-Performance Thin Layer Chromatography*) em sílica gel 60 F₂₅₄ (Tabela 1).

Tabela 1. Sistemas cromatográficos e reveladores utilizados para o perfil fitoquímico do extrato das folhas de *Amburana cearensis*.

Metabólitos analisados	Fase Móvel	Padrão	Revelador	Referências
Flavonoides	AcOEt:Ácido Acético:Ácido Fórmico:H ₂ O 100:9:9:20	Quercetina e Rutina	Cloreto de alumínio 5%	1, 2, 3
Cumarinas	Et ₂ O:Tolueno 10% Ácido acético 1:1	Cumarina	KOH 5% EtOH + UV	2
Monoterpeno, Diterpenos e Sesquiterpenos	Tolueno: AcOEt 93:7	Carvacrol e Timol	Vanilina sulfúrica + UV	2
Triterpenos e Esteroides	Tolueno: AcOEt 9:1	β-sitosterol e estigmasterol	Liebermann/Burchard + UV	4

¹ Neu (1956); ² Wagner e Bladt (1996); ³ Fiuza et al. (2008); ⁴ Harbone (1998).

Além dos metabólitos secundários analisados em HPTLC, teste para detecção de taninos hidrolisáveis e condensados foram realizados, separadamente, pelo teste de cloreto férrico (FeCl₃), que consistiu na adição de três gotas de solução de FeCl₃ a 3% nas amostras (EEB e frações cHex, Dic, AcOEt, MeOH) em uma concentração de 2 mg/mL em etanol (Fedrigo et al., 2010).

2.4.2 Quantificação de fenóis totais

O teor de compostos fenólicos totais do EEB e das frações (cHex, Dic, AcOEt e MeOH) foram determinados de acordo com o procedimento de Folin-Ciocalteu com modificações (Singleton et al., 1999). O EEB e as diferentes frações foram dissolvidas em metanol em uma concentração final de 200 µg/mL. Em seguida, 0,5 mL de cada solução foram transferidos para tubo de ensaio com 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (10%) e 2,5 mL de bicarbonato de sódio a 7,5%. Para o branco foi utilizado apenas o metanol. Em seguida, as amostras e o branco foram incubados em banho-Maria a 45°C durante 45 min. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 765 nm. As amostras foram preparadas em triplicatas para cada análise e o valor médio de absorbância foi obtido. O mesmo procedimento foi repetido para a solução padrão de ácido gálico e a curva de calibração foi interpretada. A quantidade de fenóis totais foi calculada em miligramas equivalentes

de ácido gálico (EAG)/g da curva de calibração ($y = 0,01003x + 0,01676$; $r^2 = 0,98729$) da solução padrão de ácido gálico.

2.5 Análise da citotoxicidade e da genotoxicidade

2.5.1 Citotoxicidade pelo ensaio do MTT

O teste MTT foi realizado para avaliar a citotoxicidade do EEB e das frações AcOEt e MeOH, que foram mais efetivos quanto à ação antioxidante. Para o ensaio, cultura de células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs) foi utilizada, de acordo com Mendes et al. (2015) com algumas modificações. Para tal, sangue periférico foi obtido por punção venosa de doadores do sexo masculino, aparentemente saudáveis, não fumantes e que não faziam uso de medicamentos. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o projeto aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal de Pernambuco (CAAE: 67266817.2.0000.5208; CEP-UFPE; Plataforma Brasil).

PBMCs foram isoladas do sangue total periférico, por gradiente de densidade utilizando Histopaque®-1077 em tubos Falcon de 15 mL, por centrifugação a 2400 rpm, durante 35 min a temperatura ambiente. A camada celular mononuclear foi removida, lavada em tampão fosfato (PBS) 1x estéril por centrifugação (1500 rpm) durante 10 min e ressuspendida em meio RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino (4:1; v:v). Para o ajuste da concentração celular, foi utilizado o corante azul de tripan em câmara de Neubauer. Em seguida, 100 µL de PBMCs (5×10^5 células/poço) foram semeados em placas de 96 poços. Em seguida, foram adicionados 50 µL em 5 poços correspondentes ao EEB e às frações AcOEt e MeOH nas concentrações finais de 50, 100, 150, 200, 400, 600, 800 e 1000 µg/mL diluídas em RPMI 1640 com 2% de metanol e filtrados em filtro membrana PES (22 µm de diâmetro) para eliminar microorganismos. Foram adicionados também 50 µL de triton-X 100 (1%), meio de cultura e MeOH (2%) nos poços referentes ao controle positivo (CP), controle negativo (CN) e controle do solvente (CS), respectivamente. Posteriormente, as placas foram incubadas durante 24 h a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

A avaliação da citotoxicidade em PBMCs foi realizada utilizando o ensaio de redução do brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difenil tetrazólio (MTT), adaptado de Mosmann (1983). Após 24 h de incubação foram adicionados 20 µL de solução de MTT (5 mg/mL) em todos os poços e re-incubados durante 3 h nas

mesmas condições descritas acima. Em seguida, as placas foram centrifugadas por 4500 rpm durante 10 min e o material sobrenadante foi descartado para adição de 100 µL de DMSO para a dissolução dos cristais de formazan. A absorbância foi mensurada em leitor de microplaca, utilizando filtro de 570 nm.

2.5.2 Teste do micronúcleo por bloqueio de citocinese (CBMN)

O teste CBMN foi realizado para avaliar a segurança da fração AcOEt (mais ativa na captura de radicais livres) de acordo com Gođevac et al. (2009) com algumas modificações. A coleta de sangue periférico seguiu os mesmos princípios do item anterior. Inicialmente, 0,5 mL de sangue total foi incubado em tubos Falcon de 15 mL, contendo 5 mL de meio de cultura com estreptomicina a 10% e 100 µL de fitohemaglutina, durante 20 h a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. O experimento foi realizado em triplicata biológica, sendo cada replica constituída por um doador.

Após a incubação, foram adicionados volumes necessários para concentrações finais de 200, 400 e 600 µg/mL, e incubados novamente sob as mesmas condições durante 24 h. As três concentrações foram selecionadas com base no teste MTT (duas com viabilidade celular menor que 80%: 400 e 600 µg/mL, e uma com viabilidade maior que 80%: 200 µg/mL). O controle positivo (CP) consistiu da adição de metanossulfonato de metila (MMS) para concentração final de 2×10^{-2} M; controle negativo (CN) foi constituído apenas do meio de cultura descrito acima, e o controle do solvente (CS) consistiu de etanol 0,006% em RPMI 1640 (v:v) (concentração de etanol final na dose mais alta da fração AcOEt testada, 600 µg/mL).

Em seguida, foi adicionado o mitógeno citocalasina B a cada tubo em concentração final de 4,5 µg/mL e novamente incubados durante 28 h. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 1050 rpm por 10 min. As células vermelhas foram lisadas com KCl (0,075 M) gelado e os tubos centrifugados a 1050 rpm por 10 min. O sobrenadante foi eliminado, adicionados 5 mL da solução de Ringer: fixador (metanol: ácido acético; 10:1; v:v) na proporção de 1:1 (v:v), e os tubos centrifugados a 1050 rpm por 10 min. Finalmente, o mesmo procedimento foi realizado apenas com metanol: ácido acético (10:1) até o clareamento do sobrenadante. A suspensão celular foi gotejada em lâminas e corada com Giemsa 5% durante 20 min.

Para análise da frequência de alterações nucleares, incluindo micronúcleo, broto nuclear e ponte nucleoplasmática, foi analisado o sangue de três doadores, seguindo os critérios estabelecidos por Fenech (2000). Cada doador constituiu uma unidade experimental, com 3000 células binucleadas por tratamento (1000 células/lâmina, 3 lâminas/tubo, 1 tubo/doador).

Foi calculada a proporcionalidade de alterações nucleares, dividindo-se o valor médio de cada tratamento pela média do controle negativo. A porcentagem de redução da média de alterações cromossômicas (redução de danos), após a administração das diferentes concentrações do AcOEt, foi calculada considerando o controle negativo como 100% de alterações.

2.6 Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições para a determinação do teor de fenólicos totais, teste antioxidante e micronúcleo; e com cinco repetições para a atividade citotóxica. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio-padrão.

Para a comparação das médias dos tratamentos com os controles, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey para dados com distribuição normal pelo Teste de Shapiro-Wilk e homogêneos pelo teste do Levene's ou Bartlett, usando o software Statistica 8.0. Adotou-se o nível de significância de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Apenas as médias do teor de fenólicos totais, testes de citotoxicidade e de micronúcleo foram comparadas estatisticamente.

Para o EC₅₀ foi utilizado o software GraphPad Prism 5.0 plotando as respostas normalizadas em função das concentrações em base logarítmica.

3. Resultados

3.1 Atividade antioxidante das folhas de *A. cearensis*

O extrato etanólico bruto e de suas frações obtidas das folhas de *A. cearensis* apresentaram atividade antioxidante (Figuras 1A e 1B) em diferentes concentrações. Para o teste DPPH, o screening revelou que EEB e as frações AcOEt e MeOH foram antioxidantes mais efetivos quando comparados com as frações Dic e cHex (Apendice A - Figura Suplementar 1). Além disso, as concentrações acima de 200 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram porcentagem de redução do DPPH semelhantes (sem dose dependência). Por essas razões, o ensaio DPPH

assim como os demais ensaios antioxidantes foram realizados apenas para EEB e para as frações AcOEt e MeOH nas concentrações de 25 a 200 $\mu\text{g/mL}$, a fim de verificar a dose dependência.

Para EEB e para as frações AcOEt e MeOH, as concentrações 25, 50, 75, 100, 150 e 200 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 1A) apresentaram relação dose-dependente direta entre as concentrações avaliadas e a redução do DPPH. Em 200 $\mu\text{g/mL}$, o EEB e as frações AcOEt e MeOH apresentaram valores acima de 80% de redução do radical livre. Resultado similar foi observado para o ácido ascórbico a partir da concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$. Os valores das porcentagens entre as concentrações de 25 a 200 $\mu\text{g/mL}$ variaram de 16,03% a 84,99% para o EEB; de 32,67% a 83,33% para a fração AcOEt, e de 21,19% a 89,59% para a fração MeOH.

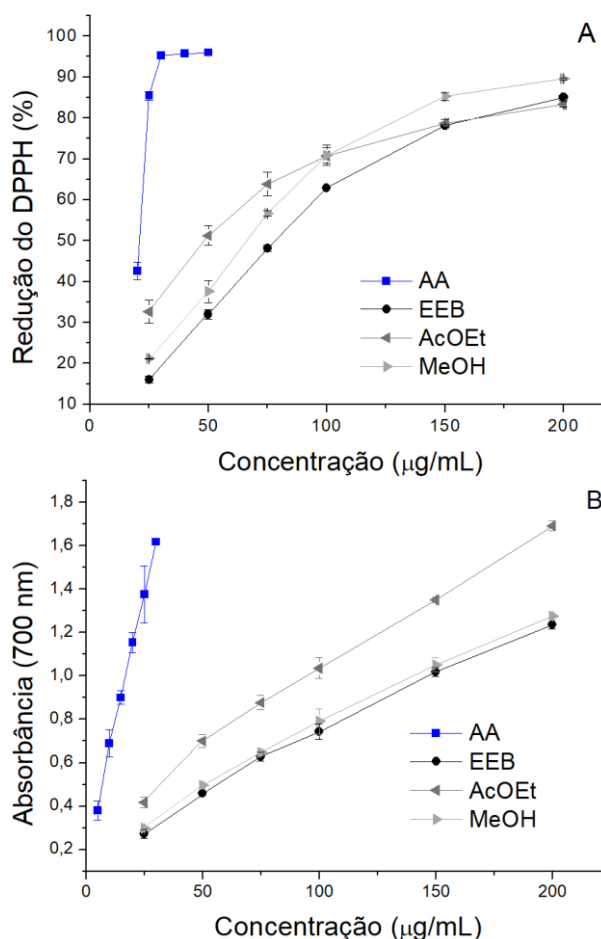


Figura 1 - Atividade antioxidante do extrato etanólico bruto (EEB) e as frações acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) das folhas de *A. cearensis*: (A) atividade de redução do DPPH; (B) atividade do poder redutor. Valores no gráfico correspondem à média e ao desvio padrão da porcentagem de redução do radical livre DPPH (A) e à absorbância em 700 nm para o poder redutor (B), ambos com $n = 3$. AA: ácido ascórbico.

Para o teste do poder redutor, as concentrações de 25, 50, 75, 100, 150 e 200 µg/mL (Figura 1B) revelaram que a fração AcOEt apresentou maior atividade em relação ao EEB e à fração MeOH. As absorbâncias de EEB e da fração MeOH foram semelhantes, variando entre 0,29 e 1,27 nm, enquanto para a fração AcOEt variou de 0,41 a 1,69 nm. Todos os tratamentos apresentaram uma relação proporcional dose-dependência. Nessa faixa de absorbância para as concentrações entre 25 e 200 µg/mL do EEB e das frações AcOEt e MeOH, o padrão ácido ascórbico atingiu resultados similares com concentrações menores, variando entre 5 e 30 µg/mL.

Em relação à EC₅₀, a fração AcOEt apresentou menor valor para os testes DPPH (53,37 µg/mL) e poder redutor (45,82 µg/mL). Enquanto EEB e a fração MeOH apresentaram concentrações medianas em ambos os testes (Tabela 2). A fração cHex apresentou maior EC₅₀ dentre os tratamentos avaliados para o teste DPPH (398 µg/mL). Por outro lado, o padrão ácido ascórbico apresentou EC₅₀ 9,8 µg/mL e 10,28 µg/mL para os testes DPPH e poder redutor, respectivamente.

Tabela 2 - Atividade antioxidante *in vitro* das folhas de *A. cearensis*.

Amostradas/Controle Positivo	Ensaio de redução do DPPH	Ensaio do poder reductor
	EC ₅₀ ^a	EC ₅₀ ^b
EEB	68,09 ± 1,47	47,95 ± 1,87
Fração cHex	398,00 ± 1,52	n.d.
Fração Dic	n.d.	n.d.
Fração AcOEt	53,37 ± 1,45	45,82 ± 1,84
Fração MeOH	62,17 ± 1,50	49,67 ± 1,84
Ácido ascórbico	9,8 ± 2,05	10,28 ± 1,82

Valores de EC₅₀ em µg/ml das atividades antioxidantes pelo teste DPPH e poder redutor obtidos do Extrato Etanólico Bruto (EEB) das folhas de *A. cearensis* e suas frações ciclohexano (cHex), diclorometano (Dic), acetato de etila (AcOEt) e metanólica (MeOH).

^a concentração efetiva em que 50% de redução dos radicais DPPH;

^b concentração efetiva em que a absorbância é 0,5;

n.d. não determinado

3.2 Caracterização fitoquímica

A análise qualitativa de metabólitos secundários das folhas de *A. cearensis* revelou presença de flavonoides e taninos no EEB e nas frações AcOEt e MeOH. Monoterpenos, Diterpenos, Sesquiterpenos, Triterpenos e Esteroides foram detectados apenas no EEB e nas frações cHex e Dic.

3.3 Fenólicos totais

As maiores concentrações de compostos fenólicos totais foram observadas nas frações AcOEt (83,55 mg de EAG/g) e MeOH (56,52 mg de EAG/g), seguidas de EEB (54,47 de EAG/g) e as menores, nas frações Dic (29,95 mg de EAG/g) e cHex (11,15 mg de EAG/g). Apenas a fração MeOH não apresentou diferença significativa quando comparada com o EEB.

3.4 Citotoxicidade

Considerando que o EEB e as frações AcOEt e MeOH apresentaram os melhores resultados quanto às atividades antioxidantes, foram realizados ensaios de citotoxicidade em concentrações variando de 50 a 1000 µg/mL mediante teste MTT (Figuras 2A, 2B e 2C).

Para EEB (Figura 2A), apenas as concentrações de 400, 800 e 1000 µg/mL não apresentaram diferença estatística significativa quando comparadas com o controle negativo ($p > 0,05$). As concentrações 150 e 200 µg/mL apresentaram moderada citotoxicidade ($p < 0,01$), enquanto as concentrações de 50 e 100 µg/mL apresentaram alta citotoxicidade (diferença estatística, $p < 0,001$).

Para a fração AcOEt (Figura 2B), apenas as concentrações de 50 a 150 µg/mL não apresentaram diferença estatística quando comparadas ao controle negativo, não sendo consideradas citotóxicas. Por outro lado, a concentração de 200 µg/mL apresentou moderada citotoxicidade (diferença estatística, $p < 0,01$), enquanto as concentrações entre 400 a 1000 µg/mL apresentaram elevada citotoxicidade ($p < 0,001$).

Por fim, para a fração MeOH (Figura 2C), apenas as concentrações de 200 e 400 µg/mL não foram estatisticamente diferentes em relação ao controle negativo. As concentrações de 50 e 600 µg/mL apresentaram baixa citotoxicidade (diferença estatística, $p < 0,05$), enquanto a concentração de 150 µg/mL apresentou moderada citotoxicidade. Já as concentrações de 100 µg/mL e entre 800 e 1000 µg/mL apresentaram elevada citotoxicidade ($p < 0,001$).

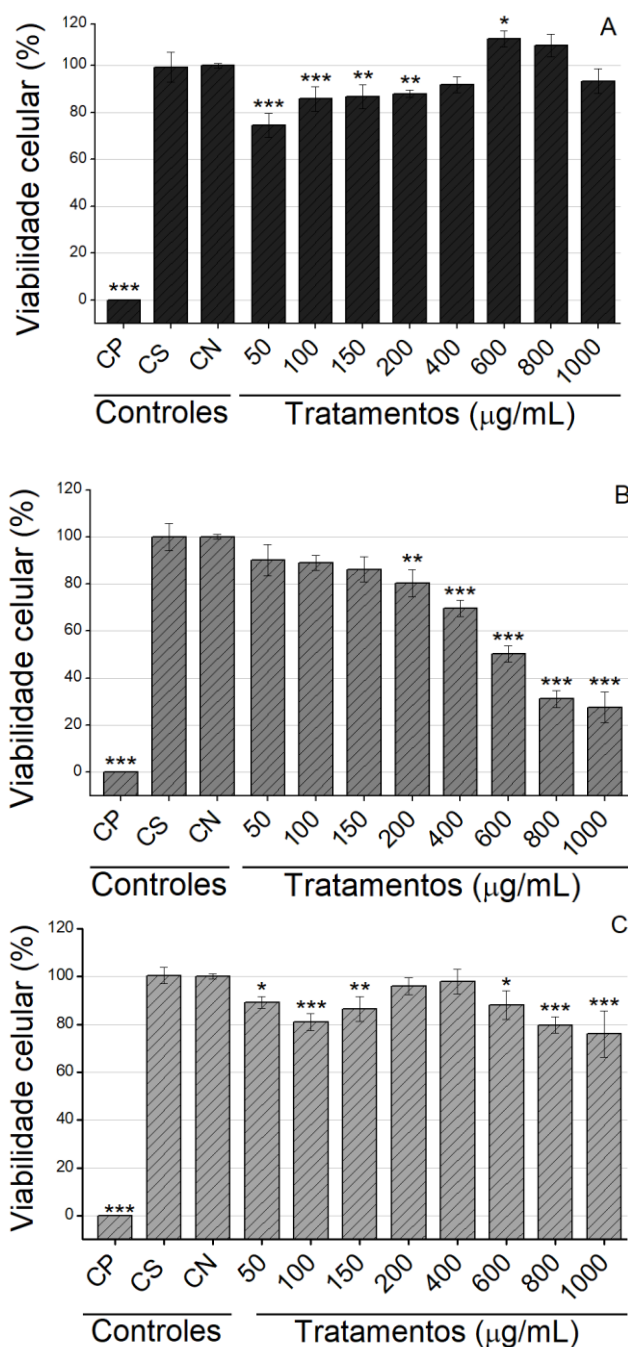


Figura 2 - Atividade citotóxica baseada na viabilidade celular pelo teste MTT das folhas de *A. cearensis*: (A) Extrato etanólico bruto (EEB); (B) Fração acetato de Etila (AcOEt); (C) Fração metanol (MeOH). Valores correspondentes à média e o desvio padrão da porcentagem de viabilidade celular ($n = 5$). CN: Controle Negativo (meio de cultura); CS: Controle Solvente (Metanol a 2%); CP: controle positivo (Triton-X a 1%). Médias estatisticamente diferentes quando comparadas com o controle negativo pelo teste Newman-Keuls: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

3.5 Genotoxicidade

As concentrações da fração AcOEt (200, 400 e 600 µg/mL) analisadas pelo ensaio do micronúcleo com bloqueio de citocinese (CBMN) não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle negativo, tanto para o número

médio de micronúcleos (7,66 a 11 MN/ 3000 células) quanto de brotos nucleares (2,0 a 2,33 MN/ 3000 células), demonstrando ausência de genotoxicidade (Tabela 3). Além disso, embora não tenham apresentado diferença estatística, as porcentagens de micronúcleos e de brotos nucleares apresentaram redução nas concentrações testadas. As concentrações 200, 400 e 600 µg/mL reduziram em 38, 35 e 11%, respectivamente, a frequência de micronúcleos em relação ao controle negativo, enquanto que brotos nucleares foram reduzidos em 84, 84 e 81%, respectivamente. Não foram observadas pontes nucleoplasmáticas para nenhum dos tratamentos analisados.

Tabela 3 - Alterações nucleares em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) após exposição à fração AcOEt do extrato etanólico bruto das folhas de *A. cearensis* nas concentrações de 200, 400 e 600 µg/mL.

Alteração	Tratamento µg/mL	N. Alterações Média ± Desvio*	Porcentagem (%)	Proporcionalidade	Redução de dano
MN	CN	12,33 ± 1,52 a	0,4	-	-
	CS	12,33 ± 1,52 a	0,4	1,0	-
	CP	42,50 ± 7,50 b	2,2	5,9	-
	200	7,66 ± 2,08 a	0,2	0,6	↓ 38%
	400	8,00 ± 3,60 a	0,2	0,6	↓ 35%
	600	11,00 ± 6,08 a	0,3	0,9	↓ 11%
BN	CN	9,00 ± 3,0 a	0,3	-	-
	CS	6,00 ± 2,64 a	0,2	0,7	-
	CP	10,33 ± 10,21 a	0,3	1,1	-
	200	2,33 ± 2,30 a	0,07	0,3	↓ 84%
	400	2,00 ± 1,00 a	0,06	0,2	↓ 84%
	600	2,00 ± 2,00 a	0,06	0,2	↓ 81%

MN, Micronúcleo; BN, Broto Nuclear; CN, Controle Negativo (apenas meio de cultura); CP, Controle Positivo (Metanosulfonato de metila; 2×10^{-2} M); CS, Controle Solvente (Etanol < 1%). * Número de alterações cromossômicas observado em 3000 células (média das três repetições). Médias seguidas de letras diferentes, na coluna para determinado tipo de alteração, diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). A proporcionalidade foi calculada dividindo-se o valor médio de cada tratamento pela média do controle negativo. Redução de dano: valor em porcentagem da redução da frequência de alterações cromossômicas.

4. Discussão

O presente estudo confirmou a propriedade antioxidante de folhas de *A. cearensis*, especialmente para extrato etanólico, como observado previamente em ensaios com folículos ovarianos de caprinos (Gouveia et al., 2015; Barberino et al., 2015; Gouveia et al., 2016). Contudo, este é o primeiro trabalho que compara a ação antioxidante do extrato etanólico bruto e quatro frações de folhas de *A. cearensis* por três diferentes testes, demonstrando que a fração AcOEt (maior poder antioxidante) não apresentou citotoxicidade em concentrações $\leq 150 \mu\text{g/mL}$ em células mononucleadas do sangue periférico humano (PBMCs), nem genotoxicidade em concentrações $\leq 600 \mu\text{g/mL}$ em linfócitos humanos.

Um dos mecanismos pelos quais os antioxidantes exercem sua ação é neutralizando os radicais livres (Poprac et al., 2017). Neste sentido, o teste do DPPH compreende um método eficaz para análise de antioxidantes, devido ao DPPH ser um radical livre estável, que pode ser neutralizado principalmente por redução a partir da doação de hidrogênios por antioxidantes (Mishra et al., 2012). Adicionalmente, a atividade antioxidante de extratos vegetais pode ser mensurada pelo teste do poder redutor (método ferricianeto), verificando a capacidade do extrato vegetal doar elétrons para reduzir íons férricos (Berker et al., 2010). No presente estudo, o EEB das folhas de *A. cearensis* e todas as suas frações (Dic, cHex, AcOEt e MeOH) apresentaram capacidade de neutralizar os radicais livres do DPPH, destacando-se a maior atividade de redução do EEB e das frações AcOEt e MeOH em relação às frações Dic e cHex. Além disso, a fração AcOEt destacou-se por sua maior capacidade redutora ($\text{EC}_{50} 45,82 \mu\text{g/mL}$) em relação ao EEB ($\text{EC}_{50} 47,95$) e à fração MeOH ($\text{EC}_{50} 49,67$). Esses resultados eram esperados devido às menores concentrações de compostos fenólicos observadas nas frações cHex e Dic e à maior concentração de compostos fenólicos na fração AcOEt, os quais estão relacionados à capacidade antioxidante (Shahidi e Ambigaipalan, 2015).

Dentre os compostos fenólicos, destacou-se a presença de flavonoides e taninos no EEB e nas frações AcOEt e MeOH. Os flavonoides, assim como os taninos neutralizam os radicais livres pela doação de hidrogênio, potencializando a ação de acordo com o número de grupamentos hidroxilas (Kumar e Pandey, 2013). Adicionalmente, a presença majoritária de compostos fenólicos totais, incluindo flavonoides e taninos, na fração AcOEt (83,55 mg de EAG/g) pode ter reduzido o maior número de radicais de DPPH ($\text{EC}_{50} 53,37 \mu\text{g/mL}$) em relação ao

EEB (EC₅₀ 68,09 µg/mL) e MeOH (EC₅₀ 62,17 µg/mL). Não foi possível determinar o EC₅₀ para a fração Dic devido à neutralização de radicais DPPH não ter ultrapassado 50% entre as concentrações de 62,5 e 1000 µg/mL. Por outro lado, embora a fração cHex tenha apresentado reduções acima de 50%, apresentou baixo potencial de redução do DPPH (EC₅₀ 398,00 µg/mL).

Adicionalmente, o EEB e as frações AcOEt e MeOH foram testados quanto a sua citotoxicidade, considerando que apresentaram melhores resultados antioxidantes. De modo geral, o EEB apresentou menor citotoxicidade que as frações AcOEt e MeOH. O EEB apresentou maior viabilidade celular para as concentrações medianas (400 a 1000 µg/mL). Enquanto as mesmas concentrações apresentaram-se citotóxicas ($p < 0,001$) para as frações AcOEt e MeOH, exceto na concentração de 400 µg/mL para a última fração. Essas variações podem ser atribuídas ao efeito sinérgico dos metabólitos presentes no EEB (terpenos, esteroides, flavonoides e taninos), como observado por Seeram et al. (2004) em células tumorais oral (KB, CAL27), cólon (HT-29, HCT116, SW480, SW620), e próstata (RWPE-1, RWPE2, 22Rv1). Terpenos e esteroides não foram encontrados nas frações AcOEt e MeOH.

Gouveia et al. (2015) verificaram a presença predominante do ácido protocatecuico (PCA), forte antioxidante natural, no extrato etanólico bruto das folhas de *A. cearensis* (Kakkar e Bais, 2014). Em modelos *in vivo*, PCA apresenta propriedade antioxidante em baixas concentrações (Liu et al., 2002), além de aumentar os níveis da atividade enzimática de glutathione peroxidase (GSH-Px) e superóxido dismutase (SOD) (Shi et al., 2006). Em contrapartida, em altas concentrações, o PCA induz ao estresse oxidativo (efeito pró-oxidante) tanto na epiderme de camundongos (Nakamura et al., 2001) quanto em linhagens celulares da mucosa oral de humanos (Babich et al., 2002). Desta forma, maior citotoxicidade em altas concentrações e menor citotoxicidade em baixas concentrações na fração AcOEt também poderia ser explicada pela provável presença do PCA, devido à sua afinidade de polaridade do solvente extrator.

Levando em consideração apenas as frações AcOEt e MeOH, é possível observar que as doses da fração AcOEt apresentaram maior citotoxicidade que as da MeOH. De acordo com as análises fitoquímicas realizadas, a fração AcOEt apresentou maior concentração de compostos fenólicos totais, incluindo flavonoides e taninos. Embora essa classe de metabólitos apresente efeitos

benéficos sobre as células a partir da captura de radicais livres, elas podem, entretanto, agir como pró-oxidantes, induzindo a formação de radicais livres (Carocho e Ferreira, 2013; Eghbaliferiz e Iranshari, 2016). No entanto, doses de 50 a 150 µg/mL da fração AcOEt não foram citotóxicas e apresentam atividade antioxidante. Em contrapartida, essas mesmas concentrações da fração MeOH induziram danos sobre as PBMCs, sugerindo a prevalência de compostos de natureza não fenólica interagindo com a atividade mitocondrial dessas células. Considerando que o EEB e a fração MeOH apresentaram citotoxicidade em baixas doses em PBMCs, além de se mostrarem menos efetivos na neutralização de radicais livres, a fração AcOEt foi selecionada para avaliação do potencial genotóxico.

As doses da fração AcOEt testadas (200 a 600 µg/mL) não induziram alterações nucleares significativas ($p < 0,05$), incluindo micronúcleos e brotos nucleares em linfócitos humanos, embora tenham apresentado moderada a alta redução da viabilidade celular pelo teste de MTT, respectivamente. Adicionalmente, as concentrações de 200 e 400 µg/mL diminuíram expressivamente a frequência de MN (35 e 38%, respectivamente) e BN (84 e 84%, respectivamente). Uma vez que o número de micronúcleos é um biomarcador de danos no DNA, os resultados observados indicam que a fração AcOEt apresentou um efeito protetor em linfócitos humanos.

Muitos danos que ocorrem no DNA são em decorrência de eventos oxidativos provocados por ROS/RSNs (Dizdaroglu, 2015). A oxidação da guanina pelo radical $\text{OH}^{\bullet}$, por exemplo, provoca a formação da 8-hidroxi guanina, tanto no meio extranuclear quanto no próprio DNA. Quando ocorre na molécula DNA, provoca quebras de fita simples ou dupla, que podem contribuir para eventos clastogênicos (quebras cromossômicas), induzindo a formação micronúcleos (Fenech et al., 2016). A presença de antioxidantes naturais, de origem exógena, impede danos no DNA neutralizando os radicais livres antes que oxide as bases nitrogenadas ou açúcares (Carocho e Ferreira, 2013). Uma das classes mais conhecidas são os flavonoides, que apresentam maiores propriedades de neutralização devido à quantidade de grupamentos hidroxilas disponíveis em suas estruturas (Gođevac et al., 2013). Além disso, evidências sugerem que os flavonoides podem atuar também atacando os radicais $\text{OH}^{\bullet}$ nas bases oxidadas no próprio DNA, promovendo seu reparo (Gođevac et al., 2013).

Desta forma, a redução da frequência de micronúcleos observada nos linfócitos humanos após a exposição da fração AcOEt, obtida do extrato etanólico bruto das folhas de *A. cearensis*, pode ser atribuída às propriedades antioxidantes dos flavonoides presentes nesta fração, que provavelmente preveniram danos por oxidação das bases nitrogenadas ou dos açúcares presentes na molécula do DNA. Resultados semelhantes foram atribuídos aos extratos metanólicos de amora (*Rubus idaeus* L.) (Gođevac et al., 2011) e groselha (*Ribes Rubrum* L.) (Gođevac et al., 2012), quando os metabólitos de origem fenólica presentes em ambos os extratos foram capazes de reduzir a frequência de micronúcleo em linfócitos humanos. Tais propriedades foram atribuídas também à presença dos antioxidantes naturais presentes nos dois extratos.

5. Conclusão

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que as folhas de *A. cearensis* apresentaram propriedades antioxidantes pelos testes DPPH e poder redutor. Em parte, estes efeitos podem estar relacionados ao seu conteúdo fenólico, incluindo flavonoides. Sendo assim, as folhas de *A. cearensis* podem ser uma potencial fonte de antioxidantes naturais. Adicionalmente, a fração acetato de etila obtida do extrato etanólico bruto das folhas de *A. cearensis* não apresentou citotoxicidade em concentrações menores ou iguais a 150 µg/mL nem genotoxicidade mesmo em concentrações citotóxicas para linfócitos humanos, além de terem reduzido a frequência de micronucleos devido provavelmente à redução de danos oxidativos.

A presença de flavonoides e taninos no extrato das folhas de *A. cearensis* e nas suas frações EtOAc e MeOH sugere que esses são os principais responsáveis pela atividade antioxidante. Como verificado nos ensaios, a habilidade de doação de hidrogênios ou elétrons para neutralizar radicais livres, sugerem que os extratos foliares e suas frações AcOEt e MeOH são potenciais candidatos para compor fitoterápicos contra doenças associadas ao estresse oxidativo (Schapira, 2014; Sarrafchi et al., 2016) ou ainda, compor cosméticos com finalidades de prevenção de danos ocasionados por radicais livres evitando a senescência celular precoce (Hunt et al., 2010; Jadoon et al., 2015). No entanto, estudos com outras linhagens

celulares *in vitro* devem ser realizados para confirmar a ausência de citotoxicidade e genotoxicidade.

6. Referências

- Alonso-Carrillo, N., Aguilar-Santamaría, M. de los Á., Vernon-Carter, E.J., Jiménez-Alvarado, R., Cruz-Sosa, F., Román-Guerrero, A., 2017. Extraction of phenolic compounds from *Satureja macrostema* using microwave-ultrasound assisted and reflux methods and evaluation of their antioxidant activity and cytotoxicity. *Ind. Crops Prod.* 103, 213–221. doi:10.1016/j.indcrop.2017.04.002
- Araldi, R.P., de Melo, T.C., Mendes, T.B., de Sá Júnior, P.L., Nozima, B.H.N., Ito, E.T., de Carvalho, R.F., de Souza, E.B., de Cassia Stocco, R., 2015. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. *Biomed. Pharmacother.* 72, 74–82. doi:10.1016/j.biopha.2015.04.004
- Barberino, R.S., Barros, V.R.P., Menezes, V.G., Santos, L.P., Araújo, V.R., Queiroz, M.A.A., Almeida, J.R.G.S., Palheta, R.C., Matos, M.H.T., 2016. *Amburana cearensis* leaf extract maintains survival and promotes in vitro development of ovine secondary follicles. *Zygote* 24, 277–285. doi:10.1017/S0967199415000179
- Babich, H., Sedletcaia, A., Kenigsberg, B., 2002. *In vitro* cytotoxicity of protocatechuic acid to cultured human cells from oral tissue: involvement in oxidative stress. *Pharmacol. Toxicol.* 91, 245–253. doi:10.1034/j.1600-0773.2002.910505.x
- Berker, K.I., Güçlü, K., Tor, I., Demirata, B., Apak, R., 2010. Total antioxidant capacity assay using optimized ferricyanide/Prussian blue method. *Food Anal. Methods* 3, 154–168. doi:10.1007/s12161-009-9117-9
- Carocho, M., Ferreira, I.C.F.R., 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem. Toxicol.* 51, 15–25. doi:10.1016/j.fct.2012.09.021
- Chen, Z., Bertin, R., Frolidi, G., 2013. EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH* assay using several statistical programs. *Food Chem.* 138, 414–420. doi:10.1016/j.foodchem.2012.11.001
- Cederbaum, A.I., 2017. Role of Cytochrome P450 and Oxidative Stress in Alcohol-Induced Liver Injury. *React. Oxyg. Species* 4, 303–319. doi:10.20455/ros.2017.851
- Diehn, M., Cho, R.W., Lobo, N.A., Kalisky, T., Dorie, M.J., Kulp, A.N., Qian, D., Lam, J.S., Ailles, L.E., Wong, M., Joshua, B., Kaplan, M.J., Wapnir, I., Dirbas, F.M., Somlo, G., Garberoglio, C., Paz, B., Shen, J., Lau, S.K., Quake, S.R., Brown, J.M., Weissman, I.L., Clarke, M.F., 2009. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature* 458, 780–783. doi:10.1038/nature07733
- Dizdaroglu, M., 2015. Oxidatively induced DNA damage and its repair in cancer. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* 763, 212–245. doi:10.1016/j.mrrev.2014.11.002
- Dizdaroglu, M., Jaruga, P., 2012. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic. Res.* 46 (4), 382–419. doi:10.3109/10715762.2011.653969

- Djouahri A, Sebiane S, Kellou F, Lamari L, Sabaou N, Baaliouamer A and Boudarene L (2017) Inhibitory effect on corrosion of carbon steel in acidic media, antioxidant, antimicrobial, anti-5-lipoxygenase and anti-xanthine oxidase activities of essential oil from *Tetralinis articulata* (Vahl) Masters leaves. J Essent Oil Res 29:169–178. doi: 10.1080/10412905.2016.1216014
- Eghbaliferiz, S., Iranshahi, M., 2016. Prooxidant Activity of Polyphenols, Flavonoids, Anthocyanins and Carotenoids: Updated Review of Mechanisms and Catalyzing Metals. Phyther. Res. 1379–1391. doi:10.1002/ptr.5643
- FDA. Food and Drug Administration., 2012. Guidance for Industry: S2 (r1) Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use.
- Fenech, M., 2000. The *in vitro* micronucleus test. Mutat. Res. 455, 81–95. doi:10.1016/S0027-5107(00)00065-8
- Fenech, M., Knasmueller, S., Bolognesi, C., Bonassi, S., Holland, N., Migliore, L., Palitti, F., Natarajan, A.T., Kirsch-Volders, M., 2016. Molecular mechanisms by which *in vivo* exposure to exogenous chemical genotoxic agents can lead to micronucleus formation in lymphocytes *in vivo* and *ex vivo* in humans. Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res. 770, 12–25. doi:10.1016/j.mrrev.2016.04.008
- Fedrigo, I.H., Borgo, A.P., Baggio, F.R., Musial, D.C., Valentini, S.A., 2010. Obtenção de Formas Cosméticas a Partir do Extrato Aquoso de Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). SaudPesq 4(2), 207-212.
- Fiuza, T.S., Rezende, M.H., Sabóia-Morais, S.M., Bara, M.T.F., Tresvenzol, L.M., 2008. Caracterização farmacognóstica das folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae). Rev Eletron Farm. 5(2), 1-11.
- Gođevac, D., Tesević, V., Vajs, V., Milosavljević, S., Stanković, M., 2013. Antioxidant evaluation of heterocyclic compounds by cytokinesis-block micronucleus assay. Mini Rev. Med. Chem. 13, 431–8.
- Gođevac, D., Tešević, V., Vajs, V., Milosavljević, S., Stanković, M., 2011. Blackberry Seed Extracts and Isolated Polyphenolic Compounds Showing Protective Effect on Human Lymphocytes DNA. J. Food Sci. 76, 1039–1043. doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02305.x
- Gođevac, D., Tešević, V., Vajs, V., Milosavljević, S., Stanković, M., 2009. Antioxidant properties of raspberry seed extracts on micronucleus distribution in peripheral blood lymphocytes. Food Chem. Toxicol. 47, 2853–2859. doi:10.1016/j.fct.2009.09.006
- Gođevac, D., Tešević, V., Vajs, V., Milosavljević, S., Zdunić, G., Đorđević, B., Stanković, M., 2012. Chemical Composition of Currant Seed Extracts and Their Protective Effect on Human Lymphocytes DNA. J. Food Sci. 77, C779–C783. doi:10.1111/j.1750-3841.2012.02756.x
- Gouveia, B.B., Barros, V.R.P., Gonçalves, R.J.S., Barberino, R.S., Menezes, V.G., Lins, T.L.B., Macedo, T.J.S., Santos, J.M.S., Rolim, L.A., Almeida, J.R.G.S., Matos, M.H.T., 2015. Effect of ovarian tissue transportation in *Amburana cearensis* extract on the morphology and apoptosis of goat preantral follicles. Anim. Reprod. 12, 316–323.
- Gouveia, B.B., Macedo, T.J.S., Santos, J.M.S., Barberino, R.S., Menezes, V.G., Müller, M.C., Almeida, J.R.G.S., Figueiredo, J.R., Matos, M.H.T., 2016. Supplemented base medium containing *Amburana cearensis* associated with FSH improves *in vitro* development of isolated goat preantral follicles. Theriogenology 86, 1275–1284. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.04.068

- Groothuis, F.A., Heringa, M.B., Nicol, B., Hermens, J.L.M., Blaauboer, B.J., Kramer, N.I., 2015. Dose metric considerations *in vitro* assays to improve quantitative *in vitro-in vivo* dose extrapolations. *Toxicology* 332, 30–40. doi:10.1016/j.tox.2013.08.012
- Harbone, J.B., 1988. *Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. 3^o ed. Chapman & Hall, London, 308 pp.
- Hunt, K.J., Hung, S.K., Ernst, E., 2010. Botanical extracts as anti-aging preparations for the skin: A systematic review. *Drugs and Aging* 27, 973–985. doi:10.2165/11584420-000000000-00000
- Jadoon, S., Karim, S., Hassham, M., Bin, H., Akram, M.R., Khan, A.K., Malik, A., Chen, C., Murtaza, G., 2015. Anti-Aging Potential of Phytoextract Loaded-Pharmaceutical Creams for Human Skin Cell Longevity 2015.
- Jomova, K., Valko, M., 2011. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 283, 65–87. doi:10.1016/j.tox.2011.03.001
- Kakkar, S., Bais, S., 2014. A Review on Protocatechuic Acid and Its Pharmacological Potential. *ISRN Pharmacol.* 2014, 1–9. doi:10.1155/2014/952943
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Nithyanandam, R., 2011. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food Bioprod. Process.* 89, 217–233. doi:10.1016/j.fbp.2010.04.008
- Kumar, S., Pandey, A.K., 2013. Chemistry and biological activities of. *Trends Food Sci. Technol.* 2013, 16 p. doi:10.1016/j.tifs.2005.08.006
- Limón-Pacheco, J., Gonsébat, M.E., 2009. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 674, 137–147. doi:10.1016/j.mrgentox.2008.09.015
- Li, H., Horke, S., Förstermann, U., 2014. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 237, 208–219. doi:https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.09.001
- Lin, M.T., Beal, M.F., 2006. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443, 787–795. doi:10.1038/nature05292
- Liu, C.-L., Wang, J.-M., Chu, C.-Y., Cheng, M.-T., Tseng, T.-H., 2002. *In vivo* protective effect of protocatechuic acid on tert-butylhydroperoxide-induced rat hepatotoxicity. *Food Chem. Toxicol.* 40, 635–641.
- Maia, GN. 2012. *Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades*. Fortaleza: Printcolor Gráfica e Editora, São Paulo, 413 p.
- Malaguarnera, G., Cataudella, E., Giordano, M., Nunnari, G., Chisari, G., Malaguarnera, M., 2012. Toxic hepatitis in occupational exposure to solvents. *World J. Gastroenterol.* 18, 2756–2766. doi:10.3748/wjg.v18.i22.2756
- Malinin, N.L., West, X.Z., Byzova, T. V, 2011. Oxidation as “The Stress of Life.” *Aging.* 3, 906–910. doi:10.18632/aging.100385
- Mendes, L.P., Delgado, J.M.F., Costa, A.D.A., Vieira, M.S., Benfica, P.L., Lima, E.M., Valadares, M.C., 2015. Biodegradable nanoparticles designed for drug delivery: The number of nanoparticles impacts on cytotoxicity. *Toxicol. Vit.* 29, 1268–1274. doi:10.1016/j.tiv.2014.12.021
- Mironczuk-Chodakowska, I., Witkowska, A.M., Zujko, M.E., 2018. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Adv. Med. Sci.* 63, 68–78. doi:10.1016/j.advms.2017.05.005

- Mishra, K., Ojha, H., Chaudhury, N.K., 2012. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH - assay: A critical review and results. *Food Chem.* 130, 1036–1043. doi:10.1016/j.foodchem.2011.07.127
- Mittal, M., Siddiqui, M.R., Tran, K., Reddy, S.P., Malik, A.B., 2014. Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. *Antioxid. Redox Signal.* 20, 1126–1167. doi:10.1089/ars.2012.5149
- Mostafalou, S., Abdollahi, M., 2013. Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 268, 157–177. doi:10.1016/j.taap.2013.01.025
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 65(1-2), 55–63.
- Nakamura, Y., Torikai, K., Ohigashi, H., 2001. A catechol antioxidant protocatechuic acid potentiates inflammatory leukocyte-derived oxidative stress in mouse skin via a tyrosinase bioactivation pathway. *Free Radic. Biol. Med.* 30, 967–978. doi:0891-5849(01)00481-6
- Neu, R. 1956. A new reagent for differentiating and determining flavones of paper chromatograms. *Naturwissenschaften.* 43(82), 1000-1007.
- Nimse, S.B., Pal, D., 2015. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv.* 5, 27986–28006. doi:10.1039/C4RA13315C
- Poprac, P., Jomova, K., Simunkova, M., Kollar, V., Rhodes, C.J., Valko, M., 2017. Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. *Trends Pharmacol. Sci.* 38, 592–607. doi:10.1016/j.tips.2017.04.005
- Riss, T.L., Moravec, R.A., Niles, A.L., Duellman, S., Benink, H.A., Worzella, T.J., Minor, L., 2016. Cell Viability Assays, in: Sittampalam, G., Coussens, N., Brimacombe, K., Al., E. (Eds.), *Assay Guidance Manual* [Internet]. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Science, Bethesda (MD), pp. 1–31. doi:10.1016/j.acthis.2012.01.006
- Ritchie, R.H., Drummond, G.R., Sobey, C.G., De Silva, T.M., Kemp-Harper, B.K., 2017. The opposing roles of NO and oxidative stress in cardiovascular disease. *Pharmacol. Res.* 116, 57–69. doi:10.1016/j.phrs.2016.12.017
- Sarrafcchi, A., Bahmani, M., Shirzad, H., Rafieian-Kopaei, M., 2016. Oxidative Stress and Parkinson's Disease: New Hopes in Treatment with Herbal Antioxidants. *Curr. Pharm. Des.* 22, 238–246. doi:10.2174/1381612822666151112151653
- Schapira, A.H. V, Olanow, C.W., Greenamyre, J.T., Bezard, E., 2014. Slowing of neurodegeneration in Parkinson's disease and Huntington's disease: Future therapeutic perspectives. *Lancet* 384, 545–555. doi:10.1016/S0140-6736(14)61010-2
- Seeram, N.P., Adams, L.S., Hardy, M.L., Heber, D., 2004. UCLA Center for Human Nutrition Total Cranberry Extract versus Its Phytochemical Constituents : Antiproliferative and Synergistic Effects against Human Tumor. *J. Agric. Food Chem.* 52 (9), 2512–2517. doi:10.1021/jf0352778
- Shahidi, F., Ambigaipalan, P., 2015. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. *J. Funct. Foods* 18, 820–897. doi:10.1016/j.jff.2015.06.018
- Shi, G.F., An, L.J., Jiang, B., Guan, S., Bao, Y.M., 2006. Alpinia protocatechuic acid protects against oxidative damage *in vitro* and reduces oxidative stress *in vivo*. *Neurosci. Lett.* 403, 206–210. doi:10.1016/j.neulet.2006.02.057

- Sies, H., 2015. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* 4, 180–183. doi:10.1016/j.redox.2015.01.002
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Meth Enzymol* 31(299), 152-178.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160, 1–40. doi:10.1016/j.cbi.2005.12.009
- Vakifahmetoglu-Norberg, H., Ouchida, A.T., Norberg, E., 2017. The role of mitochondria in metabolism and cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 482, 426–431. doi:10.1016/j.bbrc.2016.11.088

3 CONCLUSÕES

- Os metabólitos secundários do extrato etanólico bruto de *A. cearensis* e de suas frações apresentam atividade antioxidante, evidenciada pelos testes DPPH (2,2 difenil-1-picril-hidrazil) e poder redutor, com menores EC₅₀ (Concentração Eficiente) para as frações acetato de etila e metanol, seguido do extrato etanólico bruto, evidenciando a capacidade de seus compostos fenólicos atuarem como antioxidantes naturais.
- Concentrações com atividade antioxidante não são citotóxicas para EEB (entre 400 e 1000 µg/mL) e para as frações AcOEt ($\leq$ 150 µg/mL) e MeOH (entre 200 e 6000 µg/mL), de acordo com o teste MTT em PBMCs.
- As concentrações da fração acetato de etila testadas não apresentam genotoxicidade pelo teste do micronúcleo, confirmando que as doses avaliadas com propriedades antioxidantes não são capazes de induzir danos no DNA significativos, além de reduzirem a frequência de alterações cromossômicas em linfócitos humanos.
- As folhas de *A. cearensis* apresentam também potencial terapêutico, sendo fortes candidatas para serem utilizadas como matéria-prima em formulações de novos fitoterápicos para tratar doenças ou enfermidades relacionados ao estresse oxidativo, tendo em vista que o extrativismo da casca do tronco tem provocado impactos negativos nas populações nativas dessa espécie.

REFERÊNCIAS

- Achan J, Talisuna AO, Erhart A, Yeka A, Tibenderana JK, Baliraine FN, Rosenthal PJ e D'Alessandro U (2011) Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. *Malar J* 10(1): 144.
- Araújo SDS, Fernandes TCC, Marin-Morales MA, Brasileiro-Vidal AC e Benko-Iseppon AM (2015) Mutagenicity, genotoxicity and cytotoxicity assays of medicinal plants: first step for drug development. In: Duarte MCT e Rai M (eds) *Therapeutic Medicinal Plants: From lab to the market*, Taylor e Francis Group, US, pp 130-153.
- Araújo SDS, Fernandes TCC, Cardona YT, Almeida PM De, Marin-Morales MA, Dos Santos AV, Randau KP, Benko-Iseppon AM and Brasileiro-Vidal AC (2015) Cytotoxic and genotoxic effects of ethanolic extract of *Euphorbia hyssopifolia* L. on HepG2 cells. *J Ethnopharmacol* 170:16–19.
- Agarwal A, Banerjee A and Banerjee UC (2011) Xanthine oxidoreductase: A journey from purine metabolism to cardiovascular excitation-contraction coupling. *Crit Rev Biotechnol* 31:264–280.
- Agra MDF, Silva KN, Basílio IJLD, Freitas PFD e Barbosa-Filho JM (2008) Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn* 18(3): 472-508.
- Albano E (2006) Alcohol, oxidative stress and free radical damage. *Proc Nutr Soc* 65:278–290.
- Albuquerque UP, Monteiro JM, Ramos MA e Amorim ELC (2007) Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. *J Ethnopharmacol* 110(1): 76-91.
- Almeida C e Albuquerque UP (2002) Uso e conservação de plantas e animais medicinais no estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil): um estudo de caso. *Interciencia* 27:276-285.
- Almeida JRGS, Guimarães AG, Quintans JDSS, Santos MRVD, Lima JTD, Nunes XP e Quintans-Júnior LJ (2010) *Amburana cearensis*: uma revisão química e farmacológica. *Scientia Plena* 6: 1-8.
- Alves EA e Guimarães ACR (2010) Cultivo celular. In: Molinaro EM, Caputo LFG, Amendoeria MRRA (eds) *Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratório*. 4ª edição. EPSJV, IOC, Rio de Janeiro pp 215-253.
- Andrews M e Andrews ME (2017) Specificity in legume-rhizobia symbioses. *Int J Mol Sci* 18(4): 705.
- Andrews M, James EK, Sprent JI, Boddey RM, Gross e Reis FB (2011) Nitrogen fixation in legumes and actinorhizal plants in natural ecosystems: values obtained using ¹⁵N natural abundance. *Plant Ecol Divers* 4(2-3): 131-140.
- Annicchiarico P, Barrett B, Brummer EC, Julier B, Marshall AH (2015) Achievements and challenges in improving temperate perennial forage legumes. *Crit Rev Plant Sci* 34: 327-380.
- ANVISA, Agência de Vigilância Sanitária (2004) Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos. Resolução RE 90, pp 2–5.
- Apak R, Özyürek M, Güçlü K e Çapanoğlu E (2016) Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays. *J Agric Food Chem* 64(5): 997-1027.
- Araya-Cloutier C, Besten HMW, Aisyah S, Gruppen H e Vincken JP (2017) The position of prenylation of isoflavonoids and stilbenoids from legumes (Fabaceae)

- modulates the antimicrobial activity against Gram positive pathogens. *Food Chem* (226): 193-201.
- Bandeira PN, Farias SSD, Lemos TL, Braz-Filho R, Santos HS, Albuquerque MR e Costa SM (2011) New isoflavone derivative and other flavonoids from the resin of *Amburana cearensis*. *J Braz Chem Soc* 22(2): 364-371.
- Bandeira PN, Santos HS, Albuquerque MRJR, Lemos TLG e Braz-Filho R (2015) A New Diterpene Isolated from the Resin of *Hymenaea Courbaril*. *Chem Nat Compd* 51(4): 693-696.
- Barberino RS, Barros VRP, Menezes VG, Santos LP, Araújo VR, Queiroz MAA, Almeida JRGS e Matos MHT (2015) *Amburana cearensis* leaf extract maintains survival and promotes *in vitro* development of ovine secondary follicles. *Zygote* 24(2): 277-285.
- Bastos CRV (1983) Contribuição ao conhecimento químico de *Torresea cearensis* (Fr. All.) Dissertação - Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 99 pp.
- Bhatia SP, McGinty D, Letizia CS e Api AM (2008) Fragrance material review on menthol. *Food Chem Toxicol* 46(11): S209-S214.
- Berker KI, Güçlü K, Tor İ, Demirata B e Apak R (2010) Total antioxidant capacity assay using optimized ferricyanide/prussian blue method. *Food Anal Methods* 3(3): 154-168.
- Bezerra AME, Canuto KM e Silveira ER (2005) Estudo fitoquímico de espécimes jovens de *Amburana cearensis* AC Smith. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.
- Bitu VDCN, Bitu VDCN, Matias EFF, Lima WP, Portelo AC, Coutinho HDM e Menezes IRA (2015) Ethnopharmacological study of plants sold for therapeutic purposes in public markets in Northeast Brazil. *J Ethnopharmacol* 172: 265-272.
- Bonassi S et al. (2007) An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* 28(3): 625-631.
- Blois MS (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181(4617): 1199-1200.
- Braga R (1976) Plantas do Nordeste especialmente do Ceará. 3ª edição, Imprensa Oficial, Fortaleza, Brasil, 219 pp.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME e Berset CLWT (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci Technol* 28(1): 25-30.
- Bravo JAB, Sauvain M, Gimenez AT, Muñoz VO, Callapa J, Men-Olivier LL, L Massiot G e Lavaud C (1999) Bioactive phenolic glycosides from *Amburana cearensis*. *Phytochem* (50): 71-74.
- Breslin S e O'Driscoll L (2013) Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discov Today* 18(5): 240-249.
- Bruning MCR, Mosegui GBG e Vianna CMDM (2012) The use of phytotherapy and medicinal plants in primary healthcare units in the cities of Cascavel and Foz do Iguaçu – Paraná: the viewpoint of health professionals. *Cien Saude Colet* 17(10): 2675-2685.
- Brunton NP e Luengo E (2017) Pulsed Electric Fields for Extraction of Secondary Metabolites from Plants. In: Miklavcic D (eds) *Handbook of Electroporation*. Springer International Publishing, Dublin, pp 1-15.
- Bryan NS and Lancaster JR (2017) Nitric Oxide Signaling in Health and Disease. In: Bryan NS and Loscalzo J (eds) *Nitrite and Nitrate in Human Health and Disease*. Springer International Publishing, Cham, pp 165–178

- Bylund J, Brown KL, Movitz C, Dahlgren C and Karlsson A (2010) Intracellular generation of superoxide by the phagocyte NADPH oxidase: How, where, and what for? *Free Radic Biol Med* 49:1834–1845. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.016
- Cadenas E and Davies KJ a. (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging¹¹This article is dedicated to the memory of our dear friend, colleague, and mentor Lars Ernster (1920–1998), in gratitude for all he gave to us. *Free Radic Biol Med* 29:222–230.
- Canuto KM e Silveira ER (2006) Chemical constituents of trunk bark of *Amburana cearensis* AC Smith. *Quim Nova* 29(6): 1241-1243.
- Canuto KM, Lima MAS e Silveira ER (2010) Amburosides ch and 6-o-protocatechuoyl coumarin from *Amburana cearensis*. *J Braz Chem Soc* 21(9): 1746-1753.
- Canuto KM e Silveira ER (2010) Estudo fitoquímico de espécimens cultivados de cumaru (*Amburana cearensis* AC Smith). *Quim Nova* 33(3): 662-666.
- Canuto KM, Silveira ER, Bezerra AME, Leal LKA e Viana GSB (2012) 17. Phytochemistry, pharmacology and agronomy of medicinal plants: *Amburana cearensis*, an interdisciplinary study. In: Rao V *Phytochemicals-A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*. InTech, Croatia, pp 353-374.
- Carvalho PER (2003) Cumaru. *Circ Técn Embrapa Florestas* 11 pp.
- Carvalho EM, Cunha GHD, Fachine FV, Uchôa CRA, Moraes Filho MOD, Bezerra FAF e Moraes, MEAD (2012) Efficacy and safety of cumaru syrup as complementary therapy in mild persistent asthma: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Braz J Pharm Sci* 48(4): 629-637.
- Cartaxo SL, Souza AMM e Albuquerque UP (2010) Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. *J Ethnopharmacology* 131(2): 326-342.
- Cederbaum AI (2017) Role of Cytochrome P450 and Oxidative Stress in Alcohol-Induced Liver Injury. *React Oxyg Species* 4:303–319.
- Cheong HS, Seth I, Joiner MC e Tucker JD (2013) Relationships among micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds within individual cells in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutagenesis* 28(4): 433-440.
- Cheynier V, Comte G, Davies KM, Lattanzio V e Martens S (2013) Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiol Biochem* 72: 1-20.
- Chen Z, Bertin R and Frolidi G (2013) EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH* assay using several statistical programs. *Food Chem* 138:414–420. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.11.001
- Christenhusz MMJ e Byng JW (2016) The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa* 261(3): 201-217.
- Correa MP 1984. *Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Imprensa Nacional, Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro: Brasil, pp 266-267.
- Cornara L, Xiao J e Burlando B (2016) Therapeutic potential of temperate forage legumes: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 56(sup1): S149-S161.
- Costa S, Ceppi M, Costa C, Silva S, Pereira C, Laffon B, Bonasi S e Teixeira JP (2016) The cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay in human populations exposed to styrene: A systematic review and meta-analysis. *Mutat Res Rev Mutat Res* 770: 92-105.
- Costa-Lotufo LV, Jimenez PC, Wilke DV, Leal LKA, Cunha G, Silveira ER, Canuto KM, Glaube SBV, Moraes ME, Moraes MO e Pessoa C (2003) Antiproliferative effects of several compounds isolated from *Amburana cearensis* AC Smith. *Z Naturforsch C* 58(9-10): 675-680.

- Cronquist A (1981). An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, New York, 1262 pp.
- Crozier A, Jaganath IB e Clifford MN (2006) Phenols, polyphenols and tannins: an overview. In: Crozier A, Clifford MN e Ashihara H (eds) Plant secondary metabolites: Occurrence, structure and role in the Human Diet pp 1-24.
- Cunha MDC e Ferreira RA (2003) Aspectos morfológicos da semente e do desenvolvimento da planta jovem de *Amburana cearensis* (Arr. Cam.) AC Smith-Cumaru-Leguminosae Papilionoideae. Ver Braz Sem 25(2): 89-96.
- Cushnie TT, Cushnie B e Lamb AJ (2014) Alkaloids: an overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. Int J Antimicrob Agents 44(5): 377-386.
- Dantas ACDS, Araujo ADC, Pacheco AGM, Branco A, Sangioni LA, Almeida JRGS e Horta MC (2016) Acaricidal activity of *Amburana cearensis* on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Ciência Rural 46(3): 536-541.
- Davies MJ (2003) Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. Biochem Biophys Res Commun 305:761-770.
- Diehn M, Cho RW, Lobo NA, Kalisky T, Dorie MJ, Kulp AN, Qian D, Lam JS, Ailles LE, Wong M et al. (2009) Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells.
- Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M and Rodriguez H (2002) Free radical-induced damage to dna: mechanisms and measurement. Free Radic Biol Med 32:1102-1115.
- Djouahri A, Sebiane S, Kellou F, Lamari L, Sabaou N, Baaliouamer A and Boudarene L (2017) Inhibitory effect on corrosion of carbon steel in acidic media, antioxidant, antimicrobial, anti-5-lipoxygenase and anti-xanthine oxidase activities of essential oil from *Tetradlinis articulata* (Vahl) Masters leaves. J Essent Oil Res 29:169-178.
- Dutra RC, Campos MM, Santos AR e Calixto JB (2016) Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. Pharmacol Res 112: 4-29.
- Dzoyem JP, Melong R, Tsamo AT, Tchinda AT, Kapche DG, Ngadjui BT, McGaw LJ e Eloff JN (2017) Cytotoxicity, antimicrobial and antioxidant activity of eight compounds isolated from *Entada abyssinica* (Fabaceae). BMC Res Notes 10(1): 118.
- Eisenbrand G, Pool-Zobel B, Baker V, Balls M, Blaauboer BJ, Boobis A, Carere A, Kevekordes S, Lhuguenot JC, Pieters R e Kleiner J (2002) Methods of *in vitro* toxicology. Food Chem Toxicol 40(2): 193-236.
- Estevam E, Silva E, Miranda M, Alves J, Pereira P, Silva F, Esperandim VR, Martins CHG, Ambrosio MALV, Tofoli LRA, Junior LRA e Alves CCF (2016) Evaluation of antibacterial, trypanocidal and cytotoxic activities of the hydroalcoholic extract from the roots of *Tradescantia sillamontana* Matuda (Veludo Branco)(Commelinaceae). Rev Bras Pl Med 18(2): 415-422.
- Evans WC (2009) Trease and Evans' Pharmacognosy E-Book. 16ª edição. Saunders Ltd, 616 pp.
- Felix RAZ, Ono EO, Silva CP, Rodrigues JD e Piere C (2007) Efeitos alelopáticos da *Amburana cearensis* L. (Fr.All.) AC Smith na germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) e rabanete (*Raphanus sativus* L.). Rev Bras Biociencia 5(supl 2): 138-140.
- Fenech M (2000) The *in vitro* micronucleus technique. Mut Res Fund Mol Mechan Mut 455(1): 81-95.

- Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surrallés J, Crott JW, Parry J, Norppa H, Eastmond DA, Tucker JD e Thomas P (2011) Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis* 26(1): 125-132.
- Ferreira PMP, Farias DF, Viana MP, Souza TM, Vasconcelos IM, Soares BM, Pessoa C, Costa-Lotufo L V., Moraes MO and Carvalho AFU (2011) Study of the antiproliferative potential of seed extracts from Northeastern Brazilian plants. *An Acad Bras Cienc* 83:1045–1058. doi: 10.1590/S0001-37652011005000017
- Figueredo CA, Gurgel IGD e Gurgel Junior GD (2014) A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios. *Physis* 24(2): 381-400.
- Figueredo FG, Ferreira EO, Lucena BF, Torres CM, Lucetti DL, Lucetti, EC Silva JMF, Santos FAV, M CR, Oliveira GMM, Colares AV, Costa JGM, Coutinho HDM, Menezes IR, Silva JCF, Kerntopf MR, Figueiredo PRL e Matias EFF (2012) Modulation of the antibiotic activity by extracts from *Amburana cearensis* AC Smith and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan. *Biomed Res Int* 2013: 640682.
- Reflora. Flora do Brasil 2020 em construção (2017) Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> (24 de Junho de 2017).
- FDA. Food and Drug Administration (2012) Guidance for Industry: S2 (r1) Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm074931.pdf>
- Galvalisi M, Prieto JP, Martínez M, Abin-Carriquiry JA e Scorza C (2017) Caffeine Induces a Stimulant Effect and Increases Dopamine Release in the Nucleus Accumbens Shell Through the Pulmonary Inhalation Route of Administration in Rats. *Neurotox Res* 31(1): 90-98.
- Gouveia BB, Barros VP, Gonçalves RJS, Barberino RS, Menezes VG, Lins TLB, Macedo TJS, Santos JMS, Rolim LA, Neto PJR, Almeida JRGS e Matos MHT (2015) Effect of ovarian tissue transportation in *Amburana cearensis* extract on the morphology and apoptosis of goat preantral follicles. *Anim Reprod* 12(2): 316-323.
- Gouveia BB, Macedo TJS, Santos JMS, Barberino RS, Menezes VG, Müller MC, Almeida JRGS, Figueiredo JR e Matos MHT (2016) Supplemented base medium containing *Amburana cearensis* associated with FSH improves *in vitro* development of isolated goat preantral follicles. *Theriogenology* 86(5): 1275-1284.
- Graidist P, Martla M e Sukpondma Y (2015) Cytotoxic activity of *Piper cubeba* extract in breast cancer cell lines. *Nutrients* 7(4): 2707-2718.
- Gus R (2011) Técnicas de cultura de tecidos para análise citogenética. In: Maluf SW, Riegel M (eds) *Citogenética humana*. Artmed, Porto Alegre.
- Halliwell B and Gutteridge JMC (2010) *Free radicals in biology and medicine*. 4^o edição. Oxford University Press, Oxford, Reino Unido.
- Han J, Qu Q, Qiao J e Zhang J (2017) Vincamine Alleviates Amyloid- β 25–35 Peptides-induced Cytotoxicity in PC12 Cells. *Pharmacogn Mag* 13(49): 123-128.
- Harman D (1955) aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. 1–5.
- Harrison R (2004) Physiological roles of xanthine oxidoreductase. *Drug Metab Rev* 36:363–375.
- Hayashi M (2016) The micronucleus test—most widely used in vivo genotoxicity test. *Genes and Environ* 38(1): 18.
- Heddle JA, Hite M, Kirkhart B, Mavournin K, MacGregor JT, Newell GW e Salamone MF (1983) The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity: A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mut Res/Rev Gen Toxicol* 123(1): 61-118.

- Huang M, Lu JJ, Huang MQ, Bao JL, Chen XP e Wang YT (2012) Terpenoids: natural products for cancer therapy. *Expert Opin Investig Drugs* 21(12): 1801-1818.
- Irmisch S, Jiang Y, Chen F, Gershenzon J e Köllner TG (2014) Terpene synthases and their contribution to herbivore-induced volatile emission in western balsam poplar (*Populus trichocarpa*). *BMC Plant Biol* 14(1): 270.
- Jafari S, Saeidnia S e Abdollahi M (2014) Role of natural phenolic compounds in cancer chemoprevention via regulation of the cell cycle. *Curr Pharma Biotechnol* 15(4) 409-421.
- Joly AB (1979) Botânica: introdução à taxonomia vegetal. Companhia Editora Nacional, São Paulo, 777 pp.
- Jomova K and Valko M (2011) Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 283:65–87.
- Jørgensen PM, Nee MH e Beck SG (eds.) 2015. Catalogo de las plantas vasculares de Bolivia Missouri Botanical Garden Press.
- Kadavath H, Hofele RV, Biernat J, Kumar S, Tepper K, Urlaub H, Mandelko E e Zweckstetter, M (2015) Tau stabilizes microtubules by binding at the interface between tubulin heterodimers. *Proc Natl Acad Sci* 112(24): 7501-7506.
- Kainer KA e Duryea ML (1992) Tapping women's knowledge: plant resource use in extractive reserves, Acre, Brazil. *Econ Bot* 46(4): 408-425.
- Kamatou GP, Vermaak I, Viljoen AM e Lawrence BM (2013) Menthhol: a simple monoterpene with remarkable biological properties. *Phytochemistry* 96: 15-25.
- Kaupila JHK and Stewart JB (2015) Mitochondrial DNA: Radically free of free-radical driven mutations. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 1847:1354–1361.
- Knölker HJ (2016) The Alkaloids (Vol. 75). 1^o edition. Elsevier, London, 519 pp.
- Kumar S, Madaan R, Bansal G, Jamwal A and Sharma A (2012) Plants and Plant Products with Potential Anticonvulsant Activity – A Review. *Pharmacogn Commun* 2:3–99.
- Kumar S e Pandey AK (2013) Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Sci World J* 2013: 162750.
- Leal LKAM, Ferreira AAG, Bezerra GA, Matos FJA e Viana GSB (2000) Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. *J Ethnopharmacol* 70(2): 151-159.
- Leal LKAM, Fonseca FN, Pereira FA, Canuto KM, Felipe CF, Fontenele JB, Pitombeira MV, Silveira ER e Viana GS (2008) Protective effects of amburosídeo A, a phenol glucosídeo from *Amburana cearensis*, against CCl₄-induced hepatotoxicity in rats. *Planta Med* 74(05): 497-502.
- Leal LKAM, Júnior HN, Cunha GMA, Moraes MO, Pessoa C, Oliveira RA, Silveira ER, Canuto KM e Viana GSB (2005) Amburosídeo A, a glucosídeo from *Amburana cearensis*, protects mesencephalic cells against 6-hydroxydopamina-induced neurotoxicity. *Neurosci Lett* 388(2): 86-90
- Leal LKAM, Matos ME, Matos FJA, Ribeiro RA, Ferreira FV e Viana GSB (1997) Antinociceptive and antiedematogénicas effects of the hydroalcoholic extract and coumarin from *Torresea cearensis* Fr. All. *Phytomedicine* 4(3): 221-227.
- Leal LKAM, Oliveira FG, Fontenele JB, Ferreira MAD e Viana GSB (2003) Toxicological study of the hydroalcoholic extract from *Amburana cearensis* in rats. *Pharm biol* 41(4): 308-314.
- Leite EJ (2005) State-of-knowledge on *Amburana cearensis* (Fr. Allem.) AC Smith (Leguminosae: Papilionoideae) for genetic conservation in Brazil. *J Nat Conserv* 13(1): 49-65.

- Lessa BFDT, Silva MLDS, Barreto JH e Oliveira AB (2017) Effects of aqueous extracts of leaves of *Amburana cearensis* and *Plectranthus barbatus*. Rev Ciênc Agrárias 40(1): 79-86.
- Linhart K, Bartsch H and Seitz HK (2014) The role of reactive oxygen species (ROS) and cytochrome P-450 2E1 in the generation of carcinogenic etheno-DNA adducts. Redox Biol 3:56–62.
- Lima HC (2015) *Amburana* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB22781> (25 de maio de 2017).
- Lima HC et al. (2017) Fabaceae in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2017. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB115> (25 de maio de 2017)
- Lima LR, Cavalcante AAMC, Parente DM, Martins MCC e Cavalcante RRL (2013) Avaliação da atividade antiedematogênica, antimicrobiana e mutagênica das sementes de *Amburana cearensis* (AC Smith) (Imburana-de-cheiro). Rev Bras Plantas Med 15(3): 415-422.
- Limón-Pacheco J and Gonshebat ME (2009) The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen 674:137–147.
- Liou G-Y and Storz P (2010) Reactive oxygen species in cancer. Free Radic Res 44:479–496.
- Lopes A, Magalhães TR, Andrade DEU, Silveira ER, Azzolini AE, Kabeya LM, Lucisano-Valim YM, Vasconcelos SMM, Viana GSB e Leal LK (2013) Afrormosin, an isoflavonoid from *Amburana cearensis* AC Smith, modulates the inflammatory response of stimulated human neutrophils. Basic Clin Pharmacol Toxicol 113(6): 363-369.
- Lovitt CJ, Shelper TB e Avery VM (2014) Advanced cell culture techniques for cancer drug discovery. Biology 3(2): 345-367.
- LPWG. The Legume Phylogeny Working Group (2013) Legume phylogeny and classification in the 21st century: progress, prospects and lessons for other species-rich clades. Taxon 62(2): 217-248.
- LPWG. The Legume Phylogeny Working Group (2017) A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. Taxon 66(1): 44-77.
- MacDermot HE (1926) The use of ephedrin in bronchial asthma. Can Med Assoc J 16:422–423
- Madeira PL, Carvalho LT, Paschoal MA, Sousa EM, Moffa EB, Silva MADS, Tavares RJR e Gonçalves LM (2016) *In vitro* Effects of Lemongrass Extract on *Candida albicans* Biofilms, Human Cells Viability, and Denture Surface. Front Cell Infect Microbiol 6: PMC4923188.
- Malaguarnera G, Cataudella E, Giordano M, Nunnari G, Chisari G and Malaguarnera M (2012) Toxic hepatitis in occupational exposure to solvents. World J Gastroenterol 18:2756–2766.
- Mostafalou S and Abdollahi M (2013) Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. Toxicol Appl Pharmacol 268:157–177.
- Manea A (2010) NADPH oxidase-derived reactive oxygen species: Involvement in vascular physiology and pathology. Cell Tissue Res 342:325–339.
- Maia GN (2012) Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades. Fortaleza: Printcolor Gráfica e Editora, São Paulo, 413 p.

- Marrone GF, Rouzic V, Varadi A, Xu J, Rajadhyaksha AM, Majumdar S, Pan YY e Pasternak GW (2017) Genetic dissociation of morphine analgesia from hyperalgesia in mice. *Psychopharmacology* 12(234): 1891-1900.
- Mittal CK and Murad F (1977) Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation.
- Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP and Malik AB (2014) Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. *Antioxid Redox Signal* 20:1126–1167.
- Mittler R (2017) ROS Are Good. *Trends Plant Sci* 22:11–19.
- Mironczuk-Chodakowska I, Witkowska AM and Zujko ME (2018) Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Adv Med Sci* 63:68–78.
- MOBOT. Missouri Botanical Garden. <http://www.tropicos.org/Name/42000184> (27 de Maio de 2017).
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 65(1-2): 55-63.
- Murphy MP (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 417:1–13.
- Mus F, Crook MB, Garcia K, Costas AG, Geddes BA, Kouri ED, Paramasivan P, Ryu MH, Oldroyd GED, Poole PS, Udvardi MK, Voigt CA, Ané JM e Udvardi MK (2016) Symbiotic nitrogen fixation and the challenges to its extension to nonlegumes. *Appl Environ Microbiol* 82(13): 3698-3710.
- Mugweru AM, Shore A, Kahi HK and Kamau GN (2016) Electrochemical and Spectroscopic Characteristics of Artemisinin Antimalarial Drug: Charge Transfer Redox Process. *Int J Chem Kinet* 48:72–78. doi: 10.1002/kin.20971
- Negri G, Oliveira AFM, Salatino MLF e Salatino A (2004) Chemistry of the stem bark of *Amburana cearensis* (Allemão) (AC SM.).
- Newman DJ e Cragg GM (2016) Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod* 79(3): 629-661.
- Nimse SB and Pal D (2015) Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv* 5:27986–28006.
- Oliveira RR, Góis RM, Siqueira RS, Almeida JR, Lima JT, Nunes XP, Oliveira VR, Siqueira JS e Quintans-Júnior LJ (2009) Antinociceptive effect of the ethanolic extract of *Amburana cearensis* (Allemão) AC Sm, Fabaceae, in rodents. *Rev Bras Farmacogn* 19(3): 672-676.
- Pauli A e Schilcher H (2010) *In vitro* antimicrobial activities of essential oils monographed in the European Pharmacoeia 6th edition. In: Başer KHC e Buchbauer G (eds) *Handbook of Essential Oils: Science, Technology and Applications*. Boca Raton: CRC Press, 975 pp.
- Pedrollo CT, Kinupp VF, Shepard G e Heinrich M (2016) Medicinal plants at Rio Jauaperi, Brazilian Amazon: Ethnobotanical survey and environmental conservation. *J Ethnopharmacol* (186): 111-124.
- Peixinho GDS, Santos CMG, Ribeiro VG, Amorim EPDR, Carvalho VN e Bispo JDS (2017) Extracts of Brazilian peppertree, angico, amburana and “quebra-faca” on *Lasiodiplodia theobromae* control in bunches of grape cv. Itália. *Summa Phytopathol* 43(2): 158-160.
- Pelkonen O, Xu Q e Fan TP (2014) Why is research on herbal medicinal products important and how can we improve its quality? *J Tradit Complement Med* 4(1): 1-7.
- Pereira EP, Braga-de-Souza S, Santos CC, Santos LO, Cerqueira MD, Ribeiro PR, Fernandez LG, Silva VDA e Costa SL (2017a) *Amburana cearensis* seed extracts

- protect PC-12 cells against toxicity induced by glutamate. *Rev Bras Farmacogn* 27(2): 199-205.
- Pereira JJS, Pereira APC, Jandú JJ, Paz JA, Crovella S, Correia MTS e Azevêdo JS (2017b) *Commiphora leptophloeos* Phytochemical and Antimicrobial Characterization. *Front Microbiol* (8): 52
- Perier C, Tieu K, Guégan C, Caspersen C, Jackson-Lewis V, Carelli V, Martinuzzi A, Hirano M, Przedborski S and Vila M (2005) Complex I deficiency primes Bax-dependent neuronal apoptosis through mitochondrial oxidative damage. *Proc Natl Acad Sci United States Am* 102:19126–19131.
- Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ and Brand MD (2002) Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 277:44784–44790.
- Pinhatti VR. Avaliação das atividades biológicas e genotóxicas em dois derivados de guanilhidrazonas. 2009. 94 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.
- Polhill RM, Raven PH e Stirton CH 1981. Evolution and systematics of the Leguminosae. Pp. 1-26. In: Polhill RM e Raven PH (eds.). *Advances in Legume Systematics*. Kew, Royal Botanic Gardens.
- Pourahmad J e Salimi A (2015) Isolated Human Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC), a Cost Effective Tool for Predicting Immunosuppressive Effects of Drugs and Xenobiotics. *Iranian J Pharm Res* 14(4): 979.
- Poprac P, Jomova K, Simunkova M, Kollar V, Rhodes CJ and Valko M (2017) Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. *Trends Pharmacol Sci* 38:592–607.
- Preti R, Rapa M, Vinci, G (2017) Effect of Steaming and Boiling on the Antioxidant Properties and Biogenic Amines Content in Green Bean (*Phaseolus vulgaris*) Varieties of Different Colours. *J Food Qual* 2017: 5329070.
- Quadros APO, Mazzeo DEC, Marin-Morales MA, Perazzo FF, Rosa PCP e Maistro EL (2017) Fruit extract of the medicinal plant *Crataegus oxyacantha* exerts genotoxic and mutagenic effects in cultured cells. *J Toxicol Environ Health Part A* 80(3): 161-170.
- Raguso RA (2016) More lessons from linalool: insights gained from a ubiquitous floral volatile. *Curr Opin Plant Biol* 32: 31-36.
- Rego-Júnior NO, Fernandez LG, Castro RD, Silva LC, Gualberto AS, Pereira MLA e Silva MV (2011) Compostos bioativos e atividade antioxidante de extratos brutos de espécies vegetais da caatinga. *Braz J Food Technol* 14(1): 50-57.
- Ribeiro ES, Souza RATM, Paula MH, Mesquita RRS, Moreira EL e Fazon H (2016) Espécies florestais comercializadas pelo estado de Mato Grosso. *Biodiversidade* 15(2): 2-20.
- Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ and Minor L (2016) Cell Viability Assays. In: Sittampalam G, Coussens N, Brimacombe K and Al. E (eds) *Assay Guidance Manual* [Internet]. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Science, Bethesda (MD), pp 1–31
- Ritchie RH, Drummond GR, Sobey CG, De Silva TM and Kemp-Harper BK (2017) The opposing roles of NO and oxidative stress in cardiovascular disease. *Pharmacol Res* 116:57–69.
- Roberto MM, Matsumoto ST, Jamal CM, Malaspina O e Marin-Morales MA (2016) Evaluation of the genotoxicity/mutagenicity and antigenotoxicity/antimutagenicity induced by propolis and *Baccharis dracunculifolia*, by *in vitro* study with HTC cells. *Toxicol in Vitro* 33: 9-15.

- Rocha D (1945) Formulário Therapeutico de Plantas Medicinais Cearenses Nativas e Cultivadas. Ed Progresso, Fortaleza, Brasil, 250 pp.
- Roeder E, Wiedenfeld H and Edgar JA (2015) Pyrrolizidine alkaloids in medicinal plants from North America. *J Pharm Sci* 70:357–367.
- Sá MCA, Peixoto RDM, Krewer CDC, Almeida JRG, Vargas AC e Costa MM (2011) Antimicrobial activity of caatinga biome ethanolic plant extracts against gram negative and positive bacteria. *Rev Bras Ciênc Vet* 18(2/3): 62-66.
- Sá MB, Ralph MT, Nascimento DCO, Ramos, CS, Barbosa IMS, Sá FB e Lima-Filho JV (2014) Phytochemistry and preliminary assessment of the antibacterial activity of chloroform extract of *Amburana cearensis* (Allemão) AC Sm. against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing strains. *J Evid Based Complementary Altern Med* 2014: 786586.
- Salahdeen HM, Idowu GO, Salami SA, Murtala BA e Alada AA (2016) Mechanism of vasorelaxation induced by *Tridax procumbens* extract in rat thoracic aorta. *J Intercult Ethnopharmacol* 5(2): 174.
- Salgueiro ACF, Folmer V, Silva MP, Mendez ASL, Zemolin APP, Posser T, Franco JL, Puntel RL Puntel GO (2015) Effects of *Bauhinia forficata* tea on oxidative stress and liver damage in diabetic mice. *Oxid Med Cell Longev* 2016: 8902954.
- Santos ADS, Silva FAPDR, Simonetti RA, Robert RCG e Fantini AC (2014) Lumber trading in the Florianópolis Region-Santa Catarina, Brazil. *Floresta e Ambiente* 21(1): 19-29.
- Santos LDO, Reis MR, Ogava LE, Leão KV, Machado LL e Lira SP (2016) Avaliação da Atividade Antioxidante dos Compostos Fenólicos Presentes na *Amburana cearensis*. *Orbital Electron* 1(1): 44-49.
- Shahidi F e Ambigaipalan P (2015) Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *J func foods* 18: 820-897.
- Silva FAPDR, Robert RCG, Santos ADS e Mendonça SD (2015) Quantification and Assessment of the Main Forest Species Licensed for Exploitation in the State of Acre from 2005 to 2012. *Floresta e Ambiente* 22(4): 567-574.
- Silva WA, Nobre AP, Leites AP, Silva MDSC, Lucas RC e Rodrigues OG (2010) Effect Allelopathic of aqueous extract of Smith *Amburana cearensis* A. Smith in the germination and growth of sorghum seeds (*Sorghum bicolor* L.). *Agropec Científica Semiárido* 2(1): 42-54.
- Sinha S, Jothiramajayam M, Ghosh M e Mukherjee A (2014) Evaluation of toxicity of essential oils palmarosa, citronella, lemongrass and vetiver in human lymphocytes. *Food Chem Toxicol* 68: 71-77.
- Souza GA, Silva NC, Souza J, Oliveira KR, Fonseca AL, Baratto LC, Oliveira OCP, Varotti FP e Moraes WP (2017) *In vitro* and *in vivo* antimalarial potential of oleoresin obtained from *Copaifera reticulata* Ducke (Fabaceae) in the Brazilian Amazon rainforest. *Phytomedicine* (24): 111-118.
- Souza VC e Lorenzi H (2005) Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa, Editora Plantarum.
- Tanwar B e Modgil R (2012) Flavonoids: Dietary occurrence and health benefits. *Spatula DD* 2(1): 59-68.
- IUCN Red List of Threatened Species 1998: e.T32291A9687595. Americas Regional Workshop (Conservation & Sustainable Management of Trees, Costa Rica, November 1996). 1998. *Amburana cearensis*. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.1998.RLTS.T32291A9687595.en>.

- Tholl D (2015) Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants. In Schrader J e Bohlmann (eds) J Biotechnology of isoprenoids. Springer International Publishing, pp. 63-106.
- Thoppil RJ e Bishayee A (2011) Terpenoids as potential chemopreventive and therapeutic agents in liver cancer. *World J Hepatol* 3(9): 228–249.
- Trevisan MTS e Macedo FVV (2003) Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. *Quím Nova* 26(3): 301-304.
- Tigre CB (1968) Silvicultura para as matas xerófilas. DNOCS, Fortaleza, Brasil, 175 pp.
- Tissier A, Ziegler J e Vogt T (2014) 2. Specialized Plant Metabolites: Diversity and Biosynthesis. In: Krauss GJ e Nies DH (eds) *Ecological Biochemistry: Environmental and Interspecies Interactions*. John Wiley & Sons, UK, pp 14-37.
- Van WBE e Wink M (2017) Medicinal plants of the world. Medicinal plants of the world. 2 Edition, 520 pp.
- WHO. World Health Organization: The world medicines situation (2011): traditional medicines: global situation, issues and challenges. Geneva: 12p.
- Vakifahmetoglu-Norberg H, Ouchida AT and Norberg E (2017) The role of mitochondria in metabolism and cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 482:426–431. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.11.088
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M and Telser J (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39:44–84.
- Venditti P, Di Stefano L and Di Meo S (2013) Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Mitochondrion* 13:71–82.
- Vitousek PM, Menge DN, Reed SC e Cleveland CC (2013) Biological nitrogen fixation: rates, patterns and ecological controls in terrestrial ecosystems. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 368(1621): 20130119.
- Weaver BA (2014) How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Mol Biol Cell* 25(18): 2677-2681.
- Weidinger A and Kozlov A V (2015) Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction.
- Wiedenfeld H (2011) Plants containing pyrrolizidine alkaloids: toxicity and problems. *Food Addit Contam: Part A* 28(3): 282-292.
- Wink M (2010) *Annual Plant Reviews Volume 40: Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*, Second Edition, 464 pages.
- Wink M (2015) Modes of action of herbal medicines and plant secondary metabolites. *Medicines* (2): 251-286.
- Zau MDL, Vasconcelos RPD, Giacon VM e Lahr FAR (2014) Chemical, physical and mechanical properties of particleboard produced with Amazon wood waste - Cumaru (*Dipteryx Odorata*) - and castor oil based polyurethane adhesive. *Polímeros* (24): 726-732.
- Zhang H e Tsao R (2016) Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Curr Opin Food Sci* 8: 33-42.
- Zulak KG, Liscombe DK, Ashihara H e Facchini PJ (2006) Alkaloids. In: Crozier A, Clifford MN e Ashihara H (eds.) (2008) *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*. John Wiley & Sons, pp 102-136.
- Zwenger S e Basu C (2008) Plant terpenoids: applications and future potentials. *Biotechnol Mol Biol Rev* 3(1): 1-7.

APÊNDICE A - FIGURA SUPLEMENTAR 1

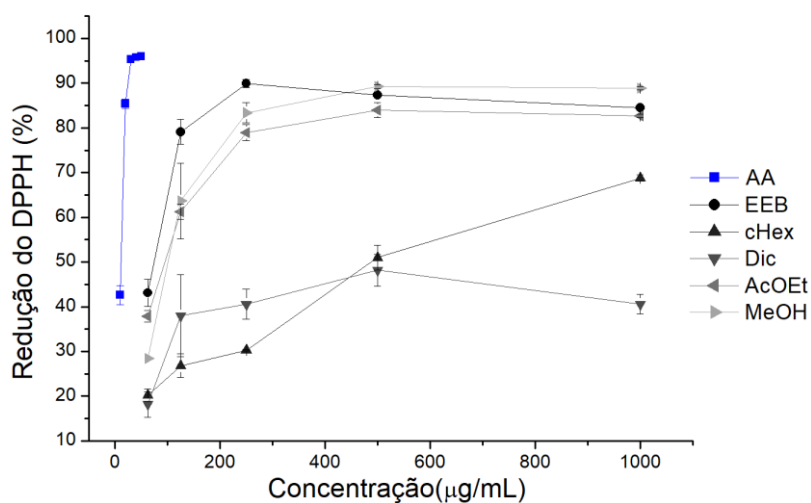


Figura Suplementar 1. *Screening* de atividade antioxidante pelo teste do DPPH (2,2 difenil-1-picril-hidrazil) do extrato etanólico bruto (EEB) e suas frações diclorometano (Dic), ciclohexano (cHex), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH), em concentrações variando de 62,5 a 1000 µg/mL. Valores no gráfico correspondem à média e ao desvio padrão da porcentagem de redução do radical livre DPPH, ambos com n = 3. AA: ácido ascórbico.

APÊNDICE B - QUÍMICOS UTILIZADOS E SUAS RESPECTIVAS MARCAS

1,1-difenil-2-picrilidrazilo (DPPH), reagente de fenol de Folin Ciocalteu, carvacrol, cumarina, ácido galico, quercetina, rutina, estigmasterol, β -sitosterol, ácido sulfúrico, timol, vanilina, histopaque®-1077, azul de tripan, 1-(4,5-Dimetiltiazol-2il)-3,5-difenilformazan (MTT) e metanossulfonato de metila foram adquiridos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA); ácido tricloroacético, neonácido tricloroacético, sulfóxido de dimetilo (DMSO) de NEON (Suzano, SP, Brasil); ácido ascórbico, ácido acético, ciclohexano, diclorometano, acetato de etilo, etanol, metanol, cloreto férrico foram adquiridos pela Alphatec (Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil); cloreto de alumínio, triton-X 100, dihidrogenofosfato de sódio monohidratado, hidrogenofosfato de sódio dihidratado, hidróxido de potássio, ferricianeto de potássio e cloreto de sódio de Vetec (Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil); O RPMI-1640 médio e a fito-hemaglutinina foram obtidos da ThermoFisher (Waltham, Massachusetts, EUA); Soro Fetal Bovino de Cultilab (Campinas, São Paulo, Brasil).

ANEXO A - REGRAS PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA INDUSTRIAL CROPS AND PRODUCTS

Article structure

Subdivision - numbered sections

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

Introduction

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

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

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

Conclusions

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

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

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

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s).

Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site. Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view [example Highlights](#) on our information site.

Keywords

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

Abbreviations

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

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Nomenclature and Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Authors and Editor(s) are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.

All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.

All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

For chemical nomenclature, the conventions of the *International Union of Pure and Applied Chemistry* and the official recommendations of the *IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature* should be followed.

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible. In principle, variables are to be presented in italics.

Number consecutively any equations that have to be displayed separate from the text (if referred to explicitly in the text). Subscripts and superscripts should be clear.

Greek letters and other non-Roman or handwritten symbols should be explained in the margin where they are first used. Take special care to show clearly the difference between zero (0) and the letter O, and between one (1) and the letter l. Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line. Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Also powers of e are often more conveniently denoted by exp.

Levels of statistical significance which can be mentioned without further explanation are: *P < 0.05, **P < 0.01 and ***P < 0.001.

In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g., Ca²⁺, not as Ca⁺⁺. Isotope numbers should precede the symbols, e.g., ¹⁸O.

Footnotes

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

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts. TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

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

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

Please do not:

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

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of electronic artwork.

Figure captions

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

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

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

communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

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

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

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

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add

[dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/industrial-crops-and-products>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author*: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors*: both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors*: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication: Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. Mendeley Data, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations.

ANEXO B - CURRÍCULO LATTES ATUALIZADO

Produção bibliográfica

Capítulos de livros publicados

1. SILVA, J. R. A.; OLIVEIRA, W. B.; COSTA, M. W. S.; CAVALCANTE, R. R.; MARTINS, F. A.; ALMEIDA, P. M. EFEITO LARVICIDA DE *Jatropha* sp. PARA *Aedes aegypti* L. In: Eduardo Bezerra de Almeida Junior; Francisco Soares Santos Filho. (Org.). Biodiversidade do meio norte do Brasil: conhecimentos ecológicos e aplicações. 1ed.Curitiba: Editora CRV, 2016, v. 1, p. 200-208.

2. CUNHA, J. O.; **SILVA, J. R. A.;** FERREIRA, F. L.; ALMEIDA, P. M.; MARTINS, F. A. POTENCIAL CITOTÓXICO E GENOTÓXICO DO EXTRATO FOLIAR E DO LATEX DE *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. In: Eduardo Bezerra de Almeida Junior; Francisco Soares Santos Filho. (Org.). Biodiversidade do meio norte do Brasil: conhecimentos ecológicos e aplicações. 1ed.Curitiba: Editora CRV, 2016, v. 1, p. 209-216.

Resumos expandidos publicados em anais de congressos

1. LOPES, M. S. B.; SOUSA, R. M. S.; **SILVA, J. R. A.;** COSTA JUNIOR, J. S.; SANTOS FILHO, F. S.; ALMEIDA, P. M.; MARTINS, F. A. Efeito modulador das folhas de *Poincianella bracteosa* em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. In: II Simpósio Nordeste de Recursos Naturais e Potencialidade Terapêuticas, 2017, Teresina. Anais do II Simpósio Nordeste de Recursos Naturais e Potencialidade Terapêuticas, 2017.

Resumos publicados em anais de congressos

1. SILVA, J. R. A.; BARROS, J. V.; ALMEIDA, P. M.; LIMA, C. S. A.; BRASILEIRO-VIDAL, A. C. Avaliação do potencial citotóxico, genotóxico, mutagênico e antimutagênico do extrato foliar de *Amburana cearensis* (Allemão) A.C.Sm. In: VII Jornada da Pós-Graduação em Genética, 2017, Recife. Anais da VII Jornada da Pós-Graduação em Genética, 2017.

2. SILVA, J. R. A.; BARROS, J. V.; ALMEIDA, P. M.; SANTOS, N.; LIMA, C. S. A. cytotoxicity and genotoxicity evaluation of leaf ethanolic extract fractions from *Amburana cearensis* (allemão) A.C.Sm. In: XX CONGRESSO BRASILEIRO DE TOXICOLOGIA, 2017, Goiânia. Anais do XX Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2017.

3. BARROS, J. V.; **SILVA, J. R. A.;** BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; ARAUJO, S. S.; SANTOS, N. *In vitro* investigation of the cytotoxic potential of the red propolis of the state of pernambuco. In: XX CONGRESSO BRASILEIRO DE TOXICOLOGIA, 2017, Goiânia. Anais do XX Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2017.

4. COSTA, R. F.; **SILVA, J. R. A.;** CORREIA, D. S.; BARROS, J. V.; MELO, M. S.; SILVA, M. V.; BRASILEIRO-VIDAL, A. C. Evaluation of the cytotoxic effect of the aqueous extract of *Libidibia ferrea* on peripheral mononuclear cells (pbmcs) using the mtt test. In: XX CONGRESSO BRASILEIRO DE TOXICOLOGIA, 2017, Goiânia. Anais do XX Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2017.

5. CORREIA, D. S.; COSTA, R. F.; **SILVA, J. R. A.;** BARROS, J. V.; ARAUJO, S. S.; SILVA, C. M. A.; SILVA, M. V.; BRASILEIRO-VIDAL, A. C. Evaluation of cytotoxicity potencial of leaf extract of *Anadenanthera colubrine* var. *cebil* (griseb.) Altschulin in human cells. In: XX Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2017, Goiânia. Anais do XX Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2017.

6. OLIVEIRA, R. S.; MOURA, D. C.; **SILVA, J. R. A.;** ALMEIDA, P. M.; MARTINS, F. A. Effects mutagenic and modulator of bark of *Poincianella bracteosa* in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. In: Brazilian-International Congress of Genetics, 2016, Caxambu. Anais do 62º Congresso Brasileiro de Genética, 2016.

7. LOPES, M. S. B.; MAGALHAES, D. H. P.; **SILVA, J. R. A.;** ALMEIDA, P. M.; MARTINS, F. A.

Mutagenic potential of leaves of *Poincianella bracteosa* in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. In: Brazilian-International Congress of Genetics, 2016, Caxambu. Anais do 62º Congresso Brasileiro de Genética, 2016.

8. CARVALHO, F. V.; **SILVA, J. R. A.**; SANTOS, C. M.; ALMEIDA, P. M.; MARTINS, F. A. Mutagenic and recombinogenic effect of citric acid in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. In: Brazilian-International Congress of Genetics, 2016, Caxambu. Anais do 62º Congresso Brasileiro de Genética, 2016.

9. LOPES, M. S. B.; SANTOS, C. M.; MOURA, D. C.; **SILVA, J. R. A.**; MARTINS, F. A. Atividade antimutagênica da folha de *Poincianella bracteosa* (Tul.)L. P. Queiroz utilizando o teste SMART. In: 'IV SIMPÓSIO REGIONAL DE DIVERSIDADE BIOLÓGICA DO PIAUÍ; XVII SEMANA DE BIOLOGIA: Biodiversidade faunística e florística do Piauí, 2016, Floriano. Anais do IV SIMPÓSIO REGIONAL DE DIVERSIDADE BIOLÓGICA DO PIAUÍ; XVII SEMANA DE BIOLOGIA:. Teresina: FUESPI, 2016. v. 1. p. 25-25.

10. OLIVEIRA, R. S.; MAGALHAES, D. H. P.; **SILVA, J. R. A.**; MOURA, D. C.; MARTINS, F. A. Avaliação do potencial toxicológico do chá da casca de catingueira. In: IV SIMPÓSIO REGIONAL DE DIVERSIDADE BIOLÓGICA DO PIAUÍ; XVII SEMANA DE BIOLOGIA: Biodiversidade faunística e florística do Piauí, 2016, Floriano. Anais do IV SIMPÓSIO REGIONAL DE DIVERSIDADE BIOLÓGICA DO PIAUÍ; XVII SEMANA DE BIOLOGIA: "Biodiversidade faunística e florística do Piauí. Teresina: FUESPI, 2016. v. 1. p. 28-28.