



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

CAMILLA MORAIS DE PAIVA

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA, ESTUDO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS
E TOXICOLÓGICAS DE EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS DE *TRIPALARIS*
GARDNERIANA WEDD.**

Recife

2018

CAMILLA MORAIS DE PAIVA

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA, ESTUDO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS
E TOXICOLÓGICAS DE EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS DE *TRIPLARIS*
GARDNERIANA WEDD.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Bioquímica e Fisiologia.

Área de concentração: Bioquímica

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Tereza dos Santos Correia

**Recife
2018**

Catálogo na Fonte:
Elaine Cristina Barroso CRB-4/ 1728

Paiva, Camilla de Morais de

Caracterização fitoquímica, estudo das atividades biológicas e toxicológicas de extrato aquoso de folhas de *Triplasis gardneriana* Wedd. / Camilla de Morais Paiva. – 2018.

97 f. : il., fig., tab.

Orientadora: Maria Tereza dos Santos Correia

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Recife, 2018.

Inclui referências

1. Plantas medicinais 2. Polygonaceae 3. Caatinga I. Correia, Maria Tereza dos Santos (orient.) II. Título

615.321

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-460

CAMILLA MORAIS DE PAIVA

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA, ESTUDO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS
E TOXICOLÓGICAS DE EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS DE *TRIPLARIS*
GARDNERIANA WEDD.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Bioquímica e Fisiologia.

Aprovada em: 26 / 04 / 2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr^a Maria Tereza dos Santos Correia – (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Túlio Diego da Silva – (membro externo)
Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste - CETENE

Maria Betânia Melo de Oliveira – (membro externo)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrícia Maria Guedes Paiva – (membro interno)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dedico este trabalho a toda minha família,
amigos e ao meu filho, por serem minha
fonte de inspiração e amor.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que sempre me sustentou e guiou cada passo para que eu pudesse chegar até aqui. Por ser meu refúgio e minha fortaleza, por sempre renovar minhas forças e minha fé, pela minha vida e por todas as coisas. Deus é bom o tempo todo.

À toda minha família, a minha mãe Simone e aos meus amados avós (*in memoriam*) pelos ensinamentos, educação, dedicação e sobretudo amor. À minha sogra, Clarice, por todo amor, suporte e cuidado de sempre.

Ao meu marido, Marcus, pelo incentivo e apoio em todos os momentos.

Ao meu tão amado e esperado filho, Benício, que acompanhou uma parte desta trajetória e chegou trazendo muito amor à minha vida.

À professora Maria Tereza dos Santos Correia pela confiança, orientações e incentivo durante esta caminhada.

À professora Márcia Vanusa da Silva pelo apoio, orientações e sugestões.

À professora Cristiane Moutinho Lagos de Melo pela parceria, contribuições e sugestões neste trabalho.

Às minhas amigas Maria Cecília e Bárbara Ramos, pela amizade, carinho e participação em etapas importantes deste trabalho.

Aos meus amigos do Laboratório de Biologia Molecular, George Souza, Hortência Andrade, Vitória Araújo, Amanda Virgínia, Sivoneide Maria, Tamiris Alves, Danielle Feijó, Carlos Eduardo, Clarissa de França, Daíllo Augusto, Rafael Artur e Luciclaudio pelo acolhimento que me foi dado desde o início, pelas experiências, conhecimentos compartilhados, pelas ajudas e pelos momentos de descontração.

A Alexandre Gomes pela ajuda prestada durante a coleta do material.

Agradeço, por fim, ao programa de Pós-graduação de Bioquímica e Fisiologia da UFPE e a todos os professores pelos ensinamentos e por toda ajuda. Aos funcionários do Departamento de Bioquímica, Djalma, Fernanda, Miron e ao técnico Sr. João Antônio por toda ajuda e prestatividade de sempre.

RESUMO

As plantas medicinais têm sido cada vez mais utilizadas na procura de novos compostos terapêuticos com baixo ou nenhum efeito colateral. A planta *Triplaris gardneriana* Wedd., conhecida popularmente como Pajeú, é muito utilizada na medicina popular para tratar diversas patologias. Assim, este estudo propôs identificar o perfil fitoquímico, investigar as atividades biológicas e toxicológicas do extrato aquoso das folhas de *Triplaris gardneriana* (TG Aq). O extrato foi submetido à triagem fitoquímica por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), revelando a presença de flavonoides, proantocianidinas condensadas, leucoantocianidinas, taninos hidrolisáveis e traços para monoterpenos e sesquiterpenos. A dosagem do teor total de fenóis e flavonoides apresentou conteúdo fenólico total de $333,44 \pm 3,43$ mg EAG/g de extrato e um conteúdo de flavonoides totais de $23,1 \pm 0,41$ mg EQ/g de extrato. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) identificou a presença do composto quercetina. Também foi observada atividade hemaglutinante (AH) inibida pela fetuína e estável à $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, não havendo inibição de tripsina. A atividade antioxidante de TG Aq foi avaliada por cinco métodos diferentes (DPPH, Ânion Superóxido, TAC, FRAP E LPIC). Nos ensaios de redução dos radicais livres DPPH e ânion superóxido, TG Aq apresentou um IC₅₀ de $19,10 \pm 0,26$ e $33,48 \pm 0,31$ µg/mL, respectivamente. Os ensaios de redução de íons metálicos, TAC e FRAP, TG Aq apresentou resultados bem próximo dos padrões utilizados. Já no ensaio de inibição da peroxidação lipídica, TG Aq apresentou atividade de inibição de $29,44 \pm 0,28$. A atividade antimicrobiana foi determinada através do método de microdiluição em caldo, onde a amostra apresentou atividade inibitória e bactericida apenas para as cepas bacterianas gram-positivas. O valor de CMI foi de 0,5 mg/mL para *S. aureus*, 0,25 mg/mL para *E. faecalis* e um valor de CMB de 1 mg/mL para *S. aureus* e 0,5 mg/mL para *E. faecalis*. A atividade imunomodulatória e citotóxica, realizadas em esplenócitos de camundongos e avaliadas através da citometria de fluxo mostrou que TG Aq aumenta significativamente a proliferação celular em 24h e que não induz a apoptose e nem a necrose celular. A amostra TG Aq não apresentou toxicidade oral aguda, assim como não indicaram potencial genotóxico através do ensaio cometa e teste de micronúcleo. Os resultados obtidos revelaram que a amostra possui atividades biológicas significativas e que o seu uso, por via oral, pode ser considerado seguro.

Palavras-chave: Plantas medicinais. Pajeú. Polygonaceae. Atividades biológicas. Estudos de segurança.

ABSTRACT

Medicinal plants have been increasingly used in the search of new therapeutic compounds with low or no side effects. The *Triplaris gardneriana* Wedd., popularly known as Pajeú, is widely used on folk medicine to treat many pathologies. Therefore, this study proposes to identify the phytochemical profile, to investigate the biological and toxicological activities of the aqueous extract from the leaves of *Triplaris gardneriana*. The extract was submitted to phytochemical screening by thin layer chromatography (TLC) showing the presence of flavonoids, condensed proanthocyanidins, leucoanthocyanidins, hydrolysable tannins and traces for monoterpenes and sesquiterpenes. The total phenol and flavonoid had a total phenolic content of 333.44 ± 3.43 mg EAG / g extract and a total flavonoid content of 23.1 ± 0.41 mg EQ / g extract. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) identified the presence of compound quercetin. Was also observed a hemagglutinating activity (HA) inhibited by fetuin and stable at 100°C , with no inhibition of trypsin. The antioxidant activity of TG Aq was evaluated by five different methods (DPPH, Superoxide Anion, TAC, FRAP and LPIC). In the free radical reduction DPPH and superoxide anion assays, TG Aq presented an IC₅₀ of 19.10 ± 0.26 and 33.48 ± 0.31 $\mu\text{g} / \text{mL}$, respectively. The metal ion reduction assays, TAC and FRAP, TG Aq presented results very close to the standards used. In the lipid peroxidation inhibition assay, TG Aq showed an inhibitory activity of 29.44 ± 0.28 . The antimicrobial activity was determined by the broth microdilution method, where the sample showed inhibitory and bactericidal activity only for the gram-positive bacterial strains. The MIC value was 0.5 mg / mL for *S. aureus*, 0.25 mg / mL for *E. faecalis* and a MBC value of 1 mg / mL for *S. aureus* and 0.5 mg / mL for *E. faecalis*. Immunomodulatory and cytotoxic activity performed on mouse splenocytes and assessed by flow cytometry showed that TG Aq significantly increases cell proliferation in 24 hours and does not induce apoptosis and necrosis. In the acute oral toxicity test, the results didn't show signs of toxicity, making no interference in the weight development of the animals, in the consumption of water and feed, besides to the absence of macroscopic changes in the animals organs and in the blood biochemistry. The TG Aq didn't show acute oral toxicity and didn't indicate genotoxic potential through the comet assay and micronúcelo test, as well. The results showed that the sample has significant biological activities and that its oral use can be considered safe.

Keywords: Medicinal plants. Pajeú. Polygonaceae. Biological activities. Safety studies.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mapa de delimitação do semiárido brasileiro	16
Figura 2 - (1) Árvore de <i>Triplaris gardneriana</i> ; (2) Folhas de <i>Triplaris gardneriana</i>	18
Figura 3 - Métodos para a obtenção de compostos ativos das plantas medicinais.....	21
Figura 4 - Representação de alguns compostos originados no metabolismo secundário de plantas.....	22
Figura 5 - Principais fatores que podem influenciar na produção de alguns metabólitos secundários.	23
Figura 6 - Principais vias do mecanismo de biossíntese dos metabólitos secundários.	24
Figura 7 - Síntese dos compostos fenólicos	25
Figura 8 - Estrutura básica dos flavonoides.....	26
Figura 9 - Estruturas das principais classes dos flavonoides.....	27
Figura 10 - Principais alvos dos radicais livres.	29
Figura 11 - Classificação dos antioxidantes.	31
Figura 12 - Locais e mecanismos na célula bacteriana que podem ser sítios de ação dos compostos naturais.	33
Figura 13 - Avaliação da toxicidade oral aguda.....	36
Figura 14 - Formação de micronúcleo – Ruptura ou perda de cromossomos. (A) Diagrama esquemático mostrando a formação de um micronúcleo a partir de um fragmento de cromossomo ou de um cromossomo inteiro. (B) Fotomicrografia de um linfócito contendo um micronúcleo.	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividades biológicas de diferentes órgãos de *Triplaris gardneriana* Wedd.....19

Tabela 2 - Classificação dos compostos fenólicos de acordo com a cadeia principal.....25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aa	Absorbância da Amostra
Aaa	Absorbância do Ácido Ascórbico
Ac	Absorbância do Controle
ABTS•	2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline- 6-sulfonic acid)
ALB	Albumina
ALT	Transaminase pirúvica
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Transaminase oxalacética
BApNa	N- α -benzoil-DL-arginil- ρ -nitroanilina
BT	Bilirrubina total
CAT	Catalase
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CMB	Concentração mínima bactericida
CMI	Concentração mínima inibitória
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMSO	Dimetilsufóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EAG	Equivalente de Ácido Gálico
EC	Ensaio cometa
EQ	Equivalente de Quercetina
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERSs	Espécies reativas de enxofre
FA	Fosfatase Alcalina
FD	Frequência de dano
FDA	Food and Drug Administration
Fe ²⁺	Ferro ferroso
FPM	Força próton motriz
GPx	Glutathiona-peroxidase

GSH	Glutationa reduzida
GSSH	Glutationa oxidada
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HOO	Radical hidroperoxil
ID	Índice de dano
IPA	Instituto Agronômico de Pernambuco
MN	Micronúcleo
NBT	Nitro blue tetrazolium chloride
NCE	Eritrócitos normocromáticos
NK	Natural Killer
NO	Óxido nítrico
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
O ₂	Oxigênio
OH [•]	Radical hidroxila
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCE	Eritrócitos policromáticos
PCEMn	Eritrócitos policromáticos micronucleados
PI	Iodeto de propídio
PT	Proteínas Totais
SOD	Superóxido dismutase
SRL	Sequestro de Radicais Livres
TAC	Atividade Antioxidante Total
TG Aq	Extrato aquoso das folhas de <i>Triplaris gardneriana</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônias

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 OBJETIVOS	15
1.1.1 Objetivo Geral	15
1.1.2 Objetivos Específicos	15
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1 CAATINGA	16
2.2 FAMÍLIA POLYGONACEAE	17
2.3 <i>TRIPLARIS GARDNERIANA</i> WEDD.	18
2.4 PLANTAS MEDICINAIS	20
2.5 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	21
2.6 COMPOSTOS FENÓLICOS	24
2.7 FLAVONOIDES	26
2.8 RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO	28
2.9 ANTIOXIDANTE	30
2.10 RESISTÊNCIA BACTERIANA	32
2.11 SISTEMA IMUNOLÓGICO	34
2.12 ESTUDO TOXICOLÓGICO	35
2.12.1 Ensaio Cometa	36
2.12.2 Teste de Micronúcleo	37
3 RESULTADOS	40
3.1 ARTIGO - CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E ESTUDO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> DE EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS DE <i>TRIPLARIS GARDNERIANA</i> WEDD. DA CAATINGA DE PERNAMBUCO	40
4 CONCLUSÃO	83
REFERÊNCIAS	84

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas com fins medicinais, para prevenção, tratamento e cura de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (MACIEL, et al., 2002). O estudo etnofarmacológico contribui para a descoberta de novos agentes biologicamente ativos aumentando também o conhecimento sobre a flora da região. (RODRIGUES, E.; CARLINI, 2003). Diversos extratos obtidos de espécies de plantas são utilizados na medicina popular (STEPP, 2004; SOUZA & LORENZI, 2005), constituindo assim importantes fontes de novos medicamentos (KINGSTON, 2005).

O reino vegetal é uma das principais fontes de substâncias orgânicas, contribuindo significativamente para o fornecimento de metabólitos secundários, os quais possuem amplo valor agregado devido ao seu potencial biotecnológico como medicamentos, cosméticos, alimentos e agroquímicos (PHILLIPSON; ANDERSON, L. A., 1989). Estes compostos são sintetizados pelas plantas a partir de uma quantidade significativa de energia e carbono absorvido, sendo produzidos em pequenas quantidades e limitados muitas vezes a uma determinada família, gênero e espécie de planta (GARCÍA; CARRIL, 2009).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) o Brasil possui considerável biodiversidade, onde as plantas medicinais não só são fontes de remédios caseiros como também são utilizadas na fabricação de fitoterápicos (BRASIL, 2006). O grande potencial de riqueza vegetal no território brasileiro corrobora para o fato de muitas indústrias farmacêuticas nacionais utilizarem as plantas como insumo básico. Essa biodiversidade está diretamente relacionada com as condições climáticas, edáficas e potencial hídrico, favorecendo o desenvolvimento de diversas espécies vegetais (ZUANAZZI; MAYORGA, 2002). Além disso, a população brasileira possui ampla coleção de conhecimentos tradicionais sobre a utilização das plantas medicinais, compilados ao longo de muitas gerações (BRASIL, 2006).

Um dos processos químicos essenciais para a sobrevivência da célula é a transferência de elétrons, este processo gera radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio (EROs) que por sua vez podem causar dano oxidativo (BAE *et al.*, 1999). Os radicais livres possuem diferentes papéis no organismo e encontram-se envolvidos em importantes processos fisiológicos, contudo o seu excesso causa efeitos prejudiciais, provocando alterações na estrutura e funções celulares através de danos ao DNA, mitocôndrias, membranas e proteínas. Desta forma, estes radicais estão envolvidos em diversas patologias, tais como o câncer, doenças cardiovasculares, degenerativas e neurológicas, choque hemorrágico, catarata,

disfunções cognitivas, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral (HALLIWELL; GUTTERIDGE; CROSS, 1992). No organismo, os radicais livres são controlados por substâncias antioxidantes capazes de minimizar os danos oxidativos às biomoléculas, inibindo ou diminuindo a oxidação. (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). As plantas sintetizam diversas moléculas durante o metabolismo secundário, dentre elas os polifenóis, constituídos de ácidos fenólicos e flavonoides (MELO, E. A. *et al.*, 2003). O consumo de antioxidantes naturais presentes na maioria das plantas, como os compostos fenólicos, tem sido associado a uma menor incidência de doenças relacionadas ao estresse oxidativo (DROGE, 2002).

As infecções causadas por bactérias geram um alto índice de mortalidade, representando assim um grande problema de saúde pública. O expansivo aumento da resistência bacteriana frente às inúmeras drogas disponíveis no mercado corroborou para a busca de novas alternativas terapêuticas (NASCIMENTO *et al.*, 2000). Em geral, as bactérias são capazes de geneticamente transmitir e adquirir resistência às drogas antimicrobianas (COHEN, 1992), onde muitas delas deixam de ser sensíveis e se tornam resistentes a praticamente todos os fármacos utilizados na rotina (SAKAGAMI; KAJAMURA, 2006). As plantas medicinais são alternativas promissoras para o combate às bactérias resistentes devido à grande diversidade de seus constituintes e metabólitos secundários, no qual são eficazes nesta atividade (NASCIMENTO *et al.*, 2000).

No entanto, as plantas medicinais também podem causar reações adversas, onde o vasto tempo do uso tradicional não é suficiente para validar a segurança dos produtos naturais. Segundo Lapa *et al.* (2004), as plantas medicinais são agentes xenobiontes, onde a sua biotransformação pode causar efeitos tóxicos que podem ser manifestados ou não no organismo, podendo até mesmo não apresentar nenhum sintoma, dificultando a correlação com a sua ingestão. Diante disto, é necessário que haja uma comprovação da qualidade e segurança das plantas medicinais, de modo que essas informações sejam fundamentadas em evidências experimentais através de estudos farmacodinâmicos e toxicológicos (SIMÕES *et al.*, 2007). O Ministério da Saúde preconiza a comprovação da segurança de novas substâncias através de vários ensaios, dentre eles se destacam a investigação da toxicidade e genotoxicidade (ANVISA, 2013). Tendo em vista que os compostos naturais podem modular a resposta imunológica (JANTAN, AHMAD, BUKHARI, 2015), é essencial que haja a análise dos efeitos imunotóxicos e imunomoduladores destas substâncias (PUTMAN *et al.*, 2002).

Para contribuir com o trabalho de educação ambiental e valorização dos recursos naturais da Caatinga, este estudo tem o propósito de investigar o perfil fitoquímico, assim como as atividades biológicas e toxicológicas do extrato aquoso das folhas de *Triplaris gardneriana*.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo do trabalho foi realizar o perfil fitoquímico, investigar a toxicidade e avaliar as propriedades antioxidante, antimicrobiana e imunomoduladora do extrato aquoso das folhas de *Triplaris gardneriana*.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Realizar a extração para obtenção do extrato aquoso de *Triplaris gardneriana* (TG Aq);
- Analisar o perfil fitoquímico de TG Aq por meio de cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Quantificar os Fenóis e Flavonoides Totais do extrato;
- Caracterizar TG Aq quanto a concentração de proteínas, atividade hemaglutinante (AH), atividade hemaglutinante específica, inibição da atividade hemaglutinante por monossacarídeos e glicoproteína e atividade inibidora de tripsina;
- Avaliar a atividade antioxidante através de cinco diferentes métodos *in vitro*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana de TG Aq frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas;
- Analisar o potencial imunomodulador de TG Aq através do ensaio de proliferação celular em esplenócitos de camundongo;
- Investigar a citotoxicidade de TG Aq frente aos esplenócitos de camundongo (apoptose e a necrose);
- Avaliar a toxicidade aguda por via oral de TG Aq em camundongos, determinando os efeitos sobre sobrevivência, parâmetros bioquímicos e análise macroscópica do fígado, baço e rins;
- Determinar o potencial genotóxico e mutagênico de TG Aq em camundongos, através do ensaio cometa e teste de micronúcleo, respectivamente.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CAATINGA

O Semiárido Brasileiro possui uma área de 1,03 milhão km², ocupa 12% da área do país, contendo uma população de aproximadamente 27 milhões de habitantes, abrangendo uma densidade populacional dentre as maiores do mundo (MINISTÉRIO DA INTEGRAÇÃO NACIONAL, 2018). É considerada pelo Ministério do Meio Ambiente como um dos maiores biomas brasileiros (MMA, 2018) e abrange 1.262 municípios dos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e a região nordeste de Minas Gerais (MINISTÉRIO DA INTEGRAÇÃO NACIONAL, 2018).

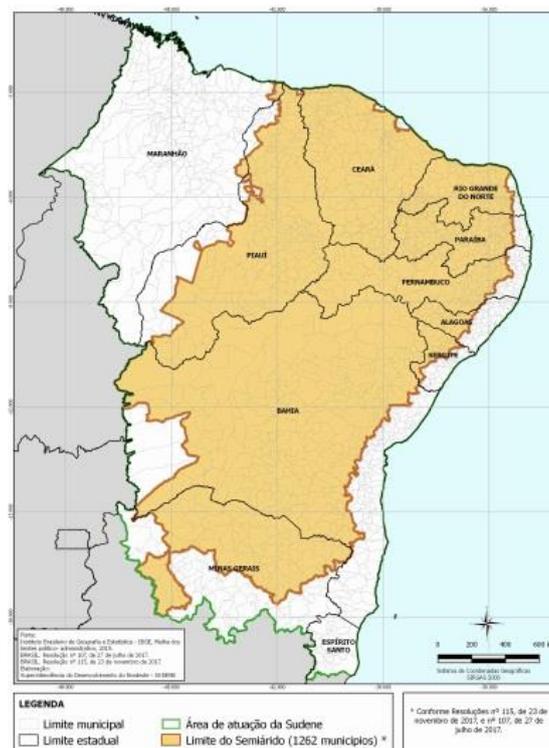


Figura 1 - Mapa de delimitação do semiárido brasileiro. Fonte: <http://sudene.gov.br/images/arquivos/semiario/arquivos/mapa-semiarido-1262municipios-Sudene.pdf>

A Caatinga é a principal formação vegetal do semiárido brasileiro, contudo é uma das vegetações mais ameaçadas do planeta sendo o bioma brasileiro mais desvalorizado e mal conhecido botanicamente (GIULIETTI et al., 2002). Dentre os biomas brasileiros, a Caatinga é a que possui uma vegetação mais heterogênea (RIZZINI, 1997). É um ecossistema único, que

apresenta uma grande biodiversidade com uma ampla variedade de paisagens, riqueza biológica e endemismo (MALVEZZI, 2007). A maioria das populações distribuídas neste bioma depende dos recursos vegetais disponíveis para o sustento (ALBUQUERQUE & ANDRADE, 2002a; ALBUQUERQUE & LUCENA, 2004).

O nome “Caatinga” significa “mata branca” em tupi-guarani pelo aspecto da vegetação durante o período de seca, onde as folhas caem deixando os troncos com tom acinzentados (ALBUQUERQUE; BANDEIRA, 1995). Apresenta parâmetros meteorológicos extremos, como secas e cheias, contudo o longo período de seca caracteriza a região, onde as precipitações são escassas e irregulares (NIMER, 1972). A região detém uma vasta vegetação xerófila, composta por árvores e arbustos adaptados ao clima característico do local (SANTOS et al., 2011). Possui uma flora bastante diversificada, com aproximadamente 4.547 espécies, 159 famílias e 1.141 gêneros (FORZZA et al., 2013). A vegetação da Caatinga possui muitas utilidades, além da importância biológica, também dispõe de espécies que podem ser utilizadas como frutíferas, forrageiras, madeireiras e de uso medicinais (ALBUQUERQUE, 2000).

Cerca de 70% da vegetação da Caatinga encontra-se modificada pelo homem e apenas 0,28% está protegida na forma de unidades de conservação (KIILL, 2005). O Parque Nacional do Catimbau é uma das poucas unidades de conservação no domínio da Caatinga, que se encontra localizado entre as coordenadas geográficas: 8°24'00” e 8°36'35” S e 37°09'30” e 37°14'40” WG, totalizando uma área de 62.300km². Sua área está distribuída entre os municípios de de Buíque (12.438 ha.); Tupanatinga (23.540 ha) na Microrregião do Vale do Ipanema, e Ibimirim (24.809 ha) na Microrregião do Moxotó, semiárido Pernambucano (RODRIGUES, 2006).

2.2 FAMÍLIA POLYGONACEAE

A família Polygonaceae compreende a um grupo de plantas predominantemente herbáceas ou lenhosas, distribuídas principalmente nas zonas temperadas do hemisfério Norte. A família abrange cerca de 49 gêneros e aproximadamente 1200 espécies (SANCHEZ *et al.*, 2011), onde no Brasil predominam 9 gêneros e 95 espécies distribuídos amplamente em seus domínios fitogeográficos (BFG, 2015).

Dos nove gêneros presentes no Brasil, cinco estão no Semiárido: *Coccoloba* (18 espécies), *Polygonum* (6 espécies), *Ruprechtia* (3 espécies), *Rumex* (1 espécie) e *Triplaris* (1 espécie), além de *Antigonum leptopus*, *Coccoloba uvifera* e *Triplaris americana*, que são

cultivadas. Estão localizadas em toda região do Semiárido, onde a depressão sertaneja do Sul é a região com maior número de espécies de Polygonaceae com 22 espécies, seguida pela Chapada Diamantina com 17 espécies (MELO; FRANÇA, 2006).

As Polygonaceae apresentam folhas com ócrea e caules articulados, usualmente ocós e habitados por formigas, além de possuir frutos coloridos e vistosos (MELO; FRANÇA, 2006). Muitas espécies desta família são fontes abundantes de flavonoides, cumarinas, terpenos, taninos (XIAO *et al.*, 2000; YAGI *et al.*, 1994), que por sua vez são utilizadas no comércio farmacêutico e na medicina popular (JÁCOME *et al.*, 2004), no entanto, algumas espécies são tóxicas. Além disto, algumas espécies são utilizadas para fins ornamentais e para o fornecimento de madeira utilizada em vassouras e outros materiais domésticos (MELO; FRANÇA, 2006). Dentre as utilizações da medicina popular das espécies desta família se destacam o tratamento de inflamações, hemorroidas, diarreia com sangramento e feridas na pele (VILELA, 2011).

2.3 *TRIPLARIS GARDNERIANA* WEDD.

Triplaris gardneriana Wedd. é uma espécie arbórea da região semiárida do Brasil, conhecida popularmente no nordeste brasileiro como pajaú, pau-jaú, pajeú e nas outras regiões do Brasil como coaçu, formigueiro e pau-formiga (MELO, 2010) e também como pajeuzeiro (FERRAZ, J. S. F.; ALBUQUERQUE; MEUNIER, 2006). É uma planta natural da mata ciliar do Rio São Francisco, sendo característica das encostas úmidas e várzeas em solos calcários (FRANÇA *et al.*, 2007). Possui sinonímia botânica as espécies *Triplaris baturitensis* Hub. (VINGT-UN ROSADO; ROSADO, 2009) e *Triplaris pachau* Mart. (MELO, 2010).



Figura 2 – (1) Árvore de *Triplaris gardneriana*; (2) Folhas de *Triplaris gardneriana*. Fonte: João de Deus Medeiros campus da UnB – Brasília – Distrito Federal Brasil, 2010.

É uma árvore heliófita, decídua, seletiva higrófila (LORENZI, 2002), com tronco ramificado e tortuoso, revestido por casca lisa, descamante e fina. Seu fruto é o do tipo aquênio, seco e com uma semente. As folhas são simples e coriáceas, com pilosidade na parte inferior e geralmente os ramos são habitados por formigas pretas. As árvores florescem em julho e agosto, dando origem aos frutos no mês de setembro (ARAÚJO, 2009). Durante todo ano produz bastante sementes viáveis, que são disseminadas pelo vento. Sua florescência se dá em julho e agosto, com subsequente amadurecimento dos frutos (LORENZI, 2002).

De acordo com Braga, 1976, esta espécie é muito importante na medicina popular onde sua casca e raiz são cozidas e usadas no tratamento de blenorragia e leucorréia e as folhas podem ser utilizadas durante banhos semicúpios auxiliando na inflamação de órgãos internos e no tratamento de hemorroidas sangrentas. A infusão da casca é utilizada no tratamento de câncer, reumatismo, gastrite, úlcera, azia, tosse e gripe (JÚNIOR, L. R. P. *et al.*, 2014; ROQUE; ROCHA, R. M.; LOIOLA, 2010), além de tratar inflamação de órgãos internos (CARTAXO; SOUZA; ALBUQUERQUE, 2010).

Alguns estudos demonstraram importantes atividades biológicas para diferentes órgãos de *T. gardneriana* (casca, folhas e sementes), conforme a tabela abaixo:

Tabela 1 - Atividades biológicas de diferentes órgãos de *Triplaris gardneriana* Wedd.

Atividade biológica	Tipo de Extrato	Órgão da planta	Referência
Atividade molusciscida	Extrato etanólico	Casca do tronco	SOUZA E ROUQUAYROL, 1974
Estimulante da musculatura lisa e toxicidade	Extrato aquoso	Casca do caule	BARROS <i>et al.</i> , 1970
Atividade antibacteriana, antioxidante e anticolinesterásica	Extrato etanólico	Sementes	FARIAS <i>et al.</i> , 2013.
Atividade antioxidante e fotoprotetora	Extrato etanólico bruto e frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e metanólica	Folhas	MACÊDO <i>et al.</i> , 2015
Atividade antibacteriana moderada	Óleo fixo das folhas e sementes	Folhas e Sementes	MACÊDO <i>et al.</i> , 2016
Atividade antioxidante	Extrato etanólico	Sementes	ALMEIDA <i>et al.</i> , 2017

Em relação à bioacessibilidade, Neto et al. (2017) constatou em seu trabalho que os compostos fenólicos encontrados no extrato etanólico das sementes de *T. gardneriana* são instáveis em condições gastrointestinais, sendo os flavonoides os compostos com maior bioacessibilidade. Além disto, neste mesmo estudo também foi demonstrado uma biodisponibilidade limitada devido à sua rápida biotransformação e eliminação pela urina.

Diante disto, é possível constatar a existencia de estudos demonstrando algumas atividades biológicas em diferentes órgãos desta espécie, contudo pouco se sabe sobre a sua segurança.

2.4 PLANTAS MEDICINAIS

O uso de plantas com fins medicinais, para prevenção, tratamento e cura de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (MACIEL, et al., 2002). Diversos extratos obtidos de espécies de plantas são utilizados na medicina popular no tratamento de diferentes patologias (STEPP, 2004; SOUZA & LORENZI, 2005). As comunidades locais do Semiárido brasileiro vêm utilizando amplamente a sua flora, possuindo desta forma uma vasta farmacopeia natural (GOMES et al., 2008).

Cerca de 25% dos medicamentos prescritos no mundo são obtidos de plantas e dos 252 medicamentos considerados essenciais pela Organização Mundial da Saúde (OMS), 11% são provenientes dos vegetais (RATES, 2001). Muitos compostos importantes na farmacologia como a muscarina, canabinóides, fisostigmina, entre outros, são de origem vegetal (WILLIAMSON; OKPAKO; EVANS, 1996). Dentre os muitos exemplos de medicamentos obtidos a partir de plantas medicinais, destacam-se os clássicos: Morfina, extraída da *Papaver somniferum*.; digoxina, extraída da *Digitalis spp* (FOGLIO, et al., 2006), atropina extraída da *Atropa beladonna* e quinina extraída da *Cinchona spp* (RATES, 2001).

As plantas medicinais podem ser utilizadas por diferentes formas, desde a sua forma *in natura*, para a preparação de infusões e chá, como na forma de extratos brutos ou frações, drogas pulverizadas, tinturas ou até mesmo comprimidos e cápsulas. A investigação biológica dos vegetais geralmente envolve diversos processos, como a caracterização fitoquímica da planta, a realização de bioensaios e estudo de toxicidade em animais (Figura 2) (RATES, 2001).

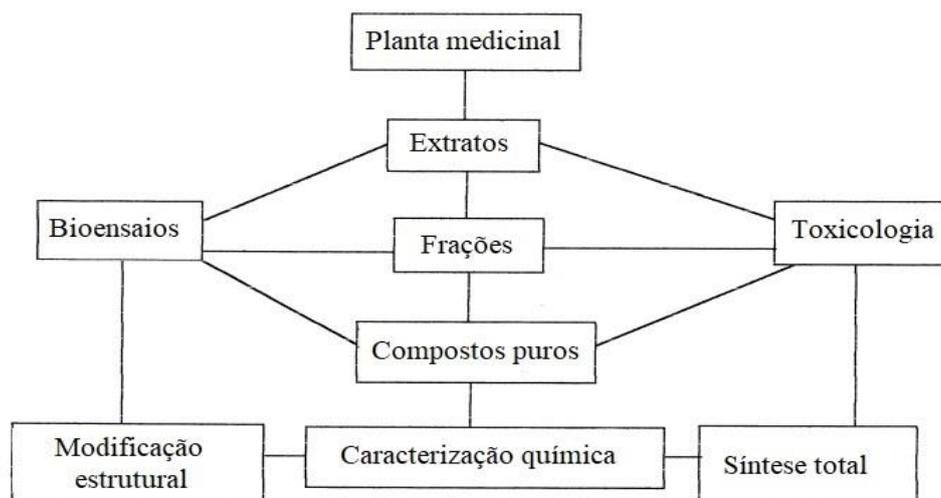


Figura 3 - Métodos para a obtenção de compostos ativos das plantas medicinais. Fonte: Adaptado de RATES (2001).

Apesar da grande variedade de medicamentos alopáticos, a utilização das plantas medicinais é bastante comum, principalmente em locais onde a população não tem acesso as terapias convencionais devido ao seu alto custo (OMS, 2013). Paralelamente a grande biodiversidade e a ampla utilização das plantas brasileiras na medicina popular, estas ainda são pouco exploradas no que diz respeito à sua segurança, reforçando assim a importância da pesquisa nesta área a fim de assegurar à população um consumo seguro e sem risco.

2.5 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

O metabolismo caracteriza o conjunto de reações químicas que ocorre continuamente dentro nas células. Os compostos químicos formados, transformados ou degradados são chamados de metabólitos (SIMÕES et al., 2010).

Nas células vegetais, o metabolismo pode ser dividido em primário e secundário, dependendo da fisiologia da planta. O metabolismo primário é essencial à vida de todas as espécies, onde substâncias como carboidratos, lipídeos, proteínas, clorofila ou ácidos nucleicos são responsáveis pelo desenvolvimento e manutenção celular (HARTMANN, 1996) Os metabólitos secundários são moléculas pequenas que a princípio não são essenciais para a vida, mas contribuem para a sobrevivência e adaptação das espécies além de suas atividades terem grande importância em outros organismos (HANSON, 2003), destacando-se devido seus efeitos biológicos sobre a saúde humana (PEREIRA, R. J.; CARDOSO, 2012). Estes consistem

principalmente nos grupos: terpenóides e esteroides, fenilpropanóides (compostos fenólicos), alcaloides, derivados de ácidos graxos e policetídeos, polipeptídeos não ribossomal e cofatores enzimáticos (MCMURRY, 2010).

Acreditava-se que estes metabólitos eram produtos sem valor ou “lixo celular”, proveniente de erro metabólico, excreta, desintoxicação ou super-expressão proteica (SWAIN, 1977). No entanto, os metabólitos secundários contribuem para a saúde da planta, atuando na defesa como antibióticos, antifúngicos, antivirais patógenos (BOURGAUD *et al.*, 2001), contra pragas, proteção contra radiação ultravioleta e temperaturas extremas, atração de polinizadores, dentre outros, mantendo a integridade da planta contra predadores e patógenos (HARTMANN, 1996). A figura 4 representa alguns compostos gerados no metabolismo secundário e alguns produtos adaptativos das plantas.



Figura 4 - Representação de alguns compostos originados no metabolismo secundário de plantas. Fonte: HARTMANN (1996).

Muitas propriedades terapêuticas identificadas nas plantas medicinais estão relacionadas com os compostos formados a partir do metabolismo secundário (AMEH *et al.*, 2010). Kaufman *et al.* (1999), acreditam que a importância ecológica dos produtos secundários possa estar relacionada ao potencial efeito medicinal. Como por exemplos, estes autores citam os metabólitos secundários citotóxicos à patógenos microbianos nocivos as plantas, que poderiam desempenhar propriedades antimicrobianas em humanos. Da mesma forma, os metabólitos secundários com potencial neurotóxico utilizado na defesa contra herbívoros,

poderiam agir no sistema nervoso central e ser úteis como antidepressivos, sedativos, anestésicos ou relaxantes musculares.

A síntese de metabólitos secundários pode sofrer influência de fatores bióticos (herbivorismo, ação antrópica, alelopatias e outros) e abióticos (condições climáticas, radiação ultravioleta, disponibilidade hídrica e outros) (figura 5), que por sua vez interferem na quantidade e qualidade de produtos secundários resultantes do metabolismo da planta (GOBBO-NETO, L. E LOPES, N.P., 2007). Diante disto, a forma de coleta e quando foi realizada são condições importantes que impactam diretamente na produção desses compostos (SIMÕES et al., 2010).

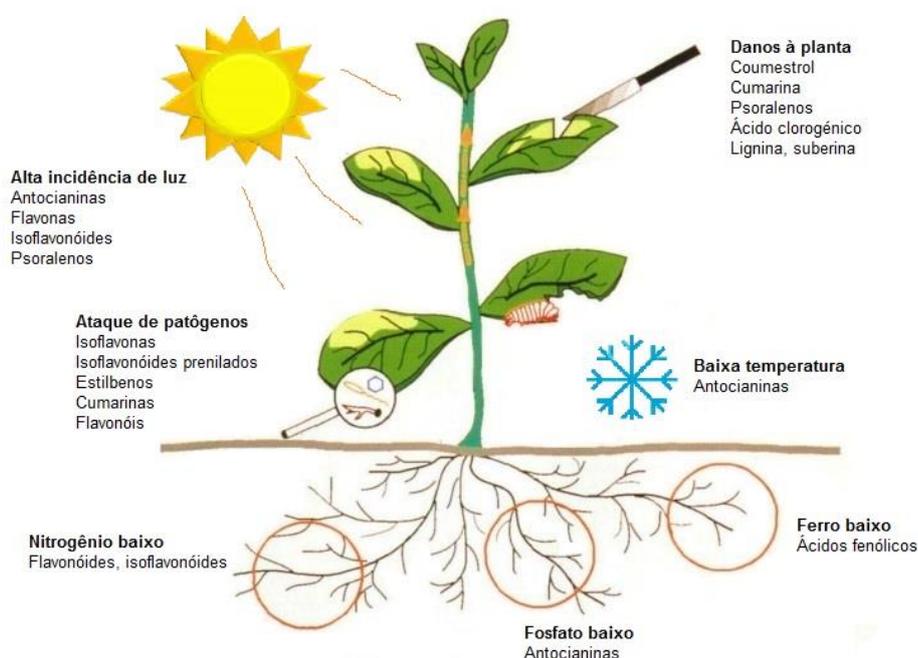


Figura 5 - Principais fatores que podem influenciar na produção de alguns metabólitos secundários. Fonte: Adaptado de DIXON; PAIVA (1995).

Os metabólitos secundários são classificados em terpenos, compostos fenólicos e alcaloides, cuja sua formação ocorre através de várias rotas (Figura 6). Os terpenos são provenientes do ácido mevalônico, no citoplasma, ou do piruvato e 3-fosfoglicerato, no cloroplasto. Os compostos fenólicos são produzidos a partir do ácido chiquímico e ácido mevalônico. Os alcaloides são derivados de aminoácidos aromáticos, cuja produção ocorre a partir do ácido chiquímico e de aminoácidos alifáticos (PERES, 2004). Todas estas classes desempenham significativa propriedade antioxidante, porém os compostos fenólicos são os principais responsáveis pelo desempenho desta atividade (BOUKHRIS et al., 2012).

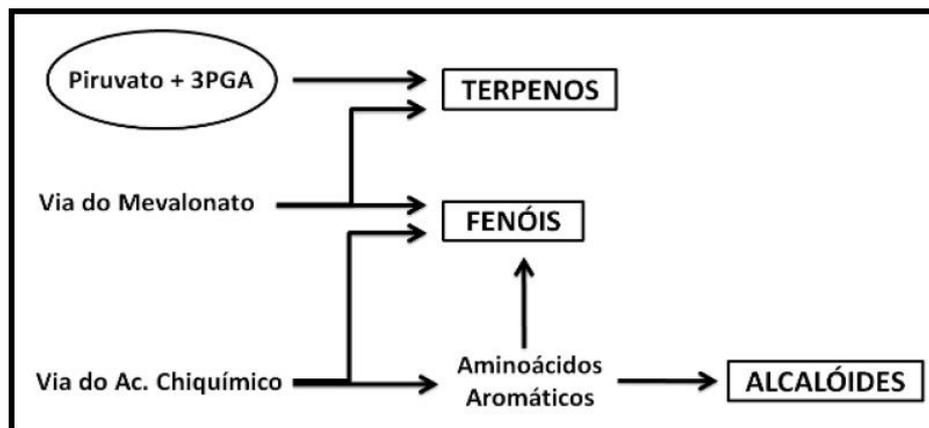


Figura 6 - Principais vias do mecanismo de biossíntese dos metabólitos secundários. Fonte: adaptado de PERES (2004).

A abrangente atuação dos produtos secundários salienta a importância da identificação destes compostos, sendo fundamental para o desenvolvimento científico das plantas medicinais vegetais. Assim, é possível verificar o efeito farmacológico, a presença de substâncias tóxicas, além do conhecimento de novas moléculas (PINTO; CARDOSO; ARRIGONI-BLANK, 2009).

2.6 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos estão presentes em todos os órgãos da planta, sendo encontrados em diversos alimentos, fazendo assim parte da dieta humana. Tal presença contribui para potenciais efeitos sobre a saúde humana, devido a sua ação antioxidante e habilidade de combate aos radicais livres (BRAVO, 2009; SHAHIDI; WANASUNDARA, 1992).

Esses compostos possuem em sua estrutura química pelo menos um anel aromático, onde um ou mais hidrogênios são substituídos por um grupamento hidroxila (SIMÕES *et al.*, 2007). A sua biosíntese ocorre através de duas rotas: a rota do ácido chiquímico e a do ácido malônico (Figura 7) (GARCÍA; CARRIL, 2009). Os compostos fenólicos podem estar complexados a proteínas, carboidratos e outros componentes vegetais ou apresentar-se em sua forma livre, resultando em vários compostos fenólicos na natureza (ROBBINS, 2003). Estes compreendem desde moléculas simples até moléculas com elevado grau de polimerização (BRAVO, 1998).

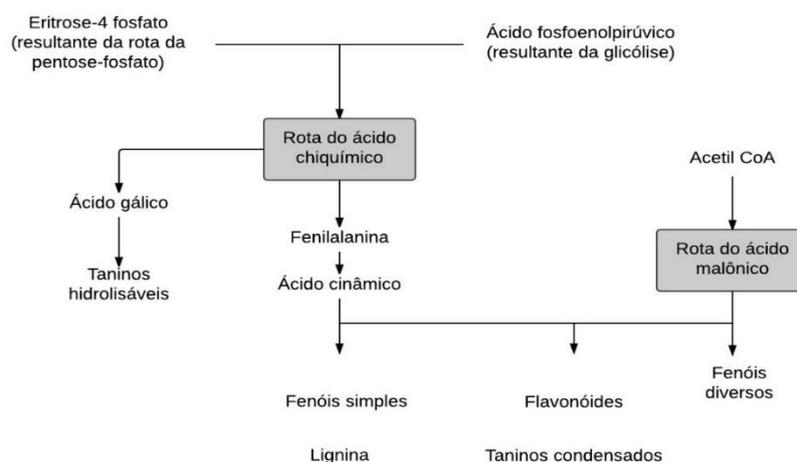


Figura 7 - Síntese dos compostos fenólicos. Fonte: Adaptado de GARCÍA; CARRIL (2009).

Desempenham muitas funções importantes nos vegetais, como a proteção contra raios UV, insetos, fungos, vírus e bactérias. Alguns vegetais sintetizam os compostos fenólicos a fim de inibir o crescimento de plantas competidoras (PERES, 2004).

Estes compostos são classificados em dois grandes grupos: fenóis simples, com um único anel aromático, constituídos de uma ou mais hidroxilas substituintes e os polifenóis, apresentando duas ou mais unidades monoméricas, fenólicas, até compostos poliméricos (HARBORNE, 1994)

Possuem uma grande diversidade estrutural, sendo classificados de acordo com a cadeia carbônica principal, conforme a tabela 2 (LEMOS, 2008).

Tabela 2 - Classificação dos compostos fenólicos de acordo com a cadeia principal.

ESTRUTURA	CLASSE
C ₆	Fenóis
C ₆ -C ₁	Ácidos hidroxibenzóicos
C ₆ -C ₃	Acetofenonas, ácidos fenilacéticos e hidroxicinâmicos, cumarinas e cromonas
C ₆ -C ₄	Naftoquinonas
C ₆ -C ₁ -C ₆	Benzofenonas e xantonas
C ₆ -C ₂ -C ₆	Estilbenzenos e antraquinonas
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonóides: flavonóis, antocianinas, flavonas, flavanonas, flavanóis e isoflavonas
(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonóides
(C ₆ -C ₁) _n	Taninos hidrolisáveis
(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Taninos condensados ou proantocianidinas

Legenda: C₆ – anel benzênico

Já se sabe que os compostos fenólicos desempenham importantes propriedades terapêuticas nos seres humanos, como: antialérgica, anti-inflamatória, antimicrobiana, anticarcinogênica, cardioprotetora e vasodilatadora (MIDDLETON; KANDASWAMI, 1994; BENAVENTE-GARCIA et al., 1997; SAMMAN et al., 1998; PUUPPONEN-PIMIA et al., 2001).

Além destas propriedades, possuem um alto potencial antioxidante destacando-se como o mais ativo e frequentemente encontrados nos vegetais. Tal atividade é atribuída principalmente à sua estrutura química e propriedades redutoras, agindo na quelação de metais de transição e no sequestro ou neutralização dos radicais livres (DECKER, 1997; SOARES, 2002; CHUN et al., 2005).

2.7 FLAVONOIDES

Os flavonoides constituem o grupo mais importante de compostos fenólicos, com mais de 8.000 compostos descritos (PEREIRA; CARDOSO, 2012). São formados por dois anéis aromáticos (anéis A e B) ligados por um anel heterocíclico, chamado de anel C, onde as mudanças e substituições deste anel originam as subclasses flavonóis, flavonas, flavononas, catequinas, isoflavonas e antocianidinas. Além disto, a estrutura básica dos flavonoides (Figura 8) propicia uma variada quantidade de padrões de substituição nos anéis A e B dentro de cada classe de flavonoides (HOLLMAN; KATAN, 1999).

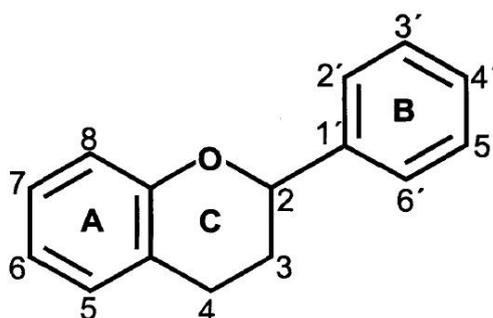


Figura 8 - Estrutura básica dos flavonoides. Fonte: HOLLMAN; KATAN (1999).

Os flavonoides geralmente ocorrem como glicosídeos, porém também podem ocorrer como agliconas ou como parte de outra estrutura que possua flavonoide, como as flavoliginanas. São subdivididos em 13 classes, destacando-se mais de 5000 compostos já descritos até 1990. Estes compostos são subdivididos em classes, conforme o grau de

insaturação e oxidação do anel C (BRAVO, 1998). As principais classes dos flavonoides estão demonstradas na Figura 9.

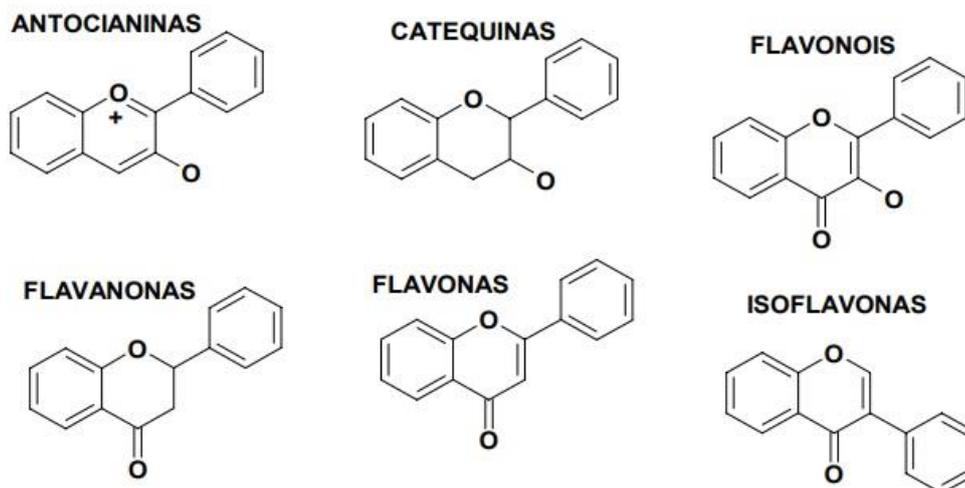


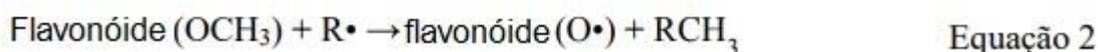
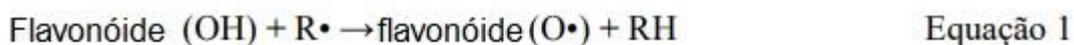
Figura 9 - Estruturas das principais classes dos flavonoides. Fonte: SHAHIDI; NACZK (2004).

Os flavonoides desempenham importantes funções na fisiologia vegetal, uma delas é a proteção contra agente oxidantes, como o raio ultravioleta B, onde formam pigmentos que absorvem a radiação UV-B, atuando como filtro e evitando a incidência destes em moléculas celulares como o DNA (DÔRES, 2007). Atuam como agente de defesa contra microorganismos fitopatogênicos e insetos, agindo como defensores naturais das plantas (ZUANAZZI, 2000; YAO-LAN et al., 2002).

Além disto, os flavonoides têm efeitos comprovados no organismo humano, como ação antiinflamatória, antimicrobiana, antivirais, antialérgica, atuam sobre vários estágios do processo de carcinogênese, na hemostasia dos sistemas celulares e também do sistema imunológico (MIDDLETON; KANDASWAMI, 1994; LOPES et al., 2000). Estudos mostraram que os flavonoides têm efeitos inibitórios e algumas vezes estimulatórios sobre uma grande quantidade de enzimas. Algumas delas estão envolvidas em importantes vias que regulam a agregação plaquetária, a proliferação e a divisão celular, a resposta imune, a inflamação e desintoxicação (HOLLMAN; KATAN, 1999).

A atividade antioxidante é a mais difundida dos flavonoides. Está comprovado que estes compostos possuem ação antienvhecimento, através da inibição da enzima responsável pela oxidação dos tecidos (xantina oxidase) (DÔRES, 2007). Eles estabilizam radicais livres do processo oxidativo pela hidrogenação ou complexação com espécies oxidantes e/ou inativam

oxigênio singleto, ânions superóxido, radicais peróxidos de lipídios. São doadores de elétrons, através de sua estrutura química rica em hidroxilas, conforme as equações 1 e 2 abaixo (MACHADO et al., 2008):



2.8 RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO

Os radicais livres são átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons não pareados na sua órbita externa, atuando como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações fundamentais ao metabolismo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). São produzidos constantemente durante os processos metabólicos no organismo humano, onde são suscetíveis à reagirem com outras moléculas devido a sua alta instabilidade e reatividade (CHEESEMAN; SLATER, 1993).

Esses radicais encontram-se envolvidos em diversos papéis no organismo como na síntese de energia, fagocitose, produção de substâncias biológicas, sinalização intercelular e regulação do crescimento celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE; CROSS, 1992), além disso, alguns fatores externos corroboram para a sua produção como: a radiação, o uso demasiado de medicamentos, o fumo, os poluentes ambientais, os pesticidas e os solventes industriais (EBADI, 2001). Os radicais livres podem reagir com as moléculas doando e aceitando elétrons, através de reações de auto-aniquilação, abstração de hidrogênio, desproporções e reações de adição (SLATER, 1984).

As espécies reativas são produzidas constantemente no organismo durante o metabolismo celular normal, incluindo as espécies reativas de oxigênio (EROs), espécies reativas de enxofre (ERSs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs). A produção de EROs ocorre como consequência do metabolismo aeróbico, incluindo os reativos como o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxil ($\text{OH}\cdot$), radical hidroperoxil ($\text{HOO}\cdot$), o óxido nítrico (NO) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Os reativos ERNs derivam do NO através da reação com

oxigênio e formação de ONOO^- e as ERSs são formadas através da reação com radicais tióis com as EROs (LÜ *et al.*, 2010).

Para a preservação de um sistema biológico, o equilíbrio entre a oxidação e a antioxidação é bastante crítico, onde a produção excessiva de radicais livres provoca um desequilíbrio nesse mecanismo levando ao estresse oxidativo (LETELIER *et al.*, 2008). Os principais alvos das espécies reativas são as moléculas de DNA e RNA, proteínas, lipídeos, açúcares (LÜ *et al.*, 2010) (Figura 10). A superprodução dos radicais livres conduz efeitos deletérios que alteram a estrutura e funções celulares e conseqüentemente contribuem para diversas patologias como o câncer (KINNULA; CRAPO, 2004), doenças hepáticas (ARTEEL, 2003), doenças cardiovasculares (SINGH; JIALAL, 2006), colite ulcerativa (RAMAKRISHNA *et al.*, 1997), aterosclerose (UPSTON; KRITHARIDES; STOCKER, *et al.*, 2003), envelhecimento (HYUN *et al.*, 2006), distúrbios neurais (SAS *et al.*, 2007), doença de Parkinson (BOLTON *et al.*, 2000), Alzheimer (SMITH *et al.*, 2000), comprometimento cognitivo (GUIDI *et al.*, 2006), dentre outras doenças idade-dependente (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; RAHMAN, 2007).

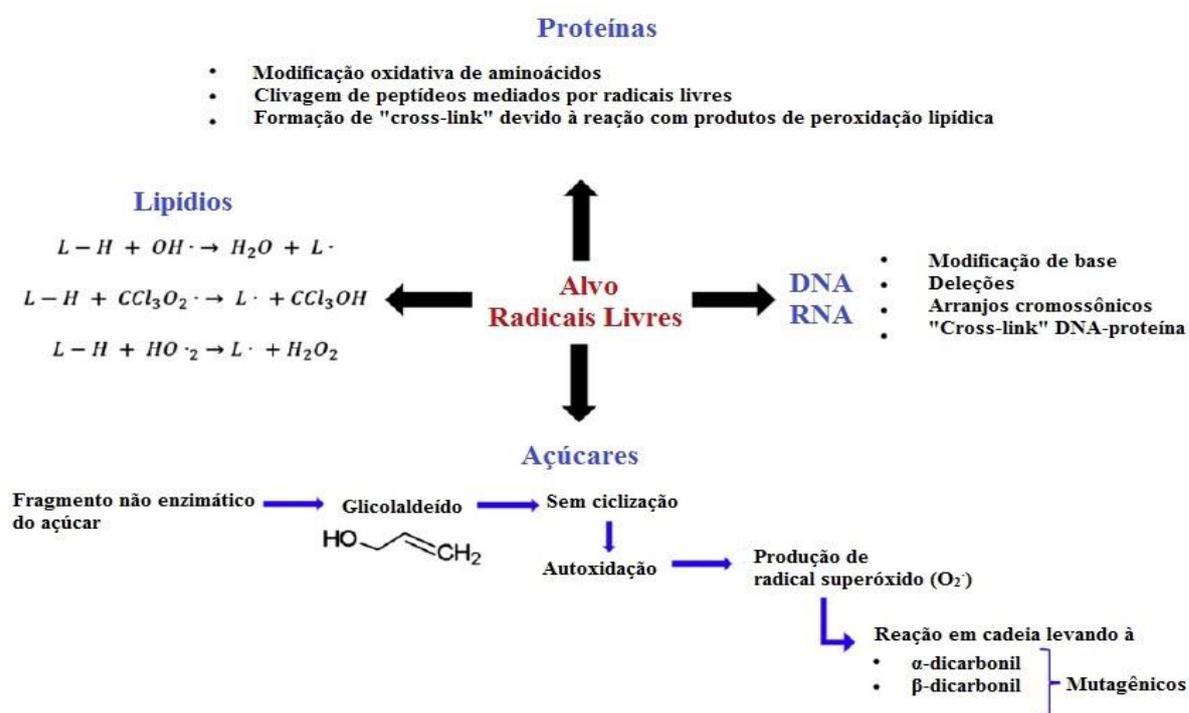


Figura 10 - Principais alvos dos radicais livres. Adaptado de Dizdaroglu *et al.* (2002), Valko *et al.* (2004), Benov e Beea (2003), Halliwell e Chirico (1993) e Lobo *et al.* (2010). Fonte: CAROCHO (2013).

2.9 ANTIOXIDANTE

Diante das descobertas sobre o impacto dos radicais livres no organismo, os estudos sobre os antioxidantes são bastante promissores atualmente (BARREIROS; DAVID, 2006). Um antioxidante é qualquer substância que em baixa concentração, no que se refere ao substrato oxidante, diminui a oxidação do substrato ou o regenera (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). O sistema de defesa antioxidante pode atuar de diferentes formas para preservar o equilíbrio entre radicais livres e estresse oxidativo, dentre elas: agem como desativadores de oxigênio singlete; como antioxidantes de quebra de cadeia; impedindo a formação de radicais livres; inibidores de enzimas pró-oxidativas; pela conversão de hidroperóxidos e metal pró-oxidante em compostos estáveis e pelo sinergismo com outros antioxidantes (DARMANYAN *et al.*, 1998; HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002; KANCHEVA, 2011; MIN; BOFF, 2002; POKORNY, 2007).

Os antioxidantes podem ser de origem natural ou sintética (CHEUNG, L. M.; CHEUNG, P. C. K.; OOI, 2003). Os naturais dividem-se em enzimáticos e não enzimáticos (Figura 11). Dentre os enzimáticos, os mais eficazes são a glutatona peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD), e catalase (CAT) (MATÉS; PÉREZ-GÓMEZ; DE CASTRO, 1999). Os não enzimáticos são a vitamina C e E, melatonina, carotenoides, antioxidantes tiol (Glutationa, tiorredoxina e ácido lipóico), flavonoides naturais, dentre outros compostos (MCCALL; FREI, 1999). Além disto, alguns antioxidantes podem ser endógenos ou obtidos através da dieta ou de suplementos. Os antioxidantes endógenos desempenham um importante papel na preservação da saúde sistêmica. Contudo, estes antioxidantes não são suficientes sob condições que provocam o estresse oxidativo, sendo necessário o auxílio dos antioxidantes dietéticos para a manutenção da saúde e função celular (RAHMAN, 2007).

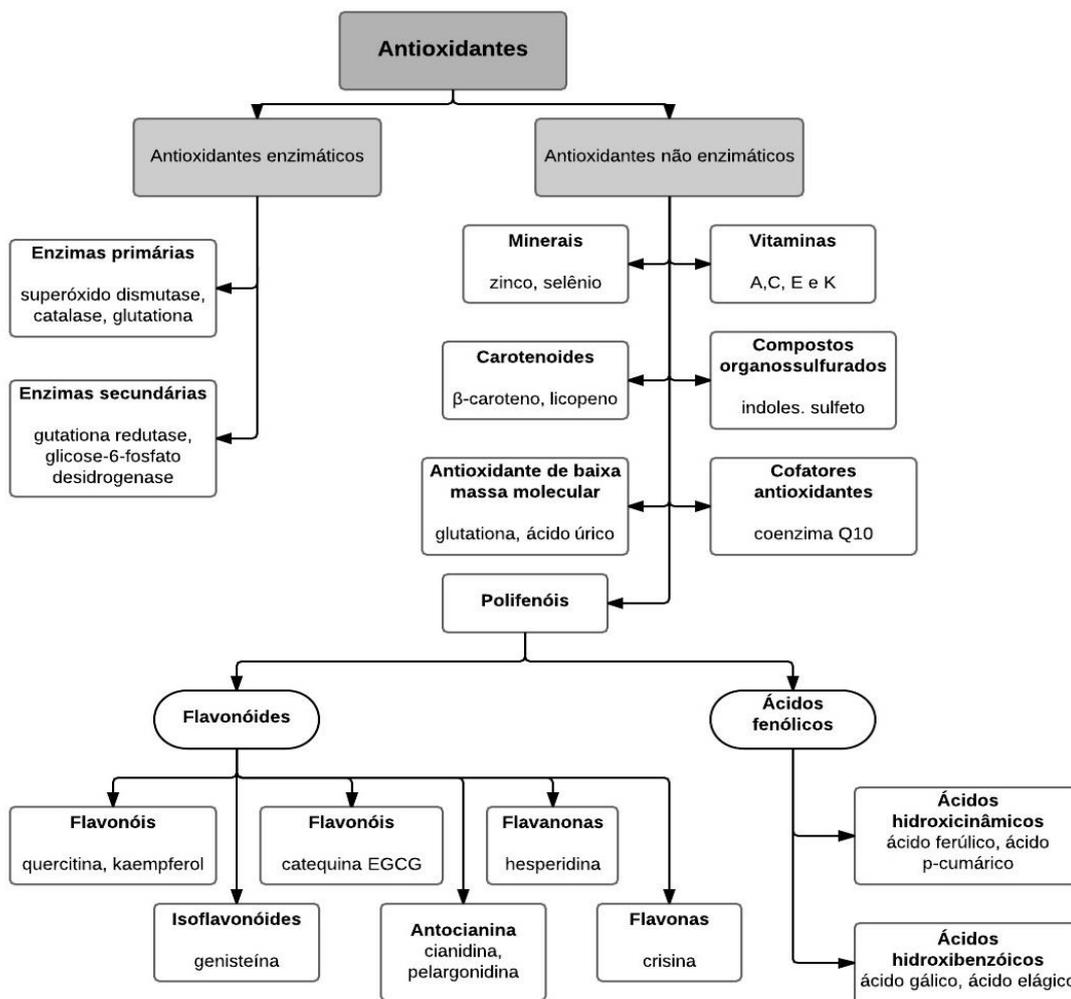


Figura 11 - Classificação dos antioxidantes. Fonte: Adaptado de RATNAM (2006).

Os antioxidantes sintéticos são muito utilizados pelas indústrias, como por exemplo, na indústria alimentícia como adjuvantes na manutenção dos alimentos e possíveis inibidores da peroxidação lipídica (SCHERER; GODOY, 2009). Contudo, estudos mostram que muitos antioxidantes sintéticos podem apresentar efeitos tóxicos, podendo atacar alvos biológicos, como por exemplo, o galato de propila (GP) que reage com íons ferrosos, em presença de peróxido de hidrogênio, formando espécies reativas de oxigênio (HASLAM, 1996; SOARES, 2002). Alguns antioxidantes sintéticos utilizados na indústria alimentícia, como o butilhidroxianisol e butil-hidroxitolueno, podem provocar lesões hepáticas e carcinogênese devido ao seu acúmulo no corpo (LUO; FANG, 2008; VALENTÃO *et al.*, 2002).

Os antioxidantes naturais podem ser encontrados em alguns alimentos e plantas onde demonstraram efeitos significativos no combate aos radicais livres, além de seu potencial nutritivo e terapêutico (AMES; SHIGENAGA; HAGEN, 1993; STEINBERG, 1991). Diante

disto, as pesquisas atuais têm buscado a ação antioxidante nos produtos naturais a fim de substituir os sintéticos na proteção contra os radicais livres e no retardo do avanço de muitas doenças crônicas (SOUSA *et al.*, 2007; SUN *et al.*, 2011).

2.10 RESISTÊNCIA BACTERIANA

As infecções bacterianas sempre despertaram grande preocupação na população, causando mortalidade e morbidade significativas. O grande avanço no desenvolvimento de drogas antimicrobianas em meados do século 20, contribuiu momentaneamente para o controle destas patologias, como na liberação da penicilina na década de 1940. No entanto, pouco tempo depois as bactérias desenvolveram várias formas de resistência e assim despertaram uma grande preocupação mundial (TENOVER, 2006).

Atualmente as doenças infecciosas causadas por bactérias é um problema de saúde pública, que afetam grande parte da população mundial sendo uma das principais causas de morte. Apesar da disponibilidade de antibióticos contra muitas bactérias, o índice de mortalidade permanece alto. De acordo com a OMS, estas doenças representam cerca de 26% da mortalidade mundial, onde causaram 14,7 milhões de mortes em 2001 (BECKER; HU; BILLER-ANDORNO, 2006). Segundo o Ministério da Saúde, mais de 70% das bactérias que causam infecções hospitalares no Brasil são resistentes a pelo menos um antibiótico utilizado rotineiramente (MARTINS; NOGUEIRA; CONCEIÇÃO, 1998).

A medida que a utilização irresponsável e indiscriminada de antibióticos aumenta, as bactérias se tornam cada vez mais resistentes, assim como a complexidade dos mecanismos de resistência (KRAUSE, 1992). Algumas bactérias podem ser inatamente resistentes a um determinado antimicrobiano e neste caso todas as cepas desta espécie são resistentes a esta classe antibacteriana. Há também as que se tornam resistentes à um composto antimicrobiano onde se proliferam sob a pressão seletiva do uso deste composto. As bactérias podem desenvolver a resistência aos antimicrobianos por meio de vários mecanismos. Podem adquirir os genes codificantes de enzimas como por exemplo as lactamases, que destroem compostos antimicrobianos antes de desempenharem seus efeitos, tornando a droga inativa. Outra forma de resistência é quando as bactérias desenvolvem bombas de efluxo que expulsam os agentes antibacterianos da célula antes que possam alcançar seu alvo. As bactérias também podem desenvolver genes que produzem as paredes das células bacterianas alteradas, sem o sítio de ligação dos compostos antimicrobianos tornando-a impermeável às drogas ou ainda podem

adquirir mutações que limitam os acessos desses compostos ao seu alvo intracelular (TENOVER, 2006).

A maioria dos antimicrobianos utilizados no tratamento das infecções bacterianas possuem uma classificação de acordo com o seu mecanismo de ação. Os principais mecanismos de ação compreendem a interferência da síntese da parede celular, inibição da síntese de proteína, interferência da síntese de ácidos nucleicos, inibição da via metabólica e rompimento da estrutura da membrana bacteriana (NEU, 1992). Os compostos naturais normalmente agem por desintegração da membrana citoplasmática, fluxo de elétrons, desestabilização de força próton motriz (FPM), coagulação do conteúdo da célula e transporte ativo. O mecanismo de ação pode não agir em alvos específicos, podendo outros mecanismos afetar alguns sítios como consequência. Os sítios de ação dos produtos naturais, estruturas ou locais da célula bacteriana, estão demonstrados na figura 12. (BURT, 2004).

Diante disto, a resistência bacteriana se tornou um problema mundial de saúde pública e a perspectiva do uso de drogas antimicrobianas no futuro ainda é incerto. Portanto, ações devem ser tomadas a fim de reduzir esta problemática, como controlar o uso de antibióticos, desenvolver pesquisas para melhor compreender os mecanismos genéticos de resistência e sobretudo aumentar as pesquisas de novas drogas (NASCIMENTO et al., 2000). Por este motivo, a busca de novas compostos antimicrobianos tornou-se uma considerável alternativa (FERREIRA, 2004). Muitos estudos, em diferentes países, mostraram uma eficiente propriedade antimicrobiana em extratos vegetais, ressaltando a importância destes nos tratamentos terapêuticos (ARTIZZU, et al., 1995; GRAHAM, et al., 2003; IZZO, et al., 1995; KUBO; MUROI; HIMEJIMA, 1993; SHAPOVAL, et al., 1994).

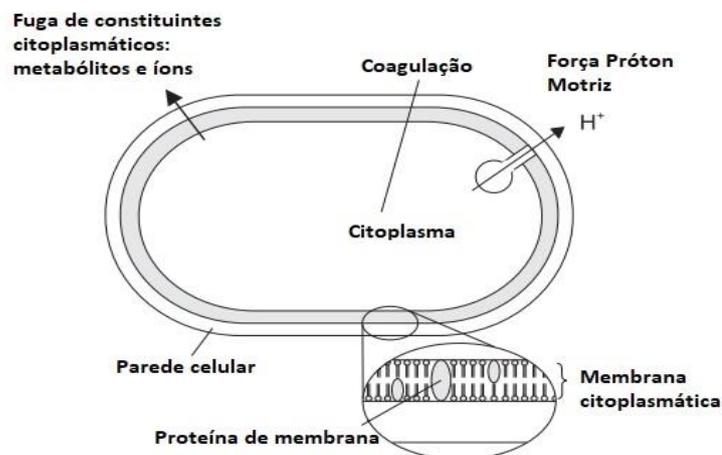


Figura 12 - Locais e mecanismos na célula bacteriana que podem ser sítios de ação dos compostos naturais. Fonte: Adaptado de BURT (2004).

2.11 SISTEMA IMUNOLÓGICO

O sistema imune é constituído por moléculas endógenas capazes de distinguir elementos estranhos ao organismo, daqueles que são próprios, além de controlar invasores. Isto se dá por diferentes mecanismos, incluindo barreiras físico-químicas, físicas, químicas, sistema fagocítico, citotoxicidade mediada por células NK, moléculas circulantes do sistema completo e de anticorpos (STITES, TERR., 1995). Além disto, possui uma cadeia complexa e fortemente regulada de várias células linfoides e outras células que interagem por contato célula a célula e por comunicação através de mediadores solúveis, como por exemplo, as citocinas (HERZYK; GORE, 2004).

A estimulação das respostas imunes ocorre frente a uma ameaça ao organismo. As células envolvidas nestas respostas possuem a função de regular, suprimindo ou estimulando a resposta imunológica, através de substâncias imunomoduladoras (HOLLAND, VIZI; 2002). Os imunomoduladores podem agir aumentando (imunoestimulantes) ou diminuindo (imunossuppressores) a resposta de defesa do hospedeiro. Dentre eles se destacam as proteínas formadas a partir da ativação do sistema imunológico, as drogas sintéticas ou naturais, além dos produtos de origem vegetal e microbiana (MASIHI, 2000).

As plantas medicinais são potenciais fontes de substâncias químicas com propriedades na imunomodulação da resposta imune (BASSO et al., 2005). Diversas plantas da medicina popular e indígena destacam-se como fontes de variadas substâncias com atividade imunomoduladora, como as lectinas, saponinas, polissacarídeos, peptídeos, dentre outras (NUNES-PINHEIRO et al., 2003). Diante disto, estes estudos têm fomentado um grande interesse como uma alternativa frente aos métodos terapêuticos tradicionais (MEHROTRA et al., 2003).

O uso de substâncias com potencial efeito imunotóxico pode resultar em variados efeitos adversos. A investigação de novas substâncias e medicamentos quanto a sua segurança e eficácia deve incluir estudos pré-clínicos para a investigação de efeitos imunotóxicos e imunomoduladores (PUTMAN et al., 2002). Diversos testes podem ser utilizados na avaliação de potenciais efeitos imunotóxicos e imunomoduladores de novas drogas, substâncias, produtos vegetais e químicos, dentre outros (LUSTER et al., 1992).

Uma das formas de investigar a atividade imunomoduladora de algum composto é através da investigação da proliferação celular de esplenócitos (SILVA et al., 2011). A capacidade de indução de apoptose e necrose é bastante utilizada como indicador de viabilidade

celular, a fim de avaliar se a citotoxicidade foi induzida por alguma substância (ELMORE, 2006; FIGUEIRÔA et al., 2013; MELO et al., 2011).

2.12 ESTUDO TOXICOLÓGICO

Uma substância é considerada tóxica quando uma determinada dose causa um desequilíbrio homeostático, desencadeando patologias ou até mesmo a morte (VEIGA JR.; PINTO; MACIEL, 2005). Toda substância pode provocar efeitos colaterais, onde a dose irá definir tal substância como medicamento ou como agente tóxico (NIGGEMANN; GRÜBER, 2003).

A toxicidade causada por uma planta medicinal pode ser contribuída por diversos fatores. Dentre eles, se destacam a adulteração da planta, sazonalidade, identificação botânica divergente, ausência de padronização na coleta. A falta de controle de qualidade durante a coleta pode corroborar para contaminações com microorganismos, pesticidas, toxinas e metais pesados (VEIGA JR.; PINTO; MACIEL, 2005). Além destes fatores, a forte crença popular de que as plantas são inofensivas devido a sua origem natural (DENG, 2002; SAAD et al., 2006) e a automedicação (STICKEL; PATSENKER; SCHUPPAN, 2005) também propiciam os efeitos nocivos.

Diversos estudos mostram que alguns extratos vegetais detêm substâncias perigosas, que causam efeitos tóxicos quando consumidas (FIGUEIREDO; KAPLAN, 1997; CAPASSO et al., 2000; GUIL, RODRIGUEZ-GARCIA, TORIJA, 1997; LOEPER et al., 1994). Diante disto, tornam-se essenciais os estudos multidisciplinares para investigar os potenciais efeitos terapêuticos e tóxicos das plantas medicinais.

O ensaio de toxicidade oral aguda permite avaliar os possíveis efeitos toxicológicos *in vivo* de um composto, estipulando uma dose segura para a utilização oral. Adicionalmente, este estudo avaliar a mortalidade, os parâmetros bioquímicos, as condições macroscópicas ou histopatológicas dos órgãos, variações da massa corporal do animal, assim como do consumo de água e ração (KIM et al., 2008). O guia 423 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico estabelece um protocolo para a análise da toxicidade aguda de compostos, onde o ensaio é realizado a partir da administração oral do produto na dose de 2000 mg/kg (figura 13) (OECD, 2001).

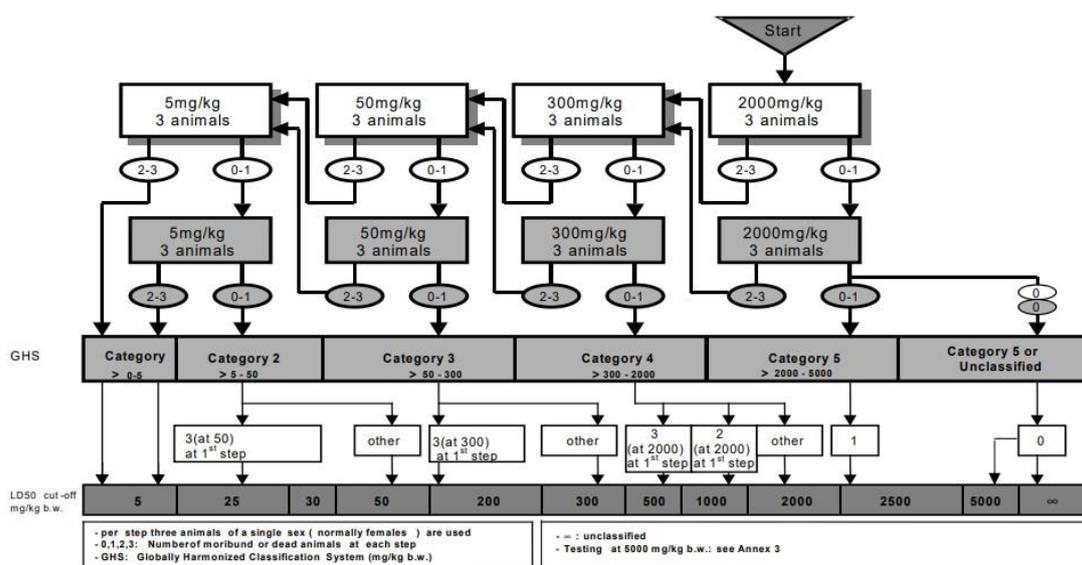


Figura 13 - Avaliação da toxicidade oral aguda. Fonte: OECD (2001).

Os efeitos toxicológicos causados pelos vegetais podem não ser imediatamente identificados e correlacionados ao seu consumo, podendo ser observados a longo prazo, causar alterações no material genético e efeitos carcinogênicos (LAPA et al., 2004). Diante disto, a realização de ensaios de toxicidade genética *in vivo* em estudos pré-clínicos são essenciais para verificar a segurança de um determinado composto, avaliando a sua potencialidade genotóxica e mutagênica. (ROTHFUSS et al., 2011).

2.12.1 Ensaio Cometa

A técnica do ensaio cometa foi desenvolvida pela primeira vez em 1984 por Ostling e Johanson, a fim de avaliar a eficácia da quimioterapia e radioterapia em células tumorais humanas, não sendo necessária a utilização de marcadores radioativos, apenas utilizando uma pequena quantidade de células. Neste ensaio, as células eram submetidas à eletroforese, porém somente as rupturas de fita dupla de DNA eram identificadas, isto porque as condições neutras limitavam o teste. (OSTLING; JOHANSON, 1984). Em seguida, Singh et al. (1988) propôs uma versão alcalina do teste, onde constatou um aumento da migração do DNA, com detecção de ruptura tanto de fita dupla quanto simples, além de sítios álcali-lábeis (sítios apurínicos) e crosslink. A versão alcalina do EC possibilitou um ensaio com maior sensibilidade na detecção de agentes genotóxicos, uma vez que a maioria deles induzem quebras de fita simples e/ou sítio álcali-lábeis em maior quantidade do que as quebras de fita dupla (TICE et al., 2000).

O teste consiste na incorporação das células em gel de agarose, lise celular para a remoção de proteínas e exposição a um campo elétrico a fim de permitir que os fragmentos de

DNA quebrados migrem sob condições alcalinas. A migração do DNA cromossomal ocorre do núcleo em direção ao ânodo, semelhante a um cometa devido à “cauda” visualizada no microscópio (OLIVE; FRAZER; BANÁTH, 1993). Desta forma, o dano ao material genético é mensurado pela quantidade e comprimento do DNA na cauda do cometa (LIAO; MCNUTT; ZHU, 2009), onde a análise pode ser realizada visualmente ou pela e imagens por softwares específicos (OECD, 2016).

O ensaio cometa (EC) tornou-se um método padrão e muito utilizado na avaliação de danos do DNA em diversas áreas de aplicação, como na genética toxicológica, biomonitorização humana, testes de genotoxicidade, ecogenotoxicologia e epidemiologia molecular (COLLINS, 2004). Além disto, esta técnica pode ser aplicada na avaliação de xenobióticos alimentares e farmacêuticos, na análise do estresse oxidativo referente às diversas patologias, investigação da atuação de antioxidantes na proteção do DNA e avaliação de danos e reparo do DNA quando exposto à agentes genotóxicos (BRENDLER-SCHWAAB *et al.*, 2005; LOVELL; OMORI, 2008).

A genotoxicidade ocorre quando o genoma é lesionado, podendo refletir em mutações gênicas ou em mudanças na estrutura cromossômica que quando ocorrem em células germinativas, podem se integrar à geração celular seguinte (MOUTSCHEN, 1985). Em comparação com outros testes de genotoxicidade, o EC possui vantagens bem como a utilização de um pequeno número de células para a investigação e identificação de diversos tipos de lesões do DNA, aplicabilidade em inúmeros tecidos animais (BRENDLER-SCHWAAB *et al.*, 2005), pode ser utilizado em ensaios *in vitro* e *in vivo* (HERNANDES *et al.*, 2014; KAHL *et al.*, 2008), é um ensaio de fácil aplicação, baixo custo e que requer pouco tempo para a finalização do procedimento (TICE *et al.*, 2000).

2.12.2 Teste de Micronúcleo

Os micronúcleos (MNs) foram inicialmente descritos no citoplasma de eritrócitos em 1900 por Howell, denominados por ele de “fragmento de material nuclear”, e chamados de “corpúsculos intraglobulares” por Jolly. (KIRSCH-VOLDERS; SOFUNI, *et al.*, 2003). Os MNs eram vistos frequentemente em células após exposição à radiação, resultando a partir de fragmentos acêntricos no estágio tardio da mitose, onde eram excluídos dos dois núcleos da filha, aparecendo como micronúcleos na interfase de uma ou ambas as células filhas (EVANS; NEARY; WILLIAMSON, 1959). Boller e Schmid, (1970) sugeriram pela primeira vez a utilização do termo teste de micronúcleo e juntamente com Heddle, (1973), contribuíram para

o progresso das pesquisas do potencial genotóxico através da utilização de eritrócitos da medula óssea (SCHMID; STAIGER, 1969). VonLedbur e Schmid contribuíram grandemente para a pesquisa de danos citogenéticos através da identificação de MNs nos eritrócitos policromáticos micronucleados (PCE) na medula óssea de roedores (VONLEDEBUR; SCHMID, 1973).

Os MNs ocorrem a partir de lesões estruturais a nível de DNA, cromossomos ou proteínas relacionadas à segregação cromossômica (KIRSCH-VOLDERS; SOFUNI, Toshio; *et al.*, 2003), resultando na formação de um pequeno núcleo ao lado do núcleo principal nas células filhas (como, por exemplo, eritrócitos policromáticos) (Figura 14) (SCHMID, 1975). A formação de MN originada a partir de fragmentos cromossômicos ou da perda de eventos cromossômicos requer uma divisão mitótica ou meiótica (KIRSCH-VOLDERS; SOFUNI, *et al.*, 2003). Isto ocorre porque alguns produtos químicos podem causar mudanças genômicas danificando diretamente o DNA ou através de ligação a proteínas relacionadas com a manutenção de integridade do material genético (FENECH, 2000; KIRSCH-VOLDERS; VANHAUWAERT, A; *et al.*, 2003).

A mutação cromossomal ou a perda do cromossomo são pontos importantes na formação do câncer (FENECH, 2000). O ensaio de MN é um importante biomarcador prévio para a carcinogênese (BONASSI *et al.*, 2007), onde muitos órgãos recomendam a avaliação da genotoxicidade para analisar a potencial carcinogenicidade humana (CIMINO, 2006). Este teste é descrito em guias de organizações científicas como a OECD (OECD, 2016) e é indicado como primeira escolha na investigação *in vivo* de ensaios de genotoxicidade por agências regulatórias, como por exemplo, o FDA, na avaliação da mutagenicidade de xenobióticos (CIMINO, 2006; ICH, 2012).

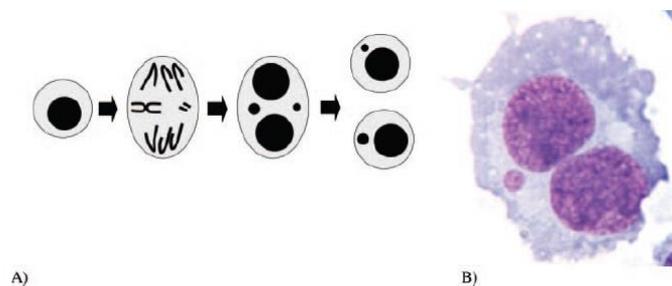


Figura 14 - Formação de micronúcleo – Ruptura ou perda de cromossomos. (A) Diagrama esquemático mostrando a formação de um micronúcleo a partir de um fragmento de cromossomo ou de um cromossomo inteiro. (B) Fotomicrografia de um linfócito contendo um micronúcleo. Fonte: BONASSI *et al.* (2007).

Quando comparado com outros ensaios de genotoxicidade, é possível perceber muitas vantagens na utilização do teste de MN's, sendo um ensaio sensível, simples, eficaz, com baixo custo, além poder ser utilizado em qualquer população celular em proliferação (HAYASHI *et al.*, 1998). Contudo, a conciliação do EC com a análise de MN's tem sido muito aplicada nas investigações de genotoxicidade *in vivo*, pois além de permitir uma viabilidade técnica com a utilização complementar de diferentes órgãos, fornece dados de diferentes *endpoints* (ROTHFUSS *et al.*, 2011).

3 RESULTADOS

3.1 ARTIGO - CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E ESTUDO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS *IN VITRO* E *IN VIVO* DE EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS DE *TRIPLARIS GARDNERIANA* WEDD. DA CAATINGA DE PERNAMBUCO

Artigo a ser enviado e traduzido para Journal of Ethnopharmacology
(ISSN: 0378-8741)



Caracterização fitoquímica e estudo das atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* de extrato aquoso de folhas de *Triplaris gardneriana* WEDD. da Caatinga de Pernambuco

Camilla Morais de Paiva¹ (camillampaiva@gmail.com)

Maria Cecília Lima Vieira de Melo¹ (ceci_lvm@hotmail.com)

Bárbara de Azevedo Ramos¹ (babi.a.ramos@gmail.com)

Alexandre Gomes da Silva¹ (agsilva@live.com)

Márcia Vanusa da Silva¹ (marciavanusa@yahoo.com.br)

Maria Tereza dos Santos Correia¹ (mtscorreia@gmail.com)

Tamiris Alves Rocha¹ (tamialvesinsl@gmail.com)

Clarissa de França Oliveira Silva¹ (clarissaclara@gmail.com)

Carlos Eduardo Sales da Silva¹ (carlossalles10@yahoo.com.br)

Cristiane Moutinho Lagos Melo² (cristianemout@gmail.com)

Cristiano Aparecido Chagas³ (chagas.cris@gmail.com)

Danielle Feijó de Moura¹ (danielle.feijo@hotmail.com)

Túlio Diego da Silva⁴ (diegotulio1@gmail.com)

¹Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife – PE.

²Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife – PE.

³Laboratório de Biotecnologia e Fármacos, Centro Acadêmico de Vitória, UFPE, Vitória de Santo Antão - PE

⁴Central Analítica do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), Recife –PE.

RESUMO

Triplaris gardneriana Wedd. é uma planta muito utilizada na medicina popular para tratar doenças venéreas, hemorroida, câncer, reumatismo, gastrite, úlcera, azia, tosse e gripe e inflamação de órgãos internos. Neste estudo, foi relatado a caracterização fitoquímica das folhas de *T. gardneriana* coletadas no Parque Nacional do Vale do Catimbau, em Buíque, Pernambuco, assim como suas atividades biológicas *in vivo* e *in vitro*. Na triagem fitoquímica, o extrato aquoso de *T. gardneriana* (TG Aq) revelou a presença de flavonoides, proantocianidinas condensadas, leucoantocianidinas, taninos hidrolisáveis e traços para monoterpenos e sesquiterpenos. Na determinação do teor total de fenóis e flavonoides, TG Aq apresentou conteúdo fenólico total de $333,44 \pm 3,43$ mg EAG/g de extrato e conteúdo de flavonoides totais de $23,1 \pm 0,41$ mg EQ/g de extrato. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) identificou a presença do composto quercetina. Ainda sobre a caracterização da amostra, foi observado atividade hemaglutinante (AH) inibida pela fetuína e estável à 100 °C, não havendo inibição de tripsina. A atividade antioxidante de TG Aq foi avaliada por cinco métodos diferentes. Nos ensaios de redução dos radicais livres DPPH e ânion superóxido, TG Aq apresentou um IC50 de $19,10 \pm 0,26$ e $33,48 \pm 0,31$ µg/mL, respectivamente. Os ensaios de redução de íons metálicos, TAC e FRAP, TG Aq apresentou resultados bem próximo dos padrões utilizados. Já no ensaio de inibição da peroxidação lipídica, TG Aq apresentou uma atividade de inibição maior que a da quercetina e do BHT. Já no ensaio de inibição da peroxidação lipídica, TG Aq apresentou uma atividade de inibição de $29,44 \pm 0,28$. Na avaliação da atividade antimicrobiana, TG Aq apresentou uma concentração inibitória apenas para as cepas bacterianas gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*). Foi visto também que TG Aq aumenta significativamente a proliferação celular em esplenócitos de camundongos em 24h e que não induz a apoptose e a necrose celular. A amostra não demonstrou toxicidade oral aguda, assim como não possui potencial genotóxico. Estes resultados demonstram que a TG Aq possui importantes ações biológicas e que o seu uso pela via oral pode ser considerado seguro.

Palavras-chave: plantas medicinais. Pajeú. Polygonaceae. atividades biológicas. estudos de segurança.

1 INTRODUÇÃO

Os radicais livres estão envolvidos em diversos processos fisiológicos (HALLIWELL; GUTTERIDGE; CROSS, 1992), no entanto, quando em excesso, provocam efeitos nocivos ao organismo causando inúmeras patologias (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; RAHMAN, 2007). Os organismos vivos produzem os antioxidantes, substâncias que regeneram ou previnem os danos causados pelos radicais livres, porém quando estes são insuficientes o organismo sofre ações degenerativas conhecidas como estresse oxidativo. Diante disto, os estudos de plantas que previnem ou minimizam estes efeitos tóxicos têm aumentado consideravelmente nos últimos anos (ALVES et al., 2010).

A crescente resistência dos microorganismos que causam prejuízo à saúde humana aos antibióticos conhecidos, tem aumentado a procura de compostos antimicrobianos de origem vegetal (NASCIMENTO et al., 2000). Há séculos os efeitos antimicrobianos das substâncias presentes nas plantas são conhecidos empiricamente e somente foram comprovados recentemente (JANSSEN; SCHEFFER; BAERHEIM SVENDEAEN, 1987).

Os produtos farmacêuticos podem ser descobertos por duas maneiras, através da síntese em laboratório ou por meio de testes e bioensaios em produtos naturais (SOEJARTO, 1996). Cerca de 64% dos medicamentos tem um produto natural envolvido em seu desenvolvimento (NEWMAN; CRAGG, 2012). As plantas são consideradas fontes naturais de novos compostos de interesse medicinal e biotecnológico, uma vez que sintetizam uma ampla variedade de compostos bioativos (KATIYAR et al., 2012). Portanto, o conhecimento dos compostos naturais é essencial para a triagem inicial na descoberta de novas drogas (LUCA et al., 2012).

Tendo em vista que as plantas medicinais representam a única fonte de medicamentos para uma grande parte da população, o governo brasileiro aprovou em 2006 a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. A fim de garantir a segurança na utilização das plantas medicinais, esta política estabelece diversas diretrizes e dentre elas preconiza o estudo de toxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e efeitos terapêuticos dos fitoterápicos (BRASIL, 2006). A pesquisa de novas substâncias também deve incluir estudos pré-clínicos para a investigação de efeitos imunotóxicos e imunomoduladores (PUTMAN et al., 2002), uma vez que os compostos naturais podem promover a modulação de respostas imunes (JANTAN, AHMAD, BUKHARI, 2015).

A utilização de plantas para fins medicinais tem aumentado progressivamente nas últimas décadas no Brasil, sendo respaldada pelo seu baixo custo, além da convicção da população de que tais produtos não causam efeitos colaterais. Contudo, as plantas possuem contraindicações, podendo causar sérios efeitos colaterais e por isso precisam ser estudadas quanto a sua segurança (MAGALHÃES et al., 2015). Apesar do conhecimento adquirido sobre as plantas medicinais serem repassados de geração a geração, muitas espécies vegetais nunca foram estudadas ou não se tem estudos suficientes, onde pouco se sabe sobre as suas propriedades terapêuticas (SOEJARTO, 1996) e sobre seus potenciais riscos à saúde (VARGAS et al., 1990), sobretudo sobre o seu potencial genotóxico (MARQUES et al., 2003). A utilização indiscriminada de produtos naturais pode acarretar na interação de substâncias vegetais com o DNA, ocasionando alterações em suas estruturas e promovendo mutações (TAMAKOU; KUETE, 2014). Diante disto, a segurança das plantas medicinais tornou-se uma preocupação não só para as autoridades de saúde nacional como também para a população (SAHOO; MANCHIKANTI; DEY, 2010), tendo em vista que diversas plantas possuem substâncias químicas conhecidas como mutagênica e/ou cancerígena (BJELDANES; CHANG, 1977; WEISBURGER, 1979).

A *Triplaris gardneriana* é uma planta utilizada pela medicina popular em diversas patologias, sendo empregada desde em banhos semicúpio no tratamento de blenorragia, leucorréia e hemorróida sangrenta (BRAGA, 1976) até o uso da infusão da casca e folhas para tratar câncer, reumatismo, gastrite, úlcera, azia, tosse e gripe e inflamação de órgãos internos (CARTAXO; SOUZA; ALBUQUERQUE, 2010; JÚNIOR et al., 2014; ROQUE; ROCHA; LOIOLA, 2010). Desse modo, esse estudo teve como objetivo analisar as atividades biológicas e investigar o risco da utilização desta espécie.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta do material e preparação do extrato

As folhas de *T. gardneriana* WEDD. foram coletadas no Parque Nacional do Vale do Catimbau, em Buíque, Pernambuco. O material foi levado à estufa de circulação de ar forçado (40-45°C) por um período de quatro dias. A amostra foi identificada conforme as técnicas taxonômicas habituais e depositado no Herbário IPA, do Instituto Agrônomo de Pernambuco. O material vegetal foi processado em moinho de bancada seguido de extração por agitação e sonicação em água destilada para obtenção do extrato bruto aquoso e posteriormente liofilizado.

2.2 Análise Fitoquímica da Amostra

2.2.1 Cromatografia em camada Delgada

Foi realizada uma triagem fitoquímica do TG Aq para detectar as principais classes de metabólitos secundários, através da Cromatografia em Camada Delgada de Sílica. A metodologia empregada para cada composto está descrita na tabela de reagentes abaixo (Harborne, 1998; Roberts, et al., 1957; Wagner, et al.; 1996 e Brasseur e Angenot, 1986).

Tabela 1: Sistemas e reveladores utilizados na cromatografia em camada delgada, para identificação dos metabólitos secundários do extrato de folhas de *T. gardneriana*.

Classe de metabólitos secundários	Padrões	Sistema de eluição	Revelador	Referências
Flavonoides, derivados cinâmicos e fenilpropanoglicosídeos	Quercetina, rutina e ácido clorogênico	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27 v/v)	NEU	Wagner & Bladt, 1996 Brasseur & Angenot, 1986
Triterpenos e esteroides	β-sitosterol	Tolueno:AcOEt (90:10 v/v)	Lieberman & Burchard	Harborne, 1998
Mono e sesquiterpenos	Timol	Tolueno:AcOEt (97:3 v/v)	Anisaldeído sulfúrico	Harborne, 1998
Cumarinas e Quinonas	Cumarina e lapachol	CHCl ₃ -MeOH (98:2 v/v)	KOH	Wagner & Bladt, 1996
Alcaloides	Pilocarpina	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27 v/v)	Dragendorff	Wagner & Bladt, 1996
Proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas	Catequina	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27 v/v)	Vanilina clorídrica	Roberts et al. 1957
Taninos hidrolisáveis	Ácido gálico	n-BuOH-H ₂ O-AcOH (40:50:10 v/v)	Alúmen de ferro 1%	Xavier (2002) Stiasny (1912)

2.2.2 Dosagem de Fenóis Totais

O método de Folin-Ciocalteu foi utilizado para a dosagem do conteúdo fenólico total, com algumas modificações (LI et al., 2008). Diferentes concentrações de ácido gálico, assim como as amostras, foram dissolvidas em metanol ou água (no caso da amostra aquosa). Para cada poço foram adicionados 0,1 mL da solução de Folin diluída de 1:10 (v/v) e 0,02 mL das amostras diluídas. Após 3 minutos no escuro, 0,08 mL de carbonato de sódio (7,5%) foi adicionado, deixando por mais 120 minutos no escuro a temperatura ambiente. Após esse período as absorbâncias das amostras foram medidas à 765 nm contra um branco (reagente adicionado ao metanol ao invés da amostra). Uma curva de calibração foi preparada através da representação gráfica da absorbância em função da concentração de ácido gálico e então encontrada a equação linear ($y = 0,0121x - 0,032$, $R^2 = 0,9967$). O teor total de fenol no extrato foi expresso em termos de equivalente de ácido gálico (mg EAG / g de extrato).

2.2.3 Dosagem de Flavonoides

O conteúdo de flavonoides foi determinado através do método colorimétrico com cloreto de alumínio descrito por Woisky e Salatino, com algumas modificações (WOISKY; SALATINO, 1998). Diferentes concentrações de Quercetina, assim como as amostras, foram dissolvidas em metanol ou água (no caso da amostra aquosa). Em cada poço foi adicionado 0,1 mL do reagente de cloreto de alumínio (2g de cloreto de alumínio diluído em etanol a 2%), e misturado a 0,1 mL das amostras em triplicata. A mistura foi mantida em temperatura ambiente durante 60 minutos. A absorbância das amostras foi medida à 420 nm contra um branco. A curva de calibração foi preparada através da representação gráfica da absorbância em função da concentração de Quercetina e então encontrada a equação linear ($y = 0,0098x - 0,0483$, $R^2 = 0,9957$). O teor de flavonoides total no extrato foi expresso como equivalente Quercetina (mg QE / g de extrato).

2.2.4 Identificação de compostos fenólicos através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A identificação dos compostos fenólicos no extrato aquoso foi determinada através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Agilen 1260 infinity) utilizando a coluna Zorbax SB

(C18), 4,6 mm x 250 mm, 5 µm, com temperatura de 30 °C. A separação cromatográfica foi realizada utilizando a fase móvel de gradiente: A (água acidificada) e B (acetona), 0-15 min = 92% de A e 8% de B, 16-30 min = 65% de A e 35% de B, com fluxo de 2,4 mL/min, usando detector UV à 254 nm, em um volume de injeção de 5 µL. Foram utilizados padrões puros (Sigma Aldrich): Ácido caféico, Ácido clorogênico, Ácido gálico, Ácido elágico, Ácido trans-ferúlico, Catequina, Quercetina e Rutina. A identificação dos compostos foi determinada através do tempo de retenção e da comparação entre o espectro UV dos picos com os previamente obtidos pela injeção dos padrões puros.

2.3 Dosagem de proteína

A quantificação de proteína foi feita pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando-se uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA), com valores compreendidos entre 31,25 e 500mg/mL, obtendo-se a curva $Y = 0,0009x + 0,0612$, $R^2 = 0,9877$.

2.4 Atividade hemaglutinante (HA)

Foi testado a capacidade da amostra de aglutinar eritrócitos de coelho. O ensaio HA foi realizado em placas de microtitulação de 96 poços (Kartell S.P.A., Itália), de acordo com Paiva e Coelho (1992), utilizando uma suspensão de 2,5% (v/v) de eritrócitos tratados com glutaraldeído (BING; WEYAND; STAVITSKY, 1966). A amostra (50 µL) foi diluída duas vezes em série em NaCl 0,15M. Em seguida, a suspensão de eritrócitos (50 µL) foi adicionada a cada poço e o ensaio foi incubado a 25°C durante 45 min. O controle negativo continha apenas eritrócitos e NaCl 0,15 M. O número de unidades HA (título) foi calculado como o valor recíproco da maior diluição da amostra que promoveu a aglutinação completa de eritrócitos. A HA específica foi definida pela razão entre o título e a concentração de proteína (mg / mL).

Para avaliar o efeito da temperatura, a amostra foi aquecida à 100 °C por 30 minutos antes da atividade hemaglutinante. Os ensaios de inibição de HA foram realizados pela adição de carboidratos à solução de NaCl 0,15 M, onde a amostra foi incubada durante 15 minutos antes da adição dos eritrócitos. Os monossacarídeos (200 mM) frutose, glicose, galactose, manose, N-acetil-glicosamina e a glicoproteína (0,5 mg / mL) fetuina, foram avaliados quanto ao efeito inibitório sobre HA de TG Aq.

2.5 Ensaio de inibição de tripsina

O ensaio de inibição de tripsina foi realizado em placas de microtitulação de 96 poços, onde 0,1 mg/mL de tripsina bovina foi preparada em Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0) contendo CaCl 0,02 M. A tripsina bovina (5,0 μ L) foi incubada (5 min, 37°C) com o extrato aquoso de *T. gardneriana* (10,0 μ L, 2,0 μ g), onde o volume foi ajustado para 195,0 μ L com tampão Tris. Em seguida, foi adicionado o composto sintético N- α -benzoyl-DL-arginil- ρ -nitroanilina (BApNa) dissolvido em dimetilsulfóxido (5 μ l) e incubado a 37°C por 30 min. A hidrólise do substrato foi obtida a 405nm através do espectrofotômetro de microplacas universal (μ Quant, MQX200; BioTek Instruments, Inc., VT, EUA). Os brancos foram realizados nas mesmas condições, sem o substrato ou sem a enzima. Uma unidade de atividade inibitória de tripsina foi definida como a quantidade de inibidor que diminui a absorbância em 0,01 em comparação com o controle 100% da atividade após 30min a 37°C (OLIVEIRA et al., 2012). A atividade específica de inibição de tripsina corresponde a proporção entre o número de unidades e o teor proteico do extrato e foi expressa como U/mg de proteína.

2.6 Atividades Antioxidantes *in vitro*

2.6.1 Preparo das amostras

Para as atividades antioxidantes *in vitro* a amostra foi diluída à 1 mg/mL em água destilada. Foram utilizados os padrões Ácido Gálico, BHT e Quercetina diluídos à 1 mg/mL em metanol, a fim de comparar as atividades dos extratos.

2.6.2 Sequestro de radicais livres DPPH•

A atividade sequestradora de radical livre do extrato foi medida em termos de doação de hidrogênio usando o radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•) (BLOIS, 1958). Quando em contato com um agente antioxidante, este radical recebe um elétron ou um radical hidrogênio sendo assim reduzido à difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, podendo ser monitorada pelo decréscimo da absorbância.

Para este ensaio, foi misturado 0,25 mL da solução de DPPH• (1 mM e DO517 = 0,650 \pm 0,05) em 0,04 mL de diferentes concentrações do extrato (31,25; 62,5; 125; 500 e 1000

$\mu\text{g/mL}$). Após 25 minutos foi medida a absorbância em 517 nm. O controle foi o DPPH adicionado a 0,04 mL de metanol. A eliminação de radicais de DPPH• foi calculada pela fórmula: $\text{SRL [DPPH}\bullet\text{]} (\%) = [(A_a - A_c) / A_c] \times 100$. Onde: A_a = Absorbância da amostra e A_c = Absorbância do controle. Os resultados serão expressos em IC50 calculados pelo GraphPrism 5.0. O consumo de DPPH pela amostra e o IC50 são inversamente proporcionais.

2.6.3 Sequestro do Ânion Superóxido

A atividade de sequestro do radical superóxido (O_2^-) foi realizada conforme descrito por Beauchamp e Fridovich, 1971, com algumas modificações. Este é um método colorimétrico que se baseia na redução fotoquímica da riboflavina induzida pela iluminação. A redução da riboflavina forma o radical O_2^- que por sua vez reduz o sal de tetrazolio NBT (incolor) à formazan (púrpura). Os compostos que atuam como antioxidantes reagem com o radical O_2^- inibindo a formação do formazan.

Diferentes volumes de amostra foram misturados ao tampão fosfato de sódio (50 mM em pH 7,8), e em seguida foi adicionado 0,2 mL de EDTA (0,1 M) e 0,1 mL de NBT (1,5 mM), onde o controle foi feito sem adição da amostra. Foi retirado 0,1 mL dessa mistura e feita a leitura no leitor de Elisa a 560 nm (leitura OD1). Foi adicionada aos tubos 0,15 mL de riboflavina (20 μM) e então exposta à luz fluorescente por 15 minutos a 25 °C para iniciar a reação. Posteriormente, a amostra foi adicionada à placa de microtitulação (100 μL) e obtida a leitura OD2 a 560 nm. A OD1 foi considerada como um branco, onde foi subtraída do valor da amostra (BEAUCHAMP; FRIDOVICH, 1971). A atividade sequestradora do radical superóxido foi calculada pela fórmula abaixo:

$$\text{Sequestro de ânions superóxido (\%)} = \frac{\text{OD do branco} - \text{OD da amostra}}{\text{OD do branco}} \times 100$$

Os resultados foram expressos em termos de concentração inibitória (CI50), ou seja, a concentração da amostra que é necessária para inibir em 50% a atividade do O_2^- e foram calculadas por análise de regressão exponencial, expressos como média \pm DP.

2.6.4 Atividade Antioxidante Total (TAC)

A atividade antioxidante total, também chamado de método do fosfomolibdênio é um ensaio quantitativo que determina a atividade antioxidante através da redução de íons metálicos e formação do complexo fosfomolibdênio. O complexo de fosfato de molibdênio é formado pela reação do fosfato de sódio monobásico, molibdato de amônio e ácido sulfúrico, onde na presença de uma substância antioxidante ocorrerá a redução do molibdato à molibdênio.

A atividade foi realizada através da adição de 0,1 mL da amostra à 1 mL da solução de fosfomolibdênio (600 mM de ácido sulfúrico, 28 mM de fosfato de sódio e 4 mM de molibdato de amônio), e posteriormente incubados em água a 95 °C por 90 minutos. Após voltarem a temperatura ambiente, as absorbâncias das amostras foram medidas a 695 nm contra um branco (1 mL de solução e 0,1 mL do metanol) (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999). A atividade antioxidante total calculada pela fórmula $TAC (\%) = [(Aa - Ac) / (Aaa - Ac)] \times 100$, onde: Ac = Absorbância do controle, Aa = Absorbância da amostra e Aaa = Absorbância do ácido ascórbico.

2.6.5 Redução do Íon Férrico (FRAP)

O ensaio por redução de íons férrico, também conhecido como FRAP, foi realizado segundo Benzie e Strain, com algumas modificações. A atividade foi determinada através da redução do complexo de Fe^{3+} -TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) à sua forma ferrosa em pH ácido.

A solução estoque foi preparada com 300 mM de tampão acetato (3,1 g CH_3COONa e 16 mL CH_3COOH) em pH 3,6, 10 mM de TPTZ (2,4,6-tripiridyl-s-triazine) solubilizado em 40 mM de HCl, e 20 mM de solução de $FeCl_3$. A solução de trabalho foi preparada na hora misturando, 25 mL do tampão acetato, 2,5 mL de TPTZ e 2,5 mL $FeCl_3$ (10:1:1) e incubado por 5 min a 37 °C (BENZIE; STRAIN, 1996). Vinte microlitros das amostras em diferentes concentrações diluídas em metanol, foram misturadas com 0,180 mL do reagente de trabalho (FRAP) e deixadas em repouso por 30 minutos a 37 °C no escuro. Posteriormente as absorbâncias foram medidas à 593 nm. Uma curva padrão com $FeSO_4$ (0 - 1000 $\mu g/mL$) foi realizada para obtenção da equação $Y = 0,0053x - 0,146$, $R^2 = 0,9849$. Os resultados são expressos em mg $EFeSO_4$ (II) / g de extrato.

2.6.6 Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada segundo Kikuzaki; Nakatani, 1993, baseado na indução da peroxidação lipídica de um ácido graxo (ácido linoléico), por aquecimento à 40 °C, onde na presença de compostos antioxidantes, a produção dos radicais peroxilas (LOOH•) é inibida.

Nesse método, duzentos microlitros da amostra, do padrão (controle positivo) ou do branco (água) foram adicionados em um tubo (separadamente) com 0,2 mL da solução de ácido linoleico (2,5 M), 0,4 mL de tampão fosfato (20 mM, pH 7) e 0,2 mL de água destilada (volume final 1 mL) (KIKUZAKI; NAKATANI, 1993). Posteriormente, os tubos foram incubados no escuro por 24 horas a 40 °C. Após a incubação, 0,05 mL da mistura foi adicionado a 0,05 mL de etanol (75%), 0,05 mL da solução de tiocianato de amônio (0,3 M) e 0,05 mL de solução de cloreto ferroso (20 mM) em um uma placa de microtitulação de fundo chato. Após 3 minutos, foi mensurada a densidade ótica em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 500 nm. A mistura original voltou para incubadora e o experimento foi realizado a cada 24h até 1 dia após o controle positivo atingir o seu valor máximo de absorbância. Os resultados foram expressos em porcentagem de Inibição, calculados pela fórmula: $I(\%) = [(\text{Abs do controle positivo do último dia} - \text{Abs da amostra no último dia}) / \text{Abs do controle positivo do último dia}] \times 100$, onde abs é absorbância.

2.7 Atividade Antimicrobiana

A determinação da atividade antimicrobiana realizada através do modelo experimental de microdiluição seriada, conforme descrita por CLSI (2014). O extrato aquoso de *T. gardneriana* foi diluído em DMSO à 2%, filtrado em membrana de 0,22 µm de porosidade a fim de garantir a esterilidade e testado nas seguintes concentrações (2000 –1000 –500 –250 –125 –e 62,5 µg/mL). As cepas de bactérias utilizadas no ensaio foram: *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 02), *Enterococcus faecalis* (UFPEDA 09), *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 224) e *Klebsiella pneumoniae* (UFPEDA 396). O inóculo foi preparado na concentração de 5 x 10⁷ UFC/mL a partir da suspensão de 0.5 McFarland (108 UFC/mL). A suspensão de bactéria foi ajustada à Densidade óptica (DO₆₀₀) e ficou na concentração de 5 x 10⁵ UFC/mL (5 x 10⁴ UFC/µL poço). Em seguida, foram adicionados em microplacas (96 poços) as concentrações descritas anteriormente de TG Aq e o meio de cultura Mueller-Hinton caldo e foram incubadas

à 37 °C por 24 horas. No controle de crescimento da bactéria foi adicionado o meio de cultura e a bactéria, e no controle de esterilidade foi adicionado apenas o meio de cultura. Após o período de incubação, foi realizada a leitura das microplacas em espectrofotômetro à 600 nm nos tempos de 0h e 24h. O teste foi executado em quadruplicata e calculado na forma de média e desvio padrão. Para avaliar a concentração mínima bactericida (CMB), 5 µL foi retirado de cada poço da microplaca e semeado em uma placa de petri contendo meio Mueller-Hinton. Essas placas foram incubadas a 37 °C por 24h. Após esse período, foi observado se houve algum crescimento bacteriano na presença do extrato, que é considerado bactericida quando na placa há ausência total de crescimento bacteriano.

2.8 Potencial imunomodulador e citotóxico em esplenócitos de camundongos

2.8.1 Preparação dos esplenócitos

Este procedimento foi realizado de acordo com Melo et al. (2011), onde foram utilizados camundongos fêmeas BALB/c (6-8 semanas de idade, 5 animais) que foram criados e mantidos nas instalações de animais do Laboratório de Imunologia de Keizo Asami - LIKA, localizado na Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. Os camundongos foram mantidos em condições laboratoriais padrão (20-22 ° C e 12 h ciclo diurno e noturno) com dieta padrão (Labina / Purina, Campinas, Brasil) e água “ad libitum”. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com a Comissão de Ética em Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco (número de protocolo: 0048/2016).

Após a eutanásia dos animais (gás CO₂), o baço de cada camundongo foi removido assepticamente e colocado num tubo Falcon contendo RPMI 1640 com soro fetal bovino (meio completo). Em uma capela, cada baço foi transferido para uma placa de Petri e macerados. As suspensões celulares obtidas a partir de cada baço foram transferidas para tubos Falcon contendo aproximadamente 10 mL de meio incompleto. Os homogeneizados de baço foram sobrepostos numa camada Ficoll-Paque TM PLUS com a densidade ajustada para 1,076 g/mL e centrifugadas a 1000 xg à temperatura ambiente durante 25 min. A camada celular de interface contendo células imunes foi recuperada por pipeta Pasteur, lavada duas vezes em solução salina tamponada com fosfato (PBS 1X) e centrifugada duas vezes a 500 g durante 10 min para obtenção do pélite. As células foram contadas numa câmara de Neubauer, e a viabilidade celular

foi determinada pelo método de exclusão do azul de tripan. As células foram utilizadas apenas quando a viabilidade foi > 95%.

2.8.2 Ensaio de proliferação celular em esplenócitos de camundongos

Após a obtenção dos esplenócitos, a solução celular foi centrifugada a 300 xg à temperatura ambiente durante 5 minutos com PBS 1X esterilizado adicionado com SFB 5% (pH 7,2). Depois disso, a solução celular foi ajustada para 1×10^6 cels/mL e recebeu 5 mM de 5(6) éster de N-succinimidil de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE). As células foram incubadas durante 10 minutos à temperatura ambiente no escuro e centrifugadas duas vezes a 300 xg por 5 minutos com PBS 1X estéril. As células marcadas com CFSE foram cultivadas durante 24 horas e 48 horas com 25 $\mu\text{g/mL}$ de TG Aq ou apenas meio de cultura (controle negativo). Após o término do tempo de cultivo, as células foram centrifugadas (300 xg por 5 min), foram transportadas para citometria de fluxo na plataforma FACSCalibur (Becton Dickinson Biosciences) e os resultados foram analisados usando o software Cell Quest Pro (Becton Dickinson).

2.8.3 Análise da citotoxicidade

Os esplenócitos foram tratados com TG Aq (3, 6, 12.5, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$) por 24 horas bem como as células não tratadas e foram centrifugados à 450 xg a 4°C durante 10 min. Após descartar o sobrenadante, adicionou-se 1 mL de PBS 1X ao precipitado e após ressuspensão, as células foram novamente centrifugadas (450 xg, 4°C, 10 min). O sedimento foi ressuspensão em 300 μL de tampão de ligação (HEPES 10 mM a pH 7,4, NaCl 150 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM e CaCl₂ 1,8 mM), transferido para um tubo citométrico marcado e anexina V conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1: 500) e iodeto de propídio (PI, 20 $\mu\text{g} / \text{mL}$). A citometria de fluxo foi realizada em uma plataforma FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, EUA) e os resultados foram analisados usando o software CellQuest Pro (BD Biosciences). As células anexos-FITC negativo/PI positivo foram consideradas como necróticas e as células Anexina-FITC positivas/PI negativas foram consideradas na fase inicial da apoptose. Os duplos negativos foram considerados células viáveis.

2.9 Avaliação da toxicidade Aguda

Este ensaio foi realizado de acordo com o protocolo 423 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 2001). Foram utilizados camundongos (swiss albino) do sexo feminino provenientes do Biotério do Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami-LIKA - UFPE, com aproximadamente oito semanas de idade, pesando em torno de 40g. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada de 22 ± 2 °C e umidade relativa de $50 \pm 5\%$, com ciclo claro/escuro de 12h, com livre acesso a comida e água. Todos os procedimentos experimentais que foram realizados estão de acordo com as leis brasileiras para experimentação com animais e foram submetidos à Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco. Protocolo nº: 0005/2017.

A toxicidade oral aguda foi determinada pelo teste de dose limite de 2000 mg/kg e os animais foram distribuídos em 2 grupos com 3 animais cada grupo, onde um grupo controle negativo recebeu apenas salina e o outro grupo recebeu o extrato aquoso da folha (2000 mg/kg). Os grupos do extrato e controle negativo receberam seus tratamentos por gavagem. Após a administração os animais foram observados quanto ao aparecimento de sinais de toxicidade, tais como alteração de locomoção, frequência respiratória, piloereção, diarreia, sialorreia, alteração do tônus muscular, convulsões, hiperexcitabilidade do Sistema Nervoso Central, contorções abdominais e número de animais mortos, com possível causa de morte. Os animais foram observados, individualmente, nos primeiros 30 minutos, 1, 2, 3 e 4 horas e diariamente durante 14 dias após administração. A massa corporal dos animais foi avaliada antes da administração do tratamento (peso inicial) e após o término dos 14 dias de avaliação (peso final) para realização dos cálculos de variação de peso corporal. O consumo de água e ração foi registrado diariamente durante todo o experimento.

Ao fim do período de observação, todos os animais foram anestesiados com xilazina e ketamina (10mg/kg e 100mg/kg, respectivamente) e em seguida foi realizada a coleta do sangue por punção cardíaca. O sangue coletado foi adicionado em tubos secos e centrifugado a 3500 rpm durante 10 minutos para obtenção do soro, que posteriormente foi utilizado para realizar as análises bioquímicas seguintes: albumina, fosfatase alcalina, ureia, creatinina, glicose, ácido úrico, proteínas totais, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). As dosagens bioquímicas foram realizadas através de kits bioquímicos da Labtest. Em seguida, foi realizada a eúctasia dos animais através da dose letal dos anestésicos Xilazina (30 mg/kg) e Ketamina (300mg/kg). Por último, fígado, baço e rins foram retirados, avaliados

macroscopicamente e pesados para determinação do peso relativo dos órgãos, que foi calculado dividindo o peso de cada órgão (g) pelo peso corporal do animal (g) e multiplicando por 100. Caso fossem observadas alterações nas autópsias, estudos histopatológicos dos órgãos acometidos seriam realizados.

2.10 Avaliação da genotoxicidade

Foram utilizados camundongos (swiss albino) do sexo masculino para o ensaio cometa e teste de micronúcleo. Os animais utilizados foram provenientes do Biotério do Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami-LIKA - UFPE, com aproximadamente oito semanas de idade, pesando em torno de 40g. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada de 22 ± 2 °C e umidade relativa de $50 \pm 5\%$, com ciclo claro/escuro de 12h e livre acesso a comida e água. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com a Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco. Protocolo nº: 0005/2017.

Os animais foram distribuídos em 3 grupos com 5 animais cada um. O grupo tratado (TG) recebeu o extrato aquoso das folhas de *T. gardneriana* na concentração de 2000 mg/kg. O grupo controle negativo (CN) recebeu apenas água destilada, o veículo no qual o extrato foi diluído. Os animais destes grupos receberam seus respectivos tratamentos por gavagem (1 mL). O grupo controle positivo (CP) para o MN recebeu ciclofosfamida (20mg/kg – Sigma), um agente mutagênico bem estabelecido na literatura científica, por injeção intraperitoneal. Para o CP do ensaio cometa, lâminas preparadas com o sangue dos animais foram expostas a peróxido de hidrogênio a 200 nM por 10 minutos antes da etapa de eletroforese (abaixo).

Após 48 horas de tratamento, os camundongos foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), por via intraperitoneal e 1mL de sangue periférico foi coletado de cada animal por punção retro-orbital. Em seguida, os animais sofreram eutanásia com injeção letal da combinação de quetamina (300 mg/kg) + xilazina (30 mg/kg).

2.10.1 Ensaio Cometa

Neste ensaio, todo procedimento após a coleta do material foi realizado em uma sala com luz vermelha (sem a presença da luz branca), pois este experimento é fotossensível. Do sangue coletado de cada animal, 15 µL foram homogeneizados com 100 µL de agarose de baixo ponto

de fusão, e tal mistura foi depositada em lâminas previamente preparadas com uma cobertura de agarose padrão. Estas lâminas foram cobertas com lamínulas e levadas para o refrigerador (temperatura de 4 °C) por 10 minutos. Depois da refrigeração, as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram depositadas em cubas (sempre protegidas da luz) com solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM TRIS, 1% Triton X-100, DMSO 10%, com pH 10). Após o tempo necessário para a lise (48 horas), as lâminas foram submetidas à eletroforese em uma cuba horizontal contendo solução tampão alcalino (1M NaOH e 200 mM sal dissódico EDTA, pH 13) por 20 minutos, com corrente de ± 300 mA e diferença de potencial de 32V. As lâminas que serviram de controle positivo foram expostas durante 10 minutos a uma solução de peróxido de hidrogênio a 200 mM, diluído no tampão de eletroforese entre as etapas de lise e eletroforese. Em seguida o tampão de eletroforese foi trocado por um novo e seguiu-se o protocolo convencional do ensaio cometa. Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas com tampão (0,4 M Tris-HCl, pH 7,5) durante 15 minutos e fixadas por 5 minutos em álcool absoluto. Para a revelação, cada lâmina foi corada com 30 μ L de solução de brometo de etídio (0,0002%, p/v).

A avaliação foi feita em microscópio de fluorescência (Zeiss-Imager, M2), com objetiva de 40X, utilizando o filtro Alexa Fluor 546. Foram analisados 100 nucleoides por animal, com observação da relação entre o comprimento da cauda e o tamanho da cabeça do cometa. Cada nucleoide analisado foi classificado em uma de cinco classes: 0 (sem dano); 1 (pouco dano aparente); 2 (dano médio); 3 (dano médio com cauda mais longa); e 4 (dano máximo). Desta forma, os valores obtidos para cada indivíduo podem variar de 0 (totalmente intacta: 100 células x 0) a 400 (com dano máximo: 100 células x 4); a este valor damos o nome de índice de dano (ID) por animal. Assim, o ID foi calculado da seguinte forma:

$$\text{ID total} = 0 (\text{n}^\circ \text{ de cometas classe } 0) + 1 (\text{n}^\circ \text{ classe } 1) + 2 (\text{n}^\circ \text{ classe } 2) + 3 (\text{n}^\circ \text{ classe } 3) + 4 (\text{n}^\circ \text{ classe } 4)$$

A frequência de danos (FD) também foi analisada, onde foi calculada de acordo com a porcentagem de todos os nucleoides com algum dano (classe 1 a classe 4) em relação ao total de nucleoides contados, que vai da classe 0 a classe 4 (nº total) (COLLINS et al., 2008). Seguindo a fórmula:

$$\text{FD} = \frac{[(\text{n}^\circ \text{ total} - \text{n}^\circ \text{ classe } 0) \cdot 100]}{\text{n}^\circ \text{ total}}$$

2.10.2 Teste De Micronúcleo

Foram depositados 5µL do sangue coletado de cada animal em lâminas com laranja de acridina, cobrindo-se com uma lamínula para espalhar uniformemente o material biológico. As lâminas passaram por uma preparação prévia para receber o material biológico. Inicialmente, foram lavadas com detergente neutro e água destilada, depois foram banhadas em álcool 70% e depositadas em estufa (80°C) por 15 minutos. Ainda aquecidas, espalhou-se uniformemente 10 µL de laranja de acridina (1 mg/mL) em cada lâmina, depois foram colocadas para secar em temperatura ambiente (mínimo 30 minutos) (YAMAMURA et al., 1992)

Antes do MN, a citotoxicidade dos tratamentos foi analisada. Para isso, 100 eritrócitos foram avaliados, contabilizando-se a proporção de eritrócitos policromáticos (PCE) em relação ao total de eritrócitos da seguinte maneira: $PCE / (PCE + NCE)$, onde NCE significa eritrócitos normocromáticos. Assim, a toxicidade de cada tratamento é indicada por uma redução significativa (menos de 20%) na percentagem de PCE, quando o grupo tratado é comparado com o CN (RIBEIRO, 2003). Para o MN propriamente dito, 2000 PCE por animal foram analisados para se quantificar a presença de PCE micronucleados (PCEMn) (OCDE, 2016). A análise foi realizada em microscópio de fluorescência Zeiss-Imager M2, com objetiva de 40X, utilizando o filtro Alexa Fluor 488.

Para a análise do teste do micronúcleo e para o ensaio cometa, os grupos tratados e o controle negativo foram comparados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis com análise a posteriori usando a estratégia de fazer testes t par-a-par com correção de Bonferroni. Para se verificar a eficiência dos testes, os grupos CN e CP foram comparados entre si pelo teste de Wilcoxon. O nível de significância estabelecido em todos os testes foi $p \leq 0,05$ e o software R foi usado para todas as análises (RDEVELOPMENT, 2012).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização fitoquímica da amostra

A cromatografia em camada delgada permitiu analisar as principais classes de metabólitos secundários presentes no extrato aquoso obtido das folhas *T. gardneriana* (TG Aq), conforme resultados expostos na tabela 2. O extrato apresentou reação positiva para flavonoides, taninos catéquicos (proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas), taninos hidrolisáveis e traços para monoterpênos e sesquiterpênos. Não foi detectada a presença de saponinas, derivados cinâmicos, alcaloides, triterpênos, esteroides, cumarinas e quinonas.

Tabela 2: Prospecção fitoquímica do extrato aquoso de folhas de *T. gardneriana*.

Classe de metabólitos secundários	<i>T. gardneriana</i> Folhas
Flavonoides	+ ¹
Derivados cinâmicos	-
Saponinas	-
Alcaloides	-
Triterpênos e Esteroides	-
Monoterpênos e Sesquiterpênos	tr
Cumarinas	-
Quinonas	-
Proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas	++ ^{2,3}
Taninos hidrolisáveis	++ ⁴

Legenda: (+++) forte; (++) médio; (+) fraco; (-) ausente; (tr) traços. Notas: ¹heterosídeos de flavonoides 3'-OH e 4'-OH; ²proantocianidinas oligoméricas; ³proantocianidinas poliméricas; ⁴ácidos fenólicos livres e poliméricos.

Segundo Farias et al. (2013) o extrato etanólico de sementes de *T. gardneriana* apresentou em seu estudo fitoquímico a presença de taninos, polifenóis e flavonoides (FARIAS et al., 2013). Um outro estudo com extrato etanólico de sementes também apresentou compostos classificados como ácidos fenólicos e flavonoides (ALMEIDA et al., 2017). Contudo, um diferente estudo com o extrato etanólico bruto e frações das folhas de *T. gardneriana* apresentou outros compostos além destes, como derivados antracênicos, cumarinas, naftoquinonas, mono e diterpênos, triterpênos e esteroides (MACÊDO et al., 2015). Esta diferença entre o perfil fitoquímico pode ser explicada pelas diferenças entre os órgãos vegetais, sazonalidade, idade da planta, e o seu desenvolvimento, aspectos que podem

influenciar na produção de metabólitos secundários (BOWERS; STAMP, 1993; HENDRIKS et al., 1997).

As classes de metabólitos identificadas nesta análise fitoquímica estão de acordo com a composição química já descrita na literatura para esta espécie, conforme supracitado. Algumas classes já conhecidas em outras frações de extrato desta espécie não foram identificadas neste estudo, provavelmente por se tratar de um extrato aquoso. Como a composição identificada compreende-se em compostos fenólicos, foi realizada uma quantificação de fenóis totais e flavonoides em TG Aq, em equivalente de ácido gálico e equivalente de quercetina, respectivamente (tabela 3).

Tabela 3: Resultado das dosagens fitoquímicas do extrato aquoso de folhas de *T. gardneriana*.

Amostra	Fenóis Totais (mg EAG / g extrato)	Flavonoides (mg EQ / g extrato)
<i>T. gardneriana</i> folha	333,44 ± 3,43	23,1 ± 0,41

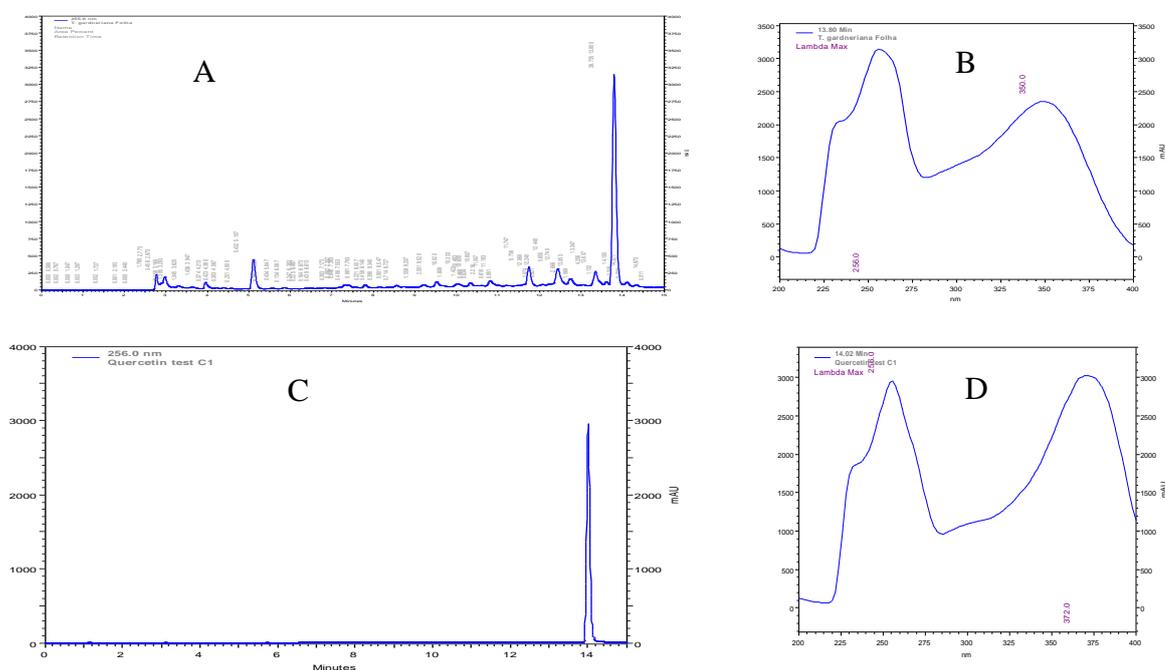
Legenda: EAG – equivalente de ácido gálico, EQ – equivalente de quercetina.

O conteúdo de fenóis totais foi de 333,44 ± 3,43 mg EAG / g e o de flavonoides foi de 23,1 ± 0,41 mg EQ / g. Um estudo recente mostrou que dentre os diferentes extratos de sementes de TG o maior teor de fenóis e flavonoides ocorreu no extrato acetato de etila, apresentando respectivamente 174.67 ± 4.22 mg EAG / g e 57.05 ± 6.72 mg EQ / g (ALMEIDA, et al., 2017). O teor de fenóis encontrado em TG Aq foi maior em comparação com o estudo citado anteriormente, porém o conteúdo de flavonoide encontrado foi menor. O alto teor destas dosagens pode ser fundamentado pela afinidade destes compostos por solventes polares, devido a maioria dos compostos fenólicos não serem encontrados na natureza no estado livre e sim na forma de ésteres ou de heterosídeos, sendo extraídos mais facilmente com água ou solventes polares (MELLO; SANTOS, 2001).

O extrato também foi submetido à cromatografia líquida de alta eficiência, onde a identificação foi estabelecida através do tempo de retenção e do espectro UV dos padrões puros. O cromatograma foi analisado à 254 nm, comprimento de onda indicado para observação de compostos fenólicos, uma vez que estes compostos estão presentes no extrato aquoso conforme visto previamente no CCD. Os picos representados no cromatograma representam a intensidade do sinal, sendo proporcional à concentração dos compostos presentes na amostra. Pode-se observar na figura 1 (A) que o cromatograma do extrato aquoso apresentou um pico maior com

tempo de retenção de aproximadamente 14 minutos, correspondente à um composto quercetínico. Observando o espectro UV da amostra, figura 1 (B), é possível observar que o primeiro pico é semelhante ao do padrão quercetina, figura 1 (D), no entanto o segundo pico da amostra apresentou uma absorvância ligeiramente menor. Isso pode representar alguma alteração na estrutura da quercetina, justificando a pequena diferença na segunda absorvância do espectro.

Figura 1: Cromatograma gerado a partir da corrida cromatográfica de TG Aq (A). (B) Espectro UV gerado a partir da corrida cromatográfica do extrato de TG Aq. (C) Cromatograma do padrão quercetina. (D) Espectro UV do padrão quercetina.



A quercetina tem sido identificada frequentemente em várias espécies da família Polygonaceae, como na *F. esculentum*, *P. virginianum*, *P. filiforme*, and *P. neofiliforme*, *R. nobile*, *T. cumingiana* (HUSSEIN et al., 2005; IWASHINA et al., 2004; KALINOVA; VRCHOTOVA, 2009; MUN; PARK, 1995). Dentre os flavonoides a quercetina é a mais encontrada na dieta humana, correspondendo cerca de 95% do total dos flavonoides ingeridos, onde as fontes majoritárias são a maçã, cebola e brócolis (NIJVELDT et al., 2001). Possui várias propriedades terapêuticas destacando-se o potencial antioxidante, antitumoral (KANEUCHI et al., 2003; LIESVELD et al., 2003; TAN et al., 2003) , efeitos protetores aos sistemas renal, cardiovascular e hepático (BEHLING et al., 2004), efeito anti-inflamatório (ROMERO et al., 1989; CHO et al., 2003; SANTANGELO et al., 2007), analgésico (WILLAIN

FILHO, 2005), hipoglicemiante (VESSAL, HEMMATI, VASEI, 2003), gastroprotetor (KAHRAMAN et al., 2003), antiulcerativo (ZAHORODNYI, 2003), antifibrótico (QI et al., 2001), citoprotetor (POTAPOVICH; KOSTYUK, 2003), ansiolítico (GOUTMAN et al., 2003), neuroprotetor (DOK-GO et al., 2003), antiviral (CARVALHO et al., 2013) e antimicrobiano (SOUZA, 2009).

Macêdo et al. (2015), identificaram diferentes classes de flavonoides glicosídeos no extrato etanólico e frações das folhas de *T. gardneriana*, coletadas na cidade de Santa Maria da Boa Vista (PE), onde através da técnica de CLAE acoplada a espectrometria de massas com ionização por electrospray identificaram a presença da miricetina-hexosídeo, quercetina-hexosídeo, quercetina-pentosídeo e quercetina-ramnobiosídeo. Outro estudo, através da técnica de CLAE, identificou no extrato etanólico e nas frações aquosa, metanólica, acetato de etila e clorofórmio das sementes de *T. gardneriana* quatro compostos fenólicos (ácido gálico, ácido elágico, ácido clorogênico e ácido cafeico) e oito flavonoides (catequina, epicatequina, rutina, quercetina, isoquercetrina, quercetrina, canferol e glicósido de canferol), onde a fração de acetato de etila concentrou uma quantidade maior de compostos fenólicos, seguido pela fração aquosa, fração metanólica, extrato etanólico e fração de clorofórmio (ALMEIDA, 2017).

Na quantificação de proteína, o extrato apresentou uma concentração de 38.1 µg/mL, HA (título) de 512 e HA específica de 13,43. A amostra manteve a sua atividade hemaglutinante quando aquecida à 100 °C por 30 minutos. Alguns estudos mostram lectinas temoresistentes, como a CrataBL (ARAÚJO, 2008), a MuLL (NAPOLEÃO et al., 2012) e a cMoL (SANTOS et al., 2009). Não houve inibição da atividade hemaglutinante com os carboidratos simples testados, mas houve inibição parcial da atividade na presença da fetuína, sugerindo a presença de lectina. Outros estudos relatam a presença de lectina inibida somente pela fetuína, como é caso da lectina isolada da casca de *H. brasilinsis* (WITTSUWANNAKUL; WITTSUWANNAKUL; SAKULBORIRUG, 1998) e da lectina CrataBL que teve sua atividade hemaglutinante totalmente inibida pela fetuína (ARAÚJO, 2008). A amostra não promoveu a inibição da tripsina, uma vez que não foi capaz de inibir a hidrólise do composto BApNA pela tripsina bovina. Estes resultados ressaltam uma potencial perspectiva de investigação e isolamento de uma nova biomolécula em estudos futuros.

Tabela 4: Caracterização de TG Aq

Amostra	Proteína (µg/mL)	Atividade hemaglutinante (HA)		Unidade inibidora de Tripsina (TIA)	
		Título	HA Específica	Unidade	TIA Específica
<i>T.gardneriana</i> (1mg/mL)	38.1	512	13.43	8.48	12.95

Tabela 5: Inibição da Atividade Hemaglutinante

Carboidrato (100mM)	AH
Manose	512
N-acetilglicosamina	512
Galactose	256
Frutose	512
Glicose	512
Glicoproteína (1mg/mL)	AH
Fetuína	8

Ainda não há relatos na literatura sobre a presença de lectinas na espécie *T. gardneriana*, no entanto, extratos de sementes de *Triplaris amaricana*, outra espécie do gênero *Triplaris*, apresentou uma forte atividade hemaglutinante em sangue humano (SCHERTZ et al., 1960).

3.2 Atividades Antioxidantes *in vitro*

A pesquisa da atividade antioxidante pode ser realizada através de diferentes métodos *in vitro*, onde são utilizados desde ensaios químicos e bioquímicos a ensaios mais complexos (SÁNCHEZ-MORENO, 2002). A variedade de métodos é importante para avaliar as diferentes formas que os radicais livres atuam no organismo. Esses testes são essenciais na investigação inicial de compostos naturais para avaliar seu potencial terapêutico, contribuindo na escolha de espécies vegetais para estudos (ALVES et al., 2010).

Foram utilizados cinco métodos para analisar a capacidade antioxidantes *in vitro* do extrato aquoso da *T. gardneriana*, conforme a tabela 6, onde os resultados foram comparados com padrões já conhecidos na literatura de substâncias puras isoladas.

Tabela 6: Atividade antioxidante do extrato aquoso de *T. gardneriana*

Amostras	DPPH IC ₅₀ (µg/mL)	Ânion Superóxido IC ₅₀ (µg/mL)	TAC (1 mg/ml - %)	FRAP (1 mg/ml - %)	Peroxidação lipídica (1 mg/ml - %)
TG Aq	19,10 ± 0,26	33,48 ± 0,31	36,07 ± 1,03	547,93 ± 1,38	29,44 ± 0,28
Quercetina	20,7 ± 1,19	56,52 ± 0,29	41,09 ± 0,48**	551,57 ± 2,69	43,21 ± 2,53***
Ác. Gálico	3,52 ± 0,64**	46,18 ± 0,28	9,12 ± 0,59***	546,73 ± 2,75	100***
BHT	20,9 ± 0,68	996,9 ± 0,33***	13,39 ± 0,86***	563,52 ± 2,53*	17,88 ± 0,66***

Legenda: Resultados expressos em média ± desvio padrão (n = 3). *p < 0,05 vs. quercetina, ácido gálico e BHT. IC50 = capacidade de neutralizar 50% de radicais livres DPPH e ânion superóxido.

Para analisar a capacidade de neutralização dos radicais livres foi utilizado o ensaio espectrofotométrico de inibição de radicais DPPH[•]. O resultado mostrou que o extrato aquoso possui um IC₅₀ muito próximo ao da quercetina e do BHT e superior ao do ácido gálico.

O ensaio do ânion superóxido também avaliou a capacidade do extrato de sequestrar o radical livre, que nesse caso é o ânion superóxido. O resultado desse ensaio constatou que o extrato TG Aq possui um IC₅₀ menor em relação a todos os padrões testados. O ânion superóxido tem um importante papel nas reações do corpo humano. Contudo, a sua produção excessiva causada tanto por patologia quanto por fatores ambientais adversos, podem causar danos teciduais e doenças (HUANG; BOXIN; PRIOR, 2005). Não foi encontrado na literatura nenhum resultado deste ensaio antioxidante para *T. gardneriana*.

Também foram utilizados métodos que avaliam a redução de íons metálicos, a atividade antioxidante total (TAC) e a redução do íon férrico (FRAP). Nestes ensaios o extrato aquoso apresentou resultado significativo quando comparado com os padrões utilizados. No ensaio TAC, o extrato aquoso possui uma atividade maior que os padrões ácido gálico, BHT e próximo ao da quercetina. Em relação ao FRAP, o extrato aquoso apresentou um resultado bem próximo da quercetina e do ácido gálico e um pouco menor que a do BHT. A interação dos radicais livres com os lipídios resulta na peroxidação (HALLIWELL, 1994).

A peroxidação lipídica causa alteração na membrana plasmática, formando produtos citotóxicos e até a morte celular. Já se sabe que algumas substâncias antioxidantes promovem proteção contra o ataque dos EROs aos ácidos graxo poli-insaturados presentes nas membranas

plasmáticas, podendo ser esse um dos possíveis mecanismos responsáveis por danos teciduais (MEAGHER; FITZGERALD, 2000). No ensaio de peroxidação lipídica o ácido gálico é o padrão mais eficaz, sendo considerado o padrão com 100% de atividade anti-peroxidação. O extrato aquoso apresentou neste ensaio uma redução da peroxidação lipídica maior que a do BHT, próximo ao da quercetina e menor que a do ácido gálico.

Muitas espécies da família Polygonaceae possuem uma alta capacidade antioxidante e já foi demonstrado que esta atividade está diretamente relacionada com a presença dos glicosídeos da quercetina (TSEYE-OIDOV et al., 2010).

Farias et al. (2013), utilizaram o ensaio do DPPH para avaliar o potencial antioxidante de 21 extratos etanólicos de plantas da Caatinga e constataram que o extrato etanólico de sementes de *T. gardneriana* possui a melhor atividade antioxidante. Um estudo recente também analisou o extrato etanólico de sementes de *T. gardneriana* com o ensaio do DPPH e relatou um alto potencial antioxidante (ALMEIDA, et al., 2017). Já Macêdo e colaboradores (2015) avaliaram extratos e frações das folhas desta planta e constatam uma significativa atividade antioxidante, pelo método do β -caroteno e DPPH.

3.3 Avaliação da Atividade Antimicrobiana

As plantas medicinais vêm sendo estudadas ao longo dos anos, com atenção especial para os efeitos antimicrobianos, onde apresentam menor risco de resistência bacteriana devido a sua complexa composição, dificultando a adaptabilidade microbiana (DAFERERA, ZIOGAS; POLISSIOU, 2003). Sendo assim, TG Aq foi analisado quanto a sua atividade antimicrobiana frente à duas cepas bacterianas Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*) e duas Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*). O resultado do ensaio pode ser observado na tabela a seguir (Tabela 7).

Tabela 7: Concentração mínima inibitória e concentração mínima bactericida de TG Aq contra bactérias gram-positivas e gram-negativas.

Cepas Bacterianas	CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)
<i>S. aureus</i>	0,5	1
<i>E. faecalis</i>	0,25	0,5
<i>P. aeruginosa</i>	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-

Legenda: Concentração mínima inibitória (CMI) e Concentração mínima bactericida (CMB) do extrato em miligrama por mL.

A atividade antimicrobiana de TG Aq foi determinada a partir da concentração mínima inibitória (CMI) e da concentração mínima bactericida (CMB). A amostra apresentou um valor de CMI de 0,5 mg/mL para *S. aureus*, 0,25 mg/mL *E. faecalis* e um valor de CMB de 1 mg/mL para *S. aureus* e 0,5 mg/mL para *E. faecalis*. Já para as bactérias gram-negativas, TG Aq não apresentou concentração mínima inibitória nem bactericida.

Holetz et al. (2002) preconiza que, para extratos vegetais, a atividade antimicrobiana é considerada forte quando o valor de CMI for inferior à 0,1mg/mL, moderada entre 0,1 a 0,5 mg/mL, fraca entre 0,5 a 1,0 mg/mL e inativos quando apresentarem valores acima de 1,0 mg/mL. Desse modo, TG Aq apresentou uma inibição moderada frente às bactérias *S. aureus* e *E. faecalis*, não demonstrando atividade frente as cepas bacterianas gram-negativas.

O estudo de Macêdo (2015) corroborou com o resultado supracitado, onde a atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto e a fração acetato de etila das folhas de *T. gardneriana* mostraram-se igualmente ativos contra cepas de *Bacillus cereus*, *Shigella flexneri* e *Staphylococcus aureus* e também não apresentou atividade contra a bactéria Gram negativa *Klebsiella pneumoniae*. Outro estudo constatou que o extrato etanólico de sementes de *T. gardneriana* possui atividade antimicrobiana frente a três espécies de bactérias, *Salmonella choleraesuis* *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*, com valores de MIC respectivos 18.8, 13.76, e 11.15mg/mL e da mesma forma não se mostrou ativo frente a bactéria *Klebsiella pneumoniae* (FARIAS, et al.; 2013).

Nakatani (1994), Delaquis et al (2002) e Gould (2009), relatam que as bactérias gram-positivas são mais sensíveis aos efeitos antimicrobianos dos extratos vegetais em relação as gram-negativas, provavelmente devido a proteção de lipopolissacarídeos que circunda a parede celular das bactérias gram (-), tornando-as resistentes (GOULD, 2009).

Já o óleo fixo das sementes e folhas de *T. gardneriana* apresentou uma inibição fraca a moderada contra *K. pneumoniae*, assim como para *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticillina (MRSA), *E. faecalis* e *Salmonella. Entérica* (MACÊDO et al., 2016).

Outras espécies do gênero *Triplaris* também apresentam uma boa atividade antimicrobiana, como a *T. surinamensis* (VERPOORTE; DIHAL, 1987) e a *T. americana* (DESMARCHELIER, C. et al.1996; GRAHAM, et al., 2003; CAMONES, 2009).

A atividade antimicrobiana de muitas plantas e seus derivados é atribuída à presença de compostos fenólicos e flavonoides, como por exemplo o Alecrim (*Rosmarinus officinali*) que possui ação antimicrobiana frente a *Bacillus subtilis* e a *Candida albicans* (NASCIMENTO et

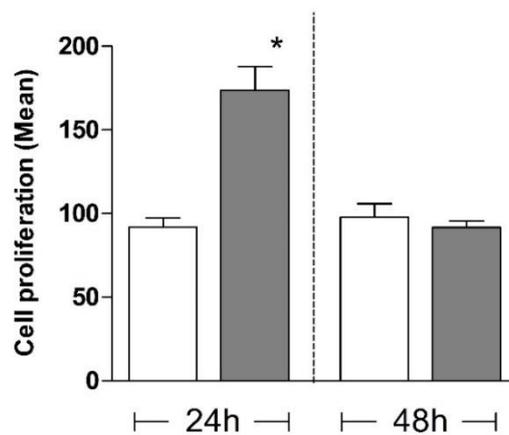
al., 2000). Chattopadhyay et al. (2001) relacionaram a significativa atividade antimicrobiana de extratos das folhas de *Alstonia macrophylla* frente a várias cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* e *Escherichia coli* com a presença de flavonoides. A própolis, muito conhecida pela sua atividade antimicrobiana, possui diversos estudos sugerindo que tal atividade é alcançada devido a presença de flavonoides (quercetina) e ácidos fenólicos (SFORCIN et al., 2000; CASTALDO, CAPASSO, 2002; PIETTA, GARDANA, PIETTA, 2002), que segundo alguns autores, agem na membrana citoplasmática ou na parede celular microbiana, causando danos funcionais e estruturais ao microrganismo (MIRZOEVA, GRISHANIN, CALDER, 1997; GATTO et al., 2002). Outro trabalho propõe que além da membrana citoplasmática, os flavonoides podem interferir no metabolismo energético pela inibição do NADH-citocromo-C-redutase ou inibir a enzima topoisomerase levando a inibição do DNA (CUSHNIE, LAMB, 2011). Neste sentido, diversos relatos na literatura correlacionam a atividade antimicrobiana com a presença de flavonoides (BAEZ, VALLEJO, JIMENEZ-ESTRADA, 1999; XU, LEE, 2001; OGUNDIPE et al., 2001).

3.4 Atividade Imunomoduladora

Compostos com ação imunomoduladora podem estimular mecanismos de defesa do hospedeiro para a profilaxia e tratamento de diversas doenças (MASIHI, 2000). Durante o processo inflamatório, a migração de células aos tecidos é fundamental e envolve rolamento destas células, adesão ao endotélio, migração transendotelial e deslocamento para o tecido (ABBAS, 2005, MONTES DE OCA et al., 2005). O aumento da proliferação celular corrobora com o processo de cicatrização, principalmente na fase inflamatória de uma ferida (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007).

A atividade imunomoduladora foi realizada através da proliferação celular, onde os esplenócitos foram marcados previamente com CFSE, molécula capaz de associar-se a proteínas do citoplasma celular e ser distribuída às células filhas, possibilitando a detecção do aumento da proliferação em função da diminuição da fluorescência nestas células. O ensaio foi realizado durante 48h, onde em 24h observou-se um significativo aumento da proliferação celular em comparação com o grupo controle (Figura 2).

Figura 2: Proliferação celular em esplenócitos de camundongos



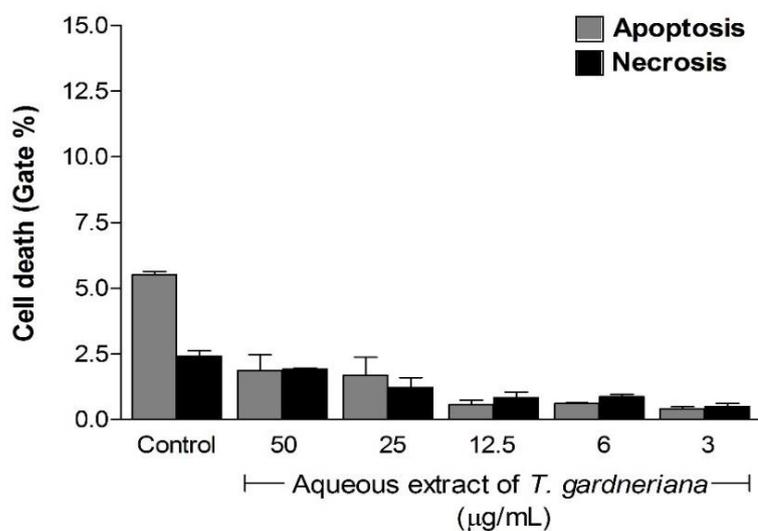
Legenda: As barras brancas se referem ao grupo controle (meio + célula) e as barras cinzas ao grupo tratado com 25ug/mL de TG Aq. *p = 0.008.

Já se sabe que os flavonoides são capazes de afetar a imunidade (BERG, DANIEL, 1988) e a inflamação (SERAFINI, PELUSO, RAGUZZINI, 2010). Middleton, (1998), demonstrou que os flavonoides modulam o sistema imunológico afetando as atividades estimuladas por células imunes, com destaque para a Quercetina que possui uma potencial atividade imunomoduladora (CHIRUMBOLO, 2010; NATHIYA, DURGA, DEVASENA, 2014). Neste sentido, alguns estudos clínicos sugeriram que alguns antioxidantes podem ter ação imunomoduladora (BENDICH, 1993; DE LA FUENTE et al., 1998; DEL RIO et al., 1998).

3.5 Potencial Citotóxico

Muitos estímulos podem induzir a morte celular pela rota apoptótica ou necrótica. A anexina V conjugada à fluoresceína (FITC) diferencia as células viáveis das células apoptóticas, ao se ligar à fosfatidilserina exposta na superfície celular, enquanto o PI reconhece as células necróticas, que tenham a integridade da membrana plasmática comprometida (VERMES, HAANEN, REUTELINGSPERGER, 2000).

O potencial citotóxico de TG Aq foi realizado através do ensaio de viabilidade celular utilizando os marcadores anexina V-FITC e iodeto de propídio em esplenócitos de camundongos BALC. O ensaio obteve uma viabilidade celular de aproximadamente 95%. As concentrações analisadas não induziram a apoptose e necrose, não apresentando citotoxicidade (Figura 3).

Figura 3: Viabilidade celular em esplenócitos de camundongos

3.6 Toxicidade aguda

A demanda do mercado por medicamentos à base de plantas é progressiva, no entanto ainda há preocupações quanto a sua segurança uma vez que muitos produtos vegetais podem ser tóxicos, dependendo da dose utilizada (MARIZ et al., 2006). Menos de 10 % destes produtos possuem seus componentes ativos padronizados e conhecidos (WINSTON, MAIMES, 2007). Vários países, como os EUA, não exigem para os medicamentos fitoterápicos os mesmos parâmetros regulatórios dos medicamentos alopáticos, não havendo assim uma comprovação de sua eficácia e segurança (IFEOMA; OLUWAKANYINSOLA, 2013). Neste sentido, a avaliação da toxicidade aguda é de extrema importância para revelar previamente os danos que os compostos vegetais podem causar à saúde.

O ensaio de toxicidade oral aguda do extrato aquoso de *T. gardneriana* foi realizado na dose de 2000 mg/kg, conforme a Guia da OECD (OECD, 2001). O resultado mostrou que não houve óbitos e que o peso dos animais do grupo tratado e do grupo controle não apresentou diferença estatística significativa, assim como o consumo de ração e água durante os 14 dias de tratamento (tabela 8).

Tabela 8: Média dos valores obtidos do consumo de ração e água, peso inicial, peso final e variação do peso corporal dos animais do grupo controle (solução salina) e do grupo tratado com TG Aq na dose única de 2000 mg/kg.

GRUPOS	CONSUMO DE RAÇÃO (g)	CONSUMO DE ÁGUA (mL)	PESO INICIAL (g)	PESO FINAL (g)	VARIAÇÃO DO PESO CORPORAL (g)
CONTROLE	18,00 ± 1,96	42,86 ± 2,29	37,0 ± 2,31	39 ± 2,65	0,65 ± 0,12
TG Aq	19,14 ± 2,35	43,93 ± 2,66	39,0 ± 2,08	41,0 ± 2,00	0,62 ± 0,23

Legenda: Resultados expressos em média ± desvio padrão.

Muitos estudos mostram que a intoxicação causada pelo consumo de produtos naturais pode causar alterações macroscópicas em alguns órgãos como o fígado, o baço e os rins (ALBERNAZ, et al., 2008; KLAUS, et al., 2010; HUBINGER, et al., 2012; MUSTAFA, et al., 2012). Diante disto, a análise macroscópica no fígado, baço e rins foi realizada e não revelou alterações na coloração ou consistência dos órgãos, bem como não houve diferença significativa no peso dos órgãos dos animais do grupo tratado em relação aos do grupo controle (Tabela 9).

Tabela 9: Peso relativo dos órgãos dos animais do grupo controle (solução salina) e do grupo tratado com TG Aq na dose única de 2000 mg/kg.

GRUPOS	FÍGADO (g)	BAÇO (g)	RINS (g)
CONTROLE	4,51 ± 0,43	0,52 ± 0,08	0,98 ± 0,03
TG Aq	4,34 ± 0,60	0,45 ± 0,14	0,94 ± 0,01

Legenda: Resultados expressos em média ± desvio padrão.

O fígado é o principal órgão metabolizador dos fármacos, realizando o fenômeno denominado de efeito de primeira passagem. Geralmente após administrados pela via oral, os fármacos são absorvidos inalterados pelo trato gastrointestinal e transportados pela circulação porta até o fígado, onde são metabolizados antes de alcançarem a circulação sistêmica (HOFFMAN, 2003). A maioria dos efeitos tóxicos relacionados ao uso de plantas medicinais

estão associados à hepatotoxicidade (SAAD et al, 2006). A biotransformação normalmente aumenta a hidrofiliabilidade das drogas a fim de propiciar a excreção renal (TANIGUCHI, GUENGERICH; S/A). Assim, o fígado e os rins podem ser alvos de lesões ocasionadas pelos efeitos colaterais de plantas medicinais (STICKEL; PATSENKER; SCHUPPAN, 2005).

Diante disto, os parâmetros bioquímicos hepáticos e renais foram avaliados para investigar a possível toxicidade do TG Aq. Conforme a análise estatística realizada (ANOVA), não foram observadas alterações significativas nos níveis séricos hepáticos e renais (albumina, ureia, creatinina, ácido úrico, proteínas totais, fosfatase alcalina, alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase) do grupo tratado com TG Aq em relação ao grupo controle (Tabela 10).

Tabela 10: Bioquímica sanguínea de animais tratados com a dose única de 2000 mg/kg de TG Aq comparada com o controle, demonstrada com valores absolutos \pm desvio padrão. (n=3)

PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	CONTROLE (veículo, salina) (n=3)	TG Aq (2000mg/kg) (n=3)
ÁCIDO ÚRICO (mg/dL)	1,71 \pm 0,09	1,75 \pm 0,09
ALT (U/L)	88,55 \pm 0,21	70,26 \pm 0,23
AST (U/L)	71,32 \pm 0,92	77,9 \pm 0,4
CREATININA (mg/dL)	0,19 \pm 0,05	0,21 \pm 0,04
ALBUMINA (g/dL)	2,19 \pm 0,12	2,00 \pm 0,22
PROTEÍNAS TOTAIS (g/dL)	7,8 \pm 0,34	6,64 \pm 0,24
FOSFATASE ALCALINA (U/L)	72,48 \pm 1,69	68,84 \pm 3,20
GLICOSE (mg/dL)	112,19 \pm 0,38	123,76 \pm 0,37
UREIA (mg/dL)	57,90 \pm 0,26	56,97 \pm 0,06

Legenda: Resultados expressos em média \pm desvio padrão.

A análise comparativa dos resultados bioquímicos com valores apresentados na literatura demonstra que as variações intraespécie existem, podendo ser resultante de variações de manuseio, ordem ambiental, bem como a metodologia utilizada (LIMA et al., 2014). Os resultados bioquímicos só devem ser generalizados sob condições específicas de estudo, utilizando-se animais com a mesma linhagem, idade, dieta, assim como a metodologia utilizada no ensaio também interfere nos resultados laboratoriais (LILLIE; TEMPLE; FLORENCE, 1996). Desta forma, os resultados do grupo tratado com TG Aq foram interpretados através da comparação com o grupo controle. Diante dos resultados da análise toxicológica é possível afirmar que o TG Aq na dose testada não demonstrou toxicidade em camundongos Swiss.

Estudos mostram que várias espécies da família Polygonaceae foram avaliadas e não apresentaram toxicidade, como a *P. hydropiperoides* (BIANCHI et al., 1993). Contudo, há também espécies que revelaram uma alta toxicidade, como a *P. acre* que apresentou uma mortalidade de 50% na dose de 2g/kg, aumento do coração e pulmão dos animais tratados, além de perda de peso corpóreo (SOFIATI, 2009).

Barros et al. (1970), analisaram algumas plantas brasileiras quanto a sua toxicidade e demonstraram que o extrato aquoso e etanólico da casca de *T. gardneriana* exibiu uma alta toxicidade quando testado em camundongos e peixe. Já Almeida et al. (2016) constataram que o extrato etanólico das sementes de *T. gardneriana* não causou morte dos animais e nem quaisquer sinais de toxicidade oral aguda. Um estudo de toxicidade oral aguda em outra espécie de Triplarias, mostrou que o extrato hidroalcoólico das folhas de *Triplaris americana* não apresentou morte, nenhuma alteração na curva de crescimento dos animais, assim como nenhum sintoma comportamental de toxicidade, considerando a amostra como segura para o uso (CAMONES et al, 2010).

3.7 Avaliação da genotoxicidade

Apesar das plantas medicinais serem amplamente utilizadas para tratar diversos sintomas, muitas não foram estudadas quanto a presença de substâncias genotóxicas em sua composição, resultantes do seu próprio metabolismo (BAGATINI, et al., 2007). A agência reguladora nacional, ANVISA, preconiza a determinação da genotoxicidade/mutagenicidade de agentes terapêuticos para avaliar a segurança destes produtos (BRASIL, 1997).

Para investigar o potencial genotóxico de TG Aq foram utilizados o teste de micronúcleo e o ensaio cometa (ID e FD) a partir de células sanguíneas de camundongos, conforme a tabela 11. Em todos os testes não houve diferença significativa entre o grupo tratado com o extrato aquoso de *T. gardneriana* e o controle negativo, de acordo com a análise estatística. Sendo assim, a amostra TG Aq não demonstrou genotoxicidade no ensaio cometa e no teste do micronúcleo.

Tabela 11: Teste de micronúcleo e ensaio cometa

GRUPOS	TESTES		
	MN	ID	FD
CN	0.8 ± 0.8	127.8 ± 15.7	82 ± 7.4
TG Aq	1.6 ± 2.1	113 ± 18.9	85.4 ± 7.2
CP	25.4 ± 12.3*	331.4 ± 38.1*	98.2 ± 3.6*

Legenda: Resultados expressos em média ± desvio padrão (n = 5). *p < 0,05. MN: micronúcleo; ID: índice de dano pelo ensaio cometa; FD: frequência de dano em percentagem pelo ensaio cometa; CN: controle negativo; CP: controle positivo.

A ausência da atividade genotóxica na amostra TG Aq demonstra uma característica positiva para o desenvolvimento de novos fármacos, uma vez que compostos químicos presentes em extratos vegetais com indícios genotóxico podem produzir danos irreversíveis ao material genético e causar alterações no funcionamento da célula, representando assim um sério risco para a saúde humana. Desta forma, as pesquisas voltadas para a análise do potencial genotóxico representam uma importante etapa na investigação de novos fármacos (HARTMANN, et al., 2001).

Não há relatos na literatura da avaliação genotóxica para a *T. gardneriana*, porém há estudos para outras espécies da família Polygonaceae. Tsuboy et al. (2010) avaliou o potencial genotóxico dos extratos etanólico de raízes e folhas de *Coccoloba mollis* e detectou que ambos os extratos induziram o dano do DNA no ensaio cometa, enquanto no teste de micronúcleo não induziu a mutagenicidade. Outro trabalho analisou a genotoxicidade de *Polygonum punctatum* utilizando raízes de bulbos e radículas obtidas a partir da germinação de sementes de *A. cepa* através do teste *in vivo* e verificou que as soluções preparadas por infusão e por extrato desta espécie possuem capacidade mutagênica e genotóxica (PASTORI, et al., 2015).

4 CONCLUSÃO

A caracterização fitoquímica das folhas de *T. gardneriana* revelou a presença de flavonoides e compostos fenólicos, a análise de CLAE indicou a presença de quercetina e a amostra exibiu atividade lectínica. Dentre as atividades biológicas avaliadas neste estudo, TG Aq apresentou uma potencial atividade antioxidante, antimicrobiana e imunomoduladora, onde tais atividades estão diretamente relacionadas à sua composição química. Nos ensaios de segurança, TG Aq não apresentou sinais de toxicidade aguda quando administrado por via oral na dose de 2000mg/kg, não induziu a citotoxicidade nas diferentes concentrações testadas, assim como não apresentou efeito genotóxico e mutagênico. Os resultados obtidos neste estudo fazem da *Triplaris gardneriana* uma fonte promissora para aplicações na indústria farmacêutica, no entanto, estudos mais aprofundados devem ser realizados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, K. A.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**, 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- ALBERNAZ, T. et al. Fotossensibilização em ovinos associada à ingestão de *Brachiaria brizanthan* o estado do Pará. **Pesq Vet Bras**, v. 30, n. 9, p.741-748, 2010.
- ALMEIDA, T. S. **Identificação, Atividade Antioxidante e Análise Toxicogenômica de Compostos Fenólicos de Sementes de *Triplaris gardneriana* Wedd.** 2016. 215f. Tese de doutorado – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.
- ALMEIDA, Thiago Silva et al. Phenolic compounds of *Triplaris gardneriana* can protect cells against oxidative stress and restore oxidative balance. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 93, p. 1261–1268, 2017.
- ALVES, C.Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 263-269, 2010.
- ARAÚJO, R. M. S. **Purificação, imobilização e avaliação de propriedades biológicas da lectina da entrecasca de *Crataeva tapia*.** 2008. 179f. Tese de doutorado - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.
- BAEZ, D. A.; VALLEJO, L. G. Z.; JIMENEZ-ESTRADA, M. Phytochemical studies on *Senna skinneri* and *Senna wishizeni*. **Nat. Prod. Lett.**, v. 13, p. 223-228, 1999.
- BAGATINI, M. D. et al. Uso do sistema de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 444-447, 2007.
- BEAUCHAMP, Charles; FRIDOVICH, Irwin. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 276–287, 1971.
- BEHLING, E. V. et al. Flavonoide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.
- BENDICH, A. Physiological role of antioxidants in the immune system. **J Dairy Sci.**, v. 76, p. 2789–2794, 1993.
- BENZIE, Iris F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **ANALYTICAL BIOCHEMISTRY**, v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996.
- BERG, P. A.; DANIEL, P. T. Effects of flavonoid compounds on the immune response. **Prog. Clin. Biol. Res.**, v. 280, 157-171, 1988.
- BIANCHI, N.R.; SILVA, M.O.; SPIASSI, L.; MACHADO, C.A.; BERGONCI, J.I. Ensaio de toxicidade excessiva e “screening” fitoquímico de plantas usadas popularmente no tratamento de afecções gastro-intestinais. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.74, n.2, p. 50-51, 1993.

BING, D. H.; WEYAND, J. G. M.; STAVITSKY, A. B. Hemagglutination with Aldehyde-Fixed Erythrocytes for Assay of Antigens and Antibodies. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 124, n. 4, p. 1166–1170, 1966.

BJELDANES, L. F.; CHANG, G. W. (Mutagenic Activity of Quercetin and Related Compounds Quantitation of Cytoplasmic Tubulin by Radioimmunoassay. **Science**, v. 197, n. August, p. 9–10, 1977.

BLOIS, M. S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. **Nature**, v. 181, p. 1199–1200, 1958.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. Fortaleza: Mossoró. p. 123, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 251; 1997. Disponível em:<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cns/1997/res0251_07_08_1997.html> Acesso em: 18 fev. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. Disponível em:<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf> Acesso em: 30 jan. 2018.

BRASSEUR, T.; ANGENOT, L. Unreactif de choix pour la revelation des flavonoides: Le mélange diphenylborated'aminoethanol – Peg 400. **Journal of Chromatography**. v. 351, p. 351-355, 1986.

BOWERS, M. ..Deane; STAMP, Nancy E. .. Effects of Plant Age , Genotype and Herbivory on Plantago Performance and Chemistry. **Ecological Society of America**, v. 74, n. 6, p. 1778–1791, 1993.

CAMONES, M. A. I. et al. Pharmacognostic study, antioxidant activity and toxicity to dose limit of triplaris americana l. (tanganara colorada). **Revista de la Sociedad Química del Perú**, v. 76, n. 1, p. 34-42, 2010.

CAMONES, M. A. I. **Actividad antioxidante y antimicrobiana de los compuestos fenólicos del extracto hidroalcohólico de la corteza de *Triplaris americana* L. (Tanganara colorada)**. 126f. TESE (Químico Farmacéutico) - E. A. P. de Farmcia Y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú, 2009.

CAMPOS, A. C. L. BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de feridas. **Arq Bras Cir Dig**, v. 20, n. 1, p. 51-8, 2007.

CARTAXO, Sarahbelle Leitte; SOUZA, Marta Maria de Almeida; ALBUQUERQUE, Ulysses Paulino De. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, n. 2, p. 326–342, 2010.

CARVALHO, O.V. et al. Antiviral potencial of quercetin in canine parvovirus. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 65, n. 2, p. 353-358, 2013.

CASTALDO, S., CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v. 73, p. 1-6, 2002

CHATTOPADHYAY, D. et al. Antimicrobial activity of *Alstonia macrophylla*: a folklore of bay islands. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p. 49-55, 2001.

CHIRUMBOLO, S. The Role of Quercetin, Flavonols and Flavones in Modulating Inflammatory Cell Function. **Inflammation & Allergy-Drug Targets**, v. 9, n. 3, p. 1-23, 2010.

CHO, S. Y.; PARK, S. J.; KNOW, M. J. et al. Quercetin supresses proinflammatory cytokines production through MAP kinases and NF-Kappa B pathway in lipopolysacaride-stimulated macrophage. **Mol. Cell Biochem.**, v. 243, p. 153-160, 2003.

CLSI., 2014. Performance Standards Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement (M100 -S24). CLSI, Wayne, PA, USA.

COLLINS, A. R. et al. The comet assay : topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 143–151, 2008.

CUSHNIE, T. P. T., LAMB, A. J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, n. 2, p. 99-107, 2011.

DAFERERA, D.J.; ZIOGAS, B.N.; POLISSIOU, M.G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop Protection**, v. 22, p. 39-44, 2003.

DE LA FUENTE, M.; FERRANDEZ, M. D.; DEL RIO, M.; SOL BURGOS, M.; MIQUEL, J. Enhancement of leukocyte functions in aged mice supplemented with the antioxidant thioproline. **Mech Aging Dev**, v. 104, p. 213–225, 1998.

DELAQUIS, P. J. et al. Antimicrobial activity of individual and mixed fraction of dill, cilantro, coriander and *Eucalyptus* essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, p. 101-109, 2002.

DEL RIO, M.; RUEDAS, G.; MEDINA, S.; VICTOR, V. M.; DE LA FUENTE, M. Improvement by several antioxidants of macrophage function in vitro. **Life Sci.**, v. 63, p. 871–881, 1998.

DESMARCHELIER, C. et al. Studies on the cytotoxicity, antimicrobial and DNAbinding activities of plants used by the Ese'ejas. **Journal of ethnopharmacology**, v. 50, n. 2, p. 91-96, 1996.

DOK-G, H. et al. Neuroprotective effects of antioxidative flavonóids, quercetin, dihydroquercetin and quercetin 3-methyl ether, isolated from *Opuntia ficusindica* var. saboten. **Brain Research**, v.965; p.130-136, 2003.

FARIAS, D. F. et al. Antibacterial, antioxidant, and anticholinesterase activities of plant seed extracts from Brazilian semiarid region. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–9, 2013.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61–68, 1997.

GATTO, M. T. et al. Antimicrobial and anti-lipase activity of quercetin and its C2-C163-O-acyl-esters. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 10, p. 269–272, 2002.

GOULD, D. Effective strategies for prevention and control of Gram-negative infections. **Nursing Standard**, v. 23, n. 48, p. 42-46, 2009.

GOUTMAN, J. D.; WAXEMBERG, M. D.; DONATE-OLIVER, F.; POMATA, P. E.; CALVO, D. J. Flavonoid modulation of ionic currents mediated by GABA (A) and GABA (C) receptors. **Eur. J. Pharmacol.** v. 14, p. 79-87, 2003

GRAHAM, J. G. et al. Antimycobacterial evaluation of Peruvian plants. **Phytotherapy**, v. 10, n. 6, p. 528-535, 2003.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: Curiosity, cause, or consequence? **Lancet**, v. 344, n. 8924, p. 721–724, 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Protection against oxidants in biological systems: the superoxide theory of oxygen toxicity. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford University Press, p. 86-179, 1989.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; CROSS, C. E. Free-radicals, antioxidants, and human-disease – Where are we now. **J Lab Clin Med.**, 119: 598–620, 1992.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**, 3a ed., New York: Oxford University Press, 1999

HARBORNE, J. B. *Phytochemical Methods*. 3^a Ed. Londres: Chapman & Hall, 1998.

HARTMANN, A. et al. Use of the alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test. **Food Chem Toxicol.**, v. 39, n. 8, p. 843-858, 2001.

HENDRIKS, Henk et al. The content of parthenolide and its yield per plant during the growth of *Tanacetum parthenium*. **Planta Medica**, v. 63, n. 4, p. 356–359, 1997.

HOFFMAN, B. B. Em Goodman & Gilman As Bases Farmacológicas da Terapêutica; Hardman, J. G.; Limbird, L. E., eds.; 10th ed., McGraw-Hill: Rio de Janeiro, 2003.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HUANG, Dejian; BOXIN, O. U.; PRIOR, Ronald L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841–1856, 2005.

HUBINGER, C. et al. Plantas tóxicas do Brasil para animais de produção. Rio de Janeiro: Editora Helianthus, 2012.

HUSSEIN, Ahmed A. et al. Cytotoxic Flavonol Glycosides from *Triplaris cumingiana*. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 231–233, 2005.

IFEOMA, O; OLUWAKANYINSOLA S. Screening of Herbal Medicines for Potential Toxicities – Chapter 4 of *New Insights into Toxicity and Drug Testing*, book edited by Sivakumar Gowder, ISBN 978-953-51-0946-4, Published: January 23, 2013.

IWASHINA, Tsukasa et al. Flavonoids in translucent bracts of the Himalayan *Rheum nobile* (Polygonaceae) as ultraviolet shields. **Journal of Plant Research**, v. 117, n. 2, p. 101–107, 2004.

JANSSEN, A. M.; SCHEFFER, J. J. C.; BAERHEIM SVENDEAEN, A. Antimicrobial activity of essential oils: a 1976–1986 literature review. Aspects of the test methods. **Planta Medica**, v. 53, p. 395–398, 1987.

JANTAN, I; AHMAD, W.; BUKHARI, S.N.A. Plant-derived immunomodulators: an insight on their preclinical evaluation and clinical trials, **Front. Plant Sci.**, v. 6, p. 1–18, 2015.

JÚNIOR, Lécio Resende Pereira et al. Espécies da Caatinga como Alternativa para o Desenvolvimento de Novos Fitofármacos. **Floresta e Ambiente**, v. 21, n. 4, p. 509–520, 2014.

KAHRAMAN, A. et al. Protective effect of quercetin on renal ischemia/reperfusion injury in rats. **Journal of nephrology**, v. 16, n. 2, p. 219–224, 2003.

KALINOVA, Jana; VRCHOTOVA, Nadezda. Level of catechin, myricetin, quercetin and isoquercitrin in buckwheat (*Fagopyrum Esculentum* Moench), changes of their levels during vegetation and their effect on the growth of selected weeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 7, p. 2719–2725, 2009.

KANEUCHI, M. et al. Quercetin regulates growth of Ishikawa cells through the suppression of EGF and cyclin D1. **International journal of oncology**, v. 22, n. 1, p. 159–164, 2003.

KATIYAR, Chandrakant et al. Drug discovery from plant sources: An integrated approach. **AYU (An International Quarterly Journal of Research in Ayurveda)**, v. 33, n. 1, p. 10, 2012.

KIKUZAKI, Hiroe; NAKATANI, Nobuji. Antioxidant Effects of Some Ginger Constituents. **Journal of Food Science**, v. 58, n. 6, p. 1407–1410, 1993.

KLAUS, C. S, et al. Intoxicação experimental por *Brachiaria decumbens* em ovinos confinados. **Pesq Vet Bras.**, v. 30, n. 3, p. 195–202, 2010.

LI, Hua-bin et al. Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. **LWT**, v. 41, n. 3, p. 385–390, 2008.

LIESVELD, J. L.; ABOUD, C. N.; LU, C.; MCNAIR, C.; MENON, A. Flavonoid effects on normal and leukemic cells. **Leuk Res.**, v. 27, p. 517-527, 2003.

LILLIE, Len E.; TEMPLE, Norman J.; FLORENCE, L. Zack. Reference values for young normal Sprague-Dawley rats: Weight gain, hematology and clinical chemistry. **Human & Experimental Toxicology**, v. 15, n. 8, p. 612–616, 1996.

LIMA, C. .. et al. Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia plena**, v. 10, n. 3, p. 1–9, 2014.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin-Phenol Reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 193, p. 265–275, 1951.

LUCA, Vincenzo De et al. Mining the Biodiversity of Plants: A Revolution in the Making. **Science**, v. 336, p. 1658–1661, 2012.

MACÊDO, S. K. S. **Estudo químico e avaliação da atividade biológica in vitro de *Triplaris gardneriana* WEDD. (POLYGONACEAE)**. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais do Semiárido) - Universidade Federal do Vale do São Francisco. Petrolina, 2015.

MACÊDO, S. K. S. et al. Identification of flavonol glycosides and in vitro photoprotective and antioxidant activities of *Triplaris gardneriana* Wedd. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 9, n. 7, p. 207–215, 2015.

MACÊDO, S. K. S. *et al.* GC-MS analysis of esterified fatty acids obtained from leaves and seeds of *Triplaris gardneriana* Wedd. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 10, n. 30, p. 623-630, 2016.

MAGALHÃES, L. S. et al. Avaliação da atividade antibacteriana do extrato de *Caesalpinia ferrea* Martius e desenvolvimento de uma formulação fitocosmética. **Revista Científica da Faminas**, v. 11, n. 1, p. 1–11, 2015.

MARIZ, S. R. et al. Estudo toxicológico agudo do extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. em ratos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 372-378, 2006.

MARQUES, Regina Célia Pereira et al. Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by the Ames test. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 536, n. 1–2, p. 117–120, 2003.

MASIHI, K. N. Immunomodulatory agents for prophylaxis and therapy of infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 14, p. 181-191, 2000.

MEAGHER, Emma A.; FITZGERALD, Garret A. Indices of lipid peroxidation in vivo: Strengths and limitations. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 28, n. 12, p. 1745–1750, 2000.

MELLO, J. P. C.; SANTOS, S. C. **Em Farmacognosia: da planta ao medicamento**; Simões, C. M. O.; Schenckel, E. P., orgs.; Ed. UFSC: Porto Alegre; 3ª ed., 2001.

MELO, C. M. L. et al. Mitogenic Response and Cytokine Production Induced by Cramoll 1,4 Lectin in Splenocytes of Inoculated Mice. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 73, p. 112–121, 2011.

MIDDENDORF, P. J.; WILLIAMS, P. L. **Nephrotoxicity: Toxic Responses of the Kidney**. In: Williams, P.L., James, R.C., Roberts, S.M. Principles of toxicology: environmental and industrial applications. 2° Edition. New York, Cap. 5, p. 120-250, 2000.

MIDDLETON, E. **Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function**. *Adv Exp Med Biol*, v. 439, p. 175–182, 1998.

MIRZOEVA, O. K.; GRISHANIN, R. N.; CALDER, P.C. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. **Microbiol. Res.**, v. 152, p. 239–246, 1997.

MONTES DE OCA, P. et al. Prolacgin stimulates integrin-mediated adhesion of circulating mononuclear cells to endothelial cells. **Lab Invest.**, v. 85, n. 5, p. 633-642, 2005.

MUN, J. H.; PARK, C. W. Flavonoid chemistry of Polygonum sect. Tovarua (Polygonaceae): a systematic survey. **Plant Systematics and Evolution**, v. 196, n. 3–4, p. 153–159, 1995.

MUSTAFA, V. S, et al. Intoxicação natural por *Brachiaria* spp. em ovinos no Brasil Central. **Pesq Vet Bras**, v. 32, n. 2, p. 1272-1280, 2012.

NAKATANI, N. Antioxidative and antimicrobial constituents of herbs and spices. **Dev. Food Sci.**, 34, p. 251 – 271, 1994.

NAPOLEÃO, T. H. et al. Effect of Myracrodruon urundeuva leaf lectin on survival and digestive enzymes of Aedes aegypti larvae. **Parasitol Res.**, v. 110, n. 2, p. 609-616, 2012.

NASCIMENTO, G. G. F. et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.31, n.4, p. 247-256, 2000.

NATHIYA, S.; DURGA, M.; DEVASENA, T. Quercetin, encapsulated quercetin and its application- A review. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 10, p. 20-26, 2014.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 1–33, 2012.

NIJVELDT, R.J et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **Am. J. Clin. Nutr.**, 74, p. 418-425, 2001.

OECD (ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT). **Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 423. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method**. Paris: OECD, 2001.

OGUNDIPE, O. O. et al. Bioactive chemical constituents from Alchornea laxiflora (benth) pax and hoffman. **J. Ethnopharmacol.**, v. 74, p. 275-280, 2001.

- OLIVEIRA, Caio Fernando Ramalhode et al. Purification and biochemical properties of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Entada acaciifolia* (Benth.) seeds. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 6, p. 929–935, 2012.
- PAIVA, P. M. G., COELHO, L. C. B. B. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (camaratu bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 36, p. 113-118, 1992.
- PASTORI, T.; et al. Ação genotóxica e antiproliferativa de *Polygonum punctatum* Elliott (Polygonaceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa* L. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 17, n. 2, p. 186-194, 2015.
- PIETTA, P. G.; GARDANA, C.; PIETTA, A.M. Analytical methods for quality control of propolis. **Fitoterapia**, 73, S7-S20, 2002.
- POTAPOVICH, A. I.; KOSTYUK, V. A. Comparative study of antioxidant properties and cytoprotect activity of flavonoids. **Biochemistry**, v.68, p.514-519, 2003.
- PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantification of antioxidante capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 337–341, 1999.
- PUTMAN, E. *et al.* Assessment of the immunotoxic potential of human pharmaceuticals: a workshop report. **Drug Information Journal**, v. 36, p. 417–427, 2002.
- QI, L. H. et al. Antifibrotic effects of genistein and quercetin in vitro. **Yao Xue Xue Bao**. v. 9, p. 648-651, 2001.
- RAHMAN, K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. **Clinical interventions in aging**, v. 2, n. 2, p. 219–236, 2007.
- RDEVELOPMENT, C. TEAM 2009: R: A Language and Environment for Statistical Computing. **Vienna, Austria. Internet: <http://www.R-project.org>**, 2012.
- RIBEIRO, L. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. **Mutagênese Ambiental. ULBRA, Canoas**, p. 173-178, 2003.
- ROBERTS, E.A.H.; CARTWRIGHT, R.A.; OLDSCHOOL, M. Phenolic substances of manufactured tea. I. Fractionation and paper chromatography of water-soluble substances. **J Sci Food Agr**, v 8, p. 72-80, 1957.
- ROMERO, J.; MARAK, G. E.; RAO, N. A. Pharmacologic modulation of acute ocular inflammation with quercetin. **Ophthalmic Res**. v. 21, n. 2, p. 112-117, 1989.
- ROQUE, A. A.; ROCHA, R. M.; LOIOLA, M. I. B. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (nordeste do Brasil). **Rev. Bras. Pl. Med**, v. 12, n. 1, p. 31–42, 2010.
- SAAD, B. et al. Safety of traditional Arab herbal medicine. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 3, p. 433-439, 2006.

SAHOO, Niharika; MANCHIKANTI, Padmavati; DEY, Satyahari. Herbal drugs: Standards and regulation. **Fitoterapia**, v. 81, n. 6, p. 462–471, 2010.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. **Food Science and Technology International**, v. 8, n. 3, p. 121-137, 2002.

SANTANGELO, C. et al. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. **Annali-istituto superiore di sanita**, v. 43, n. 4, p. 394, 2007.

SANTOS, A. F. S. et al. Isolation of a seed coagulant Moringa oleifera lectin. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 4, p. 504-508, 2009.

SCHERTZ, K. F., et al. Seed extracts with agglutinating activity for human blood. **Economic Botany**, v. 14, p. 232-240, 1960.

SERAFINI, M.; PELUSO, I.; RAGUZZINI, A. Flavonoids as antiinflammatory agents. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 69, 273-278, 2010.

SFORCIN, J. M., FERNANDES JR, A., LOPES, C. A. M., BANKOVA, V., FUNARI, S. R. C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 243-249, 2000.

SOFIATI, FILIPE TONI. **Estudo fitoquímico e atividades biológicas preliminares de extratos de *Polygonum acre* H.B.K. (POLYGONACEAE) e *Synadenium Carinatum* Boiss (EUPHORBIACEAE)**. 2009. 100f. Dissertação de mestrado – Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2009.

SOUZA, A. J. F. **Avaliação dos efeitos antimicrobianos de rutina e quercetina in vitro**. 2009. 62f. Dissertação de mestrado - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2009.

STIASNY, E. The qualitative detection and differentiation of vegetable tannins. *Collegium*, p. 483-499, 1912.

STICKEL, F.; PATSENER, E.; SCHUPPAN, D. Herbal hepatotoxicity. **Journal of Hepatology**, v. 43, n. 5, p. 901-10, 2005.

SOEJARTO, Djaja Djendoel. Biodiversity prospecting and benefit-sharing: perspectives from the field. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 51, n. 1–3, p. 1–15, 1996.

TAMAKOU, J.; KUETE, V. Mutagenicity and Carcinogenicity of African Medicinal Plants. **Toxicological Survey of African Medicinal Plants**, p. 277-322, 2014.

TAN, W. F et al. Quercetin, a dietary-derived flavonoid, posses antiangiogen potential. **European Journal of Pharmacology**, v. 459, p. 255-262, 2003

TANIGUCHI, C.; GUENGERICH, P. (s/a) - Metabolismo dos fármacos. Universidade Federal do Piauí, S/A. Acesso em: 23 fev 2018. Disponível em: <http://www.ufpi.br/subsiteFiles/lapnex/arquivos/files/Metabolismo%20dos%20farmacos.pdf>

TSUBOY, M. S. et al. In Vitro Evaluation of the Genotoxic Activity and Apoptosis Induction of the Extracts of Roots and Leaves from the Medicinal Plant *Coccoloba mollis* (Polygonaceae). **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n. 3, p. 503-508, 2010.

TSEYE-OIDOV, Odbayar et al. Antioxidant Capacities and Total Quercetin Content of Several Species of Polygonaceae in Mongolia. **Food Sci. Technol. Res.**, v. 16, n. 2, p. 169–174, 2010.

VARGAS, V. M. F. et al. Mutagenic and genotoxic effects of aqueous extracts of *Achyrocline satureioides* in prokaryotic organisms. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 240, n. 1, p. 13–18, 1990.

VERMES, I.; HAANEN, C.; REUTELINGSPERGER, C. Flow cytometry of apoptotic cell death. **Journal of Immunological Methods**, v. 243, p. 167-190, 2000.

VERPOORTE, R.; DIHAL, P. P. Medicinal plants of Surinam IV. Antimicrobial activity of some medicinal plants. **Journal of ethnopharmacology**, v. 21, n. 3, p. 315-318, 1987.

VESSAL, M.; HEMMATI, M.; VASEI, M.; Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. **Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.**, v. 3, p. 357-364, 2003

WAGNER, H.; BLADT, S. Plant drug analysis -A thin layer chromatography atlas. **Springer**. 2.ed., 1996.

WEISBURGER, Elizabeth K. Natural carcinogenic products, 1979.

WILLAIN FILHO, Arnaldo. **Potencial analgésico de flavonoides: Estudo do mecanismo de ação da quercetina**. 91f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade do Vale Do Itajaí, Itajaí, 2005.

WINSTON D, MAIMES S. Adaptogens: Herbs for strength, stamina and stress relief. Rochester, Vermont: Healing Arts Press; 2007.

WITTSUWANNAKUL, R; WITTSUWANNAKUL, D; SAKULBORIRUG, C. A lectin from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Phytochemistry**, v. 47, n. 2, p. 183-187, 1998.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, n. 2, p. 99–105, 1998.

XAVIER, H. S. et al. Contribuição à caracterização dos taninos hidrolisáveis. **Congresso Nacional de Botânica**, n. 53, p. 20, 2002.

XU, H. X.; LEE, S. F. Activity of plant flavonoids against antibiotic-resistant bacteria. **Phytother. Res.**, v. 15, p. 39-43, 2001.

YAMAMURA, E. et al. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides with triethylenemelamine. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 278, n. 2–3, p. 127–130, 1992.

4 CONCLUSÃO

- O extrato TGAq apresentou em sua composição compostos relacionados com as atividades biológicas, em destaque a quercetina descrita com um grande potencial biotecnológico, além disto a caracterização da amostra demonstrou atividade hemaglutinante, com atividade mantida após aquecimento e inibida pela fetuína, sugerindo a presença de lectina.
- O extrato TG Aq apresenta potencial antioxidante.
- O extrato TG Aq possui potencial antimicrobiano contra cepas Gram positivas (*S. aureus* e *E. faecalis*), mas parece ineficaz contra cepas Gram negativas (*P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*).
- Foi possível observar que TG Aq induziu significativamente a proliferação celular em esplenócitos de camundongos em 24 horas.
- O extrato TG Aq não induziu a morte celular por apoptose e necrose em esplenócitos de camundongos.
- O ensaio de toxicidade aguda por via oral mostrou que TG Aq não apresentou nenhum indício de toxicidade na dose testada (2000mg/kg).
- O extrato não possui efeitos genotóxicos, pelo ensaio cometa e teste de micronúcleo.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, S. G. De; BANDEIRA, G. R. L. **Effect of thinning and slashing on forage phytomass from a caatinga of Petrolina, Pernambuco, Brazil.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 30, n. 6, p. 885–891, 1995.
- ALBUQUERQUE, U. P. **A etnobotânica no nordeste brasileiro.** In: CAVALCANTI, T. B. E WALTER, B. M. T. Tópicos atuais em Botânica. Brasília: EMBRAPA, São Paulo. Sociedade Botânica do Brasil, p. 241-249. 2000.
- ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. C. **Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de caatinga no estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil.** Acta Botanica Brasilica, v.16, n.3, p.273-85, 2002.
- ALBUQUERQUE, U. P.; LUCENA, R. F. P. **Métodos e técnicas de pesquisa etnobotânica.** Recife: LivroRápido/NUPEEA, 189p, 2004.
- ALMEIDA, T. S. De et al. **Phenolic compounds of Triplaris gardneriana can protect cells against oxidative stress and restore oxidative balance.** Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 93, p. 1261–1268, 2017.
- AMEH, S. J. et al. **Current phytotherapy – A perspective on the science and regulation of herbal medicine.** Journal of Medicinal Plants Research, v. 4, p. 72 – 81, 2010.
- AMES, B. N.; SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M. **Oxidants, Antioxidants, and the Degenerative Diseases of Aging.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 90, n. 17, p. 7915–7922, 1993.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos.** GESEF, Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2013.
- ARAÚJO, Margarida Maria. **Estudo etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais no assentamento Santo Antônio, Cajazeiras, PB Brasil.** 2009. 130 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais e Ambientais) - Universidade Federal de Campina Grande, Patos 2009.
- ARTEEL, G. E. **Oxidants and antioxidants in alcohol induced liver disease.** Gastroenterol, v. 124, p. 778–790, 2003.
- ARTIZZU, N. et al. **Studies of the diuretic and antimicrobial activity of Cynodon dactylon essential oil.** Fitoterapia, v. 66, p. 174-175, 1995.
- BAE, G. U. et al. **Hydrogen peroxide activates p70(S6k) signaling pathway.** Journal of Biological Chemistry, v. 274, n. 46, p. 32596–32602, 1999.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. P. **Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense.** Química Nova, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.

BARROS, G. S. G. et al. **Pharmacological screening of some Brazilian plants.** Journal of Pharmacy and Pharmacology, v. 22, n. 2, p. 116–122, 1970.

BASSO, L. A. et al. **The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria , tuberculosis , and T-cell mediated diseases – A Review.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 100, n. 6, p. 475–506. 2005.

BECKER, K.; HU, Y.; BILLER-ADORNO, N. **Infectious diseases – a global challenge.** International Journal of Medical Microbiology, v. 296, p. 179-185, 2006.

BENAVENTE-GARCÍA, O. et al. **Uses and properties of Citrus flavonoids.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.45, n.12, p.4505–4515, 1997.

BFG. **Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil.** Rodriguésia 66, v. 66, n. 4, p. 1085–1113, 2015.

BOLLER, K.; SCHMID, W. **Chemical mutagenesis in mammals.** The Chinese hamster bone marrow as an *in vivo* test system. Hematological findings after treatment with trenimon, Humangenetik, v. 11, n. 1, p. 35–54, 1970.

BOLTON, J. L. et al. **Role of quinones in toxicology.** Chem. Res. Toxicol., v. 13, p. 135–160, 2000.

BONASSI, S. et al. **An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans.** Carcinogenesis, v. 28, n. 3, p. 625–631, 2007.

BOUKHRIS, M. et al. **Hypoglycemic and antioxidant effects of leaf essential oil of *Pelargonium graveolens* L'Hér. In alloxan induced diabetic rats.** Lipids in Health and Disease. v. 11, p. 81, 2012.

BOURGAUD, F. et al. **Production of plant secondary metabolites: A historical perspective.** Plant Science, v. 161, n. 5, p. 839–851, 2001.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará.** Fortaleza: Mossoró. p. 123, 1976.

BRAVO, L. **Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance.** Nutrition Reviews, v. 56, n. 11, p. 317–333, 2009.

BRENDLER-SCHWAAB, S. et al. **The *in vivo* comet assay: use and status in genotoxicity testing.** Mutagenesis, v. 20, n.4, p.245-254, 2005.

BURT, S. **Essential Oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review.** International Journal of Food Microbiology, v.94, n.3, 223-253, 2004.

CAPASSO, R. et al. **Phytotherapy and quality of herbal medicines.** Fitoterapia, v. 71, n. 1, p. S58-S65, 2000.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. **A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives.** Food and Chemical Toxicology, v. 51, n. 1, p. 15–25, 2013.

CARTAXO, S. L.; SOUZA, M. M. A.; ALBUQUERQUE, U. P. De. **Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil.** Journal of Ethnopharmacology, v. 131, n. 2, p. 326–342, 2010.

CHEESEMAN, K. H.; SLATER, T. F. **An introduction to free radicals chemistry.** Br Med Bull., v. 49, p. 481-93, 1993.

CHEUNG, L. M.; CHEUNG, P. C. K.; OOI, V. E. C. **Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts.** Food chemistry, v. 81, p. 249–255, 2003.

CHUN, S. S. et al. **Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*.** Process Biochem, v. 40, n. 2, p. 809-816, 2005.

CIMINO, M. C. **Comparative Overview of Current International Strategies and Guidelines for Genetic Toxicology Testing for Regulatory Purposes.** Environmental and Molecular Mutagenesis, v. 47, p. 362–390, 2006.

COHEN, M. L. **Epidemiology of drug resistance: implications for a postantimicrobial era.** Science, v. 257, n. 5073, p. 1050-1055, 1992.

COLLINS, A. R. **The Comet Assay for DNA Damage and Repair.** Molecular Biotechnology, v. 26, p. 249–261, 2004.

DARMANYAN, A. P. et al. **Quenching of Singlet Oxygen by Oxygen- and Sulfur-Centered Radicals: Evidence for Energy Transfer to Peroxyl Radicals in Solution.** Journal of the American Chemical Society, v. 7863, n. 9, p. 396–403, 1998.

DECKER, E. A. **Phenolics: prooxidants or antioxidants?** Nutrition Reviews, v.55, n.11, p.396-407, 1997.

DENG, J. F. **Clinical and laboratory investigations in herbal poisonings.** Toxicology, v. 181-182, p. 571-6, 2002.

DIXON, R. A.; PAIVA, N. L. **Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism.** The Plant Cell, v. 7, n. 7, p. 1085-1097, 1995.

DÔRES, R. G. R. **Determinação de composto fenólicos em *Dimorphandra mollis* Benth. In: Análise formológica e fitoquímica da fava d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth).** Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, MG, 2007.

DROGE, W. **Free radicals in the physiological control of cell function.** Physiological Reviews, 2002. v. 82, n. 1, p. 47–95, 2002.

EBADI, M. **Antioxidants and free radicals in health and disease: An introduction to reactive oxygen species, oxidative injury, neuronal cell death and therapy in neurodegenerative diseases.** Arizona: Prominent Press, p. 13-5, 2001.

ELMORE, S. A. **Enhanced Histopathology of the Spleen.** Toxicologic Pathology, v. 34, n. 5, p. 648–655, 2006.

EVANS, H. J.; NEARY, G. J.; WILLIAMSON, F. S. **The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma rays in Vicia faba roots and the effect of oxygen.** Part II. Chromosome damage; the production of micronuclei. International Journal of Radiation Biology, v. 3, p. 216–229, 1959.

FARIAS, D. F. et al. **Antibacterial , Antioxidant , and Anticholinesterase Activities of Plant Seed Extracts from Brazilian Semiarid Region.** BioMed Research International, v. 2013, p. 1–9, 2013.

FENECH, M. **The *in vitro* micronucleus technique.** Mutation Research, v. 455, p. 81–95, 2000.

FERRAZ, J. S. F.; ALBUQUERQUE, U. P.; MEUNIER, I. M. J. **Valor de uso e estrutura da vegetação lenhosa às margens do riacho do Navio, Floresta, PE, Brasil.** Acta Botanica Brasilica, v. 20, n. 1, p. 125–134, 2006.

FERREIRA, D. T. **Antimicrobial activity and chemical investigation of Brazilian Drosera.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 99, n. 7, p. 753-755, 2004.

FIGUEIREDO, M. R.; KAPLAN, M. A. C. **Pyrrolizidine alkaloids: A word of caution.** J Braz Assoc Adv Sci., v. 49, n. 5/6, p.331-8, 1997.

FIGUEIRÔA, E. De O. et al. **Evaluation of Antioxidant, Immunomodulatory, and Cytotoxic Action of Fractions from Eugenia uniflora L. and Eugenia malaccensis L. : Correlation with Polyphenol and Flavanoid Content.** The ScientificWorld Journal, v. 2013, p. 1–7, 2013.

FOGLIO, M. A et al. **Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar.** Construindo a História dos Produtos Naturais. p. 1-8, 2006.

FORZZA, R.C. et al. **Lista de Espécies da Flora do Brasil.** 2013. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/BemVindoConsultaPublicaConsultar.do>>. Acesso em 29/05/2017.

FRANÇA, P. R. C. et al. **Germinação e Vigor de Sementes de Coaçu em Diferentes Substratos.** Associação Brasileira de Horticultura, 2007.

GARCÍA, A. A.; CARRIL, E. P. **Metabolismo secundario de plantas.** Reduca Biología Serie Fisiología Vegetal, v. 2, n. 3, p. 119–145, 2009.

GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R. M.; QUEIROZ, L. P.; BARBOSA, M. R.; BOCAGE, A. L.; FIGUEIREDO, M. A. **Espécies endêmicas da caatinga.** in: SAMPAIO EVSB, GIULIETTI AM, VIRGÍNIO J, GAMARRA-ROJAS CFL, editores. Vegetação e flora da caatinga. Recife: Associação de Plantas do Nordeste; 2002.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. **Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários.** Química Nova, v.30, n.2, p. 374-81, 2007.

- GOMES, E. C. S. J. et al. **Plantas da caatinga de uso terapêutico: levantamento etnobotânico.** Engenharia Ambiental, v. 5, n. 2, p. 74-85, 2008.
- GRAHAM, J. G. et al. **Antimycobacterial evaluation of Peruvian plants.** Phytomedicine, v. 10, n. 6, p. 528-535, 2003.
- GUIDI, I. et al. **Oxidative imbalance in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease.** Neurobiol. Aging, v. 27, p. 262–269, 2006.
- GUIL, J. L.; RODRIGUEZ-GARCIA, I.; TORIJA, E. **Nutritional and toxic factors in selected wild edible plants.** Plant Foods Hum. Nutr., v. 51, n. 2, p. 99-107, 1997.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; CROSS, C. E. **Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now?** J Lab Clin Med, 119:598–620, 1992.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine.** 3 ed. New York: Oxford University Press, 1999.
- HANSON, J. R. **Natural products: the secondary metabolites.** Tutorial Chemistry Texts, v. 17. Royal Society of Chemistry (RSC), UK, 2003.
- HARBORNE, J. B. **Flavonoids: advances in research since 1986.** London: Champman and Hall, 1994.
- HARTMANN, T. **Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view.** Entomologia Experimentalis et Applicata, v.80, n.1, p. 177-88, 1996.
- HASLAM, E. **Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs : Possible Modes of Action.** Journal of natural products, p. 205–215, 1996.
- HAYASHI, M. et al. **Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms.** Mutation Research, v. 399, p. 125–133, 1998.
- HEDDLE, J. A. **A rapid *in vivo* test for chromosomal damage.** Mutation Research, v. 18, n. 2, p. 187--190, 1973.
- HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. **Flavonoid antioxidants : chemistry , metabolism and structure-activity relationships.** The Journal of Nutritional Biochemistry, v. 13, n. 10, p. 572-584, 2002.
- HERNANDES, L. C. et al. ***In vivo* assessment of the cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic potential of maná-cubiu (Solanum sessiliflorum Dunal) fruit.** Food Research International, v. 62, p. 121–127, 2014.
- HERZYK, D. J.; GORE, E. R. **Adequate immunotoxicity testing in drug development.** Toxicology Letters, v. 149, p. 115–122, 2004.
- HOLLAND, S. M.; VIZI, E. S. **Immunomodulation. Current Opinion in Pharmacology,** v. 2, p. 425-427, 2002.

HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. **Dietary Flavonoids: Intake, Health Effects and Bioavailability**. Food and Chemical Toxicology, v. 37, n. 9–10, p. 937–942, 1999.

HYUN, D. H., et al. **The plasma membrane redox system in aging**. Aging Res. Rev., v. 5, p. 209–220, 2006.

ICH. Guidance for Industry. **S2(R1) Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use**. International Conference on Harmonization Expert Working Group, 2012. Disponível em: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S2_R1/Step4/S2R1_Step4.pdf . Acesso em: 15 out. 2017.

IZZO, A. A. et al. **Biological screening of Italian medicinal plants for antibacterial activity**. Phytother. Res., v. 9, p. 281-286, 1995.

JÁCOME, R. L. R. et al. **Caracterização farmacognóstica de Polygonum hydropiperoides Michaux e P. spectabile (Mart.) (Polygonaceae)**. Revista brasileira de farmacognosia, v. 14, n. 1, p. 21–27, 2004.

JANTAN, I.; AHMAD, W.; BUKHARI, S. N. A. **Plant-derived immunomodulators: an insight on their preclinical evaluation and clinical trials**, Front. Plant Sci., v. 6, p. 1–18, 2015.

MEDEIROS, J. D. UnB – Distrito federal, Distrito federal – Brasil, 2010, acessado em 02/02/2018, disponível em <https://www.flickr.com/photos/cerrados/4806013321>

JÚNIOR, L. R. P. et al. **Espécies da Caatinga como Alternativa para o Desenvolvimento de Novos Fitofármacos**. Floresta e Ambiente, v. 21, n. 4, p. 509-520, 2014.

KAHL, V. F. S. et al. **A influência da origem geográfica de amostras de acerola (Malpighia glabra L.) em relação ao seu potencial genotóxico e antígenotóxico**. Revista de Iniciação Científica da ULBRA, v. 7, n. 7, p. 37–45, 2008.

KANCHEVA, V. D. **Phenolic antioxidants of natural origin- structure activity relationship and their beneficial effects on human health**. Nova Science Publishers, Inc, p. 1-45, 2011.

KAUFMAN, P. B.; CSEKE, L. J.; WARBER, S.; DUKE, J. A.; BRIELMANN, H. L. **Natural products from plants**. Boca Raton: CRC Press, FL, 1999.

KIILL, L. H. P. **Bioma Caatinga**. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. 2005. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/bioma_caatinga/arvore/CONT000glz1ehqv02wx5ok0f7mv200nvg0xn.html. Acesso em: 10 fev. 2018.

KIM. et al. **Twenty-Eight-Day Oral Toxicity, Genotoxicity, and Gender-Related Tissue Distribution of Silver Nanoparticles in Sprague-Dawley Rats**. Inhalation Toxicology, v. 20, n. 6, p. 575-583, 2008.

KINGSTON, D. G. **In Anticancer Agents from Natural Products**; CRAGG, G. M.; KINGSTON, D. G. I.; NEWMAN, D. J., Eds.; C.R.C Press LLC: Boca Raton, FL; p 89, 2005.

KINNULA, V. L.; CRAPO, J. D. **Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors**. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 36, p. 718–744, 2004.

KIRSCH-VOLDERS, M. et al. **Report from the *in vitro* micronucleus assay working group**. *Mutation Research*, v. 540, p. 153–163, 2003.

KIRSCH-VOLDERS, M. et al. **Indirect mechanisms of genotoxicity**. *Toxicology Letters*, v. 140–141, p. 63–74, 2003.

KRAUSE, R. M. **The origin of plagues: old and new**. *Science*. v. 257, p. 1073–1078, 1992.

KUBO, L.; MUROI, H.; HIMEJIMA, M. **Structure-antibacterial activity relationships of anacardic acids**. *J. Agri. Food Chem*, v. 41, p. 1016-1019, 1993.

LAPA, A. J. et al. **Farmacologia e toxicologia de produtos naturais**. In Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A and Petrovick, P.R (org). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5.ed. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, 2004.

LEMOIS, A. R. **Caracterização físico-química, bioquímica e avaliação da atividade antioxidante em genótipos de urucueiros (*Bixa-orellana* L.)**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Ipapetinga, 2008.

LETELIER, M. E. et al. **DPPH and oxygen free radicals as pro-oxidant of biomolecules**. *Toxicology in Vitro*, v. 22, n. 2, p. 279–286, 2008.

LIAO, W.; MCNUTT, M. A.; ZHU, W. G. **The Comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells**. *Methods*, v. 48, n. 1, p. 46–53, 2009.

LOEPER, J. et al. **Hepatotoxicity of germander in mice**. *Gastroenterol*, v. 106, n. 2, p. 464-472, 1994.

LOPES, R. M. et al. **Flavonoides: Farmacologia de flavonoides no controle hiperlipidêmico em animais experimentais**. *Biocnologia Ciência & Desenvolvimento*, n. 17, p. 18-22, 2000.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. v. I e II 4a Ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002.

LOVELL, D. P.; OMORI, T. **Statistical issues in the use of the comet assay**. *Mutagenesis*, v.23, n.3, p.171–182, 2008.

LÜ, J. M. et al. **Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems**. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 14, n. 4, p. 840–860, 2010.

LUO, D.; FANG, B. **Structural identification of ginseng polysaccharides and testing of their antioxidant activities**. *Carbohydrate Polymers*, v. 72, p. 376–381, 2008.

- LUSTER, M. I. et al. **Risk assessment in immunotoxicology: I. Sensitivity and predictability of immune tests.** *Fundamental and applied toxicology*, v. 18, n. 2, p. 200–210, 1992.
- MACÊDO, S. K. S. et al. **Photoprotective and antioxidant activities of *Triplaris gardneriana* Wedd.** *Journal of Medicinal Plants Research*, v. 9, n. 7, p. 207–215, 2015.
- MACÊDO, S. K. S. et al. **GC-MS analysis of esterified fatty acids obtained from leaves and seeds of *Triplaris gardneriana* Wedd.** *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 10, n. 30, p. 623-630, 2016.
- MACHADO, H. et al. **Flavonoides e seu potencial terapêutico.** *Boletim do Centro de Biologia da Reprodução*, v. 27, n. 1/2, p. 33-39, 2008.
- MACIEL, M.A.M. et al. **Medicinal plants: The need for multidisciplinary scientific studies.** *Química Nova*, v.25, p 429–438, 2002.
- MALVEZZI, R. **Semi-árido: uma visão holística.** p. 140. 2007.
- MARTINS, I. S.; NOGUEIRA, I. A.; CONCEIÇÃO, M. **Recomendações para o uso adequado de antimicrobianos.** Rio de Janeiro: Secretária de Estado de Saúde; 1998. Disponível em: <http://www.saude.rj.gov.br/Docs/cecih/Antimicrobianos.doc>. Acesso em: 17 de Jan de 2018.
- MASIHI, K. N. **Immunomodulatory agents for prophylaxis and therapy of infections.** *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 14, p. 181–191, 2000.
- MATÉS, J. M.; PÉREZ-GÓMEZ, C.; CASTRO, I. N. DE. **Antioxidant Enzymes and Human Diseases.** *Clinical biochemistry*, v. 32, n. 8, p. 595–603, 1999.
- MCCALL, M. R.; FREI, B. **Can Antioxidant Vitamins Materially Reduce Oxidative Damage In Humans ?** *Free Radical Biology and Medicin*, v. 26, n. 98, p. 1034–1053, 1999.
- MCMURRY, J. **Organic Chemistry with Biological Applications.** Brooks/Cole Cengage Learning, Canada, 1015-1046, 2010.
- MEHROTRA, S. et al. **Anticellular and immunosuppressive properties of ethanolic extract of *Acorus calamus* rhizome.** *International Immunopharmacology*, v. 3, n. 1, p. 53–61, 2003.
- MELO, C. M. L. et al. **Mitogenic Response and Cytokine Production Induced by Cramoll 1,4 Lectin in Splenocytes of Inoculated Mice.** *Scandinavian Journal of Immunology*, v. 73, p. 112–121, 2011.
- MELO, E. A. et al. ***In vivo* antioxidant effect of aqueous and etheric coriander (*Coriandrum sativum* L.) extracts.** *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 105, n. 9, p. 483–487, 2003.

MELO, E. **Polygonaceae In: Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br> >. Acesso em: 20 de julho e 2017.

MELO, E.; FRANÇA, F. **A família Polygonaceae no semiárido brasileiro**. In: Giuliatti, A. *et al.* Diversidade e caracterização das fanerógamas do semiárido brasileiro. APNE, Recife. p. 437-488, 2006.

MIDDLETON JR, E.; KANDASWAMI, C. **The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer**. In: Harborne, J.B. (Ed.), *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*. Chapman & Hall, London, pp. 619±652, 1994.

MIN, D. B.; BOFF, J. M. Chemistry and Reaction of Singlet Oxygen in Foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 1, 2002.

MINISTÉRIO DA INTEGRAÇÃO NACIONAL. **Semiárido Brasileiro**. Disponível em: < <http://www.integracao.gov.br/semiario-brasileiro>>. Acesso em: 04 de maio de 2018.

MMA. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Caatinga**. . Disponível em: < <http://www.mma.gov.br/biomas/caatinga>>. Acesso em: 04 de maio de 2018.

MOUTSCHEN, J. **Introduction to Genetic Toxicology**. New York, NY: John Wiley and Sons; 1985.

NASCIMENTO, G. G. F. et al. **Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria**. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.31, n.4, p. 247-256, 2000.

NETO, J. J. L. et al. **Impact of bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in biological systems upon the antioxidant activity of the ethanolic extract of *Triplaris gardneriana* seeds**. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 88, p. 999–1007, 2017.

NEU, H. C. **The crisis in antibiotic resistance**. *Science*. v. 257, p. 257:1064–1073, 1992.

NIGGEMANN, B.; GRÜBER, C. **Side-effects of complementary and alternative medicine**. *Allergy*. v. 58, n. 8, p. 707-16, 2003.

NIMER, E. **Climatologia da região Nordeste do Brasil. Introdução à climatologia dinâmica**. *Revista Brasileira de Geografia* 34: 3-51, 1972.

NUNES-PINHEIRO, D. C. S. et al. **Atividade imunomoduladora das plantas medicinais: perspectivas em medicina veterinária**. *Ciência Animal*, v. 13, n. 1, p. 23–32, 2003.

OCDE. **Test N° 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test**, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris, 2016. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9716401e.pdf?expires=1508079555&id=id&accname=guest&checksum=E27E451DCEA591075E1BDDDFCEED3F9D>. Acesso em: 15 out. 2017.

OLIVE, P. L.; FRAZER, G.; BANÁTH, J. P. **Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells using the comet assay.** Radiation Research, v. 136, n. 1, p. 130–136, 1993.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, OMS. **Traditional Medicine Strategy: 2014–2023**, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2013.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. **Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells.** Biochemical and biophysical research communications, v. 123, n. 1, p. 291–298m 1984.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. **Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes.** Journal of Biotechnology and Biodiversity, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PERES, L. E. P. **Metabolismo Secundário.** Piracicaba – São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. ESALQ/Universidade de São Paulo, p. 1-10, 2004.

PHILLIPSON, J. D.; ANDERSON, L. A. **Ethnopharmacology and western medicine.** Journal of Ethnopharmacology, v. 25, n. 1, p. 61–72, 1989.

PINTO, J. E. B. P.; CARDOSO, M. G.; ARRIGONI-BLANK, M. F. **Estabelecimento de cultura de células em suspensão e identificação de flavonoides em *Cordia verbenacea* DC.** Revista Brasileira Plantas Mediciniais, v.11, n. 11, p. 7-11, 2009.

POKORNY, J. **Are natural antioxidants better – and safer – than synthetic antioxidants?** European Journal of Lipid Science and Technology, v. 109, p. 629–642, 2007.

PUTMAN, E. et al. **Assessment of the immunotoxic potential of human pharmaceuticals: a workshop report.** Drug Information Journal, v. 36, p. 417–427, 2002.

PUUPPONEN-PIMIA , R. et al. **Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries.** Journal of Applied Microbiology, v. 90, 494–507, 2001.

RAHMAN, K. **Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors.** Clinical interventions in aging, v. 2, n. 2, p. 219–236, 2007.

RAMAKRISHNA, B. S. et al. **Circulating antioxidants in ulcerative colitis and their relationship to disease severity and activity.** J. Gastroenterol. Hepatol., v. 12, p. 490–494, 1997.

RATES, S. M. K. **Plants as source of drugs.** Toxicicon, v. 39, p. 603-613, 2001.

RATNAM, D. V. et al. **Role of antioxidants in prophylaxis and therapy : A pharmaceutical perspective.** Journal of controlled Release, v. 113, p. 189–207, 2006.

RIZZINI, C. T. **Tratado de fitogeografia do Brasil.** Rio de Janeiro: Âmbito Cultural Edições Ltda., 1997, 157p.

ROBBINS, R. J. **Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 51, n. 10, p. 2866-2887, 2003.

RODRIGUES, E.; CARLINI, E. A. **Levantamento etnofarmacológico realizado entre um grupo de quilombolas do Brasil.** Arquivos Brasileiros de Fitomedicina Científica, v. 1, n. 2, p. 80–87, 2003.

RODRIGUES, N. M. **Potencialidades e impactos ambientais no Parque Nacional do Catimbau e sua Zona de amortecimento.** Dissertação (Mestrado em Gestão e Políticas Ambientais)- Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2006.

ROTHFUSS, A. et al. **Improvement of in vivo genotoxicity assessment: Combination of acute tests and integration into standard toxicity testing.** Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, v. 723, n. 2, p. 108–120, 2011.

ROQUE, A. A.; ROCHA, R. M.; LOIOLA, M. I. B. **Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (Nordeste do Brasil).** Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v.12, n.1, p.31-42, 2010.

SAAD, B. et al. **Safety of traditional Arab herbal medicine.** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v. 3, p. 433-439, 2006.

SAKAGAMI, Y.; KAJAMURA, K. **Bactericidal activities of disinfectants against vancomycin – resistant Enterococci.** Journal of Hospital Infection, v.50, n.2, p.140-144, 2002.

SAMPAIO, E. V. S. B.; ARAÚJO, M. S. B. **Desertificação no Nordeste do Brasil.** In: Anais do XXX Congresso Brasileiro de Ciência do Solo; Recife. Recife: SBCS, 2005.

SANCHEZ, A. et al. **Taxonomy of Polygonoideae (Polygonaceae): A new tribal classification.** TAXON 60, v. 60, n. February, p. 151–160, 2011.

SAS, K. et al. **Mitochondrial, metabolic disturbances, oxidative stress and kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders.** J. Neurol. Sci., v. 257, p. 221–239, 2007.

SANTOS, R. S. D. et al. **Avaliação da relação seca/produktividade agrícola em cenário de mudanças climáticas.** Revista Brasileira de Meteorologia, v. 26, p. 313-321, 2011.

SCHERER, R.; GODOY, H. T. **Antioxidant activity index (AAI) by the 2 , 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method.** Food chemistry, v. 112, p. 654–658, 2009.

SCHMID, W. **The micronucleus test.** Mutation Research, v. 31, n. 1, p. 9–15, 1975.

SCHMID, W.; STAIGER, G. R. **Chromosome studies on bone marrow from Chinese hamsters treated with benzodiazepine tranquilizers and cyclophosphamide.** Mutation Research, v. 7, n. 1, p. 99–108, 1969.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in Food and Nutraceuticals.** Boca Raton: CRC Press, 2004.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, P. K. **Phenolic antioxidants.** Critical reviews in food science and nutrition, v. 32, n. 1, p. 67–103, 1992.

SHAPOVAL, E. E. S. et al. **Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora***. *J. Ethnopharmacol.*, v. 44, p. 136-142, 1994.

SILVA, F. De O. et al. **Immunostimulatory activity of ConBr: A focus on splenocyte proliferation and proliferative cytokine secretion**. *Cell Tissue Res*, v. 346, p. 237–244, 2011.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Florianópolis: UFSC; Porto Alegre: UFRGS, cap. 11, p. 247-262, 2007.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/ Universidade Federal do Rio Grande do Sul/ Da Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

SINGH, N. P. et al. **A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells**. *Experimental Cell Research*, v. 175, p. 184–191, 1988.

SINGH, U.; JIALAL, I. **Oxidative stress and atherosclerosis**. *Pathophysiology*, v. 13, p. 129–142, 2006.

SLATER, T. F. **Free-radical mechanisms in tissue injury**. *The Biochemical journal*, v. 222, n. 1, p. 1–15, 1984.

SMITH, M. A., et al. **Oxidative stress in Alzheimer's disease**. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1502, p. 139–144, 2000.

SOARES, S. E. **Ácidos fenólicos como antioxidantes Phenolic acids as antioxidants**. *Revista de Nutrição*, v. 15, n. 1, p. 71–81, 2002.

SOUSA, C. M. D. M. et al. **Total phenolics and antioxidant activity of five medicinal plants**. *Quim. Nova, São Paulo*, v.30, n.2, p.351-355, 2007.

SOUZA, M. P.; ROUQUAYROL, M. Z. **Molluscicidal activity of plants from northeast Brazil**. *Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas*. v. 7, n. 4, p. 389-394, 1974

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2005.

STEINBERG, D. **Antioxidants and Atherosclerosis. A current assessment**. *Circulation*, v. 84, p. 1420–1425, 1991.

STEPP, J.R. **The role of weeds sources of pharmaceuticals**. *Journal of ethnopharmacology*, v.92, p. 163-166, 2004.

STICKEL, F.; PATSENKER, E.; SCHUPPAN, D. **Herbal hepatotoxicity**. *J Hepatol.*, v. 43, n. 5, p. 901-10, 2005.

STITES, D. P.; TERR, A. I. **Basic and Clinical Immunology**, Appleton & Lange, 7nd. Edition, New York, p. 870, 1995.

SUN, L. et al. **Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves.** Food and Chemical Toxicology, v. 49, n. 10, p. 2689–2696, 2011.

SWAIN, T. **Secondary Compounds as Protective Agents.** Annual Review of Plant Physiology, v. 28, n. 1, p. 479–501, 1977.

TENOVER, F. C. **Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria.** The American Journal of Medicine, v. 119, n. 6A, p. S3-S10, 2006.

TICE, R. R. et al. **Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing.** Environmental and Molecular Mutagenesis, v. 35, p. 206–221, 2000.

UPSTON, J. M.; KRITHARIDES, L.; STOCKER, R. **The role of vitamin E in atherosclerosis.** Prog. Lipid Res. v. 42, p. 405–422, 2003.

VALENTÃO, P. et al. **Antioxidative Properties of Cardoon (*Cynara cardunculus* L.) Infusion Against Superoxide Radical, Hydroxyl Radical, and Hypochlorous Acid.** J. Agric. Food Chem., p. 4989–4993, 2002.

VEIGA-JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C; MACIEL, M.A.M. **Plantas medicinais: cura segura?** Química Nova. v. 28, p. 519-528, 2005.

VILELA, L. S. T. **Avaliação do potencial antimicrobiano in vitro das espécies vegetais *Coccoloba mollis* Casaretto, *Triplaris americana* Linnaeus, e *Coutarea hexandra* (Jacq.) K. Schum.** Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade Federal de Alagoas. Maceió, 2011.

VINGT-UN ROSADO; ROSADO, A. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará.** Fortaleza: Acervo Virtual Oswaldo Lamartine de Faria. Mossoró, p. 624, 2009.

VONLEDEBUR, M.; SCHMID, W. **The micronucleus test methodological aspects.** Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, v. 19, n. 1, p. 109–117, 1973.

WILLIAMSON, E.; OKPAKO, D. T.; EVANS, F. J. **Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of Plant Material,** Wiley, Chichester, 1996.

XIAO, K. et al. **Stilbene Glycoside Sulfates from *Polygonum cuspidatum*.** Journal of Natural Products, v. 63, p. 1373–1376, 2000.

YAGI, A. et al. **Antioxidative sulfated flavonoids in leaves of *Polygonum hydropiper*.** Phytochemistry, v. 35, n. 4, p. 885–887, 1994.

YAO-LAN, L.; SHUANG-CHENG, M.; YI-TING, Y.; SHAO-MING, Y.; PAUL, H.B. **Antiviral activities of flavonoids and organic acid from *Trollius chinensis* Bunge.** Journal of Ethnopharmacology, v. 79, p. 365-8, 2002.

ZUANAZZI, J.A.S. **Flavonoides**. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia – da planta ao medicamento*. 2. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade, p. 489-515, 2000.

ZUANAZZI, J. A. S.; MAYORGA, P. **Assuntos Gerais**. v. 25, n. 4, p. 689–695, 2002.