



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
NÍVEL: DOUTORADO

**ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS DE *Pityrocarpa moniliformis* E AVALIAÇÃO DE SEU POTENCIAL
BIOLÓGICO**

TAMIRIS ALVES ROCHA

RECIFE
2019

TAMIRIS ALVES ROCHA

**ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS DE *Pityrocarpa moniliformis* E AVALIAÇÃO DE SEU POTENCIAL
BIOLÓGICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos, para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnologia

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Maria Tereza dos Santos Correia
CO-ORIENTADORA: Prof^a Dr^a. Marcia Vanusa da Silva

RECIFE
2019

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso
(CRB4 1728)

Rocha, Tamiris Alves

Isolamento, purificação e caracterização de metabólitos secundários de *Pyitorycarpa moniliformis* e avaliação de seu potencial biológico / Tamiris Alves Rocha – 2019.

120 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Maria Tereza dos Santos Correia
Coorientadora: Márcia Vanusa da Silva

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2019. Inclui referências e apêndices.

1. Plantas medicinais 2. Citotoxicidade 3. Metabólitos secundários I. Correia, Maria Tereza dos Santos (orient.) II. Silva, Márcia Vanusa da (coorient.) III. Título

615.321

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2020-305

TAMIRIS ALVES ROCHA

**ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS DE *Pityrocarpa moniliformis* E AVALIAÇÃO DE SEU POTENCIAL
BIOLÓGICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas do Centro de Biociências
da Universidade Federal de Pernambuco como
parte dos requisitos, para obtenção do título de
Doutora em Ciências Biológicas.

Aprovado por: 26/02/2019

Prof^a. Dr^a. Maria Tereza dos Santos Correia (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Márcia Vanusa da Silva (Membro Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão (Membro Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Cristiano Aparecido Chagas (Membro Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior (Membro Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Data: 26/02/2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, senhor da minha vida, que me abençoou e me deu sustento durante toda a minha trajetória, e principalmente por ter colocado pessoas insubstituíveis no meu caminho.

À minha família, meu pai Junior, minha mãe Adriana e minha irmã Taysa, por sempre serem meu porto seguro e as pessoas que independente de qualquer coisa estão comigo sempre e a todos os familiares e amigos que sempre estão presentes nos momentos mais importantes da minha vida:

As minhas orientadoras, Prof^a. Dr^a. Maria Tereza dos Santos Correia e Prof^a. Dr^a. Marcia Vanusa por terem me recebido em seu laboratório, investido e acreditado no meu trabalho durante todo trajeto percorrido e por todo conhecimento e disciplina transmitidos;

Ao Professor Dr. Emerson Peter da Silva Falcão que me deu todo apoio em seu laboratório e esteve comigo desde a minha graduação, ajudando-me com os procedimentos experimentais e com seu amplo conhecimento, me abrindo portas para meu sucesso acadêmico;

Ao Professor Dr. Cristiano Aparecido Chagas pelo seu conhecimento, conselhos, paciência e dedicação;

Ao Professor Dr. Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior que me recebeu com toda gentileza em seu laboratório, me apoiando e ajudando em meus experimentos.

A Professora Dr^a. Noêmia Santos por seu tempo e interesse em colaborar com as pesquisas;

A Professora Dr^a. Idjane Santana de Oliveira por sua disposições em colaborar com este trabalho e me receber em seu laboratório;

Aos Professores Doutores que colaboraram para o sucesso deste trabalho como a Prof^a Daniela Navarro, Prof^a. Cláudia Sampaio, Prof^o. Alexandre Gomes, Prof^o. Rafael Ximenes, Prof^o. Wolfgang Harand.

Ao Técnico Silvio Assis de Oliveira Ferreira pelo companheirismo, preocupação e presteza de me fazer entender toda rotina de um laboratório de pesquisa e me ajudar em tudo que eu precisava;

A minha amiga e companheira de pesquisa Danielle Feijó que esteve junto comigo em todos os momentos, tanto da pesquisa como da minha vida fora do mundo acadêmico, momentos bons e momentos difíceis que foram compartilhados juntos.

A minha amiga Maria Aparecida que está me acompanhando desde a graduação, estando do meu lado sempre que precisava.

A minha amiga Marllyn Marques por toda sua ajuda, conhecimento, conselhos e por compartilhar tantos momentos bons.

Aos meus amigos de laboratório: Dayane Melo pela sua amizade e pela parceria em publicações e me ajudar sempre; Talita Giselly pela sua ajuda nos experimentos e pelos momentos vividos; Bárbara Ramos pela sua disposição em me ajudar; Daniel Araújo pelos seus conhecimentos e disponibilidade; As meninas que me ensinaram diversas técnicas no laboratório Beatriz, Patrícia, Cleciana. Ao José Adelson por ser tão prestativo comigo e me auxiliar na pesquisa.

Aos meus amigos de laboratório André Severino, Cristiane Maria, Diego Leandro e tantos outros que passaram nessa minha caminhada.

Aos meus amigos pessoais que sem eles eu não teria tido forças para chegar até aqui, Tiago Trajano, Elma Camilo, Maurília Costa, Milca Gomes.

Aos camundongos que tanto ajudaram nessa pesquisa, dando o sangue literalmente.

Aos professores do Centro de biociência pelo conhecimento compartilhado;

Ao Pessoal do campus UFPE-CAV: pelo uso do biotério, principalmente ao veterinário Vinícius, e laboratórios de pesquisa;

Aos Técnicos do CAV que sempre se mostraram disponíveis;

Ao pessoal do grupo de pesquisa de Síntese/CAV;

A secretaria Adenilda e coordenação da Pós-graduação em Ciências Biológicas por todo apoio cedido;

Aos meus Avós: Dona Loura, por tantas orações e sempre torcer pela minha vitória, Cesário e Gersa (*in memoriam*);

No mais Agradeço a todos que direta e indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Por fim, porém muito importante, a FACEPE pelo suporte financeiro durante todo período da Pós Graduação.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante dos meus olhos.”

Isaac Newton, 1687

RESUMO

Pityrocarpa moniliformis é uma planta endêmica da caatinga, bioma que apresenta várias espécies vegetais com grandes propriedades biológicas. Essa espécie demonstrou uma elevada atividade antimicrobiana e antioxidante. Muitas dessas plantas são utilizadas empiricamente, devidos às diversas substâncias, produzidas através de seu metabolismo secundário, que são fontes de recursos terapêuticos. No entanto, a maioria das espécies empregadas no tratamento de doenças não possui respaldo científico quanto à eficácia e segurança, nem se conhecem seus efeitos tóxicos. Desta forma ensaios para avaliar a toxicidade e a atividade genotóxica desses compostos são necessários para promover uma segurança na utilização desses terapêuticos. O objetivo deste trabalho é avaliar a atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos orgânicos de *P. moniliformis* obtidos a partir de diferentes métodos de extração e solventes, bem como avaliar sua toxicidade, citotoxicidade e efeitos genotóxicos e identificar os compostos que apresentam potencial atividade. Os extratos orgânicos foram obtidos através das seguintes técnicas: Maceração, Soxhlet, Flúido Supercrítico, Ultrassom e extrator automático (ASE), com os solventes ciclohexano, acetato de etila e metanol. As atividades antioxidantes foram realizadas pelos métodos ATT, DPPH, ABTS e FRAP. Os extratos com melhores atividades foram submetidos a cromatografia Flash e Cromatografia de alta eficiência. Os testes antimicrobianos foram feitos com cepas bacterianas gram-positivas e gram-negativas e o antibiofilme com *Staphylococcus aureus*. Os animais (machos) receberam por via oral a dose 2000 mg/kg do extrato para a avaliação da toxicidade aguda e 1000 mg/kg do extrato para os ensaio de genotoxicidade pelo teste de micronúcleo e ensaio cometa. A citotoxicidade foi realizado pelo método do MTT, utilizando as linhagens de células J774.A1 e HEK-293. Os extratos metanólicos apresentaram maior ação antioxidante, sendo o extrato ASE que demonstrou os melhores resultados, sendo a atividade de suas frações potencializadas. Os extratos orgânicos também apresentaram atividade antimicrobiana e antibiofilme significativas. Além disso, os animais não apresentaram sinais de toxicidade aguda. Nas análises bioquímicas também não foram observadas alterações. E em relação ao exame histopatológico, observaram-se alterações no fígado e rins. Os extratos não mostraram diferenças significativas para os ensaios citotóxicos e genotóxico quando comparados com o controle. Conclui-se então, que os extratos orgânicos de *P. moniliformis* apresentam um potencial farmacológico promissor, necessitando de testes adicionais para potencializar esses resultados.

Palavras-chave: Antioxidantes. Citotoxicidade. Genotoxicidade. Metabólitos Secundários. Toxicidade Oral.

ABSTRACT

Pityrocarpa moniliformis is an endemic plant of the caatinga, a biome that presents several plant species with great biological properties. This species showed a high antimicrobial and antioxidant activity. Many of these plants are used empirically, due to the various substances produced through their secondary metabolism, which are sources of therapeutic resources. However, most of the species used in the treatment of diseases do not have scientific support for efficacy and safety nor are their toxic effects known. Thus, assays to assess the toxicity and genotoxic activity of these compounds are necessary to promote safety in the use of these therapeutics. The objective of this work is to evaluate the antioxidant and antimicrobial activity of organic extracts of *P. moniliformis* obtained from different extraction methods and solvents, as well as their own toxicity, cytotoxicity and genotoxic and isolated effects, to purify and to identify the compounds that already are in potential activity. The organic extracts were obtained by the following techniques: Maceracion, Soxhlet, Supercritical Fluid, Ultrasound and Automatic Extractor (ASE), with hexanes, ethyl acetate and methanol solvents. As antioxidant activities were performed by TAA, DPPH, ABTS and FRAP methods. The extracts with the best activities were submitted to Flash chromatography and High efficiency Chromatography. The antimicrobial testes were made with gram-positive and gram-negative bacterial strains and the antibiofilm with *Staphylococcus aureus*. The animals (male) were orally given a dose of 2000 mg/kg extract for acute toxicity evaluation and 1000 mg / kg extract for genotoxicity test by micronucleus test and comet assay. A cytotoxicity was performed by the MTT method, using as cell lines J774.A1 and HEK-293. The methanolic extracts presented higher antioxidant action, and the ASE extract showed the best results, being an activity of their potentiated fractions. Organic extracts also showed significant antimicrobial activity and antibiofilm activity. In addition, the animals did not show signs of acute toxicity. In the biochemical analyzes also no changes were observed. And in relation to histopathological examination, there were changes in the liver and kidneys. The extracts did not show significant differences for the cytotoxic and genotoxic assays when compared with the control. It is concluded that the organic extracts of *P. moniliformis* present a promising pharmacological potential, requiring additional tests to potentiate these results.

Keywords: Antioxidants. Cytotoxicity. Genotoxicity. Secondary Metabolites. Oral Toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1 - <i>Pityrocarpa moniliformis</i> (BENTH) LUCKON & R. W. JOBSON.....	23
Figura 2 - Folhas e Flores de <i>Pityrocarpa moniliformis</i>	24
Figura 3 - Frutos de <i>Pityrocarpa moniliformis</i>	24
Figura 4 - Redução do MTT por enzimas mitocondriais.....	27
Figura 5 - Classificação do dano do DNA das células analisadas por ensaio cometa. 0 (sem dano aparente); 1 (com pouco dano aparente); 2 (dano médio); 3 (dano médio com cauda mais longa) e 4 (dano máximo).....	29
Figura 6 - Esquema da formação de micronúcleos como consequência de um dano no DNA de uma célula em divisão.....	30
Figura 7 - Processo de formação dos EROs.....	32
Figura 8 - Ácido fenólico (a) e Ácido tânico (b).....	34
Figura 9 - Etapas da formação de biofilme. 1:adesão bacteriana, 2: comunicação celular microbiana, 3: maturação e dispersão.....	38

Artigo I

Figure 1 - Antioxidant activity assay by the DPPH free radical sequestration method of the methanolic extracts obtained through different methods of the leaves of <i>P. moniliformis</i> . GA: Gallic acid; BHT: Butylated hydroxytoluene; EM-MeOH: Methanolic extract by	
--	--

maceration; ESA-MeOH: Methanolic extract in soxhlet apparatus; UAE-MeOH: Ultrasonic assisted methanolic extract; ASE-MeOH: Methanolic extract in solvent-accelerated extractor; SFE-MeOH: Methanolic Extract in Supercritical Fluid.....	56
---	----

Figure 2 - Antioxidant activity test by the ABTS radical inhibition method of the methanolic extracts obtained through different methods of the leaves of <i>P. moniliformis</i> . GA: Gallic acid; BHT: Butylated hydroxytoluene; EM-MeOH: Methanolic extract by maceration; ESA-MeOH: Methanolic extract in soxhlet apparatus; UAE-MeOH: Ultrasonic assisted methanolic extract; ASE-MeOH: Methanolic extract in solvent-accelerated extractor; SFE-MeOH: Methanolic Extract in Supercritical Fluid.....	58
--	----

Figure 3 - Chromatograms with 190 nm to 400 nm scanning of the EM-MeOH, ESA-MeOH, ASE-MeOH, SFE-MeOH and UAE-MeOH extracts showing the major compounds visualized by UV. EM-MeOH: Methanolic extract by maceration; ESA-MeOH: Methanolic extract in soxhlet apparatus; UAE-MeOH: Ultrasonic assisted methanolic extract; ASE-MeOH: Methanolic extract in solvent-accelerated extractor; SFE-MeOH: Methanolic Extract in Supercritical Fluid.....	60
--	----

Figure 4 - Antioxidant activity assay by the DPPH radical inhibition method of the fractions obtained from ASE-MeOH of <i>P. moniliformis</i> leaves. GA: Gallic acid.....	61
--	----

Apêndice A

Figure 1 - Representation of the plating performed to determine the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of the organic extracts of <i>P. moniliformis</i>	94
--	----

Apêndice B

- Figure 1 - Classification of DNA damage of cells submitted to comet assay; 0 (no apparent damage); 1 (little apparent damage); 2 (average damage); 3 (moderate damage with longer tail) and 4 (maximum damage)..... 99
- Figure 2 - Chromatogram (HPLC/UV, $\lambda=254$ nm) of extracts obtained from *P. moniliformis*. Arrows indicating chromatographic peaks of marjorite compounds..... 101
- Figure 3 - Percentage viability of J774A.1 cells. The cells were treated with different concentrations of the organic extracts of *P. moniliformis* for 24 h and 48 h. NC: Negative control; EP1: Hexanic extract; EP2: Ethyl acetate extract; EP3: Methanolic extract. * $P<0.05$ compared with the growth control..... 102
- Figure 4 - Cell viability of HEK-293 cells after treatment with different concentrations of the organic extracts of *P. moniliformis* leaves for 24 and 48 h. NC: Negative control; EP1: Hexanic extract; EP2: Ethyl acetate extract; EP3: Methanolic extract. * $p<0.05$ compared with the growth control..... 103
- Figure 5 - Comparison of cell viability between EP1, EP2 and EP3 extracts against cell lines J774A.1 and HEK-293 (24h and 48h times). $a_p<0.05$ EP1 vs EP2; $b_p<0.05$ EP2 vs EP3; $c_p<0.05$ EP1 vs EP3..... 104
- Figure 6 - Photomicrographs of different tissues submitted to acute toxicity studies. A (control) and B (treated) - Note an increase in the number of hepatocytes in the liver of animals treated with EP3; Hepatocyte (arrow). C (Control) and D (Treated) - Decreased corpuscle area and kidney glomerulus of animals treated with EP1 and EP2. Glomerulus (asterisk). E (Control) and F (Treated) - Observe reduction of white pulp of the spleen of animals treated with EP1. RP (Red Pulp), WP (white pulp). Hematoxylin-eosin;400x..... 106

Apêndice C

Figura 1 – Atividade Hemolítica dos extratos orgânicos das folhas de <i>P. moniliformes</i>	117
---	-----

LISTA DE TABELAS

Artigo I

Table 1 - Extraction yields of the extracts obtained by different techniques and solvents of the leaves of <i>P. moniliformis</i>	72
Table 2 - Total Phenols and Flavonoids contents of the leaves of <i>P. moniliformis</i> extracts obtained by different extraction techniques and solvents.....	73
Table 3 - Effect of different extraction/solvent techniques on the antioxidant activity of extracts of the leaves of <i>P. moniliformis</i> (1000 µg/mL) using four methods.....	74
Table 4 - Antioxidant activity by the free radical sequestration method (DPPH) of the fractions obtained from ASE-MeOH of the leaves of <i>P. moniliformis</i> .	75

Apêndice A

Table 1 - Growth inhibition percentages obtained with organic extracts in bacterial isolates at the concentration of 2 mg/mL.....	93
Table 2 - Percentages of biofilm inhibition after exposure of organic extracts to <i>S. aureus</i>	94

Apêndice B

Table 1 - Phytochemical profile of the organic extracts of <i>P. moniliformis</i> leaves...	100
---	-----

Table 2 - Biochemical parameters of the blood of mice treated orally with the organic extracts of <i>P. moniliformis</i> for 14 days.....	104
Table 3 - Blood hematological parameters of mice orally administered the organic extracts of <i>P. moniliformis</i> for 14 days.....	105
Table 4 - Relative mass of the organs after euthanasia of the male mice treated with the organic extracts of <i>P. moniliformis</i>	105
Table 5 - Histomorphometric analysis of the liver, kidney, and spleen of mice exposed to the organic extracts of <i>P. moniliformis</i> leaves.....	105
Table 6 - Mutagenicity and genotoxicity assessment using the micronucleus test and comet assay.....	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg	Micrograma
μL	Microlitro
$\mu\text{g}/\text{mL}$	Micrograma por microlitro
Mm	Micrômetro
μM	Micromolar
ABTS	2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)
ATT	Atividade Antioxidante Total
ATP	Adenosina Trifosfato
B16 F10	Melanoma Murino
BHA	Butil-hidroxianisol
BHT	Butil-hidrotolueno
$^{\circ}\text{C}$	Grau
CI_{50}	Concentração necessária para inibir 50% da proliferação celular
CNPq	Conselho Nacional de Pesquisa
CD71	Expressão do receptor de Transferrina
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CL_{50}	Concentração que mata 50% dos animais exposto ao produto testado
CEEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
CO_2	Dióxido de Carbono
DAPI	4'-6-diamidino-2-fenilindole
D.P.	Desvio padrão
DL_{50}	Dose que mata 50% dos animais
DMEM	Meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
FD	Frequência de dano
FRAP	Redução do Íon Férrico
g	Gramas
h	Hora
HEK-293	Células embrionárias do rim humano
IC	Intervalo de confiança
ID	Índice de dano
IMA	Imazalil
IPA	Instituto Agrônomo de Pernambuco
IV	Infravermelho
J774.A1	Macrófagos murinho
K562	Leucemia
Kg	Quilograma
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami
log P	Lipofilicidade
Malonil-CoA	Malonil-coenzima A
mg	Miligrama
MN	Teste do Microcúcleo

MMS	Metanossulfonato de metilo
MCH	Hemoglobina corpuscular média
MCHC	Concentração média de hemoglobina corpuscular
Ms.	Mestre
mL	Mililitro
mg/kg	Miligrama por quilograma de peso
mM	Milimolar
MTT	Brometo de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NCE	Eritrócitos normocromáticos
NF-kB	Fator de transcrição nuclear
Nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino
PCE	Proporção de eritrócitos policromáticos
PCEMn	Proporção de eritrócitos policromáticos micronucleados
Ph	Potencial Hidrgeniônico
Ppm	Parte por milhão
RET	Reticulócito
RDW-CV	Largura de distribuição de células vermelhas
RNA	Ácido Ribonucléico
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
CO ₂	Dióxido de Carbono
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral
TPTZ	2,4,6-tripiridyl-s-triazine
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UV	Ultravioleta
v/v	Volume por volume

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	OBJETIVOS.....	20
1.1.1	Objetivo Geral.....	20
1.1.2	Objetivos Específicos.....	20
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	PLANTAS MEDICINAIS.....	21
2.2	<i>Pityrocarpa moniliformis</i>	22
2.3	ENSAIOS DE TOXICIDADE.....	25
2.3.1	Toxicidade Oral Aguda.....	26
2.3.2	Citotoxicidade.....	26
2.3.3	Genotoxicidade e Mutagenicidade.....	27
2.3.3.1	Ensaio Cometa.....	28
2.3.3.2	Teste de Micronúcleo.....	29
2.4	RADICAIS LIVRES E OXIDANTES.....	31
2.4.1	Espécies Reativas de Oxigênio.....	32
2.4.2	Antioxidantes.....	33
2.4.3	Compostos Fenólicos e Atividade Antioxidante.....	34
2.5	ANTIMICROBIANOS.....	35
2.5.1	Resistência a Antimicrobianos.....	36
2.5.1.1	Formação de Biofilme.....	37
2.5.2	Produtos Naturais e Atividade Antimicrobiana.....	39
3	ARTIGO I - Comparative Evaluation of Different Extraction Techniques and Solvents for Testing of Phytochemicals and Antioxidant Activity of the Leaves of <i>Pityrocarpa moniliformis</i>.....	42
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	76
	REFERÊNCIAS.....	77
	APÊNDICE A – Artigo Comparison of Antibacterial and Antibiofilm Potential of Organic Extracts of <i>Pityrocarpa moniliformis</i> Leafs Obtained by Different Methods of Extraction publicado em International Journal of	

	Recent Scientific Research.....	91
APÊNDICE B-	Artigo Evaluation of cytotoxic potential, oral toxicity, genotoxicity, and mutagenicity of organic extracts of <i>Pityrocarpa moniliformis</i> publicado em Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues.....	96
APÊNDICE C-	CAPÍTULO PUBLICADO NO LIVRO DIGITAL BASES CONCEITUAIS DE SAÚDE 4.....	112

1 INTRODUÇÃO

A origem do conhecimento do homem sobre as propriedades medicinais das plantas confunde-se com sua própria história. Há milênios os vegetais têm sido utilizados pelos seres humanos no tratamento de doenças. As doenças infecciosas estão entre as doenças de interesse no estudo dos efeitos benéficos das plantas medicinais e fitoterápicos. Tais síndromes são responsáveis por grandes gastos em saúde pública, devido ao aumento da estadia hospitalar, necessidade de maior consumo de medicamentos e/ou procedimentos médicos, principalmente quando se trata de infecções causadas por microrganismos portadores de resistência a antimicrobianos.

Nos últimos anos, a resistência de microorganismos patogênicos a múltiplas drogas tem aumentado devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos, comumente comercializados e usados no tratamento de doenças infecciosas. Essa situação tem forçado os cientistas à busca de novas drogas. As plantas tem se mostrado bastante promissoras como fonte de novas drogas antimicrobianas, considerando-se que a diversidade de compostos químicos dos produtos naturais é muito maior àquela derivada dos processos de síntese química (NOVAIS, et al., 2003).

Além das doenças infecciosas algumas doenças relacionadas ao envelhecimento como doenças degenerativas crônicas, cardiopatias e aterosclerose também têm sido alvo de intensas pesquisas em todo o mundo. Estas doenças podem estar relacionadas a danos causados por estresse oxidativo. Este fenômeno está relacionado, principalmente, à ação constante de espécies reativas de oxigênio (ERO) e/ou espécies reativas de Nitrogênio (ERN) geradas em processos inflamatórios ou por alguma outra disfunção biológica, por exemplo, as causadas por infecções (BARREIROS et al, 2006; BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Os extratos vegetais possuem substâncias conhecidas por sua capacidade antioxidante, em especial os flavonoides e taninos que, por serem ricos em hidroxilas, são capazes de reagir com as ERO e ERN e, dessa forma, podendo ser úteis no tratamento de algumas doenças por inibir ou retardar significativamente os processos oxidativos (VIEGAS JUNIOR et al., 2006).

Atualmente, as vantagens que justificam a utilização dos fitoterápicos, são: o efeito sinérgico, ou seja, as plantas apresentam vários compostos com efeitos similares; associação de mecanismos por compostos agindo em alvos moleculares diferentes; menores riscos de efeitos colaterais, uma vez que os compostos ativos se apresentam em concentrações

reduzidas nas plantas; e, menores custos de pesquisa (YUNES; PEDROSA; CECHINEL, 2001).

Nesse contexto, as pesquisas com plantas medicinais, se tornam importantes tanto no que diz respeito á descoberta de novos medicamentos fitoterápicos, atribuição de novos usos aos já utilizados pela população, quanto no que diz respeito á descoberta, purificação e isolamento de novas moléculas. Isso porque mesmo aquelas plantas medicinais que já possuem alguma descrição farmacológica podem revelar novas atividades biológicas outrora não percebidas, porque geralmente os metabólitos relacionados às atividades biológicas fazem parte de um metabolismo especial ou secundário do vegetal, em resposta às agressões provenientes do ambiente que o cercam e das condições de cultivo. Ou seja, o ambiente desempenha um papel crucial no metabolismo das plantas fazendo com que estas produzam diferentes e variados complexos moleculares, abrindo caminho para a descoberta de novos grupos estruturais e para estudos de identificação de alvos moleculares e de mecanismos de ação de fármacos (YUNES; PEDROSA; CECHINEL, 2001).

Apesar das inúmeras vantagens na utilização das plantas como recursos terapêuticos, muitas vezes esses recursos são consumidas sem a devida comprovação científica de suas atividades farmacológicas e seu perfil tóxico, que devem ser estabelecidos por testes não clínicos e clínicos (VEIGA-JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005; SILVEIRA; BANDEIRA; ARRAIS, 2008; FRANÇA et al., 2008).

Devido a isso, é importante a pesquisa por informações que embasem o uso seguro de determinadas espécies vegetais e fitoterápicos de interesse clínico, pois, mesmo possuindo baixa toxicidade, pode provocar efeitos graves que muitas vezes são subnotificados (MONTEIRO; CARVALHO JUNIOR, 2007; SILVEIRA; BANDEIRA; ARRAIS, 2008).

A Caatinga, um dos biomas brasileiros que apresenta alta diversidade de espécies vegetais, sendo muitas delas endêmicas e adaptadas às condições de estresse ambiental característicos das regiões semiáridas, como baixa pluviosidade, temperaturas elevadas e altas taxas de evapotranspiração, tem sido fontes promissoras de biomoléculas que apresentam atividades biológicas importantes (TROVÃO et al., 2007; ARCOVERDE et al., 2014; FÉLIX-SILVA et al., 2014).

Pityrocarpa moniliformis é uma planta arbórea do Nordeste do Brasil, ocorrendo disjunta em florestas secas da região de Sucre (Venezuela), é popularmente conhecida como Catanduva, e sinonimamente de *Piptadenia moniliformis* (Benth.). A *Pityrocarpa moniliformis* é uma espécie ainda pouco explorada e estudos recentes revelaram um potencial

microbiológico e antioxidante significativo. Por ser uma planta endêmica da caatinga, que apresenta várias espécies vegetais com grande potencial terapêutico e farmacológico esse estudo visa o aprofundamento e aplicação de sua atividade microbiológica e antioxidante, bem como seu efeito toxicológico *in vitro* e *in vivo*.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antibacteriana, antibiofilme, antioxidante e realizar os testes de toxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade dos extratos orgânicos das folhas de *Pityrocarpa moniliformis*.

1.1.2 Objetivos Específicos

- ✓ Preparar extratos com solventes de diferentes polaridades (ciclohexano, acetato de etila, metanol) das folhas de *P. moniliformis*;
- ✓ Realizar o screen fitoquímico dos extratos relatados acima;
- ✓ Efetuar fracionamento cromatográfico em cromatografia FLASH, visando conhecer a composição química da espécie em estudo;
- ✓ Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos e frações de *P. moniliformis*;
- ✓ Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* e determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos orgânicos de *P. moniliformis*;
- ✓ Avaliar atividade antibiofilme *in vitro* dos extratos orgânicos de *P. moniliformis*;
- ✓ Avaliar a toxicidade aguda dos extratos orgânicos de *P. moniliformis*;
- ✓ Avaliar a toxicidade dos extratos por ensaios de citotoxicidade celular *in vitro* (método de redução do MTT);
- ✓ Avaliar a atividade genotóxica e mutagênica dos extratos orgânicos de *P. moniliformis*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PLANTAS MEDICINAIS

A utilização de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das formas mais antigas de prática medicinal da humanidade. No Brasil o uso das plantas medicinais teve início com os povos indígenas que aplicavam suas próprias experiências para distinguir as plantas que serviam para curar doenças das que eram venenosas (OLIVEIRA; SIMÕES; SASSI, 2006). Com o descobrimento do nosso país surgiram novas plantas trazidas de vários países da Europa, Ásia, Índia, África que hoje fazem parte da nossa flora constituindo desta forma as plantas denominadas exóticas (BRITO; DANTAS; DANTAS, 2009).

Atualmente, essa prática vem crescendo a cada dia devido ao grande interesse da população por terapias menos agressivas e pelos benefícios dos tratamentos naturais (BRIMA, 2017; ARNOUS et al. 2005), por ser uma prática comum na sociedade e até mesmo pela falta de medicamentos sintéticos (FERREIRA; PINTO, 2010). Esse crescimento é visível não só nas populações, mas também nos profissionais de saúde que carecem de informações seguras sobre os recursos fitoterápicos. Além disso, o baixo custo e o fácil acesso, ao contrário do que ocorre com outros medicamentos, proporcionam as pessoas um método de cura e prevenção mais acessível.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de 80% da população de países em desenvolvimento utiliza ervas para o tratamento de doenças, que são consideradas até mais seguras e mais efetivas que drogas sintéticas (GURIB-FAKIM, 2006; PANG et al., 2014). Desse modo, os produtos naturais vêm recuperando espaço e importância na indústria farmacêutica, tanto para a sua utilização direta quanto para uso como fonte inspiradora de novos padrões de moléculas bioativas (VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Entre os 252 fármacos básicos ou essenciais selecionados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), 11% são de origem exclusivamente vegetal e uma parcela significativa é preenchida por medicamentos sintéticos, obtidos a partir de precursores naturais (RATES, 2001). Apesar de possuir a maior diversidade vegetal do mundo, com cerca de 60.000 espécies vegetais superiores catalogadas, no Brasil, apenas 8% foram estudadas para pesquisas de compostos bioativos e 1.100 espécies foram avaliadas em suas propriedades medicinais (BRASIL, 2006).

A Caatinga Nordestina é um dos principais biomas brasileiros que apresentam uma ampla diversidade de produtos naturais com propriedades terapêuticas que são utilizadas por comunidades da região. Estas comunidades possuem uma vasta farmacopeia natural, que são provenientes dos próprios recursos naturais que estão em áreas ocupadas por estas populações (GOMES et al., 2008). Apesar das inúmeras evidências que confirmam que a flora deste bioma é bastante rica em plantas com elevado potencial terapêutico, o valor farmacológico dessas plantas não tem sido avaliado de forma adequada (BRASIL, 2002), sendo proporcionalmente a menos estudada entre as regiões naturais brasileiras, e que esforços científicos estão concentrados em apenas alguns pontos em torno das principais cidades da região (MELO-BATISTA; OLIVEIRA, 2014).

Em relação a esse bioma, este quadro torna-se preocupante, pois além da insuficiente realização de trabalhos relacionados à catalogação da flora nativa, a caatinga encontra-se entre os mais alterados e ameaçados pela ação antrópica e, por conta disto, tem sido apontado como o bioma brasileiro mais crítico no que se refere à conservação (SOUZA, 2013).

Além disso, pouco se sabe sobre os efeitos tóxicos destas plantas utilizadas pelas comunidades locais. Sabe-se que os vegetais contêm milhares de constituintes químicos e suas propriedades terapêuticas estão especialmente relacionadas com os chamados metabólitos secundários, que são compostos micromoleculares evolutivamente selecionados para conferir vantagens adaptativas às plantas (BERTOLDI, 2006). Muitas dessas substâncias podem ser agressivas, e por esta razão, devem ser utilizadas com cuidado, respeitando seus riscos toxicológicos (VEIGA-JUNIOR; PINTO; MARCIEL, 2005). Para tanto, são necessários estudos que comprovem a eficácia do fitoterápico em questão, sem que o mesmo cause danos à saúde do paciente e dessa forma a população possa fazer uso do fitoterápico com segurança (REZENDE; COCCO, 2002). A importância desse tipo de estudo remete à necessidade de um conhecimento mais direcionado ao estudo da fitoterapia e do entendimento de qual sua contribuição para a população atual.

2.2 *Pityrocarpa moniliformis*

Pityrocarpa moniliformis (Benth.) Luckow & R.W. é uma planta arbórea do Nordeste do Brasil, pertencente à família Fabaceae – Leguminosae, que está distribuída a partir dos estados do Maranhão e Piauí até o estado da Bahia, mais especificamente na Caatinga, Carrasco, Seridó, Cerrado e Agreste, sendo particularmente encontrada no Vale do Rio São

Francisco (BENEDITO, 2011; FERREIRA et al., 2014). Entretanto, sua área de distribuição também inclui a região de Sucre na Venezuela (QUEIROZ, 2009).

Popularmente conhecida como “angico-de-bezerro”, “catanduba”, “quipembé” (PE), “surucucu” (BA), “carrasco” (PA) e “muquém”, é uma árvore que pode atingir entre 4 e 10 m de altura, com copa arredondada e bipinadas (Figura 1), flores amareladas em forma de espigas cilíndricas (Figura 2) e frutos denominados vagens (Figura 3), é considerada economicamente relevante como espécie forrageira, para a extração de taninos, e para a apicultura (SANTOS et al. 2004; LUCKOW 2005; SODRÉ et al. 2008).

Figura 1. *Pityrocarpa moniliformis* (BENTH) LUCKON & R. W. JOBSON.



Fonte: Nunes, 2007.

É uma espécie rústica, de crescimento rápido, indicada para reflorestamentos heterogêneos com fins preservacionistas e recomendada como forragem para bovinos e ovinos (AZEREDO et al., 2010). Na região Nordeste do Brasil, onde a apicultura tem como fonte as flores de plantas nativas, esta espécie destaca-se como planta melífera em potencial. Suas flores são apreciadas pelas abelhas, fornecendo mel de excelente qualidade (SILVA et al., 2004).

Figura 2. Folhas e Flores de *Pityrocarpa moniliformis*.



Fonte: <http://rubens-plantasdobrasil.blogspot.com/2012/02/piptadenia-moniliformis-benth.html>. acesso em 08 de novembro de 2017.

Figura 3. Frutos de *Pityrocarpa moniliformis*.



Fonte: <http://fm2.fieldmuseum.org/plantguides/view.asp?checkbox=18902>, acesso em 08 de novembro de 2017.

Esta espécie ainda é pouco explorada em relação a seu potencial farmacológico, mas estudos recentes revelaram um potencial microbiológico e antioxidante significativo.

Os estudos de Trentin et al. (2014) e (2015), demonstraram alta eficiência na inibição do crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, além de evitar a formação de biofilme por várias espécies de bactérias. Nos trabalhos de Silva et al., (2013a) e (2013b) esta planta apresentou atividade microbiana contra *Staphylococcus aureus* quando foi testado o seu potencial isoladamente e em sinergismos com o antibiótico eritromicina, sendo a atividade positiva atribuída à alta concentração de compostos fenólicos em seus extratos (quercitina, rutina).

Em estudos sobre o potencial antioxidante desta espécie, sua alta atividade foi correlacionada com a presença de compostos fenólicos e flavonoides nos extratos testados (ALVES et al., 2014; DA SILVA et al., 2011). Além disso, os extratos de *P. moniliformis* mostraram-se ricos em compostos com atividade larvicida contra *Aedes aegypti* L. (FARIAS, 2010).

2.3 ENSAIOS DE TOXICIDADE

O aumento do uso de plantas medicinais mostrou ao longo dos anos, que determinadas plantas apresentam substâncias potencialmente nocivas. Pesquisas demonstraram que muitas destas substâncias são agressivas, devendo ser utilizadas com cautela, respeitando seus riscos toxicológicos (VEIGA-JUNIOR; PINTO; MARCIEL, 2005). Como exemplos de algumas substâncias que causam efeitos tóxicos o apiol, o safrol, lignanas e alcaloides pirrolizidínicos que causam toxidez para as células do fígado (VEIGA-JUNIOR; PINTO; MARCIEL, 2005). Efeitos de toxicidade renal são causados por terpenos e saponinas, substâncias muito comuns nas espécies vegetais (CAPASSO et al., 2000). Além disso, diversas substâncias isoladas de plantas medicinais possuem atividades citotóxicas, genotóxicas e mutagênicas, mostrando uma relação com a incidência de tumores (AMES, 1983; MORTELMANS; ZEIGUER, 2000).

Diante disso, é evidente a importância da avaliação do estudo tóxico das plantas medicinais e de seus constituintes através de estudos científicos necessários para que a população tenha acesso a uma terapia alternativa segura e de qualidade. Esses estudos de toxicidade tem por objetivo caracterizar potenciais efeitos tóxicos dos componentes ativos do produto, estimar o grau de perigo e entender o mecanismo de toxicidade induzido pelo produto. A toxicidade é um parâmetro necessário de qualquer estudo *in vivo* ou *in vitro* que atende a esse objetivo (PURCHASE et al., 1998) e são realizados seguindo-se protocolos bem aceitos internacionalmente, ainda que, dentro do aprovado, as exigências legais variem de país a país (LAPA et al., 2003).

Sendo assim, os principais testes toxicológicos normalmente requeridos são: toxicidade aguda, toxicidade sub-crônica, toxicidade crônica, genotoxicidade, mutagênese, citotoxicidade, carcinogênese, reprodução e teratogênese, toxicocinética, efeitos locais sobre a pele e olhos, sensibilização cutânea e ecotoxicidade (SPIELMANN, 2002; BARROS; DAVINO, 2003).

2.3.1 Toxicidade Oral Aguda

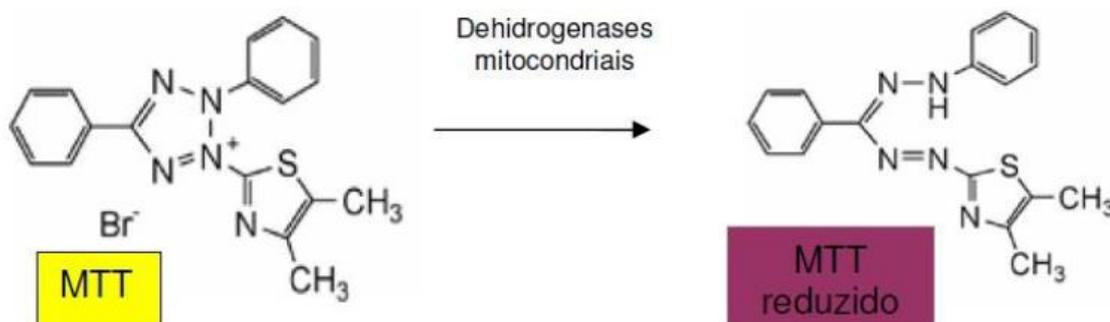
Os estudos de toxicidade oral aguda avaliam os efeitos nocivos que ocorrem em um breve período de tempo, após a administração única ou múltipla dentro de 24 horas, de elevadas doses da substância avaliada. Assim, podem fornecer subsídios referentes aos riscos à saúde após uma exposição de curta duração (BRITO, 1994; DIPASQUALE; HAYES, 2001).

Estes testes são conduzidos com o propósito de expressar a potência das substâncias em termos de dose letal média (DL₅₀- dose letal 50% - dose que mata 50% dos animais) ou da concentração letal média (CL₅₀ concentração letal 50% - concentração que mata 50% dos animais exposto ao produto testado) (AMENI, 2011). Desta forma, os efeitos observados nos animais são relacionados à quantidade de produto administrado, a morte do animal, sendo o principal ponto analisado e os efeitos adversos que possam ser atribuídos a substância durante o período estudado. Portanto, os resultados obtidos através do teste de toxicidade aguda se dá pela caracterização da relação dose-resposta, de tecidos e órgãos alvo por meio de avaliações macro e microscópicas, além de outros parâmetros como o início, a natureza e a duração da intoxicação associada à morte. Além disso, estes testes permitem identificar os agravos referentes às diferentes vias de exposição e diferenças entre os sexos ou idades dos animais (CORRÊA; BOFF; 2009).

2.3.2 Citotoxicidade

Um dos ensaios citotóxicos *in vitro* mais utilizados é baseado no teste colorimétrico com o sal de tetrazólio MTT - brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio], este ensaio mede a viabilidade celular, de modo que é efetuada sua leitura em espectrofotômetro de varredura de múltiplos poços, se tornando um protocolo versátil e quantitativo (MOSMAN, 1983). O ensaio de MTT avalia a atividade oxidativa mitocondrial, ou seja, o sal é reduzido nas mitocôndrias das células vivas, através da clivagem da enzima succinato desidrogenase, em cristais de formazan, de coloração púrpura (Figura 4), estes cristais são extraídos através da adição de um solvente apropriado. A variável resultante da quantidade de cristais formados é diretamente proporcional ao número de células viáveis.

Este ensaio apresenta-se mais rápido, seguro e com alto grau de precisão quando comparado a outros métodos colorimétricos ou outras técnicas como as radioativas (ensaio que consiste na capacidade das células de incorporar substâncias radioativas ou na capacidade de liberar um marcador radioativo) (MOSER, 2011).

Figura 4. Redução do MTT por enzimas mitocondriais.

Fonte: GOMES, 2008.

Apesar das inúmeras vantagens, o ensaio MTT possui algumas limitações como a falta de linearidade frente a densidades celulares elevadas. Esta situação é corrigida mediante padronização da técnica de acordo com a linhagem celular a ser utilizada. Outra desvantagem está no fato de diferentes linhagens diferirem na capacidade de reduzir o corante. No entanto, a grande vantagem é que as células mortas não podem interferir nos níveis de absorvância porque apenas as células metabolicamente ativas podem reduzir o sal de tetrazólio ao seu produto formazan. Todavia, pode ocorrer redução do MTT em células em apoptose em estágios iniciais visto que as mitocôndrias permanecem intactas (LOTZE; THOMSON, 2005).

2.3.3 Genotoxicidade e Mutagenicidade

Os efeitos genotóxicos de uma substância são baseados na sua habilidade de induzir modificações no material genético do organismo a ele exposto. Essas substâncias interagem quimicamente com o material genético, causando alterações oxidativas ou mesmo quebras na molécula de DNA. Na grande maioria dos casos, o dano é reparado pelo próprio organismo ou a célula é eliminada. Caso essa lesão seja fixada, as alterações podem se perpetuar nas células filhas durante o processo de replicação (WHITE; RASMUSSEN, 1998; SASAKI et al. 2000; OBE et al., 2002; WASSON; MCKELVEY-MARTIN; DOWNES, 2008). A genotoxicidade de um composto pode ser avaliada por meio de ensaios que investiguem o dano cromossômico como o de eletroforese em gel, conhecido como ensaio cometa.

No entanto, a mutagenicidade se caracteriza pela indução de alterações transmissíveis e permanentes da quantidade ou da estrutura do material genético (SASAKI et al. 2000; WASSON; MCKELVEY-MARTIN; DOWNES et al., 2008). Apesar de ocorrerem mutações espontâneas, que surgem na ausência do efeito de um mutágeno conhecido, a maioria delas é

induzida por agentes físicos, químicos ou biológicos, aos quais os seres humanos e outros organismos podem ser expostos (GAMEIRO, 2005; CALVIELLO et al., 2006). O efeito mutagênico pode ser determinado através de ensaio *in vitro* ou *in vivo*. Um dos ensaios de mutagenicidade é o teste do micronúcleo (MN), um bioindicador do efeito clastogênico (quebra de cromossomos) ou aneugênico (segregação cromossômica anormal), que revela a instabilidade genômica (LINDBERG et al 2007; IARMARCOVAI et al. 2009; THIERENS; VRAL, 2009; MUGHAL et al. 2010; TERRADAS et al. 2010).

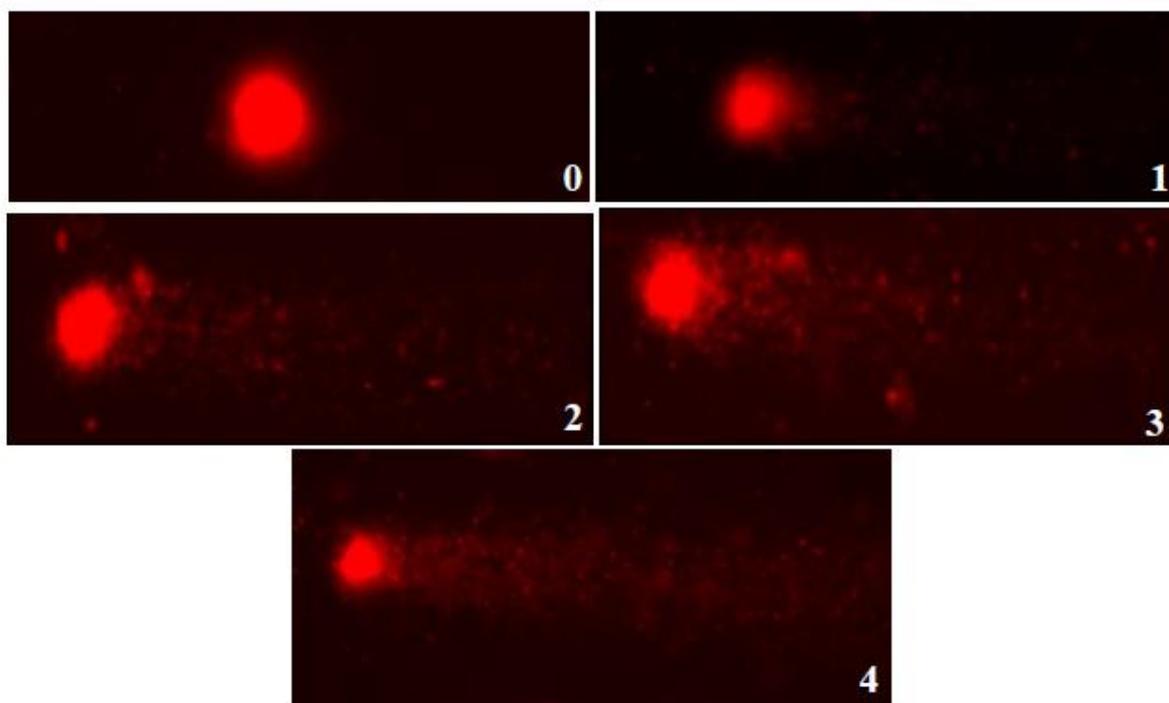
2.3.3.1 Ensaio Cometa

O ensaio cometa ou teste do cometa foi proposto inicialmente em 1984 com objetivo de pré-determinar a eficiência da radioterapia e quimioterapia em células de tumores humanos *in vivo*, com a vantagem de não precisar utilizar marcadores radioativos e precisar de um pequeno número de células para execução do ensaio (ÖSTLING; JOHANSON, 1984).

Este ensaio baseia-se na medida de fragmentos de DNA que migram em um campo elétrico. Primeiramente as células são englobadas em gel e espalhadas em uma lâmina, e posteriormente submetidas a uma corrente elétrica que age como uma força proporcionando a migração desses fragmentos livres, resultantes de quebras, para fora do núcleo. Essas quebras podem ser de fita simples, dupla, *crosslinks*, sítios de reparo por excisão e/ou lesões alcali-lábeis (locais em que a cadeia polinucleotídica sofre quebra quando há incubação do DNA em pH elevado (SINGH et al. 1988; TICE et al. 2000).

Após a eletroforese, as células que apresentam um núcleo redondo são identificadas como normais, sem lesão detectável no DNA. Em contra partida, as células danificadas são identificadas, visualmente, por uma espécie de cauda, semelhante a um cometa, formada pelos fragmentos de DNA. Estes fragmentos podem se apresentar em diferentes tamanhos, e ainda estar associados ao núcleo por uma cadeia simples (DA SILVA et al., 2003; GONÇALVES; CONCEIÇÃO; RESGALL-JUNIOR, 2003; SPIVAK; COX; HANAWALT, 2009). Existe uma escala visual de dano de acordo com a intensidade ou tamanho da cauda que vai de 0 (sem dano) a 4 (dano máximo) (Figura 5), que pode ser determinada utilizando-se microscopia (COLLINS, 2004).

Figura 5. Classificação do dano do DNA das células analisadas por ensaio cometa. 0 (sem dano aparente); 1 (com pouco dano aparente); 2 (dano médio); 3 (dano médio com cauda mais longa) e 4 (dano máximo).



Fonte: Rocha, 2015.

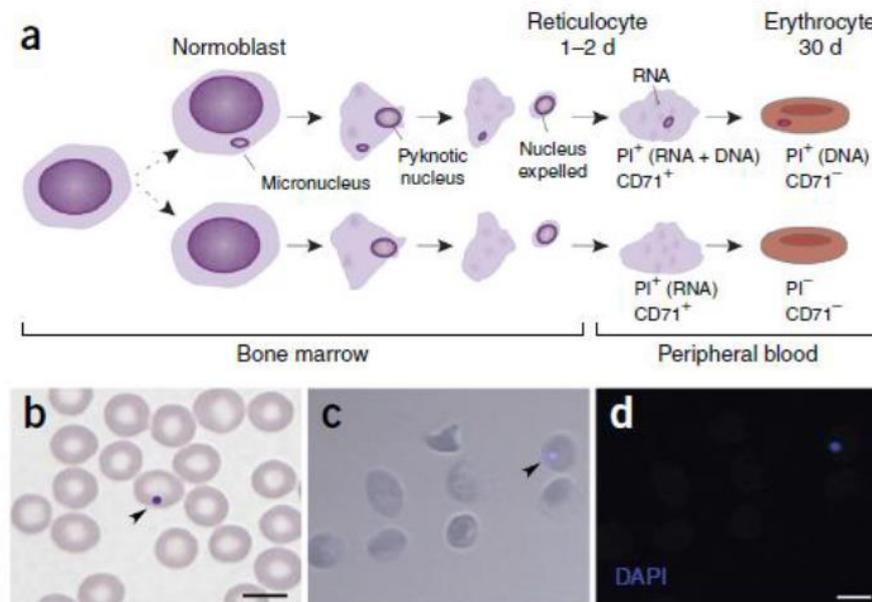
A execução do ensaio cometa é considerada simples, rápida e flexível, de baixo custo e requer pouco material para análise. Além disso, pode ser considerada uma técnica confiável, sensível para a detecção de baixos níveis de danos de DNA, e requer um período de tempo relativamente curto para completar um experimento (TICE et al. 2000; DUSINSKA; COLLINS, 2008; COLLINS et al. 2008). Além disso este teste pode ser realizado em células não proliferativas e a partir de células individuais de diferentes tecidos (LOVELL; OMORI, 2008; BAGATINI; MALUF, 2011).

2.3.3.2 Teste de Micronúcleo

O estudo do micronúcleo consiste basicamente na exposição das células a agentes mutagênicos, onde micronúcleos, que são pequenos corpúsculos nucleares, são perdidos pelo núcleo principal ou formados por cromossomos inteiros que atrasam na anáfase durante a divisão celular. Esses corpúsculos perdidos ou cromossomos atrasados são envolvidos por uma membrana celular durante a telófase, aparecendo como pequenos núcleos além do núcleo principal (Figura 6) (IARMARCOVAI et al., 2009; THIERENS; VRAL, 2009; CEPPI et al., 2010).

Inicialmente desenvolvido da médula óssea de camundongos (SCHMID, 1976) o teste de micronúcleo tem sido recomendado para estudos de monitoramento ambiental, danos citogenéticos induzidos por radiações, estilo de vida, deficiências em nutrientes e doenças e, principalmente, por sua capacidade de detectar agentes clastogênicos e aneugênicos solicitando, no entanto, proliferação celular para a observação do biomarcador de efeito. (SCHMID, 1976; STICH et al., 1998; FENECH, 2000; RIBEIRO; MARQUES, 2003; PASTOR et al., 2003).

Figura 6. Esquema da formação de micronúcleos como consequência de um dano no DNA de uma célula em divisão. (a) Dentro do normoblasto, a cromatina se condensa e o núcleo pinótico é expelido formando um reticulócito (RET). Os RETs migram a partir da medula óssea para a circulação periférica, de modo que, 1 ou 2 dias mais tarde amadurece em um eritrócito normocromático, o qual é caracterizado pela degradação do RNA reticular e perda da expressão do receptor de transferrina (CD71). O núcleo é expelido durante a maturação de células vermelhas do sangue e o micronúcleo é retido. (b) Fragmento de DNA (micronúcleos) em um eritrócito da amostra de sangue de um rato do tipo selvagem, feito por coloração May-Grünwald-Giemsa. (c, d) eritrócitos micronucleados a partir de uma amostra de sangue preparado pelo método DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindole). As barras de escala, 5 μM . As setas indicam micronúcleos.



Fonte: Adaptada de Balmus et al., 2014.

A presença de micronúcleos pode ser considerada como uma indicação de ocorrência prévia de aberrações cromossômicas estruturais ou numéricas, em algum momento do ciclo de vida das células ou exposição exógena a agentes genotóxicos, refletindo inúmeras alterações cromossômicas importantes para a carcinogênese (CARRANO; NATARAJAN, 2002).

Deste modo, este teste tem sido amplamente utilizado tanto *in vitro* como *in vivo* e *in situ*, com a vantagem de ser simples, eficaz e rápido na detecção de danos cromossômicos

induzidos. Além disso, a frequência de micronúcleos aparece elevada em tecidos expostos bem antes que qualquer sintoma clínico seja evidente, tornando-o valiosa ferramenta como biomarcador precoce para o risco do desenvolvimento de câncer (GARAJ-VRHOVAC; ZELJEZIC, 2001).

2.4 RADICAIS LIVRES E OXIDANTES

Os radicais livres são moléculas ou átomos que possuem a capacidade de existir independentemente, contendo um ou mais elétrons desemparelhados na sua órbita externa (VANNUCCHI et al., 1998). Isto determina uma atração para um campo magnético, o que pode torna-lo altamente reativo, capaz de reagir com qualquer composto situado próximo à sua órbita externa, passando a ter uma função oxidante ou redutora. Os radicais livres são formados em um cenário de reações de óxido-redução, isto é, ou cedem o elétron solitário, oxidando-se, ou recebem outro, reduzindo-se. Portanto os radicais livres ou provocam ou resultam dessas reações de óxido-redução (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A incidência de radicais livres endógenos e exógenos não pode ser impedida, e isto é devido tanto por processos metabólicos normais que ocorrem a todo o momento da vida, quanto pela ação de oxidantes do meio ambiente (POLJSAK et al., 2011). Esses radicais livres são gerados a partir de processos aeróbicos como a respiração celular; processos infecciosos envolvendo ativação fagocítica; durante atividade física intensa; ou pela ação de poluentes e toxinas, como fumaça de cigarro, álcool, radiações ionizantes e ultra-violeta, pesticidas e ozônio (LOBO et al., 2010).

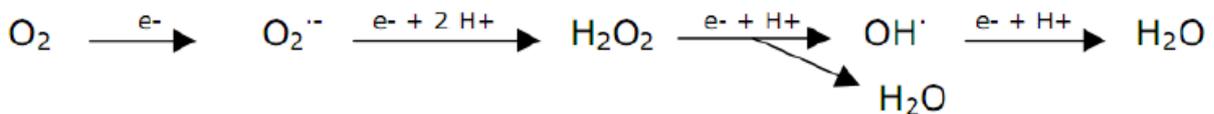
O aumento dessas moléculas no organismo leva a alterações em nível molecular que estão associadas a danos das macromoléculas biológicas como lipídios, proteínas e DNA, gerando alterações em diversos tecidos que estão envolvidos em uma variedade de processos patológicos, como por exemplo: câncer, aterosclerose, doenças neurodegenerativas, diabetes, cirrose, artrite reumatoide entre outras (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000).

No entanto, o excesso de radicais livres pode ser controlado nos seres vivos por diversos compostos antioxidantes, os quais podem ter origem endógena, como a superóxido desmutase, ou serem provenientes da dieta alimentar e outras fontes. Destas últimas, destacam-se tocoferóis (Vitamina E), ácido ascórbico (Vitamina C), polifenóis, selênio e carotenoides. Esses antioxidantes possuem a capacidade de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células (SOUZA et al. 2007).

2.4.1 Espécies Reativas de Oxigênio

Várias substâncias são definidas como radicais livres, porém as substâncias de maior interesse são as espécies reativas do oxigênio (ERO) (Figura 7), produzidas em geral de forma endógena ou exógena. As fontes exógenas das ERO's incluem a radiação, fumo, estresse e alguns medicamentos (HALLIWELL, 1987). O oxigênio tem papel fundamental no crescimento e desenvolvimento do organismo, assim como, na produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) que podem desregular processos celulares normais e causar a morte da célula, tanto no metabolismo animal quanto no vegetal (SLESACK et al., 2007).

Figura 7. Processo de formação dos EROs.



Fonte: Renz, 2003.

O esquema acima (Figura 7) mostra o ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), o primeiro intermediário monovalente do oxigênio até a água, a partir dele, são formados os demais EROs (RENZ, 2003). No processo celular para obtenção de energia (cadeia respiratória) ocorre uma sequência de reações oxidativas sendo o oxigênio o aceptor final de elétrons. Dessa sequência resultam compostos como o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), o radical hidroperoxila (HO_2^\cdot), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^\cdot), sendo encontradas em todos os sistemas biológicos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; CATANIA et al., 2009).

As ERO em baixos níveis e em condições normais possuem um papel importante em seres vivos. Um exemplo de suas funções no organismo é na resposta imune a infecções. Os fagócitos em geral possuem um mecanismo de defesa contra corpos estranhos onde ocorre um alto consumo de oxigênio, geralmente denominado queima ou explosão respiratória. Entretanto, devido a sua elevada reatividade, o acúmulo de ERO além das necessidades imediatas da célula pode afetar a estrutura celular e a integridade funcional, ao provocar a degradação oxidativa de moléculas críticas, tais como o DNA, proteínas e lipídios (CUI et al., 2004).

No organismo humano existem alguns mecanismos de defesa antioxidante contra essas moléculas, como enzimas e os antioxidantes nos alimentos que estão ligados aos outros e equilibram as EROs. Quando os mecanismos de proteção antioxidante se tornam ineficientes

por fatores como idade, pode ocorrer deterioração das funções fisiológicas, resultando em doenças e aceleração do envelhecimento (LEE et al., 2004; MORAIS et al., 2006).

2.4.2 Antioxidantes

De forma geral, denominam-se antioxidantes biológicos quaisquer composto, que quando presente em uma concentração mais baixa comparado ao substrato oxidável é capaz de atrasar ou prevenir a oxidação do substrato. As funções dos antioxidantes estão implicadas em diminuir o estresse oxidativo, mutações de DNA, transformações malignas, dentre outros parâmetros de dano celular (GODIC et al., 2014).

Os antioxidantes podem ser classificados a partir de dois mecanismos de ação, como primários e secundários. Os antioxidantes primários atuam como doadores de prótons e impedem o processo de iniciação desencadeado pelos radicais livres, ao convertê-lo em produtos mais estáveis termodinamicamente. Enquanto que os antioxidantes secundários atuam bloqueando a reação em cadeia através de captação de intermediários reativos, como os radicais peroxila e alcooxila (NACZK; SHAHIDI, 2004).

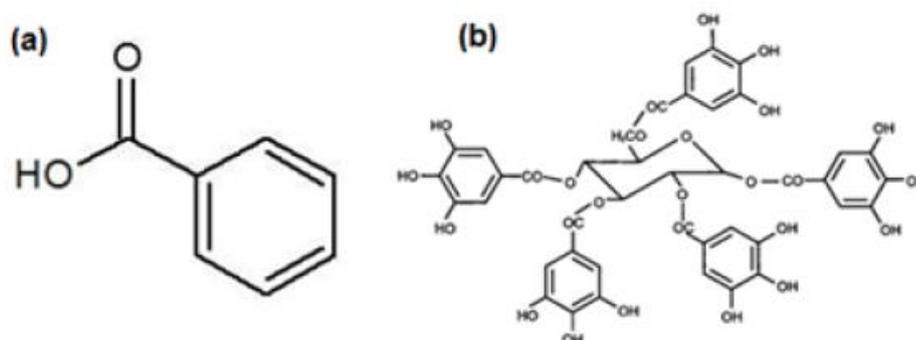
Essas substâncias com capacidade antioxidante podem atuar em diferentes níveis na proteção dos organismos (BIANCHI; ANTUNES, 1999): Atuam no mecanismo de defesa contra os radicais livres impedindo sua formação, principalmente pela inibição das reações em cadeia com o ferro e o cobre; são capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre os lipídeos, os aminoácidos das proteínas, a dupla ligação dos ácidos graxos poli-insaturados e as bases do DNA, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular, como por exemplo, os antioxidantes obtidos da dieta, tais como as vitaminas C, E e A, os flavonoides e carotenoides; reparam lesões causadas pelos radicais, processo relacionado com a remoção de danos da molécula de DNA, a reconstituição das membranas celulares danificadas; e em algumas situações pode ocorrer o aumento da síntese de enzimas antioxidantes em resposta a adaptação do organismo contra a geração desses radicais.

Adicionalmente, antioxidantes podem ser sintéticos, como o butil-hidroxianisol (BHA) e o butil-hidrotolueno (BHT), largamente utilizados pela indústria de alimentos; ou naturais, substâncias bioativas, como compostos organossulfurados, fenólicos e terpenos, que fazem parte da constituição de diversos alimentos (KITTS, 1994). Os Antioxidantes naturais são originados principalmente de plantas na forma de compostos fenólicos (flavonóides, ácidos fenólicos, álcoois, estilbenos, tocoferóis, tocotrienóis), ácido ascórbico e carotenóides (REDDY et al., 2012).

2.4.3 Compostos Fenólicos e Atividade Antioxidante

Os compostos fenólicos são caracterizados por ter pelo menos um anel aromático com um ou mais grupamento hidroxila. Essas moléculas são oriundas do metabolismo secundário de plantas que possuem elevada diversidade estrutural variando de moléculas simples tais como os ácidos fenólicos (Figura 8a), para compostos altamente polimerizados, tais como taninos (Figura 8b), apresentando mais de 8.000 substâncias já descritas (BRAVO, 1998). Esses compostos são biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides e são frequentemente conjugados com açúcares, outros fenólicos e poliamidas (TORRAS-CLAVERIA et al., 2012). Tais substâncias ocorrem naturalmente em frutas, vegetais, nos chás e nos vinhos tintos e fazem parte integral da dieta humana (MANACH et al., 2005; MEZADRI et al., 2008; TULIPANI et al., 2008; LASKAR et al., 2010).

Figura 8. Ácido fenólico (a) e Ácido tânico (b).



Fonte: Bravo, 1998.

Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm se destacado nos últimos anos, sobretudo por retardarem a degradação oxidativa (SREERAMULU; RAGHUNATH, 2010). Acredita-se que a estrutura química dos polifenóis está diretamente relacionada com sua biodisponibilidade e atividade biológica e, além disso, exista uma variedade individual do metabolismo e biodistribuição desses compostos em humanos (MONTEIRO et al., 2007).

A natureza química dos compostos fenólicos está intimamente correlacionada com seu potencial antioxidante. Desta forma, a associação desses compostos com outros agentes redutores tais como vitamina C, vitamina E e carotenoides, podem proteger tecidos e

estruturas celulares contra danos oxidativos (VINSON; DABBAG, 1998; PRASAD et al., 2009). Além disso, estas substâncias são capazes de inibir a oxidação de diversos substratos através da captação de radicais livres, bloqueando reações em cadeia e algumas vezes agindo como quelantes de metais (SHAHIDI et al., 1992), atuando tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os produtos intermediários, formados pela ação destes antioxidantes, são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático apresentada por estas substâncias (SOARES et al., 2002).

Além do efeito antioxidante, compostos fenólicos também possuem outras propriedades, dentre elas, atividade antiinflamatória, anti-agregação plaquetária, diurética, antiviral e anticarcinogênica, sendo também benéficos ao sistema cardiovascular por sua participação na vasodilatação (RICE-EVANS, 1996; NEIVA et al., 1999; PRASAD et al., 2009).

2.5 ANTIMICROBIANOS

O desenvolvimento de agentes antimicrobianos surgiu com a descoberta das sulfonamidas em 1935. E logo em seguida na década de 1940, foi demonstrado que a penicilina e a estreptomicina poderiam ter uma terapêutica eficaz. A partir daí, foi desencadeada uma busca de novas substâncias de origem microbiana, surgindo o desenvolvimento de novas classes de agentes antimicrobianos como tetraciclina, a quinolona e os aminoglicosídeos (JAWETZ; MELNICK; ADALBERG, 1998; NORRBY; NORD, 2005).

O agente antimicrobiano ideal necessita apresentar algumas propriedades como a chamada toxicidade seletiva, isto é, o fármaco deve ser prejudicial ao parasita e não ao hospedeiro, sendo assim, em doses tolerantes ao hospedeiro, o fármaco tem a capacidade de lesar o parasita (JAWETZ; MELNICK; ADALBERG, 1998; BLACK, 2002). Além disso, esses agentes também devem agir sobre as bactérias susceptíveis afetando seu crescimento e reprodução, causando um efeito bacteriostático, e/ou induzindo sua morte, causando um efeito bactericida (FERREIRA, 2007).

O mecanismo de ação de antimicrobianos se baseia principalmente na inibição da síntese da parede celular e/ou membrana plasmática, atuando na atividade enzimática ou estrutura do protoplasma bloqueando certas reações enzimáticas, bem como atuam na inibição de proteínas e ácidos nucleicos (JAWETZ, MELNICK, ADALBERG, 1998; TORTORA,

FUNK, CASE, 2003; BLACK, 2002; TRABULSI; TOLEDO, 2004) e como antimetabólito (BLACK, 2002).

É inquestionável que o desenvolvimento dos antibióticos possibilitaram importantes intervenções farmacológicas em relação a redução da morbidade e mortalidade humana. No entanto, seu uso intensivo aumentou drasticamente a frequência da resistência dos patógenos humanos, reduzindo a probabilidade de tratar com eficácia as infecções, aumentando o risco de complicações e um desfecho fatal (WOODFORD; LIVERMORE, 2009; LEW et al., 2009; ANDERSSON; HUGHES, 2010).

2.5.1 Resistência a Antimicrobianos

Resistência a um antibiótico significa que um microrganismo antes sensível à ação de um antibiótico não é mais afetado por ele. Um fato relevante na resistência dos microrganismos aos antibióticos é que muitas drogas são bacteriostáticas (BLACK, 2002). O uso inadequado de drogas também vem agravando o problema de resistência dos microrganismos, além de outros fatores, como o aparecimento de cepas bacterianas multirresistentes (FERREIRA, 2007) A resistência bacteriana tornou-se um grande problema frente às doenças infecciosas, pois já houve casos de patógenos resistentes à maioria dos medicamentos disponíveis no mercado, aumentando assim os custos com os serviços de saúde (ORLANDO, 2005).

As bactérias podem desenvolver mecanismos de resistência aos antimicrobianos, que podem ser naturais ou adquiridos. Os mecanismos naturais são características de algumas bactérias e conferem resistência a um antibiótico de todas as cepas dessa espécie bacteriana. Enquanto que a resistência adquirida ocorre devido a uma mutação genética, tanto em nível cromossomal, pela alteração de DNA bacteriano, como extracromossomal, pela transferência de DNA, geralmente pelos plasmídios de resistência (NORMARK; NORMARK, 2002).

Múltiplos são os mecanismos de resistência adquirida, incluindo perda da permeabilidade da membrana, ocorrendo modificação das proteínas da membrana e impedindo assim, a passagem dos antimicrobianos (ex. quinolonas), alteração do sítio de ligação (ex. eritromicina), superprodução de enzimas-alvo (ex. sulfonamida), síntese de enzimas que inativam o fármaco (ex. β -lactâmicos) e rotas metabólicas alternativas (ex. sulfas) (MOREIRA, 2004).

O uso indiscriminado de antibióticos, tendo como principais fatores determinantes a automedicação e a prescrição indevida desses medicamentos pelos profissionais de saúde,

favorecem o crescimento de cepas resistentes. Estima-se que cerca de 20 a 50% dos antimicrobianos prescritos são desnecessários. Podemos citar como exemplo a indicação de antibióticos para o tratamento de infecções das vias respiratórias superiores – como resfriado comum, infecção de ouvido (otite média), garganta dolorida, tosses e bronquites – apesar das evidências de ineficiência desses agentes para essas doenças, por serem frequentemente de etiologia viral (VIKSVEEN, 2003; NORBY; NORD, 2005).

Diante disso, algumas medidas devem ser tomadas para resolver esse problema, como controlar o uso indiscriminado dos antibióticos, ampliar os estudos sobre o mecanismo genético de resistência e continuar as pesquisas para desenvolver novas drogas. Assim, as pesquisas que visam o estudo e avaliação dos produtos obtidos de recursos naturais como terapêuticos e/ou com atividade antimicrobiana devem ser ampliadas no intuito de criar novas drogas e melhorar as já existentes, para que estas voltem a ter alguma atividade (COUTINHO et al., 2003/2004).

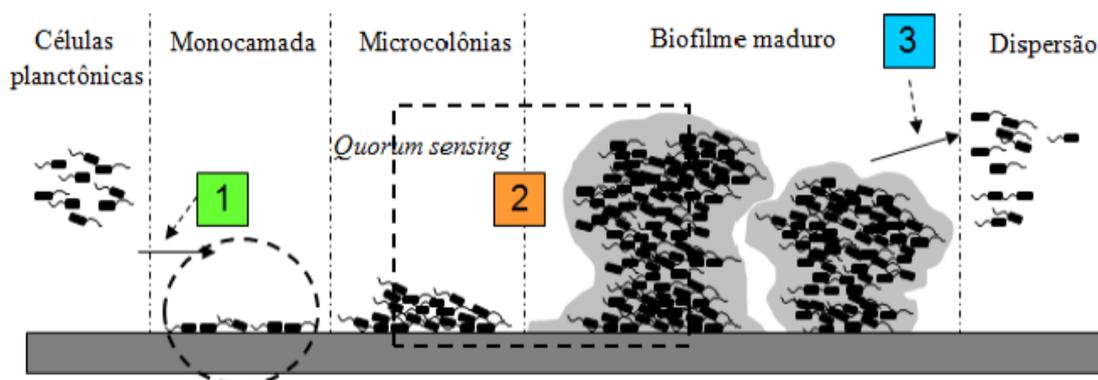
2.5.1.1 Formação de Biofilme

Uma das estratégias desenvolvidas pelos micro-organismos para sua sobrevivência em ambientes com condições adversas é a formação de biofilme (TRACHOO, 2003). O biofilme microbiano é definido como uma associação de células bacterianas e fúngicas, fixadas às superfícies, bióticas ou abióticas, inclusas em uma complexa matriz extracelular de substâncias poliméricas (LUCCHESI, 2006), podendo provocar uma alteração fenotípica de células planctônicas (vida livre) para a forma sésil. Células que crescem em biofilme expressam propriedades distintas das células planctônicas, uma destas é o aumento da resistência aos agentes antimicrobianos e biocidas (LECHEVALIER; CAWTHON; LEE, 1988; HOLAH et al., 1990; MOSTELLER; BISHOP, 1993; WALKER; ROGERS; KEEVIL, 1994; EGINTON et al., 1998; TRACHOO, 2003).

Esta resistência é, em parte, atribuída à matriz polimérica, pois parece funcionar como uma barreira protetora contra fatores agressivos externos, como os biocidas (PEREIRA, 2001). A elevada resistência de biofilmes bacterianos, pode ser explicada pela difusão limitada de agentes antimicrobianos por meio da matriz do biofilme, interações de agentes antimicrobianos com a matriz (células e polímeros), resistência mediada por enzimas, adaptação genética, níveis de atividade metabólica dentro do biofilme, e outros fatores inter-relacionados, como as barreiras de difusão, ultraestrutura da parede celular e atividade metabólica diferencial (CAIXETA, 2008).

A formação do biofilme inicia-se quando células planctônicas (células de vida livre) são ativadas por mudanças na expressão gênica (sistema “quorum sensing”) e tornam-se capazes de se fixar a praticamente qualquer superfície. Essas bactérias aderidas multiplicam-se e encapsulam as colônias com uma matriz de substância extracelular polimérica (EPS). Entre essas células há a formação de canais que facilitam a difusão dos nutrientes na matriz. A proximidade dessas células facilita a troca de sinais moleculares que regulam o comportamento, a estrutura e a dinâmica dessa comunidade sésil microbiana. Além disso, há gradientes químicos que geram microambientes para diferentes espécies microbianas ou níveis de atividade. Em determinadas condições, como falta de nutrientes ou uso de biocidas, ocorre a cisão de um agregado celular ou a migração de células planctônicas, a fim de colonizar outros ambientes (HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004) (figura 9).

Figura 9. Etapas da formação de biofilme. 1: adesão bacteriana, 2: comunicação celular microbiana, 3: maturação e dispersão.



Fonte: Adaptada de Macedo e Abraham, 2009.

O fato de o biofilme conferir maior proteção aos microrganismos, a utilização de antimicrobianos se torna menos eficiente, gerando uma pressão seletiva que pode acarretar no desenvolvimento de resistência a esses fármacos (TENOVER, 2006). Infecções resistentes a antibióticos duplicam o tempo de estada no hospital e o número de mortes quando comparadas com infecções susceptíveis (DONELLI, 2007; STAR; KUPFERBERG, 2004). Essa situação alarmante também ocorre quando o microrganismo causador da infecção é capaz de formar biofilme, o que coloca a vida do paciente em risco e aumenta o custo hospitalar (STAR; KUPFERBERG, 2004).

Portanto, é de grande importância sanitária e econômica a descoberta de moléculas capazes de inibir a formação ou destruir biofilmes já formados, visto que diminui a virulência dos microrganismos e os gastos hospitalares.

2.5.2 Produtos Naturais e Atividade Antimicrobiana

O uso de antimicrobianos obtidos de produtos naturais, como extratos vegetais tende a ser uma alternativa interessante para reduzir ou eliminar microrganismos patogênicos, levando assim ao aumento da procura dessas novas alternativas terapêuticas (BURT, 2004; SILVA et al., 2010). Além disso, devido ao aumento de cepas bacterianas resistentes, houve um aumento no número de publicações sobre atividade antibacteriana de extrato de plantas (ELOFF, 1998). Trabalhos realizados por Dimitrova et al., (2017) sobre a atividade antimicrobiana de extratos vegetais frente a isolados de *Staphylococcus* spp., constataram dentre os extratos metanólicos e frações de plantas, que a maioria deles apresentaram alguma inibição ou inativação sobre *Staphylococcus* spp.

A estrutura química dos antibióticos vegetais diferem daqueles derivados de microrganismos, podendo regular o metabolismo intermediário de patógenos, ativando ou bloqueando reações e síntese enzimática ou mesmo alterando a estrutura de membranas (MICHELIN et al., 2005). As plantas são capazes de produzir diferentes substâncias tóxicas em grandes quantidades, aparentemente para sua defesa contra vírus, bactérias, fungos e animais predadores. Muitas dessas substâncias são responsáveis pelas suas propriedades medicinais e aromáticas que são utilizadas na medicina popular e despertam interesse científico pelas suas atividades biológicas (LAPA et al., 2002).

Estes compostos são produzidos a partir do metabolismo secundário das plantas, tendo uma composição química muito diversificada, mas enfatizando o interesse em compostos com grande ação antimicrobiana podemos citar: os terpenóides (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e saponinas), compostos fenólicos (fenóis simples, taninos, dibenzofuranos e flavonoides), compostos nitrogenados (alcaloides, polipeptídeos cíclicos, glicosídeos), cumarina e cânfora (RESCHKE et al., 2017; SIMÕES et al., 2003).

Os compostos isolados de plantas apresentam estruturas químicas, com raras exceções, que possuem grandes diferenças estruturais em relação ao antibióticos derivados de microrganismos (GONÇALVES et al., 2005). Os estudos sobre o mecanismo responsável pela ação antimicrobiana dos princípios ativos extraídos das plantas mostraram a relação do metabolismo intermediário da bactéria através do bloqueio de reações químicas, da ação

direta sobre a atividade enzimática, ou mesmo de alterações nas estruturas de membrana (SINGH; SHUKLA, 1984; COWAN, 1999; BURT, 2004).

As substâncias antimicrobianas nas plantas são detectadas pela observação do crescimento de microorganismos colocados em contato com tecidos e ou extratos, e para detectar estas substâncias são utilizadas diversos métodos, diferenciados pela sensibilidade ou princípios. A região ou estrutura da planta e suas características fisiológicas também são determinantes para a medição da atividade antibiótica, bem como a forma de uso como suco, óleo essencial e extração por água ou outros solventes (SOUZA et al., 2000).

Diversos métodos são utilizados para esse efeito e como não são todos baseados no mesmo princípio, os resultados obtidos serão também profundamente influenciados, não só pelo método escolhido, mas também pelos microorganismos utilizados para realizar o teste, e pelo grau de solubilidade de cada teste (SILVEIRA et al., 2009). Os principais métodos microbiológicos de detecção de atividade antimicrobiana encontrados na literatura tanto para detecção na atividade de bactérias como fungos podem ser classificados em três tipos: ensaios biogeográficos, de difusão e de diluição (SILVEIRA et al., 2009).

A bioautografia é um método útil para a localização de substâncias com ação antimicrobiana, sendo em um extrato ou em frações complexas, como os derivados dos produtos naturais (CAMPOS, 2006). Nesta técnica, um meio de cultura sólido, fundido e inoculado, é aplicado sobre a placa cromatográfica na qual foi eluído o extrato ou fração. Durante o período de incubação da placa, os compostos ultrapassarão o meio por difusão, formando zonas de inibição do crescimento microbiano (CAMPOS, 2006). A comparação desenvolvida pelo cromatograma sob circunstâncias idênticas e visualizada com o uso de reagentes apropriados pode fornecer informações úteis sobre a natureza de compostos ativos, permitindo um isolamento biodirecionado (CAMPOS, 2006; VALGAS et al., 2007). Uma vantagem deste método é a possibilidade de usar para fases móveis solventes de baixa volatilidade (VALGAS et al., 2007).

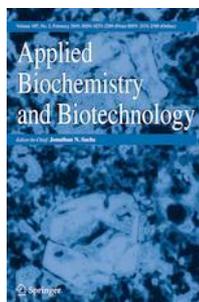
Os métodos de diluição *in vitro* detectam possíveis atividades antimicrobianas de compostos, utilizando métodos celulares sem alvo específico (SARTORI, 2005). O ensaio para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), ou Minimum Inhibitory Concentration (MIC), é obtido através da macro ou microdiluição de compostos que consiste em se preparar diluições sucessivas do antimicrobiano a ser testado, em meios de cultura sólidos ou líquidos, semear o microorganismo e após a incubação verificar a menor concentração (maior diluição) do antimicrobiano que inibiu o crescimento do microorganismo.

Para a determinação dos resultados pode-se usar a verificação visual por turbidez, mensurar a viabilidade e proliferação das células através de corantes indicadores de oxi-redução como Alamar blue e Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio ou utilizar aparelhos, como o espectrofotômetro (PFALLER; BARRY, 1994; CLSI, 2003; BAKER; TENOVER, 1996; DUARTE et al., 2005).

Determina-se a CIM como sendo a concentração mais baixa de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um microrganismo no teste de sensibilidade por diluição em ágar ou caldo (CLSI, 2002; 2003). As vantagens desse método é proporcionar mais informações quantitativas e poder ser aplicado a uma variedade mais ampla de isolados do que as provas por difusão (KONEMAN et al., 2001).

Já o método de difusão em disco baseia-se nas provas de sensibilidade antimicrobiana estabelecendo a dose responsável pela curva de crescimento dada por um determinado inóculo contra um dado antimicrobiano, seja ele um antibiótico, extrato vegetal ou composto isolado de um extrato (COLE, 1994; KONEMAN et al., 2001). Nesta técnica, utilizam-se discos de papel impregnados com quantidades definidas do antimicrobiano. Estes discos são colocados em contato com a superfície úmida do ágar, já semeado com uma suspensão microbiana. A amostra é absorvida pelo papel de filtro e o seu conteúdo se difunde no meio circundante. Após a incubação, na placa semeada com a suspensão bacteriana, ocorre o desenvolvimento das células no ágar e, simultaneamente, a difusão do antimicrobiano. Na área onde o antimicrobiano é suficiente para impedir o crescimento do microrganismo, pode ser observado o halo de inibição (COLE, 1994; KONEMAN et al., 2001).

3 ARTIGO I - Artigo a ser submetido em APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY



COMPARATIVE EVALUATION OF DIFFERENT EXTRACTION TECHNIQUES AND SOLVENTS FOR TESTING OF PHYTOCHEMICALS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THE LEAVES OF *Pityrocarpa moniliformis*

Tamiris Alves Rocha^{1*}; Danielle Feijó de Moura¹; Maria Aparecida da Conceição de Lira⁴; Bárbara de Azevedo Ramos¹; Daniel Rodrigo Cavalcante de Araújo⁵; Bheatriz Nunes de Lima Albuquerque²; Patrícia Cristina Bezerra-Silva²; Wolfgang Harand⁵; Claudia Sampaio de Andrade Lima³; Alexandre Gomes da Silva^{4,5}; Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro²; Emerson Peter da Silva Falcão⁶; Marcia Vanusa da Silva^{1,5}; Maria Tereza dos Santos Correia^{1,5}

¹Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

²Departamento Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

³Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

⁴Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

⁵Núcleo de Bioprospecção da Caatinga, Instituto Nacional do Semiárido, Campina Grande, Paraíba, Brazil

⁶Núcleo de Nutrição, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

Comparative Evaluation of Different Extraction Techniques and Solvents for Testing of Phytochemicals and Antioxidant Activity of the Leaves of *Pityrocarpa moniliformis*

Tamiris Alves Rocha^{1*}; Danielle Feijó de Moura¹; Maria Aparecida da Conceição de Lira⁴; Bárbara de Azevedo Ramos¹; Daniel Rodrigo Cavalcante de Araújo⁵; Bheatriz Nunes de Lima Albuquerque²; Patrícia Cristina Bezerra-Silva²; Wolfgang Harand⁵; Claudia Sampaio de Andrade Lima³; Alexandre Gomes da Silva^{4,5}; Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro²; Emerson Peter da Silva Falcão⁶; Marcia Vanusa da Silva^{1,5}; Maria Tereza dos Santos Correia^{1,5}.

¹Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

²Departamento Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

³Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

⁴Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

⁵Núcleo de Bioprospecção da Caatinga, Instituto Nacional do Semiárido, Campina Grande, Paraíba, Brazil

⁶Núcleo de Nutrição, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

*Corresponding author.

Email address: tamiris.rocha@ufpe.br (T.A. Rocha)

Abstract

This study aimed to investigate the efficiency of different extraction techniques and solvents to obtain compounds with antioxidant activity of the leaves of *Pityrocarpa moniliformis*. The extracts were obtained by extraction by maceration (EM), Soxhlet apparatus (ESA), ultrasound (UAE), solvent accelerated extraction (ASE) and Supercritical Fluid (SFE) using three solvents (Cyclohexane, Ethyl Acetate and Methanol) and tested by four antioxidant methods (Sequestration of radicals DPPH and ABTS, phosphomolybdenum and iron reducing power). The total phenolic content and flavonoids were measured by the methods Folin-Ciocalteu and aluminum chloride, respectively. The technique considered most effective in relation to yield and extraction time was ASE. The methanolic extracts exhibited higher phenolic and flavonoid contents as well as better antioxidant activities. The methanolic extracts presented three major compounds with Retention time (Rt) of 1.73, 4.52 and 7.90 in all techniques analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The methanolic extracts of the ASE were followed for fractionation in FLASH chromatography, obtaining 45 fractions, which showed increase of DPPH activity in relation to the extracts. The antioxidant activity of *P. moniliformis* shows that this species can be considered as a promising source of bioactive compounds.

Keywords: antioxidant agents; caatinga; DPPH; oxidative stress; phenolic compounds.

1. INTRODUCCION

Pityrocarpa moniliformis is an arboreal plant in the Northeast of Brazil, occurring disjunct in dry forests of the region of Sucre (Venezuela). Because it is an endemic plant of the caatinga, which presents several plant species with great therapeutic and pharmacological potential [1-4] and being a species still little explored, there is a need for more in-depth

studies about its biological activities. Recent studies have revealed a significant antioxidant potential as well as promising antimicrobial activity [5-7].

Antioxidant agents are of great importance to inhibit the processes of oxidative stress that triggers problems in animal metabolism [8]. The oxidation process is essential in the production of energy by biological systems [9], because they are related not only to energy production but to cell growth, intercellular signaling and synthesis [10]. However, excess oxidation reactions become detrimental by causing peroxidation of membrane lipids, aggression to tissue and membrane proteins; as well as damage to enzymes, carbohydrates and DNA [11]. Phenolic compounds are well known in the literature as antioxidants, mainly because of their oxide-reduction properties, which may play an important role in the absorption and neutralization of free radicals, chelating oxygen or decomposing peroxides [12-16].

The isolation and identification of phenolic compounds from medicinal plants depends mainly on the extraction solvent and the technique used. Several extraction techniques have been previously reported to extract phenolic compounds from plant materials such as microwaves [17] ultrasound-assisted methods [18], methods of extracting supercritical fluids, technique of the stirring flask [19], reflux [20] and the extractions of Soxhlet [21]. In addition, there are few studies that report the phenolic compounds found in the species *P. moniliformis* and the relation of these compounds with the high antioxidant activity of this plant. Apart from that, the analysis of the best extraction technique to obtain compounds with antioxidant activity and the isolation and identification of these compounds were not developed for this species. Thus, the objective of this study was to investigate the efficiency of different extraction techniques and solvents to extract compounds with antioxidant activity obtained from the leaves *P. moniliformis*.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Collection of material and extraction solvents

Leaves of *P. moniliformis* were collected in the Parque Nacional do Catimbau, in Buíque, Pernambuco. The material was taken to the forced air circulation oven (40-45 °C) for a period of three to four days. The samples were also identified according to the usual taxonomic techniques and deposited in the Herbarium of the Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA) (code 84.048). The plant material was processed in a bench mill and subjected to different extraction methods following the eluotropic order of the solvents: cyclohexane, ethyl acetate and methanol. The samples were rotated and left at room temperature for complete drying of the solvent. All extracts obtained were stored at -20 °C for further analysis.

2.2 Extraction methods

a) *Extraction by Maceration (EM)*: 30 g of the dried and ground vegetable material was added to 300 ml of cyclohexane and subjected to successive extractions, remaining under mechanical stirring for 72 h at room temperature (25-27 °C). The obtained cyclohexane extract was filtered and maintained at a temperature of ± 4 °C. To the residue was added cyclohexane again and the same extraction procedure repeated 3 more times. The same procedure was performed for the solvents ethyl acetate and methanol following the eluotropic series. The extracts were dried under reduced pressure on a rotary evaporator coupled to a water bath at 40 °C and kept in a desiccator until constant weight for further calculation of their yield.

- b) *Extraction in Soxhlet Apparatus (ESA)*: The vegetable material (30 g) was added 300 mL of cyclohexane in Soxhlet apparatus at 40 °C for 72 h in a water bath. Subsequently, the extract was filtered and concentrated to dryness in a rotary evaporator coupled in a water bath at 40 °C under reduced pressure. The residue was kept in desiccator until constant weight for further calculation of its yield. The same procedure was repeated to obtain extracts with ethyl acetate and methanol.
- c) *Ultrasound Assisted Extraction (UAE)*: To obtain extracts, an ultrasonic bath (model USC-1400 / Family USC-1400A / USC-1450A) was used as the source of ultrasound. 30 g of the plant material was added to 300 ml of solvent, following the eluotropic series (cyclohexane, ethyl acetate and methanol) and sonicated (3 x 30 min) at a temperature of 40 °C and power of 150 W, then the samples were rotoevaporated under reduced pressure and left at room temperature for complete drying of the solvent and subsequent calculation of the yield.
- d) *Accelerated Solvent Extraction (ASE)*: 20g of the plant material together with 10g of diatomaceous earth was subjected to ASE 350 Dionex automatic extractor, following the eluotropic order of the solvents: cyclohexane, ethyl acetate and methanol, under a temperature of 40 °C for 15 min under a pressure of \pm 1500 psi and solvent flow of 5mL/min. The extracts already filtered in the ASE were dried in Rocket Evaporator™ and left at room temperature for complete drying of the solvent.

e) *Supercritical Fluid Extraction (SFE)*: Supercritical extraction was performed on an Applied Separations Speed SFE unit model 7071 (Allentown, PA, USA) with a 115 mL extraction cell. 30 g of dry plant material was loaded into the SFE cell at a temperature of 50 °C at a pressure of 5000 psi with a static period of 30 min. With dynamic mode (continuous flow) using scCO₂ (Supercritical carbon dioxide) as solvent and cyclohexane, ethyl acetate and methanol as co-solvents following the eluotropic series. Flow rates were 4 mL/min for scCO₂ and 1 mL/min for the solvents. The extracts were then evaporated at room temperature until complete drying.

2.3 Calculation of extraction yield

The extraction yield was expressed as a percentage and calculated as the weight of the extract obtained and concentrated, divided by the weight of vegetable drug used, multiplied by 100.

2.4 Phytochemical evaluation

2.4.1 Dosing of Total Phenols

Total phenolic content (TPC) was determined by the Folin-Ciocalteu method according to Li et al. [22] with some modifications. Different concentrations of gallic acid were dissolved in methanol. For each tube 1mL of the diluted Folin solution of 1:10 (v / v) and 0.2mL of the extracts diluted to 1mg/mL in methanol were added. After 3 minutes in the dark, 0.8 ml of 7.5% sodium carbonate was added, leaving a further 120 minutes at ambient temperature. After this period the absorbances of the samples were read at 765 nm against a blank (reagents added to methanol instead of the sample). A calibration curve was prepared by plotting the absorbance as a function of concentration and the linear equation ($y =$

0.0121x-0.032, $R^2 = 0.9967$) was found. The total phenol concentration in the sample was determined from the calibration curve. The total phenol content in the extract was expressed in terms of gallic acid equivalent per gram of extract (mg EAG.g^{-1}).

2.4.2 Dosing of Flavonoids

The colorimetric technique with aluminum chloride described by Woisky and Salatino [23] was used to estimate flavonoids, with some modifications. Different concentrations of quercetin were dissolved in methanol to be used as standard. Into each tube was added 0.05 mL of the aluminum chloride reagent (2 g aluminum chloride diluted in 2% ethanol) and mixed to 0.05 mL of the extracts in triplicate. The mixture was kept at room temperature for 60 minutes. The absorbance of the samples was read at 420 nm against a blank. The calibration curve was prepared by plotting the absorbance as a function of concentration and the linear equation ($y = 0.0284x + 0.037$, $R^2 = 0.9918$) was found. The concentration of flavonoids was determined from the calibration curve. The total flavonoid content in the extract was expressed as quercetin equivalent per gram of extract (mg EQ.g^{-1}).

2.5 Antioxidant Activities

2.5.1 Scavenging free radicals by DPPH•

In this assay the extractive free radical scavenging activity was measured in terms of hydrogen donation using the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) [24]. 0.25 mL of the DPPH • solution (1 mM) was mixed in 0.04 mL of different extracts concentrations (31.25, 62.5, 125, 500 and 1000 $\mu\text{g/mL}$). After 25 minutes the absorbance at 517 nm was measured. Trolox (analogue of water-soluble vitamin E), Gallic Acid and BHT (butylated

hydroxytoluene) were used as the reference compound and the control was DPPH added to 0.04 mL of methanol (solvent used to dilute the samples). Elimination of DPPH radicals was calculated by the formula: $SRL [DPPH \cdot] (\%) = [(As-Ac)/Ac] \times 100$. Where: As = Absorbance of the sample and Ac = Absorbance of the control.

2.5.2 Inhibition by the radical ABTS \cdot^+

The method of ABTS \cdot^+ (2,2'-azino-bis- (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) was made based on Re et al. [25] with some modifications. A stock solution of the ABTS \cdot^+ radical was prepared by dissolving 7 mM ABTS \cdot^+ with 2.45 mM potassium persulfate, and left for 16 hours prior to use. The working solution was prepared by diluting the stock solution in ethanol to obtain the absorbance of 0.700 ± 0.02 at 734 nm. 0.01 mL of extracts at the concentration of 1 mg/mL was added to 1 mL of working solution and read exactly after 6 minutes of the spectrophotometer reaction at 734 nm. Trolox was used in different concentrations (0 - 2000 μ M) to compare the activity and to obtain the calibration curve. The results were expressed in Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC), where Trolox's calibration curve equation ($Y = -0.0003x - 0.6367$, $R^2 = 0.9886$) and percent inhibition were obtained was calculated by the equation $Inhibition\ of\ ABTS\ \cdot^+ (\%) = [(Ac-As)/Ac] \times 100$. Where: Ac = Absorbance of the control and As = Absorbance of the sample.

2.5.3 Total Antioxidant Activity (TAA)

The extracts were diluted to 1 mg/mL concentration in methanol. 0.1 mL of each sample was mixed with 1 mL of the phosphomolybdenum solution (600 mM sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate and 4 mM ammonium molybdate), and then incubated in water at 95 °C for 90 minutes. After returning to room temperature, the absorbances of the samples were

measured at 695 nm against a blank (1 mL of solution and 0.1 mL of methanol) (PRIETO, et al., 1999). The TAA was expressed in relation to ascorbic acid, calculated by the formula $TAA (\%) = [(As - Ac)/(Aaa - Ac)] \times 100$, where: Ac = Absorbance of the control, As = Absorbance of the sample and Aaa = Absorbance of ascorbic acid. The total antioxidant activity was compared with BHT and Gallic Acid.

2.5.4 Reduction of Ferric Ion (FRAP)

The FRAP assay was done according to Benzie et al. [26] with some modifications. The stock solution was prepared with 300 mM acetate buffer (3.1 g CH₃COONa and 16 mL CH₃COOH) at pH 3.6, 10 mM TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) solubilized in 40 mM HCl, and 20 mM FeCl₃ solution. The working solution was prepared by mixing 25 mL of the acetate buffer, 2.5 mL of TPTZ and 2.5 mL of FeCl₃. 0.07 ml of the 1 mg/ml extracts were mixed with 0.2 ml of the FRAP reagent and allowed to stand for 30 minutes at 37 °C in the dark. Subsequently the samples were read at 593 nm. A standard curve was made with FeSO₄ (0 – 1000 µg/mL) ($Y = 0.0003x - 0.0694$, $R^2 = 0.9916$). The results are expressed in mg Fe(II)/g extract and compared with the Gallic acid in the same conditions of the samples.

2.6 Analysis of High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

The extracts that presented the best antioxidant activities were submitted to analysis of HPLC in order to identify the major compounds of each extract. Samples from different extraction methods (EM, ESA, UAE, ASE and SFE) were dissolved in methanol and acetonitrile (MeOH: ACN 75:25) and sonicated for 15 minutes until complete solubilisation, resulting in a final concentration of 5 mg/ml. Afterwards the samples were treated with PSE cartridges (phase-solid extraction) to remove compounds that can interact permanently with

the stationary phase, then 10 μ L were injected into the CLAE (Agilent 1260 infinity with quaternary pump, automatic injector, column furnace and DAD detector) equilibrated with the mobile phase (Milliq) CH₃COOH 1% (A) and acetonitrile (Lichrosolv [®]) (B), following a linear gradient from 95% (A) to 5% (A) (0 to 30 minutes) with a flow rate of 2.4 mL/min and a temperature of 30 °C. The separation occurred on a Zorbax [®], SB-C18 5 μ m column; 4.6x250mm with Zorbax pré pre-column, SB-C18 5 μ m; 4.6x12.5 mm with complete detection of 190 to 400 nm and acquisition of the working chromatogram at 254 nm.

2.7 Liquid Chromatography - FLASH

After grinding of the leaves of *P. moniliformis*, extracts from various extraction methods were obtained for the purpose of comparing the best method to extract active compounds. The extract that reached this criterion was then sent to the fractionation in Biotage Isolera One™ (Flash Chromatography). Separation occurred on the Biotage[®] SNAP KP-SIL C18 33g Column with a mobile phase gradient of 5%-20% MeOH (3CV), 20%-30% MeOH (1CV), 30%-30% MeOH (1.5CV) 40%-50% MeOH (1CV), 50-50% MeOH (1.5CV), 50%-100% MeOH (3CV), 40%-40% MeOH , 100%-100% MeOH (3CV) with constant flow 50 mL/min and scanning detection of 200-800 nm. After this process 45 fractions were obtained with 18 mL in 16x150mm rack type flasks.

Fractions were grouped, as suggested by the software itself when abrupt changes in the UV absorption spectrum were observed, as follows: F1-F4, F5-F9, F10-F13, F14-F17 and F18-F45 followed for *in vitro* testing.

2.8 Statistical Analyzes

Each experiment was performed in triplicate and the results presented in mean \pm SD. Statistical analyzes and the IC₅₀ were calculated by GraphPad Prism 5.0.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Effect of extraction technique and solvent on the yield of extracts obtained from leaves of *P. moniliformis*

The extraction methods were first compared in terms of extraction yields, and in particular, the main influence of the parameters. The best operating conditions in terms of obtaining overall yield, type of solvent, polarity, temperature and extraction time were defined for each of the five extraction processes. In a second part, the chemical composition and the antioxidant activity of the extracts were compared.

The percentage yields of extracts obtained from *P. moniliformis* using three different solvents (cyclohexane, ethyl acetate and methanol) and five extraction techniques (EM, ESA, UAE, ASE and SFE) are shown in Table 1. The studies showed that the most efficient extraction method with respect to yield, extraction time and temperature was the ASE. Comparison of the five extraction techniques showed that ASE was generally more effective than extracts prepared on ultrasound and soxhlet for the cyclohexane and methanol solvents. However, ESA had a better yield for extracting with ethyl acetate.

SFE extraction was less efficient than the other extraction techniques tested. However, higher yields were obtained using methanol as co-solvent. It has been suggested that the extraction with scCO₂ using polar solvents as a co-solvent generally results in higher extraction yields of bioactive compounds [27]. This can be explained by differences in the polarity of the target compounds and their solubility in scCO₂. The addition of polar co-solvents may increase the solubility of a less soluble solute in the solvent used, which in turn may improve the extraction efficiency [28].

3.2 Content of Total Phenols and Flavonoids

The results of the present study showed that methanolic extracts presented higher content of total phenols (CTF) and flavonoids (CF) than the extracts of cyclohexane and ethyl acetate in all techniques performed. Significant differences ($p < 0.05$) were observed depending on the solvents and extraction techniques used for the CTF and CF contents. According to Table 2, EM showed higher content of phenolic compounds (119.70 mg EAG.g⁻¹) for the methanolic extract, followed by extracts UAE (117.82 mg EAG.g⁻¹), SFE (113.0 mg EAG.g⁻¹), ASE (99.15 mg EAG.g⁻¹) and ESA (88.40 mg EAG.g⁻¹). Previous studies performed by Silva [29] also found a higher total phenol content in methanolic extracts of *P. moniliformis* compared to extracts obtained by less polar solvents, thus corroborating our results. In addition, work done with different plant species has reported an increase in CFT in extracts obtained with methanol, for example, Hossain et al. [30], who studied organic extracts of leaves of the medicinal plant *Tetragium* sp., Obtained for the methanolic extract 386.22 mg EAG.g⁻¹. Vieira et al. [31] also obtained higher CFT values for the methanolic extraction of leaves and bark (194 and 193 mg EAG.g⁻¹, respectively) from the stem of *Myracrodruon urundeuva*.

The CF of *P. moniliformis* leaves ranged from 7.48 to 5.18 mg EQ.g⁻¹. Unlike CFT, the higher CF content was observed when ASE was used, but the methanolic extracts also had a higher flavonoid content. This is due to the fact that polyphenols are not found in the free state in nature but in the form of esters or heterosides making them more soluble in polar solvents such as methanol than in less polar solvents such as cyclohexane and ethyl acetate [32-34].

3.3 Antioxidant Activity

3.3.1 Scavenging free radicals by 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH•)

The DPPH radical scavenging activities of *P. moniliformis* leaf extracts obtained by different extraction methods and solvents are shown in Table 3. Significant differences ($p < 0.05$) were observed between extracts obtained through different extraction methods and solvents. The methanolic extracts obtained better activity in relation to cyclohexanic and ethyl acetate extracts and their maximum inhibitory concentrations (IC₅₀) were classified in the following order: ESA-MeOH (34.70 µg/mL), ASE-MeOH (37.67 µg/mL), UAE -MeOH (39.70 µg/mL), EM-MeOH (43.98 µg/mL) and SFE-MeOH (68.87 µg/mL). No significant difference was observed between the ESA-MeOH, ASE-MeOH and UAE-MeOH methods. Gallic acid, BHT and Trolox, with IC₅₀ values of 0.0011, 26.24 and 50.01 µg/mL, respectively, were used as positive control.

As shown in Figure 1, a better inhibition percentage was observed for the SFE-MeOH extraction technique (97.26%) at the concentration of 1000 µg/mL. The % inhibition values for the ESA-MeOH, ASE-MeOH, EM-MeOH and UAE-MeOH techniques were 96.30%, 96.06%, 95.55%, 95.28%, respectively. The results showed that the methods and the type of solvent used influenced the antioxidant activity, but there was no significant difference of the antioxidant activity by the DPPH method when compared to methanol extraction methods. In addition, the total content of antioxidant components (phenolic compounds and flavonoids) are positively correlated with the values of DPPH elimination activity for extracts obtained with methanol.

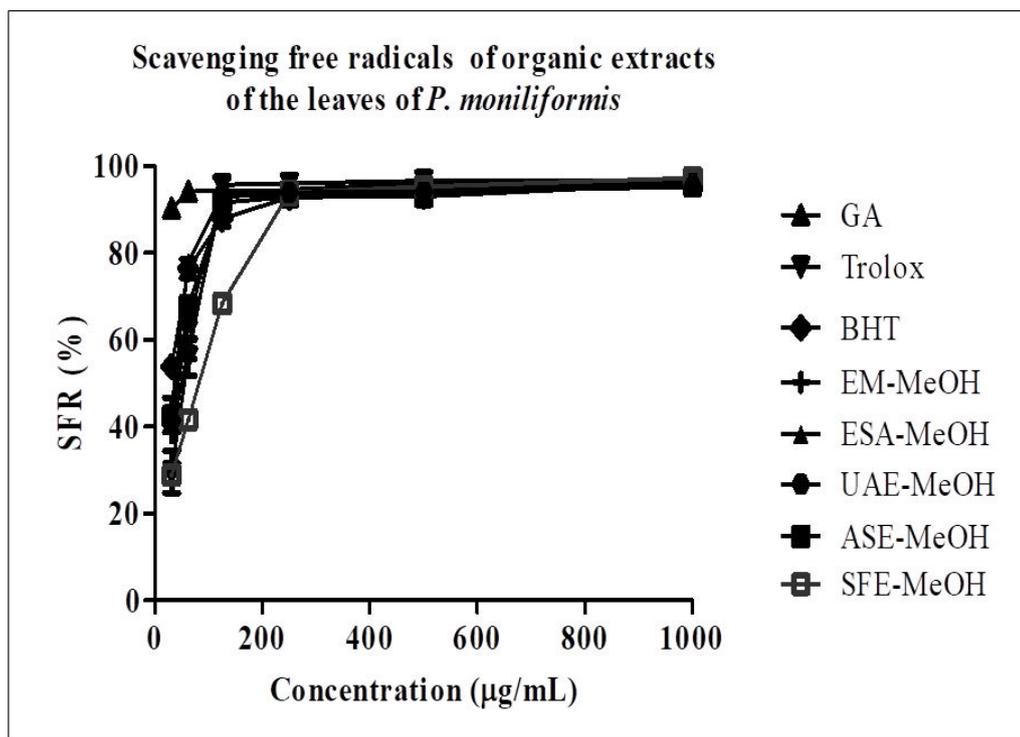


Figure 1. Antioxidant activity assay by the DPPH free radical sequestration method of the methanolic extracts obtained through different methods of the leaves of *P. moniliformis*. GA: Gallic acid; BHT: Butylated hydroxytoluene; EM-MeOH: Methanolic extract by maceration; ESA-MeOH: Methanolic extract in soxhlet apparatus; UAE-MeOH: Ultrasonic assisted methanolic extract; ASE-MeOH: Methanolic extract in solvent-accelerated extractor; SFE-MeOH: Methanolic Extract in Supercritical Fluid.

This antioxidant activity of phenolic compounds is due to its ability to eliminate free radicals, to donate hydrogen atoms or electrons. The structure of phenolic compounds is a key determinant of their radical elimination and their metal chelating activity. The position and number of the hydroxyl group of phenolic compounds and flavonoids determine the ability of molecules to donate an electron and stabilize free radicals [35-36]. Likewise, the antioxidant activity of phenolic compounds has been related mainly by their redox properties that allow them to act as reducing agents, hydrogen donors and oxygen neutralizers [37]. Consequently, the total phenol content in the methanolic extracts of *P. moniliformis* were possibly the main components that contribute most to its antioxidant activity.

3.3.2 Inhibition by the radical ABTS •⁺

The ABTS assay is similar to the DPPH method, where both work with the reduction of the radicals present, but the ABTS radical is formed at the beginning of the analysis, unlike the DPPH that is already acquired in its radical form. The main difference between the two radicals is that the DPPH radical is soluble in organic solvents, whereas ABTS is soluble in both water and organic solvents, allowing the analysis of both hydrophilic and lipophilic samples [38-40].

As shown in Table 3, extracts of *P. moniliformis* had significant effects on ABTS radical removal capacity, exhibiting IC₅₀ values ranging from 258.2 to 447.3 µg/mL, values that were close enough to the Trolox standard (synthetic antioxidant, analogous to vitamin E) already known in the literature for presenting relevant antioxidant activity. Once again the methanolic extracts exhibited the best activity (Figure 2), the best percentage of inhibition was observed for the ASE-MeOH extraction technique (96.61%) at the concentration of 1000 µg/mL. The % inhibition values for the SFE-MeOH, ESA-MeOH, EM-MeOH and UAE-MeOH techniques were 94.07%, 87.96%, 87.68%, 78.61%, respectively.

Thus, these data show a high antioxidant activity of extracts of *P. moniliformis*, evidencing that the compounds with greater activities are extracted with the methanol as solvent and by the ASE and SFE methods.

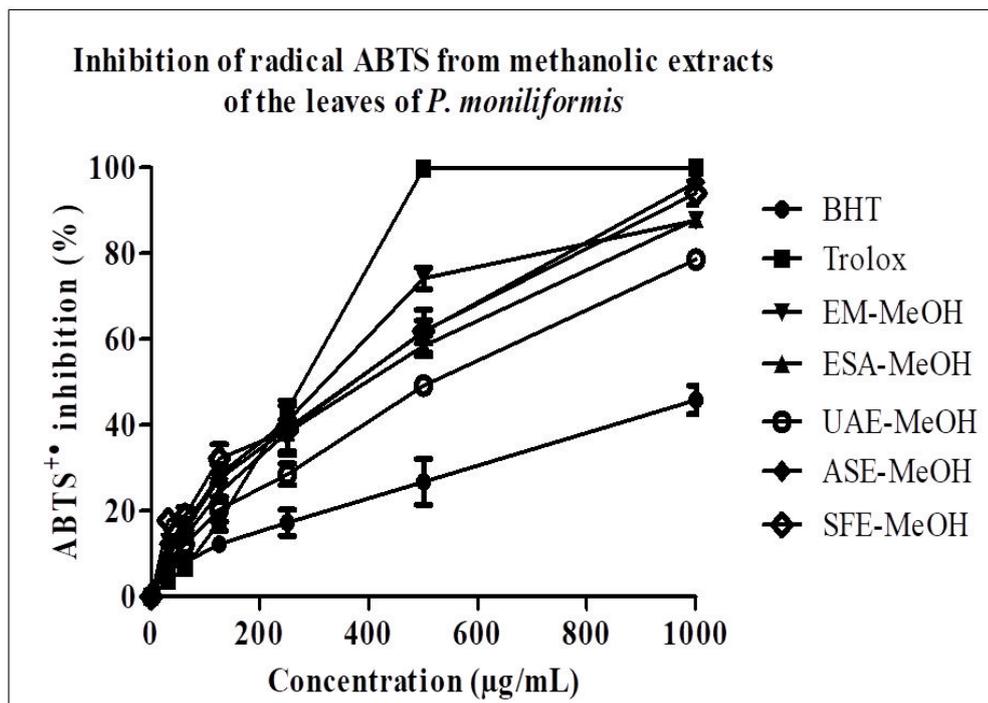


Figure 2. Antioxidant activity test by the ABTS radical inhibition method of the methanolic extracts obtained through different methods of the leaves of *P. moniliformis*. GA: Gallic acid; BHT: Butylated hydroxytoluene; EM-MeOH: Methanolic extract by maceration; ESA-MeOH: Methanolic extract in soxhlet apparatus; UAE-MeOH: Ultrasonic assisted methanolic extract; ASE-MeOH: Methanolic extract in solvent-accelerated extractor; SFE-MeOH: Methanolic Extract in Supercritical Fluid.

3.3.3 Total Antioxidant Activity (TAA) and Ferric Ion Reduction (FRAP)

The TAA was measured by the phosphomolybdenum method which is based on the reduction of Mo (VI) to Mo (V) by the antioxidant compound tested and the formation of a green phosphate / Mo (V) complex, which is formed under conditions of acidic pH and can be monitored at 695 nm with a spectrophotometer [41]. Increased absorbency indicates increased total antioxidant capacity. Thus, the more reductive the agent is tested, the greater the absorbance of the sample and the more evident is the green coloration of the complex formed. All the extracts exhibited significant activities (Tabela 3). The TAA was higher in the methanolic extracts, except for the ASE extraction that obtained better results with the ethyl acetate solvent ($54.51\% \pm 1.72\%$), the UAE-MeOH presented better activity with $60.47\% \pm 0.93\%$ in relation to Ascorbic acid activity ($p < 0.001$) followed by EM-MeOH ($53.53\% \pm 2.29\%$), SFE-MeOH ($44.60\% \pm 1.35\%$) and ESA-MeOH ($38.27\% \pm 1.05\%$). The values for

the FRAP test are also presented in Table 3. The methanol extracts exhibited again the best activities, and the UAE-MeOH presented the highest value with $38.63\% \pm 1.29\%$ mg Fe(II)/g extract, followed by ESA-MeOH ($38.28\% \pm 0.70\%$), EM-MeOH ($38.16\% \pm 0.47\%$), SFE-MeOH ($37.81\% \pm 0.77\%$) and ASE-MeOH ($25.60\% \pm 0.36\%$). The Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) method is based on the reduction of the ferric-tripyridyltriazine (FeIII-TPZ) complex in ferrous complex (FeII-TPZ), in the presence of an antioxidant and under acidic conditions. The complex formed by this reaction has an intense blue color, with maximum absorption at 593 nm [26]. In this way, chelating agents, which have the ability to bind metal ions, can be added to increase the activity of natural preservatives such as in foodstuffs [42]. Consequently, the high iron (ferrous ion) chelating activity of extracts of *P. moniliformis* was quite remarkable.

3.4 Analysis High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

The extracts obtained with methanol through the five methods presented the best antioxidant activities and were submitted by HPLC analysis and by means of a DAD detector it was possible to define as majorities the compounds with larger area and with greater ultraviolet (UV) absorption by means of a scanning at 190 to 400 nm. On the occasion, the compounds with maximum UV absorption of λ_{\max} 254 were defined as major. Analysis by CLAE showed the presence of approximately 26 compounds in the extracts EM-MeOH and ESA-MeOH, 23 compounds in ASE-MeOH, 32 in the SFE-MeOH and 20 in the UAE-MeOH integrated as peaks in HPLC. All extracts showed the compound with Retention time (Rt) of 1.73 as a major (Figure 3), followed by the compound with Rt of 4.52 and 7.90, in which have not yet been identified.

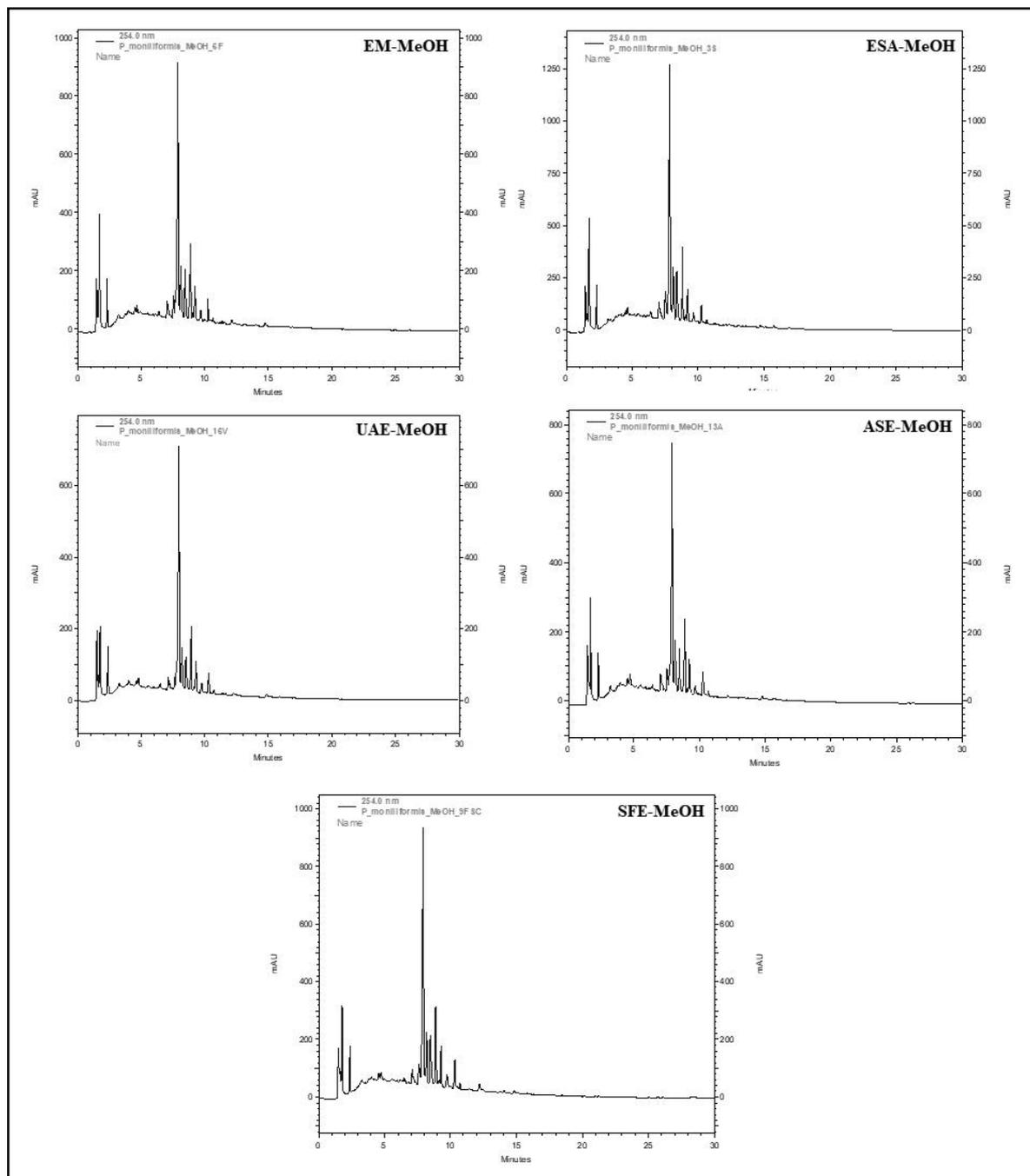


Figure 3. Chromatograms with 190 nm to 400 nm scanning of the EM-MeOH, ESA-MeOH, ASE-MeOH, SFE-MeOH and UAE-MeOH extracts showing the major compounds visualized by UV. EM-MeOH: Methanolic extract by maceration; ESA-MeOH: Methanolic extract in soxhlet apparatus; UAE-MeOH: Ultrasonic assisted methanolic extract; ASE-MeOH: Methanolic extract in solvent-accelerated extractor; SFE-MeOH: Methanolic Extract in Supercritical Fluid.

Recent phytochemical studies of extracts with different solvents of *P. moniliformis* have demonstrated the presence of some compounds such as α -tocopherol and α -tocotrienol, as well as quercetagenin-3'-methoxy-7-O-glucoside, isorhamnetin-7-O-glucosyl (1 \rightarrow 6) rhamnoside and syringetin 3-O- α -rhamnoside-7-O- β -glucoside [29]. However, the R_t values

did not coincide with the values of the compared standards, and more detailed studies about this analysis were necessary. Despite this, we could observe that the ESA-MeOH presented the highest content of the major compounds seen in the chromatogram. However, because ASE-MeOH showed better antioxidant activity in most of the techniques tested, we proceeded with this extract for fractionation in flash chromatography.

3.5 Liquid Chromatography - FLASH

The fractionation generated 45 fractions, which were grouped according to the UV absorption profile in the software as follows: F1-F4, F5-F9, F10-F13, F14-F17 and F18-F45 in yields of 42.82% , 4.08%, 4.28%, 10.38% and 45.8%, respectively. F10-F13 and F14-F17 were characterized as the most active (Figure 4).

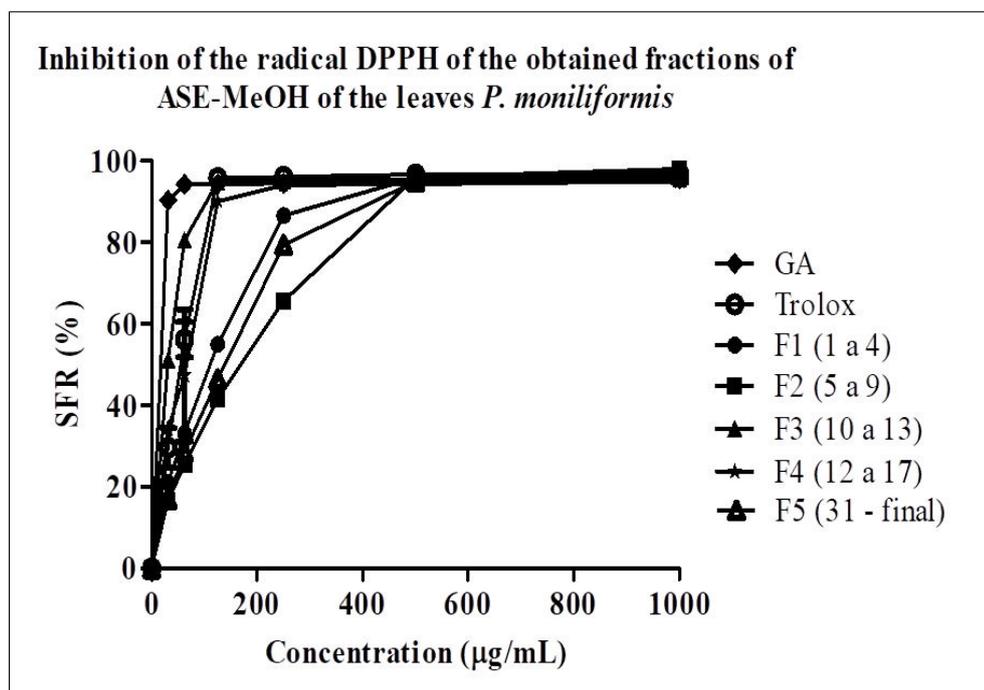


Figure 4. Antioxidant activity assay by the DPPH radical inhibition method of the fractions obtained from ASE-MeOH of *P. moniliformis* leaves. GA: Gallic acid.

Table 4 shows the IC_{50} values of the antioxidant activity by the DPPH method of fractions obtained by flash chromatography of the ASE-MeOH extract. We observed that

there was a potentiation of free radical sequestration by the fractions, demonstrating that the most active compounds are in the F10-13 fraction, followed by the F14-F17, F1-F4, F18-F45 and F5-F9 fractions. The F10-13 fraction (30.20 $\mu\text{g/mL}$) was more active than the Trolox standard (50.01 $\mu\text{g/mL}$), evidencing the high antioxidant power of *P. moniliformis* and confirming the studies done by Da Silva et al. [5] and Silva et al. [6] who also found a relevant antioxidant activity for extracts and fractions of *P. moniliformis*.

A study evaluating the chemical composition of a species of the Fabaceae family has demonstrated the presence of several chemical constituents that are known for their antioxidant properties such as kaempferol, rutin, gallic acid and methyl gallate [43]. Therefore, further studies are needed to isolate and identify the possible compounds responsible for the antioxidant activity of *P. moniliformis*.

4 CONCLUSION

Extraction of organic extracts and *P. moniliformis* was studied using EM, ESA, ASE, SFE and UAE methods. The best results were obtained for the ASE that showed a positive correlation between yield, extraction time and amount of solvent used. Regarding the solvents used, the extracts obtained with methanol presented better antioxidant activity for all methods. In addition, it was shown that there was a significant correlation between phenolic content and antioxidant activities indicating that phenolic compounds could be the main contributors to these activities. Although solvent extractions by ESA have provided good results, their use as an industrial process is questionable, mainly because of the hazards they generate, either because of their toxicity or because of their flammability. Analyzes of HPLC showed the existence of several compounds in the extracts obtained with methanol, and it is not possible to identify the major components. The obtained methanolic fractions also present significant antioxidant activity, presenting values superior to Trolox. Additional tests will be required for

the isolation and identification of the major compounds of the extracts and fractions that presented potential antioxidant activity.

FUNDING

The authors thank the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE; IBPG-0630-2.08/14), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for support.

CONFLICT OF INTEREST: The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

1. Melo, J. G.; De Sousa Araújo, T. A.; Thijan, N. A. C.V, Lyra, de V. C. D; Do Desterro, R. M.; Carneiro do N. S., ... De Albuquerque, U. P. (2010). Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid northeastern Brazil. *Molecules*, *15*(12), 8534–8542. doi:10.3390/molecules15128534
2. Costa, M., Silva, A., Silva, A., Lima, V., Bezerra-Silva, P., Rocha, S., ... Paiva, P. (2017). Essential Oils from Leaves of Medicinal Plants of Brazilian Flora: Chemical Composition and Activity against Candida Species. *Medicines*, *4*(2), 27. doi:10.3390/medicines4020027
3. Malafaia, C. B., Jardelino, A. C. S., Silva, A. G., de Souza, E. B., Macedo, A. J., Correia, M. T. dos S., & Silva, M. V. (2018). Effects of Caatinga Plant Extracts in Planktonic Growth

and Biofilm Formation in *Ralstonia solanacearum*. *Microbial Ecology*, 75(3), 555–561. doi:10.1007/s00248-017-1073-0

4. Vieira, P. De B.; Feijó Silva, N.L.; Silva, D. B.; Lopes, N. P.; Da Silva, A. G.; Da Silva, M., ... Tasca, T. (2017). The Caatinga endemic *Manilkara rufula* possesses remarkable activity against *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Experimental Parasitology*, 173(2017), 18–28. doi:10.1016/j.exppara.2016.12.006

5. Da Silva, L. C. N., Da Silva, C. A., De Souza, R. M., José Macedo, A., Da Silva, M. V., & Dos Santos Correia, M. T. (2011). Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. *Food and Chemical Toxicology*, 49(9), 2222–2228. doi:10.1016/j.fct.2011.06.019

6. Silva, L. C. N.; Miranda, R. C. M.; Gomes, E. B.; Macedo, A. G.; Araújo, J. M.; Figueiredo, R. C., ... Correia, M. T. S. (2013). Evaluation of combinatory effects of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(32), 2358–2364. doi:10.5897/JMPR2013.25971.

7. Trentin, D. S., Silva, D. B., Frasson, A. P., Rzhepishevskaya, O., Da Silva, M. V., De Pulcini, E. L., ... Macedo, A. J. (2015). Natural Green Coating Inhibits Adhesion of Clinically Important Bacteria. *Scientific Reports*, 5(v), 1–10. doi:10.1038/srep08287

8. Gautam, M. K., Goel, S., Ghatule, R. R., Singh, A., Nath, G., & Goel, R. K. (2013). Curative effect of Terminalia chebula extract on acetic acid-induced experimental colitis: Role of antioxidants, free radicals and acute inflammatory marker. *Inflammopharmacology*, 21(5), 377–383. doi:10.1007/s10787-012-0147-3
9. Csiszar, A., Podlutzky, A., Podlutskaya, N., Sonntag, W. E., Merlin, S. Z., Philipp, E. E. R., ... Ungvari, Z. (2012). Testing the oxidative stress hypothesis of aging in primate fibroblasts: Is there a correlation between species longevity and cellular ROS production? *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 67 A(8), 841–852. doi:10.1093/gerona/glr216
10. Jaganjac, M., Čačev, T., Čipak, A., Kapitanović, S., Gall Trošelj, K., & Zarković, N. (2012). Even stressed cells are individuals: second messengers of free radicals in pathophysiology of cancer. *Croatian Medical Journal*, 53(4), 304–309. doi:10.3325/cmj.2012.53.304
11. Philpott, M., Lim, C. C., & Ferguson, L. R. (2009). Dietary protection against free radicals: A case for multiple testing to establish structure-activity relationships for antioxidant potential of anthocyanic plant species. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(3), 1081–1103. doi:10.3390/ijms10031081
12. Fennema, O.R. (1993). *Química de los alimentos*. 2.ed. Zaragoza: Acribia.
13. Antunes, A. J.; Canhos, V. (1984) *Aditivos em Alimentos*. Campinas: Editora da UNICAMP.

14. Simão, A.M. (1985). Aditivos para alimentos sob o aspecto toxicológico. São Paulo: Nobel.
15. Brenna, O. V., & Pagliarini, E. (2001). Multivariate analysis of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4841–4844. doi:10.1021/jf0104376
16. Zheng, W.; Wang, S.Y. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agric. Food Chemistry*, 105(3), 940–949. doi:10.1016/j.foodchem.2007.04.038
17. Proestos, C., & Komaitis, M. (2008). Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds. *LWT - Food Science and Technology*, 41(4), 652–659. doi:10.1016/j.lwt.2007.04.013
18. Ghasemzadeh, A., Jaafar, H. Z. E., Karimi, E., & Rahmat, A. (2014). Optimization of ultrasound-assisted extraction of flavonoid compounds and their pharmaceutical activity from curry leaf (*Murraya koenigii* L.) using response surface methodology. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(1). doi:10.1186/1472-6882-14-318
19. Madhava Naidu, M., Sulochanamma, G., Sampathu, S. R., & Srinivas, P. (2008). Studies on extraction and antioxidant potential of green coffee. *Food Chemistry*, 107(1), 377–384. doi:10.1016/j.foodchem.2007.08.056

20. Ghasemzadeh, A., & Jaafar, H. Z. E. (2014). Optimization of Reflux Conditions for Total Flavonoid and Total Phenolic Extraction and Enhanced Antioxidant Capacity in Pandan (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) Using Response Surface Methodology. *Scientific World Journal*, 2014. doi:10.1155/2014/523120
21. Bicchi, C., Binello, A., & Rubiolo, P. (2000). Determination of phenolic diterpene antioxidants in Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) with different methods of extraction and analysis. *Phytochemical Analysis*, 11(4), 236–242. doi:10.1002/1099-1565(200007/08)11:4<236::AID-PCA503>3.0.CO;2-B
22. Li, H. Bin, Wong, C. C., Cheng, K. W., & Chen, F. (2008). Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT - Food Science and Technology*, 41(3), 385–390. doi:10.1016/j.lwt.2007.03.011
23. Woisky, R. G., & Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: Some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research*, 37(2), 99–105. doi:10.1080/00218839.1998.11100961
24. Blois, M.S. (1958). Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical, *Nature*, 181, 1199-1200.
25. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A; Pannala, A.; Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(98), 1231–1237. doi:10.1016/S0891-5849(98)00315-3

26. Benzie, I.F.F., Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (Frap) as a measure of antioxidant power: the frap assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-6. doi:10.2307/3280933
27. Monroy, Y. M., Rodrigues, R. A. F., Sartoratto, A., & Cabral, F. A. (2016). Influence of ethanol, water, and their mixtures as co-solvents of the supercritical carbon dioxide in the extraction of phenolics from purple corn cob (*Zea mays* L.). *Journal of Supercritical Fluids*, 118, 11–18. doi:10.1016/j.supflu.2016.07.019
28. Radzali, S. A., Baharin, B. S., Othman, R., Markom, M., & Rahman, R. A. (2014). Co-solvent Selection for Supercritical Fluid Extraction of Astaxanthin and Other Carotenoids from *Penaeus monodon* Waste. *Journal of Oleo Science*, 63(8), 769–777. doi:10.5650/jos.ess13184
29. Silva, M. F. S. (2013). Estudo Químico e Avaliação da Atividade Antibacteriana de *Pityrocarpa moniliformis* (BENTH) LUCKON & R. W. JOBSON (Fabaceae), Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Semiárido da Universidade Federal do Vale do São Francisco, Mestrado em Recursos Naturais Do Semiárido, Petrolina-Pe. 147p.
30. Hossain, M. A., Shah, M. D., Gnanaraj, C., & Iqbal, M. (2011). In vitro total phenolics, flavonoids contents and antioxidant activity of essential oil, various organic extracts from the leaves of tropical medicinal plant *Tetragium* from Sabah. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4(9), 717–721. doi:10.1016/S1995-7645(11)60180-6

31. Vieira, L. M., Castro, C. F. S., Dias, A. L. B., & Silva, A. R. (2015). Fenóis totais, atividade antioxidante e inibição da enzima tirosinase de extratos de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (Anacardiaceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 17(4), 521–527. doi:10.1590/1983-084X/13_033
32. Siddhuraju, P.; Becker, K. (2003). Antioxidant Properties of Various Solvent Extracts of Total Phenolic Constituents from Three Different Agroclimatic Origins of Drumstick Tree (*Moringa oleifera* Lam .) Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(8), 2144-2155. doi:10.1021/jf020444+
33. Karimi, E., Mehrabanjoubani, P., Keshavarzian, M., Oskoueian, E., Jaafar, H. Z., & Abdolzadeh, A. (2014). Identification and quantification of phenolic and flavonoid components in straw and seed husk of some rice varieties (*Oryza sativa* L.) and their antioxidant properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(11), 2324–2330. doi:10.1002/jsfa.6567
34. Burque, R. K.; Francesconi, L. P.; Victorino, A. T.; Mascarenhas, M. Á. & Ceresér, K. M. (2015). DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Lafoesia pacari* (LYTHRACEAE). *Revista Eletrônica de Farmácia*, 12(1), 1. doi:10.5216/ref.v12i1.24645
35. Ayala-Zavala, J. F., Silva-Espinoza, B. A., Cruz-Valenzuela, M. R., Villegas-Ochoa, M. A., Esqueda, M., González-Aguilar, G. A., & Calderón-López, Y. (2012). Antioxidant and antifungal potential of methanol extracts of *Phellinus* spp. from Sonora, Mexico. *Revista Iberoamericana de Micologia*, 29(3), 132–138. doi:10.1016/j.riam.2011.09.004

36. Aliboudhar, H., & Tigrine-Kordjani, N. (2014). Effect of extraction technique on the content and antioxidant activity of crude extract of *Anacyclus clavatus* flowers and their essential oil composition. *Natural Product Research*, 28(23), 2140–2149. doi:10.1080/14786419.2014.927872
37. Rice-evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M., & Pridham, J. B. (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, 22(4), 375–383. doi:10.3109/10715769509145649
38. Rufino, M.S.M; Alves, R.E.; Brito, E.S.; Morais, S.M.; Sampaio, C.G.; Jimenez, J.P. & Calixto, F.D.S. (2007). Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH, *Comunicado Técnico Embrapa*, 127, 1-4.
39. Di, T., Chen, G., Sun, Y., Ou, S., Zeng, X., & Ye, H. (2017). Antioxidant and immunostimulating activities in vitro of sulfated polysaccharides isolated from *Gracilaria rubra*. *Journal of Functional Foods*, 28, 64–75. doi:10.1016/j.jff.2016.11.005
40. Wang, X., Zhang, Y., Liu, Z., Zhao, M., & Liu, P. (2017). Purification, characterization, and antioxidant activity of polysaccharides isolated from cortex *periplocae*. *Molecules*, 22(11), 9–13. doi:10.3390/molecules22111866
41. Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a *Analytical Biochemistry*, 269, 337–341. doi:10.1037/a0037168

42. Erdogan-Orhan, I., Sever-Yilmaz, B., Altun, M. L., & Saltan, G. (2010). Radical Quenching Activity, Ferric-Reducing Antioxidant Power, and Ferrous Ion-Chelating Capacity of 16 *Ballota* Species and Their Total Phenol and Flavonoid Contents. *Journal of Medicinal Food*, 13(6), 1537–1543. doi:10.1089/jmf.2009.0237
43. Moura, A. C. S.; Vilegas, W. & Santos, L. C. (2011). Identificação de Alguns Constituintes Químicos de *Indigofera hirsuta* Linn. (Fabaceae) por Clae-Ies-Em (Tof) e Avaliação da Atividade Antirradicalar. *Quim. Nova*, 34(7), 1136-1140.

Table 1. Extraction yields of the extracts obtained by different techniques and solvents of the leaves of *P. moniliformis*.

Extraction yield (%)			
Extraction methods	Cyclohexane	Ethyl acetate	Methanol
EM	3.83±0.77	1.31±0.57	30.74±1.07
ESA	2.61±0.57	4.20±0.90	20.50±2.30
UAE	1.26±0.51	1.47±0.52	20.05±1.06
ASE	4.18±0.86	2.13±0.25	36.84±0.55
SFE	0.68±0.50	0.48±0.23	6.05±0.73

EM= Extraction by Maceration; ESA = Extraction in Soxhlet Apparatus; UAE = Ultrasound Assisted Extraction; ASE = Accelerated Solvent Extraction; SFE = Extraction in Supercritical Fluid.

Table 2. Total Phenols and Flavonoids contents of the leaves of *P. moniliformis* extracts obtained by different extraction techniques and solvents.

Extraction	Total Phenols Content ^a			Flavonoid content ^b		
	HEX	EtOAc	MEOH	HEX	EtOAc	MEOH
EM	31.18±0.76	37.08±1.32	119.70±1.48	1.20±0.77	3.63±1.84	6.21±0.09
ESA	12.53±0.23	47.88±2.94	88.40±2.53	0.55±0.02	1.15±0.50	5.50±0.00
UAE	40.80±2.04	43.44±1.34	117.82±1.05	1.66±0.94	4.23±0.89	5.18±0.43
ASE	18.51±0.50	52.87±0.67	99.15±2.91	1.15±0.29	0.69±0.54	7.48±0.86
SFE	32.96±0.05	27.82±0.48	113.00±0.97	0.50±0.40	2.05±0.46	6.51±0.78

^aDosage of total phenols expressed as gallic acid equivalents/g extract (mg EAG.g⁻¹). ^bDosing of flavonoids expressed in mg equivalents of quercetin/g extract (mg EQ.g⁻¹). EM: extraction by maceracion; ESA: extraction in soxhlet apparatus; UAE: ultrasonic assisted extraction; ASE: solvent-accelerated extraction; SFE: extraction in supercritical fluid. HEX: Cyclohexane; EtOAc: Ethyl acetate; MeOH: Methanol. Values are expressed as mean ± standard deviation.

Table 3. Effect of different extraction/solvent techniques on the antioxidant activity of extracts of the leaves of *P. moniliformis* (1000 µg/mL) using four methods.^aThe results are expressed as mg Fe (II)/g extract. *The results are expressed as mean ± SD. ** Results are

Extracts	TAA (%)*	FRAP ^{a*}	DPPH (IC ₅₀ µg/mL)**	ABTS (IC ₅₀ µg/mL)**
ESA-HEX	24.19 ± 2.36	7.72 ± 0.96	374.2 330.8 - 423.2	277432 36229-2.124x10 ⁶
ESA-EtOAc	25.08 ± 0.41	17.20 ± 0.28	103.0 92.89 - 114.2	1071.0 963.6 - 1190
ESA-MeOH	38.27 ± 1.05	38,28 ± 0.70	34.70 32.57 - 36.96	325.6 289.8 - 365.8
EM-HEX	44.49 ± 3.82	17.65 ± 2.5	178.5 159.6 - 199.5	235888 62105 - 895946
EM-EtOAc	26.74 ± 0.71	8.90 ± 0.29	124.5 110.4 - 140.5	854.9 739.1 - 988.9
EM-MeOH	53.53 ± 2.29	38.16 ± 0.47	43.98 39.31 - 49.21	258.2 229.2 - 290.9
SFE-HEX	41.47 ± 0.66	9.94 ± 0.54	454.3 389.1 - 530.5	90128 30363 - 267527
SFE-EtOAc	33.73 ± 1.07	7.51 ± 1.24	425.8 363.2 - 499.3	46859.0 13947 - 157441
SFE-MeOH	44.60 ± 1.35	37.81 ± 0.77	68.87 62.47 - 75.93	266.6 213.6 - 332.7
ASE-HEX	30.66 ± 0.64	15.33 ± 1.78	111.6 99.29 - 125.4	5206 2587 - 10475
ASE-EtOAc	54.51 ± 1.72	21.94 ± 1.47	67.24 60.77 - 74.40	797.8 662.8 - 960.3
ASE-MeOH	44.32 ± 1.82	25.60 ± 0.36	37.67 33.94 - 41.80	285.2 239.0 - 340.5
UAE-HEX	10.98 ± 0.33	18.66 ± 0.10	200.1 186.5 - 214.6	58574 8753 - 391969
UAE-EtOAc	54.52 ± 2.66	11.47 ± 0.74	292.5 271.5 - 315.2	41234.0 17019 - 99900
UAE-MeOH	60.47 ± 0.93	38.63 ± 1.29	39.70 35.87 - 43.95	447.3 395.6 - 505.7
Gallic acid	1.62 ± 0.12	1849.20 ± 59.66	0.001166 1.364x10 ⁻⁵ - 0.09973	-
Ascorbic acid	100 ± 0.00	-	-	-
BHT	3.98 ± 0.02	30.28 ± 0.37	26,24 23.27 - 29.58	1366.0 1098.0 - 1700.0
Trolox	-	40.80 ± 0.12	50,01 45.62 - 54.82	250.8 228.9 - 274.7

expressed as mean ± confidence interval. EM: extraction by maceration; ESA: extraction in soxhlet apparatus; UAE: ultrasonic assisted extraction; ASE: solvent-accelerated extraction; SFE: extraction in supercritical fluid. HEX: Cyclohexane; EtOAc: Ethyl acetate; MeOH: Methanol.

Table 4. Antioxidant activity by the free radical sequestration method (DPPH) of the fractions obtained from ASE-MeOH of the leaves of *P. moniliformis*.

Fractions	Inhibition of the DPPH radical (IC₅₀ µg/mL)
F1-F4	88.47 (80.26-97.51)
F5-F9	138.9 (122.8-157.0)
F10-F13	30.20 (27.93-32.65)
F14-F17	52.85 (44.18-63.22)
F18-F45	116.0 (106.3-126.6)
Trolox	50.10 (45.62-54.82)

Results are expressed as mean ± confidence interval.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os ensaios de atividade antioxidante demonstraram o potencial dos extratos metanólicos obtidos por diferentes métodos de extração de *P. moniliformis*, sendo o extrato ASE-MeOH o que apresentou melhor resultado. A ação antioxidante das frações de ASE-MeOH também foi potencializada, aumentando sua capacidade de sequestro de radicais livres. As análises de CLAE possibilitou identificar, pelo tempo de retenção, os principais compostos majoritários dos extratos metanólicos.

Os extratos de *P. moniliformis* apresentaram moderada atividade antimicrobiana sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas, como também inibiu a formação de biofilme contra as cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus*. Ao analisar os resultados referentes à toxicidade aguda, foi demonstrado que os extratos hexânico, de acetato de etila e metanólico não apresentaram efeitos tóxicos visíveis, nem alterações morfológicas. No entanto, os extratos hexânico e de acetato de etila apresentaram alterações na análise histomofológica dos rins e o extrato metanólico mostrou-se com moderada hepatotoxicidade. Os extratos não foram citotóxicos para as células J774.A1 e HEK-293, como também não apresentaram genotoxicidade e mutagenicidade para os modelos animais.

Com base nisto, podemos afirmar que os extratos orgânicos obtidos de *Pityrocarpa moniliformis* apresentam um potencial farmacológico promissor, revelando possuir diversas propriedades biológicas. Apesar disto, estudos complementares e mais aprofundados deverão ser realizados, como isolamento dos compostos ativos que apresentaram tais atividades.

REFERÊNCIAS

- ALVES, M. J.; KENNED SILVA, A.; MURATORI, L.; FERREIRA, E. J.; SOUSA, G. M.; JESUS, N. D.; LOPES, A. M. G. Teor de fenóis totais e flavonoides, atividade antioxidante e citotóxica das folhas, frutos, cascas dos frutos e sementes de *Piptadenia moniliformis* Benth (Leguminosae-Mimosidae). **Blacpma**, v. 13, n. 5, p.466-476, 2014.
- AMENI, A. Z. **Avaliação dos possíveis efeitos tóxicos do extrato fluido de casearia sylvestris, em ratos Wistar**. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo. 93F, 2011.
- AMES, B N. Dietary Carcinogens and Anti-carcinogens (Oxygen Radicals and Degenerative Diseases). **Science**, v. 221, p. 1256-64, 1983.
- ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 260-271, 2010.
- ARCOVERDE, J. H. V.; CARVALHO, A. S.; NEVES, F. P. A.; PAIVA, P. M. G.; NAPOLEÃO, T. H.; CORREIA, M. T. S.; SILVA, M. V.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. Screening of Caatinga plants as sources of lectins and trypsin inhibitors. **Natural Product Research**, v. 28, n. 16, p. 1297–1301, 2014.
- ARNOUS, A.H. et. al. Plantas medicinais de uso caseiro – Conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. **Revista Espaço para a Saúde**, v. 6, n. 2, p. 1-6, 2005.
- AZEREDO. G. A. et al. Superação de dormência de sementes de *Piptadenia moniliformis benth*. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 2 p. 049-058, 2010.
- BAGATINI, P.B.; MALUF, S.W. Ensaio Cometa. In: MALUF, S.W. Citogenética Humana. 1ª edição. Porto Alegre: Artmed, p.194-201, 2011.
- BALMUS, G. et al. A high-throughput *in vivo* micronucleus assay for genome instability screening in mice. **Nature Protocols**, v. 10, p. 205–215, 2014.
- BARROS, S. B. M; DAVINO, S. C. **Avaliação da toxicidade**. In: OGA, S. Fundamentos de toxicologia. 2.ed., p. 57-68, 2003.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.P. Estresse Oxidativo: Relação entre Geração de Espécies Reativas e Defesa do Organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BENEDITO, P. C.; RIBEIRO, M. C. C.; TORRES, S. B.; CAMACHO, R. G. V.; SOARES, A. N. R.; GUIMARÃES, L. M. S. Armazenamento e Sementes de Catanduva (*Piptadenia moniliformis* Benth.) em Diferentes Ambientes e Embalagens. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, nº 1, p. 028 - 037, 2011.

BERTOLDI, M.C.; **Atividade antioxidante *in vitro* da fração fenólica das oleorresinas e do óleo essencial de pimenta rosa.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa, 96f, 2006.

BIANCHI, M.L.P; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes a dieta. **Revista de Nutrição**, v.12, n. 2, 125-130. 1999

BLACK, J. G. **Microbiologia: fundamentos e perspectivas.** 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 829 p., 2002.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros.** Brasília, 2002. 404p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos.** Departamento de Assistência Farmacêutica. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos/Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60 p.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v.56, p.317-33, 1998.

BRIMA, E. I. Toxic Elements in Different Medicinal Plants and the Impact on Human Health. **Int J Environ Res Public Health**, v. 14, n. 10, p. 1201-1209, 2017.

BRITO, A. S. **Manual de ensaios toxicológicos *in vivo*,** Campinas: UNICAMP, 122p., 1994.

BRITO, V. F. S., DANTAS, I. C.; DANTAS, G. D. S. Plantas Medicinais utilizadas pela comissão de mulheres na zona rural no município de Lagoa Seca-PE. **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 03. N.01, 2009.

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.

CAIXETA, D. S. **Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 75 f., 2008.

CALVIELLO, G.; PICCIONI, E.; BONINSEGNA, A.; TEDESCO, B.; MAGGIANO, N.; SERINI, S.; WOLF, F. I.; PALOZZA, P. DNA Damage and Apoptosis Induction by the Pesticide Mancozeb in Rat Cells: Involvement of the Oxidative Mechanism. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 211, n. 2, p. 87 - 96, 2006.

CAMPOS, M. P. de **Análise do potencial antimicrobiano de extrato, frações e substâncias puras obtidas de *Piper solmsianum* C. D. C. var. *solmsianum* (Piperaceae).** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 90f., 2006.

CAPASSO, R.; IZZO, A.A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO, C.; MASCOLO, N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, v.71, p. 58-65, 2000.

CARRANO, A. V.; NATARANJAN, S. Considerations for populations monitoring using cytogenetic techniques. **Mutation Research**, v.204, p. 379-406, 2002.

CATANIA, A.S.; BARROS, C.R.; FERREIRA, S.R.G.; Vitaminas e minerais com propriedades antioxidantes e risco cardiometabólico: controvérsias e perspectivas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 550-559, 2009.

CEPPI, M.; BIASOTTI, B.; FENECH, M.; BONASSI, S. Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: statistical and epidemiological issues. **Mutation Research**, v. 705, n. 1, p. 11 – 19, 2010.

CLSI. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras**; Norma Aprovada - Segunda Edição. CLSI document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**; Approved Standard—Eighth Edition. CLSI document M2-A8 (ISBN 1-56238- 485-6). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

COLE, M.D. Key antifungal, antibacterial and anti-insect assays-a critical review. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 22, n. 8, pp. 837-856, 1994.

COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations. **Molecular Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 249 – 261, 2004.

COLLINS, A.R.; OSCOZ, A.A.; BRUNBORG, G.; GAIVÃO, I.; GIOVANNELLI, L.; KRUSZEWSKI, M.; SMITH, C.C.; STETINA, R. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v.23, n.3, p.143-151, 2008.

CORRÊA, C.L.; BOFF, M.M. **Toxicidade Aguda**. In: CORRÊA, C. L.; LEMONICA, I. P.; ZAMBRONE, F.A.D.; CAMARGO, J. L. V. Bases científicas para avaliação da toxicidade de agrotóxicos. São Paulo: ILSI- Brasil- Internacional Life Science Institute do Brasil, cap.1, p. 15-23, 2009.

COUTINHO, H.D.M. et al. Atividade antimicrobiana de produtos naturais. **Conceitos**, p.77-85, 2003/2004

COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 12, n. 4, 1999.

CUI, K.; LUO, X.; XU, K.; VEN MURTHY, M. R. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 28, n.5, p.771–799, 2004.

DA SILVA, J.; HERRMANN, S. M.; HEUSER, V.; PERES, W.; MARRONI, N. P.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; ERDTMANN, B. Evaluation of the genotoxic effect of rutin

and quercetin by comet assay and micronucleus test. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 7, p. 941-947, 2003.

DA SILVA, L.C.N., SILVA-JU´NIOR, C.A., SOUZA, R.M., MACEDO, A.J., SILVA, M.V., & CORREIA, M.T.S. Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 2222–2228. 2011.

DIMITROVA, L., ZAHARIEVA, M. M., POPOVA, M., KOSTADINOVA, N., TSVETKOVA, I., BANKOVA, V., NAJDENSKI, H. Antimicrobial and antioxidant potential of different solvent extracts of the medicinal plant *Geum urbanum* L. **Chem Cent**, v. 11, p. 113, 2017.

DIPASQUALE, L. C.; HAYES, A. W. **Acute toxicity and eye irritancy**. In: HAYES, A. W. Principles and methods of toxicology. 4.ed. London: Taylor & Francis, p.853-916, 2001.

DONELLI, G.; FRANCOLINI, I.; ROMOLI, D.; GUAGLIANONE, E.; PIOZZI, A.; RAGUNATH, C.; KAPLAN, J.B. Synergistic activity of dispersin B and cefamandole nafate in inhibition of staphylococcal biofilm growth on polyurethanes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 8, p. 2733-2740, 2007.

DUSINSKA, M.; COLLINS, A.R. The comet assay in human biomonitoring: gene–environment interactions. **Mutagenesis**, v.23, n.3, p.191–205, 2008.

EGINTON, P.J.; HOLAH,J.; ALLISON. D.G.; HANDLEY, P.S.;GILBERT, P. Changes in the strength of attachment of micro-organisms to surfaces following treatment with disinfectants and cleansing agentes. **Letters Appl. Microbiol.**, v. 27, p. 101-105, 1998.

ELOFF, J.N. A Sensitive an quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plants extract for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, n. 8, p. 711-713, 1998.

FARIAS, D. F.; CAVALHEIRO, M. G.; VIANA, M. P.; QUEIROZ, V. A., ROCHA-BEZERRA, L. C. B.; VASCONCELOS, I. M.; MORAIS, S. M.; CARVALHO, A. F. U. Water extracts of Brazilian leguminous seeds as rich sources of larvicidal compounds against *Aedes aegypti* L. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, p. 585-594, 2010.

FÉLIX-SILVA, J.; SOUZA, T.; CAMARA, R. B. G.; CABRAL, B.; ILVA-JUNIOR, A. A.; REBECCHI, I. M. M.; ZUCOLOTTI, S. M.; ROCHA, H. A. O.; FERNANDES-PEDROSA, M. F. In vitro anticoagulant and antioxidant activities of *Jatropha gossypifolia* L.(Euphorbiaceae) leaves aiming therapeutical applications. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 14, n. 1, p. 405, 2014.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus thechnique. **Mutation Research**, v. 455, n. 1 – 2, p. 81 – 95, 2000.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L. S. **Radicais livres**: conceitos, doenças relacionadas, sistemas de defesa e estresse oxidativo. Ver. Assoc. Méd. Bras., São Paulo v. 43, n. 1, p 61-68, 1997.

- FERREIRA, B. L. A. **Identificação da atividade antibiótica e relação estrutura-atividade de moléculas de origem sintética e animal**. Dissertação (Mestrado em Neuroimunologia) – Universidade Federal, 110f., 2007.
- FERREIRA, V. F.; PINTO, A. C. A fitoterapia no mundo atual. **Quím. Nova**, v.33, n.9, pp. 1829-1829, 2010.
- FERREIRA, E. G. B. S.; MATOS, V. P.; SILVA, R. B.; SANTOS, H. H. D.; SENA, L. H. M. Thermal scarification to overcome *Piptadenia moniliformis* seeds dormancy. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias - Brazilian Journal of Agricultural Sciences**, v. 9, n. 1, p. 79–83, 2014.
- FRANÇA, I. S. X. D., SOUZA, J. A., BAPTISTA, R. S., BRITTO, V. R. D. S. 2008. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista brasileira de enfermagem**, v. 61, p. 201-208.
- GAMEIRO, P. H. **Efeito antimutagênico do extrato aquoso de Agaricus brasilienses em cultura de linfócitos humanos**. Monografia de conclusão de curso. Universidade Federal de Pelotas, p. 56, 2005.
- GARAJ-VRHOVAC, V.; ZELJEZIC, D. Cytogenetic monitoring of Croatian population occupationally exposed to a complex mixture of pesticides. **Toxicology**, v. 165, p. 153-162, 2001.
- GODIC, A.; POLJSKAK, B.; ADAMIC, M.; DAHMANE, R. The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. **Oxid. Med. Cell. Longev.** v. 2014, 6 p. 2014.
- GOMES, E. C. S.; BARBOSA, J.; VILAR, F. C. R.; PEREZ, J. O.; VILAR, R. C. FREIRE, J. L. O.; LIMA, A. N. DIAS, T. J. Plantas da Caatinga de Uso terapêutico: Levantamento Etnobotânico. **Engenharia Ambiental – Espírito Santo do Pinhal**, v. 5, n. 2, p. 074-085, 2008.
- GOMES, J.P.M. **Pesquisa de atividade antitumoral e mutagênica in vitro de produtos naturais**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, São Paulo, 86p., 2008.
- GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo Comparativo da Atividade Antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arq. Int. Biol. São Paulo**. v. 72, n. 3, p. 353-358, 2005.
- GONÇALVES, L. M.; CONCEIÇÃO, M.B.; RESGALL-JUNIOR, C. **Avaliação do potencial genotóxico das águas do Rio Itajaí-Açú e zona costeira sobre os hemócitos do mexilhão Perna perna através do Ensaio do Cometa**. In: II Simpósio Brasileiro De Engenharia Ambiental. Livro de Resumos. v.1, UNIVALI, p. 384, 2003.
- GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 1, p. 1–93, 2006.

HALLIWELL, B. Oxigens radicals and metal ions: potential antioxidant intervention strategies. **Ann. Interme. Med.**, v. 107, p. 526-45, 1987.

HALLINWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3 ed Clarendon, Oxford, p. 936, 2000.

HALLIWELL B.; GUTTERIDGE, J.M.C.; **Free radicals in biology and medicine**. 4ªEd, Oxford, New York, 2007.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, V. 2, p. 95-108, 2004.

HOLAH, J.T. et al. A conductance based surface disinfectant test for food hygiene. **Letters in applied microbiology**, v. 11, p.255-260, 1990.

IARMARCOVAI, G.; CEPPI, M.; BOTTA, A.; ORSIÉRE, T.; BONASSI, S. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: a meta-analysis. **Mutation Research**, v. 659, n. 3, p. 274–283, 2009.

JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. (Ed.). *Microbiologia medica*. 20ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 524p., 1998.

KITTS, D.D.; Bioactive substances in food: identification and potential uses. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 72, n. 4, p. 423-434, 1994.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN JR, W.C. **Diagnóstico microbiológico**. 5ª. Ed., Medsi: Rio de Janeiro, p. 1465, 2001.

LAPA, A.J. et al. **Farmacologia e toxicologia de produtos naturais**. In: SIMÕES, C.M.O. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 4. ed. Porto Alegre: Editora da Universidade, p.183-199, 2002.

LAPA, J.A. et al. **Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais**. In: SIMÕES, C.M. O. ; SANTOS, S. C.; MELLO, J.C.P. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. Porto alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora UFSC, 1102p., 2003.

LASKAR, R.A.; SK, I.; ROY, N.; BEGUM, N.A. Antioxidant activity of Indian propolis and its chemical constituents. **Food Chemistry**, v. 122, n. 1, p. 233-237, 2010.

LECHEVALIER, M.W.; CAWTHON, C. D.; LEE,R.G. Factor promoting survival of bacterian in chlorinated water supplies. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 649-654, 1988.

LEE J; KOO N MIN DB. Rective oxyen species, aging and antioxidante nutraceuticals. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 3, p. 21-33, 2004.

LEW, W.; PAI, M.; OXLADE, O.; MARTIN, D.; MENZIES, D. Initial drug resistance and tuberculosis treatment outcomes: systematic review and meta-analysis. **Annals of internal medicine**, v. 149, p. 123-134, 2008.

LINDBERG, H. K.; WANG, X.; JARVENTAUS, H.; FALCK, G.C.; NORPPA, H.; FENECH, M. Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 617, n. 1 – 2, p. 33 – 45, 2007.

LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacog. Rev.**, v. 4, n.8, p. 118–126, 2010.

LOTZE, M.T.; THOMSON, A.W. **Measuring Immunity: Basic Science and Clinical Practice**. 1ª ed. Elsevier Science. London: p. 344-346, 2005.

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

LUCCHESI, Eliane Gama. **Desenvolvimento de sistema de obtenção de biofilmes *in vitro* e avaliação de sua susceptibilidade a biocidas**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 77f, 2006.

LUCKOW, M. Mimoseae. In: LEWIS, G., SCHRIRE, B., MACKINDER, B., LOCK, M. (eds.). **Legumes of the world**. Kew: Royal Botanical Gardens, p., 163-185. 2005.

MACED, A. J.; ABRAHAM, W. R. Can infections biofilm be controlled by blocking bacterial communication? **Medicinal Chemistry**, v. 5, p. 517-528, 2009.

MANACH, C.; MAZUR, A.; SCALBERT, A. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. **Current Opinion in Lipidology**, v.16, p.77-84, 2005.

MELO-BATISTA, A. A.; OLIVEIRA, C. R. M. Plantas utilizadas como medicinais em uma comunidade do semiárido baiano: saberes tradicionais e a conservação ambiental. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia**, v. 10, n. 18, p. 74-88, 2014.

MEZADRI, T. et al. Antioxidant compounds and antioxidant activity in acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruits and derivatives. **Journal of Food Composition and analysis**, v. 21, p.282-290, 2008.

MICHELIN, D.C.; MORESCHI, P.E.; LIMA, A.C.; NASCIMENTO, G.G.F.; PAGANELLI, M.O.; CHAUD, M.V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 15, p. 316-320, 2005.

MONTEIRO, M.; FARAH, A.; PERRONE, D.; TRUGO, L.C.; DONANGELO, C. Chlorogenic acid compounds from Coffee Are Differentially Absorbed and Metabolized in Humans. **The Journal of Nutrition**, v. 137, n. 10, p. 2196-2201, 2007.

- MONTEIRO, P.A.A.; CARVALHO JUNIOR, P.M. Características epidemiológicas dos atendimentos de intoxicações humanas no CEATOX-79 (Marília-S.P.) em 2004. **Rev. Bras. Toxicol.**, v. 20, n. 1,2, p. 39-45, 2007.
- MORAIS, S.M.; JÚNIOR, F. E. A. C.; SILVA, A. R. A.; NETO, J.S.M. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de Croton do nordeste do Brasil, **Química Nova**, v. 29, n.5, p. 907-910, 2006.
- MOREIRA, L. B. Princípios para uso racional de antimicrobianos. **Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul (AMRIGS)**, v. 48, n. 2, p. 73 – 152, 2004.
- MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/ microsome mutagenicity assay. **Mut. Res.**, v. 455, p. 29-60, 2000.
- MOSER, Marília C. **Avaliação ecotoxicológica do Manancial da Lagoa do Peri: testes genotóxicos, citotóxicos e mutagênicos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 125p., 2011.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983.
- MOSTELLER, T. M.; BISHOP, J. R. Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. **Journal of Food Protection**, v. 56, p. 34-41, 1993.
- MUGHAL, A.; VIKRAM, A.; RAMARAO, P.; JENA, G.B. Micronucleus and comet assay in the peripheral blood of juvenile rat: establishment of assay feasibility, time of sampling and the induction of DNA damage. **Mutation Research**, v. 700, n. 1-2, p. 86-94, 2010.
- NACZK, M.; SHAHIDI, F.; Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 95-111, 2004.
- NEIVA, T. J.C.; MORAIS, L.; POLACK, M.; SIMÕES, C.M.O.; D'AMICO, E.A. Effects of catechins on human blood platelet aggregation and lipid peroxidation. **Phytotherapy Research**, v. 13, p. 597-600, 1999.
- NORMARK, B. H.; NORMARK, S.; Evolution and spread of antibiotic resistance. **Journal of Internal Medicine**, n. 252, p. 91-106, 2002.
- NORBY, S. R.; NORD, C. E. Lack of development of new antimicrobial drugs; a potential serious threat to public health. **Lancet Infectious diseases**, v. 5, p. 115-119, 2005.
- NOVAIS, T.S. COSTA, J.F.O.; DAVID, J.P.L.; DAVID, J.M.; QUEIROZ, L.P.; FRANÇA, F.; GIULIETTI, A.M.; SOARES, M.B.P.; SANTOS, R.R. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.14, supl., p.8-11, 2003.
- NUNES, S. R. D. F.; GARCIA, F. C. P.; LIMA, H. C. *Mimosoideae* (Leguminosae) arbóreas do parque estadual do rio doce, minas gerais, brasil: distribuição geográfica e similaridade

florística na floresta atlântica no sudoeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 58, n.2, 403-421, 2007.

OBE, G.; PFEIFFER, P.; SAVAGE, J.R.K.; JOHANNES, C.; GEODECKE, W.; JEPPESEN, P.; NATARAJAN, A. T.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, W.; FOLLE, G. A.; DRETS, M. E. Chromosomal Aberrations: Formation, Identification and Distribution. **Mutation Research**, v. 504, n.5, p. 17-36, 2002.

OLIVEIRA, M.J.R.; SIMÕES, M.J.S.; SASSI, C.R.R. Fitoterapia no sistema de saúde pública (SUS) no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicináveis**, v. 8, n. 2, p. 39-41, 2006.

ORLANDO, S. C. **Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico bruto da casca do *Stryphnodendro adstringens* (Martius) Coville (Barbatimão)**. Dissertação (Mestrado em Promoção de Saúde) – Universidade de Franca, São Paulo, 89f., 2005.

ÖSTLING, O.; JOHANSON, K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Res. Commun.**, v.123, n.1, p. 291-298, 1984.

PANG, Y. WANG, D.; FAN, Z.; CHEN, X.; YU, F.; HU, X.; WANG, K.; YUAN, L. *Blumea balsamifera* - a phytochemical and pharmacological review. **Molecules**, v. 19, n. 7, p. 9453–9477, 2014.

PASTOR, S. CREUS, A.; PARRÓN, T.; CEBULSKA-WASILEWSKA, A.; SIFFEL, C.; PIPERAKIS, S.; MARCOS, R. Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides: use of micronuclei as biomarkers. **Mutagenesis**, v. 18, n. 3, p. 249–58, 2003.

PEREIRA, O.B.O. **Comparação da eficácia de dois biocidas (carbamato e glutaraldeído) em sistemas de biofilme**. 2001. 221f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) – Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga, 2001.

PFALLER, M.A.; BARRY, A. L. Evaluation of a novel colorimetric broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of yeast isolates. **Journal Clinical Microbiology**, v. 32, n. 8, p. 1992-1996, 1994.

POLJSAK, B. et al. Oxidation-antioxidation-reduction processes in the cell: impacts of environmental pollution. In: JEROME, N. (Ed.). **Encyclopedia of Environmental Health**. [s.l.]: Elsevier, p. 300-306, 2011.

PRASAD, K.N.; HAO, J.; SHI, J.; LIU, T.; LI, W.; WEI, X.; QIU, S.; XUE, S.; JIANG, Y. Antioxidant and anticancer activities of high pressure-assisted extract of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) fruit pericarp. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 10, p. 413-419, 2009.

PURCHASE, I.F.; BOTHAM, P. A.; BRUNER, L.H.; FLINT, O.P.; FRAZIER, J.M.; STOKES, W.S. Workshop overview: scientific and regulatory challenges for the reduction,

refinement and replacement of animals in toxicity testing. **Toxicological Sciences**, v.43, n2, p. 86-101, 1998.

QUEIROZ, L.P. **Leguminosas da Caatinga**. Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana; Kew: Royal Botanic Gardens; Associação Plantas do Nordeste, 443 p., 2009.

RATES, S.M.K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 2, p. 57-69, 2001.

REDDY, G.M.; RAO, V.; SARMA, D.; REDDY, T.K.; SUBRAMANYAM, P.; NAIDU, M.D.; Evaluation of antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl method of 40 medicinal plants. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 24, p. 4082-4086, 2012.

RENZ, S. V. **Oxidação e antioxidantes**. Seminário apresentado na Disciplina de Bioquímica do Tecido Animal, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS. p. 1-11. 2003.

RESCHKE, A.; MARQUES, L.M.; MAYWORM, M. A. S. Atividade antibacteriana de *Ficus benjamina* L (Moraceae). **Revista Brasileira de plantas Mediciniais**, v. 9, n.2, p. 67-70, 2007.

REZENDE HA, COCCO MIM. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. **Revista Escola Enfermagem USP**, v. 36, n.3, p. 282-283, 2002.

RIBEIRO, L. R.; MARQUES, E. K. **A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana**. In: Mutagênese Ambiental. Org: Ribeiro, L. R.; Salvadori, D. M. F.; Marques, E. K. Canoas: Ulbra, p. 21 - 27, 2003.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933–956, 1996.

ROCHA, T. A. **Avaliação da citotoxicidade e ação genotóxica de extratos orgânicos e ácido úsnico de *Cladonia substellata* (Líquén) e derivados pirazólicos sintéticos**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas., 104f, 2015.

SANTOS, M.C.; DÓREA, M.C.; SANTOS, F.A.R. 2004. **Pollen types of honey and pollen loads from Bahia (Northeastern Brazil)**. In: XI International Palynological Congress, Granada. Polen, Córdoba: The Spanish Palynological Association, v. 14, p., 397- 398, 2004.

SARTORI, M. R. K. **Atividade antimicrobiana de frações de extratos e compostos puros obtidos das flores de *Acmela brasiliensis* SPRENG (*Wedelia paludosa*) (ASTERACEAE)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 81f., 2005.

SASAKI, Y.F.; SEKIHASHI, K.; ITUMIYAMA, F.; NISHIDATE, E.; SAGA, A.; ISHIDA, K.; TSUDA, S. The comet assay with mouse multiple organs: Comparison of comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP carcinogenicity database. **Critical Reviews Toxicology**, v. 30, n. 6, p. 629-799, 2000.

SCHMID, W. **The micronucleus test for cytogenetics analysis**. In: Principles and Methods for Their Detection (ed. Hollaender, A.). Plenum Press, New York, v.4, p.31-53, 1976.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P.K.; WANASUNDARA, P.D. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 32, p. 67-103, 1992.

SILVA, C. L.; QUEIROZ, A. J. M.; FIGUEIREDO, R. M. F. Caracterização físico-química de méis produzidos no Estado do Piauí para diferentes floradas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.8, n.2/3, p.260-265, 2004.

SILVA, RB; ALMEIDA, CR; CHAVASCO, JM. Antimycobacterial activity evaluation and MIC determination of liophilized hydroalcoholic extracts of *bixa orellana* L., Bixaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.2, p. 171-174, 2010.

SILVA, L. C. N. MIRANDA, R. C. M.; GOMES, E. B.; MACEDO, A. G.; ARAÚJO, J. M.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q.; SILVA, M. V.; CORREIA, M. T. S. Evaluation of combinatory effects of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 32, p 2358-2364, 2013a.

SILVA, N.L.C., MESSIAS SANDES, J., PAIVA, M.M., ARAÚJO, J.M., FIGUEIREDO, R.C.B.Q., SILVA, M.V., CORREIA, M.T.D.S. Anti-Staphylococcus aureus action of three Caatinga fruits evaluated by electron microscopy. **Natural Product Research**, v. 27, p. 1492–1496, 2013b.

SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 618-626, 2008.

SILVEIRA, D.G. et al. Micropropagation and in vitro conservation of *Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez, a fiber produced bromeliad from Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52, n.4, p.923-932, 2009.

SIMÕES, C. M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN; MELLO, J.C.P.; MENTZ, PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ed., 1102p., 2003.

SINGH, K. V.; SHUKLA, N. P. Activity on multiple resistant bacteria of galic (*Allium sotivum*) extract. **Fitoterapia**. v. 55, p. 313-315, 1984.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA in individual cells. **Experimental cell research**, v. 175, p. 184-91, 1988.

SLESÁK, I. LIBÍK, M.; KARPINSKA, B.; KARPINSKI, S.; MISZALSKI, Z. The Role of Hydrogen Peroxide in Regulation of Plant Metabolism and Cellular Signalling in Response to Environmental Stresses. **Acta Biochemistry Polonica**, v. 54, n. 1, p. 39-50, 2007.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15. 1, p. 71-81, 2002.

SODRÉ, G.S.; MARCHINI, L.C.; MORETI, A.C.C.C.; CARVALHO, C.A.L. 2008. Tipos polínicos encontrados em amostras de méis de *Apis mellifera* em Picos, Estado do Piauí. **Ciência Rural**, v.38, n.3, 2008.

SOUZA, A. S.; AVANCINI, C. A. M.; WIEST, J. M. Atividades Antimicrobianas de *Tagetes minuta* L. Compositae (Chinchilho) frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n.6, 2000.

SOUSA, C. M. M.; ROCHA E SILVA, H.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDAO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUZA, Ana Valéria. Potencialidades de algumas espécies arbóreas madeireiras do bioma Caatinga. In: SILVA, Márcia Vanusa *et al.* (Org.). **A Caatinga e seu potencial**. 23 ed. Recife: Ed. Universitária, cap.4, p. 89-99, 2013.

SPIELMANN, H. Animal use in the safety evaluation of chemicals: harmonization and emerging needs. **ILAR Journal**, v. 43, p.11-17, 2002.

SPIVAK, G. COX, R. A.; HANAWALT, P. C. New applications of the Comet assay: Comet-FISH and transcription-coupled DNA repair. **Mutation Research**, v. 681. p. 44-50, 2009.

SREERAMULU D.; RAGHUNATH, M. ANTIOXIDANT activity and phenolic content of roots, tubers and vegetables commonly consumed in India. **Food Research international**, v. 43, pp, 1017-20, 2010.

STAR, L.; KUPFERBERG, E.D. The misuse of antibiotics. **Medical Ethics (Burlingt Mass)**, v. 1, p. 5-8, 2004.

STICH, H.F. et al. Remission of oral leukoplakias and micronuclei in tobacco/betel quid chewers treated with beta-carotene and with beta-carotene plus vitamin A. **International Journal of Cancer**, v. 42, p. 195–199, 1998.

TENOVER, F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **The American Journal of Medicine**, v.119, p.3-10, 2006.

TERRADAS, M.; MARTÍN, M., TUSELL, L.; GENESCA, A. Genetic activities in micronuclei: Is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? **Mutation Research**, v. 705, n. 1, p. 60 – 67, 2010.

THIERENS, H.; VRAL, A.; The micronucleus assay in radiation accidents. **Annali dell' Institute Superiore de Sanità**, v. 45, n.3, p. 260-264, 2009.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. 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.

TORRAS-CLAVERIA, L., JÁUREGUI, O., CODINA, C., TIBURCIO, A.S., BASTIDA, J., VILADOMAT, F. Analysis of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry in senescent and water-stressed tobacco. **Plant Science**, v. 182, p.71-78, 2012.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. Ed. Porto Alegre: Artmed, 827p., 2003.

TRABULSI, L. R.; TOLEDO, M. R. F. de (Ed.). **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 386 p., 2004.

TRACHOO, N. Biofilms and the food industry. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 25, p. 807-815, 2003.

TRENTIN, D. S.; ZIMMER, K. R.; SILVA, M. V.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Medicinal plants from brazilian Caatinga: antibiofilm and antibacterial activities against *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista Caatinga**, v. 27, n. 3, p. 264–271, 2014.

TRENTIN, D.S., SILVA, D.B., FRASSON, A.P., RZHEPISHEVSKA, O., DA SILVA M.V., PULCINI, E. DE L., JAMES, G., SOARES, G.V., TASCA, T., RAMSTEDT, M., GIORDANI, R.B., LOPES, N.P., MACEDO, A.J. Natural Green coating inhibits adhesion of clinically important bacteria. **Sci Rep**. v. 5, p. 1-10, 2015.

TROVÃO, D. M. et al. Variações sazonais de aspectos fisiológicos de espécies da Caatinga. **R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental**, v. 11, n. 3, p. 307–311, 2007.

TULIPANI, S.; MEZZETTI, B.; CAPOCASA, F.; BOMPADRE, S.; BEEKWILDER, J.; VOS, C. H.R.; CAPANOGLU, E.; BOVY, A.; BATTINO, M. Antioxidants, Phenolic compounds, and Nutritional quality of Different Strawberry Genotypes. **Journal of Agricultura and Food Chemistry**, v. 56, n. 3, p. 696-704, 2008.

VALGAS, C.; SOUZA, S. M. de; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA JR, A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 369-380, 2007.

VANNUCCHI, H.; MOREIRA, E.A.M.; CUNHA, D.F.; JUNQUEIRA-FRANCO, M.V.M.; BERNARDES, M.M.; JORDÃO Jr, A.A.; **Papel dos nutrientes na Peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante, Simpósio: Nutrição Clínica**, Ribeirão Preto/São Paulo, Cap. III, v. 31, p. 31-44 1998.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; Maciel, M. A. M. Plantas Mediciniais: Cura Segura? **Química Nova**, v. 28, p. 519-528, 2005.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006.

VIKSVEEN, P. Antibiotics and the development of resistant microorganisms. Can omeopathy be na alternative? **Journal of Homeopathy, London**, v. 92, p. 99-107, 2003.

VINSON, J.A.; DABBAG, Y.A. Tea phenols; antioxidante effectiveness of teas, tea componentes, tea fractions and their binding with lipoproteins. **Nutrition Research**, v. 18, p. 1067-1107,1998.

YUNES R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 4. p. 147-52, 2001.

WALKER, J. T.; ROGERS, J.; KEEVIL, C. W. An investigation of the efficacy of a bromine containing biocide on aquatic consortium of planktonic and biofilm microorganisms including legionella pneumophilia. **Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research**, v. 8, n.1, p. 47-54, 1994.

WASSON, G. R.; MCKELVEY-MARTIN, J.; DOWNES, C.S.; The use of the comet assay in the study of human nutrition and cancer. **Mutagenesis**, v.23, n.3, p. 153 – 162, 2008.

WHITE, P. A; RASMUSSEN, J. B. The Genotoxic Wastes in Surface Waters. **Mutation Research**, v. 410, p. 223-236, 1998.

WOODFORD, N.; LIVERMORE, D. M. Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge. **Journal of Infection**, v. 59, suppl 1, p 4-16, 2009.

APÊNDICE A – Artigo Comparison of Antibacterial and Antibiofilm Potential of Organic Extracts of *Pityrocarpa moniliformis* Leafs Obtained by Different Methods of Extraction publicado em International Journal of Recent Scientific Research.



ISSN: 0976-3031

Available Online at <http://www.recentscientific.com>

CODEN: IJRSFP (USA)

International Journal of Recent Scientific Research
Vol. 9, Issue, 12(A), pp. 29791-29795, December, 2018

**International Journal of
Recent Scientific
Research**

DOI: 10.24327/IJRSR

Research Article

COMPARISON OF ANTIBACTERIAL AND ANTIBIOFILM POTENTIAL OF ORGANIC EXTRACTS OF *Pityrocarpa moniliformis* LEAFS OBTAINED BY DIFFERENT METHODS OF EXTRACTION

Tamiris Alves Rocha*¹, Cleciana Maristela de Souza², José Adelson Alves do Nascimento Junior¹, Danielle Feijó de Moura¹, Dayane de Melo Barros³, Maria Aparecida da Conceição de Lira², Marlllyn Marques da Silva², Alexandre Gomes da Silva^{4,5}, Idjane Santana de Oliveira², Emerson Peter da Silva Falcão³, Marcia Vanusa da Silva^{1,5} and Maria Tereza dos Santos Correia^{1,5}

¹Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brazil²Núcleo de Ciências Biológicas, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brazil³Núcleo de Nutrição, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brazil⁴Departamento de Antibióticos, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brazil⁵Núcleo de Bioprospecção da Caatinga, Instituto Nacional do Semiárido, Paraíba, BrazilDOI: <http://dx.doi.org/10.24327/ijrsr.2018.0912.2931>**ARTICLE INFO****Article History:**Received 6th September, 2018Received in revised form 15th

October, 2018

Accepted 12th October, 2018Published online 28th December, 2018**Key Words:**Microorganisms, Minimum Bactericidal Concentration, Minimum Inhibitory Concentration, *Pityrocarpa moniliformis*.**ABSTRACT**

The objective of this study was to determine the antimicrobial and antibiofilm properties of the organic extracts of *Pityrocarpa moniliformis* obtained by different techniques of extraction against several microorganisms. Antimicrobial and antibiofilm activities were determined using the serial microdilution method in 96-well culture plates and the crystal violet method, respectively. Most extracts showed antimicrobial activity in all evaluated microorganisms and Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) were achieved for some extracts at the concentration of 2 mg/mL. In addition, the methanolic extracts showed antibiofilm activity against most of the tested microorganisms. Therefore, the extracts of *P. moniliformis* proved to be efficient for the activities tested, demonstrating their potential commercial application.

Copyright © Tamiris Alves Rocha et al, 2018, this is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

INTRODUCTION

The caatinga is one of the biomes richest in biodiversity in Brazil, being the only large region fully inserted in the Brazilian national territory with a wealth of cultural knowledge accumulated by local communities. It is a semi-arid region, marked by a severe drought, with precipitation generally lower than 600 mm⁻¹ per year (SAMPAIO *et al.*, 2002), native plants developed strategies to compensate for this difficulty by producing unique chemical molecules that have made them an

excellent source of bioactive compounds with antibacterial activity. In addition, studies have shown that caatinga plants have potential to prevent bacterial growth and adhesion (TRENTIN *et al.*, 2011).

In recent years, biofilms have attracted significant interest, especially because of their high impact in medicine and public health. Bacteria in the form of biofilms contribute to the chronicity of persistent infections, such as those associated with implanted medical devices.

*Corresponding author: **Tamiris Alves Rocha**

Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brazil

Tamiris Alves Rocha et al., Comparison of Antibacterial And Antibiofilm Potential of Organic Extracts of Pityrocarpa moniliformis Leaves Obtained By Different Methods of Extraction

The ability to form biofilm allows the pathogens to escape the immune defenses of the host and resist antibacterial treatments (HOIBY *et al.*, 2010).

The encouragement to identify new antibacterial agents with clear mechanisms of action, including anti-adherent compounds, raises the need for identification of innovative antimicrobials and highlights the potential of plant-derived molecules as a source of biofilm control products.

Pityrocarpa moniliformis is a tree plant in the Northeast of Brazil, with disjoint occurrence in dry forests of the region of Sucre (Venezuela). It is an endemic plant of the caatinga, a biome that has several plant species with therapeutic and pharmacological potential (MELO ET AL., 2010, COSTA *et al.*, 2017, MALAFAIA *et al.*, 2017, VIEIRA *et al.*, 2017) was not explored, evidencing the need to develop studies on its possible biological activities. Recent studies have shown promising antimicrobial and antibiofilm activities (SILVA *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2013; TRENTIN *et al.*, 2015).

The objective of this study was to evaluate the antibacterial activity of the organic extracts of the leaves of *P. moniliformis*, obtained by different techniques of extraction against several pathogenic microorganisms, and to verify the antibiofilm activity of these extracts under viability of *Staphylococcus aureus*.

MATERIALS AND METHODS

Collect the material and extraction solvent

The leaves of *P. moniliformis* were collected in the *Parque Nacional do Catimbau*, in Buíque, Pernambuco. The material was taken to the forced air circulation oven (40-45 °C) for a period of three to four days. The samples were also identified according to the usual taxonomic techniques and deposited in the Herbarium *Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA)*, Recife, Brazil. The plant material was processed in a bench mill and subjected to different extraction methods following the eluotropic order of the solvents: cyclohexane, ethyl acetate and methanol. The samples were rotated and left at room temperature for complete drying of the solvent. All extracts obtained were stored at -20 °C for further analysis.

Obtaining organic extracts by different methods

Cold Extraction (CE): 30 g of the dry and ground vegetable material was added to 300 mL of cyclohexane and subjected to successive extractions, remaining under mechanical agitation for 72 h at room temperature. The hexane extract (Hex) obtained was filtered and maintained at a temperature of ± 4 °C. To the residue was added cyclohexane again and the same extraction procedure repeated 3 more times. The same procedure was performed for solvents ethyl acetate (AcOEt) and methanol (MeOH) following the eluotropic series. The extracts were dried in a rotary evaporator coupled to a water bath at 40 °C and kept in desiccator until constant weight for subsequent calculation of their yield.

Extraction in Soxhlet Apparatus (ESA): The vegetable material (30 g) was added in 30 mL of cyclohexane in soxhlet apparatus at 40 °C for 72 h in a water bath. Subsequently, the extract was filtered and concentrated to dryness in a rotary evaporator coupled to a water bath at 40 °C. The residue was

kept in desiccator until constant weight for further calculation of its yield. The same procedure was repeated to obtain extracts with ethyl acetate and methanol.

Ultrasonic Assisted Extraction (UAE): Ultrasonic bath (model USC-1400/Family USC-1400A/USC-1450A) was used as the source of ultrasound to obtain extracts. 30 g of the plant material was added to 300 mL of solvent, following the eluotropic series (Cyclohexane, ethyl acetate and methanol) and sonicated (3x30 min) at a temperature of 40 °C and power of 150W, then the samples were rotated and left at room temperature for complete drying of the solvent and subsequent calculation of the yield.

Accelerated Solvent Extraction (ASE): 20 g of the vegetable material together with 10 g of diatomaceous earth was subjected to extraction in ASE 350 Dionex automatic extractor, following the eluotropic order of the solvents: cyclohexane, ethyl acetate and methanol, under a temperature of 40 °C for 15 minutes under a pressure of ± 1500 psi and solvent luxury of 5 mL/min. The extracts filtered on the ASE were dried on Rocket Evaporator™ and left at room temperature for complete drying of the solvent.

Supercritical Fluid Extraction (SFE): Supercritical extraction was performed on a Spe-ed SFE unit from Applied Separations model 7071 (Allentown, PA, USA) with a 115 mL extraction cell. 30 g of dry plant material were loaded into the SFE cell at a temperature of 50 °C under a pressure of 5000 psi with a static period of 30 min. With dynamic mode (continuous flow) scCO₂ was used as solvent and cyclohexane, ethyl acetate and methanol as co-solvent following the eluotropic series. Flow rates were 4 mL/min for scCO₂ and 1 mL/min for solvents. The extracts were then evaporated at room temperature until complete drying.

Antibacterial activity

Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

The antimicrobial activity of *P. moniliformis* organic extracts obtained by different techniques was determined by the serial microdilution method (CLSI, 2011) in 96 well flat bottom culture plates. The pathogenic bacteria tested against the extracts were obtained from the culture collection of the Department of Antibiotics of the Federal University of Pernambuco (UFPE). Gram-negative bacteria, *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* and Gram-positive, *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) were tested 100 µL of the Heller-Hinton broth (MH) HIMEDIA® medium was distributed to all wells of the 96-well plate, then 100 µL of each extract (20 mg/mL) was added to the 1st row of the plate (horizontal direction). Subsequently, serial dilution of the metabolites to the wells of row G was carried out, obtaining concentrations of 2000; 1000; 500; 250; 125; 62.5; 32.25 and 15.625 µL/mL. A bacterial suspension corresponding to 0.5 tube of the Mac Farland scale was used with 0.85% saline, corresponding to a concentration of approximately 1.5 x 10⁸ CFU/mL. This solution was diluted 1:90 in order to obtain the standard suspension. Then, 20 µL of the bacterial suspension was dispensed into each well on the plate, except the control wells. The plate was sealed and incubated in the oven at 37 °C for 18-24 h. The assays were performed in triplicates at all concentrations for each strain.

After incubation time, the plates were read in spectrophotometer at 600 nm (A600) for each well. Percent growth inhibitions at different concentrations of the extracts for each microorganism were calculated as: % Growth Inhibition = $[1 - A_c/A_0 \times 100]$, where A_c represents the absorbance of the well with a concentration of the extract and A_0 is the absorbance of the well with the control (without extract). Minimum inhibitory concentration (MIC) was determined for each strain as the lowest extract concentration that completely inhibits measurable growth ($A_{600} = 0$).

Minimal Bactericidal Concentration (MBC)

The Minimum Bactericidal Concentration (MBC) was determined according to the technique described by Koo *et al.* (2000) and Duarte *et al.* (2003). With the aid of sterile loops, the blending of each well of the microplate was replicated on the plate Petri dishes containing Mueller-Hinton agar medium for all tested microorganisms. Plates were incubated at 37 °C for 24 h. The lowest concentration of the extract that did not allow growth was considered the CBM for each strain. The spaces that presented growth were considered from wells with bacteriostatic concentration of the extract.

Determination of anti-biofilm formation

The *S. aureus* isolate with a strong biofilm formation was tested with the methanolic extracts of *P. moniliformis*. The activity was performed through the adaptation of the methodology described by Trentin *et al.* (2011), where 20 µL of extracts concentrations were added to the microtiter plate together with 20 µL of the bacterium and 160 µL of Tryptone Soy Broth (TSB) growth medium. The final concentration of extracts was then 4 and 0.4 mg/mL. The plate was incubated for 24 hours at 37 °C, after incubation the contents were removed and the plate washed three times with 0.85% saline. For biofilm fixation the plate was incubated at 55 °C for one hour. The biofilm visualization is revealed with 0.4% violet crystal for 10 minutes, and then removed, washed three times and ethanol (100%) added, in which the optical density is visualized at 570 nm.

RESULTS AND DISCUSSION

Antimicrobial activity

The antimicrobial activity of the organic extracts (CE, ESA, UAE, ASE and SFE) was determined by calculating the percentage inhibition of growth obtained for various microorganisms. From these results, the MIC for each microorganism was determined (Table 1). In addition, where possible, CBM has also been established. Organic extracts of *P. moniliformis* were effective for most of the microorganisms tested, although to varying degrees. It was observed that the methanol extract obtained by the UAE technique showed more than 90% inhibition of the growth of three microorganisms (*S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*) at a concentration of 2 mg/mL. The same occurred for ESA-MeOH and ASE-MeOH, but these inhibited only *S. aureus* bacteria. The CE-Hex extract also showed satisfactory results for all strains tested, except for *K. pneumoniae*.

The *S. aureus* bacteria showed the highest sensitivity against most of the extracts tested. Most phytochemicals perform better against Gram-positive bacteria and there are still a limited

number of plant-derived molecules that act as high-activity antimicrobial compounds against Gram-negative species (LEWIS, 2013).

The antimicrobial activity of extracts obtained with methanol has been reported in several studies. Pareek *et al.* (2000) reported the antibacterial activity of the methanolic extract of the leaves of *Syzygium cumini* against the bacterial strains of *Raoultella planticola*, *Pseudomonas aeruginosa*, *B. subtilis* and *Agrobacterium tumefaciens*. Ibrahim, Hong and Kupan (2013) also referred to the antibacterial efficiency of the *Phyllanthus niruri* plant's methanolic extract against pathogenic bacteria responsible for common skin infections and gastrointestinal and urinary tract infections, demonstrating antibacterial action against all tested Gram-positive and Gram-negative bacteria. It is believed that the actions of many antimicrobial agents results in the formation of pores in the bacterial membrane and stimulate the leakage of cellular content (YENUGU *et al.*, 2006).

It should be noted that the results obtained corroborate with the studies by Silva *et al.* (2012 and 2013) that evaluated the antibacterial activity of *P. moniliformis* against clinical strains of *S. aureus*, so that the samples were active for all strains of *S. aureus* (minimum concentration of inhibition: 0.38-3.13 mg/mL⁻¹), suggesting that the cell wall was the main target of extracts. Moreover, the harmful activity of methanolic extracts to the bacterial membrane can be attributed mainly to the presence of phenolic and flavonoid compounds, which have characteristics similar to detergent (YADAV *et al.*, 2017).

Table 1. Growth inhibition percentages obtained with organic extracts in bacterial isolates at the concentration of 2 mg/mL.

Extracts	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
CE	Hex	93.4 ± 5.0	72.3 ± 2.8	33.4 ± 2.3	59.4 ± 2.0
	AcOEt	40.3 ± 7.8	20.4 ± 1.7	6.0 ± 1.5	9.7 ± 3.8
	MeOH	60.0 ± 5.5	52.1 ± 4.1	17.9 ± 3.1	23.9 ± 1.7
ESA	Hex	73.4 ± 3.9	4.3 ± 1.8	49.3 ± 3.5	17.9 ± 1.4
	AcOEt	51.7 ± 4.7	8.4 ± 0.7	6.0 ± 2.7	4.7 ± 1.6
	MeOH	96.2 ± 2.9	55.2 ± 3.1	5.5 ± 3.7	20.8 ± 3.0
UAE	Hex	47.8 ± 2.2	17.9 ± 4.6	22.5 ± 3.4	22.7 ± 4.9
	AcOEt	31.4 ± 5.6	91.3 ± 1.6	92.2 ± 1.2	12.2 ± 3.6
	MeOH	98.9 ± 4.9	94.2 ± 2.8	94.5 ± 1.4	41.1 ± 2.7
ASE	Hex	40.5 ± 2.0	55.4 ± 2.8	58.8 ± 3.0	1.4 ± 2.4
	AcOEt	45.6 ± 1.4	34.4 ± 5.0	45.3 ± 2.2	23.1 ± 1.8
	MeOH	94.2 ± 2.5	3.3 ± 2.1	60.8 ± 2.5	20.2 ± 4.3
SFE	Hex	53.8 ± 3.1	64.7 ± 4.4	12.3 ± 4.7	20.4 ± 4.7
	AcOEt	33.7 ± 2.1	49.8 ± 1.5	8.8 ± 3.6	34.8 ± 4.3
	MeOH	75.3 ± 3.6	0.2 ± 3.9	47.7 ± 4.6	21.7 ± 3.0

The results are expressed as means ± standard deviations of the values obtained from the triplicate assays.

The Minimum Bactericidal Concentrations (MBC) was performed for the extracts that showed activity against at least two microorganisms. Figure 1 shows the plating performed to determine the CBM.

Extracts tested for CMB were CE-MeOH, ESA-Hex, ESA-AcOEt, ESA-MeOH, UAE-MeOH, ASE-MeOH, SFE-AcOEt and SFE-MeOH. It was observed that the SFE-MeOH extract showed bactericidal activity, while the others were considered bacteriostatic.

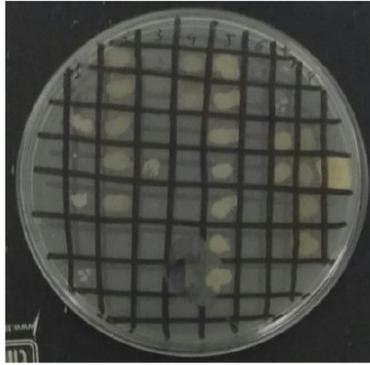


Figure 1. Representation of the plating performed to determine the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of the organic extracts of *P. moniliformis*.

Activity Antibiofilm

The antibiofilm activity of extracts of *P. moniliformis* that were considered bacteriostatic was evaluated against *S. aureus* bacteria. All extracts tested inhibited biofilm formation at the two concentrations tested (Table 2).

Biofilm inhibition was higher for the ESA-MeOH extract at concentrations of 4 mg/mL and 0.4 mg/mL (81.1% and 79.0%, respectively). The lowest activity was presented by SFE-MeOH with 65.8% for the concentration of 4mg/mL and 74.4% for the concentration of 0.4 mg/mL, this may be related to the bactericidal action of this extract, preventing the viability of the microorganism and consequently preventing it from forming the biofilm.

Table 2. Percentages of biofilm inhibition after exposure of organic extracts to *S. aureus*.

Extracts	<i>S. aureus</i>	
	4 mg/mL	0,4 mg/mL
CE MeOH	76.5 ± 0.6	73.2 ± 1.6
ESA MeOH	81.1 ± 1.2*	79.0 ± 0.8*
UAE MeOH	67.2 ± 1.6	78.0 ± 1.6
ASE MeOH	73.6 ± 1.0	67.8 ± 2.1
SFE MeOH	65.8 ± 1.4	74.4 ± 0.4
GC -	0.0 ± 0.9	

Growth Control = GC. Results are expressed as means ± standard deviation of triplicate results.

Studies have demonstrated the antibiofilm activity against different microorganisms of extracts of plants of the caatinga, indicating that this biome has several species with a high potential of use in the development of prototypes of drugs with property antibiofilms (TRENTIN *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2015). Malafaia *et al.* (2017) verified the antibiofilm activity in 22 extracts of caatinga plants against *Ralstonia solanacearum*, one of the most destructive pathogens identified so far, due to its ability to induce fast and fatal symptoms in host plants. In the present study, researchers also confirmed their antibiotic activity against resistant strains of *Staphylococcus epidermidis*, *P. aeruginosa* and *K. pneumonia*, demonstrating this as a plant species rich in biomolecules with such activity (TRENTIN *et al.*, 2011 and 2015). Inhibition of bacterial adhesion with consequent inhibition of biofilm formation by a pathway that does not cause bacterial destruction is an important feature in relation to a novel concept of antiviral therapies. This technique explores new mechanisms of action that may hinder the rapid

development of bacterial resistance. In addition, this approach allows bacterial growth, maintains cells in planktonic state, and admits the extinction of virulence expression and attenuation of the pathogen, making the microorganisms more susceptible to other antimicrobials and the immune system (CLATWORTHY *et al.*, 2007; MARTIN *et al.*, 2008; MACEDO, ABRAHAM, 2009).

In this context, natural products are an important source of bioactive molecules and the medicinal plants commonly used in folk medicine can facilitate the search for new functional agents.

Some of the molecules that may be involved with the antibiofilm effect are: polyphenols, coumarins, steroids and terpenes. Sampaio *et al.* (2009) demonstrated that extracts rich in fruit polyphenols from *Caesalpinia ferrea* showed antibiofilm activity in a multispecies biofilm model involving *Streptococcus sp.*, *Candida albicans* and *Lactobacillus casei*. Considering the coumarins, some studies were found with reaction to antibiofilm activity (GIRENNAVAR *et al.*, 2008; PRAUD-TABARIES *et al.*, 2009).

The study highlighted the potential application of *P. moniliformis* as a new and valuable source of prototype compounds. Further studies are needed in order to isolate the components of the plant species and elucidate the most efficient molecules in the fight against pathogenic microorganisms and antibiofilm activity.

CONCLUSIONS

The antimicrobial and antibiofilm properties of the organic extracts of the leaves of *P. moniliformis* obtained by different techniques against several pathogenic microorganisms were evidenced, suggesting the possible use of this plant as antimicrobial agent of commercial application. In addition, due to the antibiofilm action, it is considered an alternative for the coating of bioactive compounds and mainly hospital materials that are commonly contaminated by bacteria, causing serious health risks to patients.

References

- CLATWORTHY, A.E.; PIERSON, E.; HUNG, D.T. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. **Nature Chemical Biology**, v.3, p.541-548, 2007.
- CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement**. CLSI document M100-S21. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.
- COSTA, M. D. C. M. F. D.; SILVA, A. G. D.; SILVA, A. P. S. D.; LIMA, V. L. M.; BEZERRA-SILVA, P. C.; ROCHA, S. K. L. D.; NAVARRO, D. M. D. A. F.; CORREIA, M. T. D. S.; NAPOLEÃO, T. H.; SILVA, M. V. D.; PAIVA, P. M. G. Essential Oils from Leaves of Medicinal Plants of Brazilian Flora: Chemical Composition and Activity against *Candida* Species. **Medicines**, v.4, p.1-27, 2017.
- DUARTE, S.; KOO, H.; BOWEN, W. H.; HAYACIBARA, M. F.; CURY, J. A.; IKEGAKI, M.; PARK, Y. K.; ROSALEN, P. L. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on

- growth and adherence of mutans streptococci. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.26, n.4, p.527-531, 2003.
- GIRENNAVAR, B.; CEPEDA, M.L.; SONI, K.A.; VIKRAM, A.; JESUDHASAN, P.; JAYAPRAKASHA, G.K.; PILLAI, S.D.; PATIL, B.S. Grapefruit juice and its furocoumarins inhibits autoinducer signaling and biofilm formation in bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.125, p.204-208, 2008.
- HOIBY N, B.J.; ARNSHOLT, T.; GIVSKOV, M.; MOLIN, S.; CIOFU, O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **Int J Antimicrobial Agents**, v.35, p.322-332, 2010.
- IBRAHIM, D.; HONG, L. S.; KUPPAN, N. Antimicrobial activity of crude methanolic extract from *Phyllanthus niruri*. **Nat Prod Commun**, v.4, p.493-496, 2013.
- KOO, H.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; AMBROSANO, G. M. B.; MURATA, R. M.; YATSUDA, R.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M.; PARK, Y. K. Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on mutants *Streptococci*. **Current Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 192-196, 2000.
- LEWIS, K. Platforms for antibiotic discovery. **Nat Rev Drug Discovery**, v.12, p.371-387, 2013.
- MACEDO, A.J.; ABRAHAM, W.R. Can infectious biofilm be controlled by blocking bacterial communication?. **Medicinal Chemistry**, v.5, p.517-528, 2009.
- MALAFAIA, C. B.; JARDELINO, A. C. S.; SILVA, A. G.; DE SOUZA, E. B.; MACEDO, A. J.; CORREIA, M. T. D. S.; SILVA, M. V. Effects of Caatinga Plant Extracts in Planktonic Growth and Biofilm Formation in *Ralstonia solanacearum*. **Microb Ecol**, 2017.
- MARTIN, C.A.; HOVEN, A.D.; COOK, A.M. Therapeutic frontiers: preventing and treating infectious diseases by inhibiting bacterial quorum sensing. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.27, p.635-642, 2008.
- MELO, J. G.; DE SOUSA ARAÚJO, T. A.; THIJAN, N. A. C.V, LYRA, DE V. C. D; DO DESTERRO, R. M.; CARNEIRO DO N. S.; CAVALCANTI, DE A. E. L.; DE ALBUQUERQUE, U. P. Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid northeastern Brazil. **Molecules**, v.15, p.8534-8542, 2010.
- PAREEK, A.; MEENA, R.K.; YADAV, B. Antimicrobial activity of *Syzygium cumini*. **Indian J Appl Res**, v.5, n.9, p.64-66, 2015.
- PRAUD-TABARIES, A.; DOMBROWSKY, L.; BOTTZEK, O.; BRIAND, J.; BLACHE, Y. Synthesis of a polyprenyl-type library containing 1,4-disubstituted-1,2,3-triazoles with anti-biofilm activities against *Pseudoalteromonas* sp. **Tetrahedron Letters**, v.50, p.1645-1648, 2009.
- SAMPAIO, E.V.S.B.; GIUIIETTI, A.M.; VIRGINIO, J.; GAMARRA-ROJAS, C.F.L. **Vegetation and flora of the caatinga**. Northeast Plants Association - APNE; Northeast Plant Information Center - CNIP, 176 p, 2002.
- SAMPAIO, F.C.; PEREIRA, M.; DO, S.; DIAS, C.S.; COSTA, V.C.; CONDE, N.C.; BUZALAF, M.A. In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, v.124, p.289-294, 2009.
- SILVA, L.C.N.; SILVA-JÚNIOR, C.A.; SOUZA, R.M.; MACEDO, A.J.; SILVA, M.V.; CORREIA, M.T.S. Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. **Food and Chemical Toxicology**, v.49, p.2222-2228, 2011.
- SILVA, L. C. N.; TRENTIN, D.D.A.S.; ZIMMER, K.R.; TRETER, J.; BRANDELLI, C.L.; FRASSON, A.P.; TASCA, T.; DA SILVA, A.G.; DA SILVA, M.V.; MACEDO, A.J. Anti-infective effects of Brazilian Caatinga plants against pathogenic bacterial biofilm formation. **Pharm Biol**, v.53, p.464-468, 2015.
- SILVA, L. C. N.; MIRANDA, R. C. M.; GOMES, E. B.; MACEDO, A. G.; ARAÚJO, J. M.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q.; SILVA, M. V.; CORREIA, M. T. S. Evaluation of combinatory effects of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 32, p. 2358-2364, 2013.
- SILVA, L. C.; SANDES, J. M.; DE PAIVA, M. M.; DE ARAÚJO, J. M.; DE FIGUEIREDO, R. C.; DA SILVA, M. V.; CORREIA, M. T. Anti-*Staphylococcus aureus* action of three Caatinga fruits evaluated by electron microscopy. **Nat Prod Res**, v.16, p.1492-1496, 2012.
- TRENTIN, D. S.; GIORDANI, R. B.; ZIMMER, K. R.; SILVA, A. G.; SILVA, M. V.; CORREIA, M. T. S.; BAUMVOL, I. J. R.; MACEDO, A. J. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **Journal of Ethnopharmacology**, v.137, n.1, p.327-335, 2011.
- TRENTIN, D. S.; ZIMMER, K. R.; SILVA, M. V.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Medicinal plants from brazilian Caatinga: antibiofilm and antibacterial activities against *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista Caatinga**, v. 27, n. 3, p. 264-271, 2014.
- TRENTIN, D.S.; SILVA, D.B.; FRASSON, A.P.; RZHEPISHEVSKA, O.; DA SILVA M.V.; PULCINI, E.L.; JAMES, G.; SOARES, G.V.; TASCA, T.; RAMSTEDT, M.; GIORDANI, R.B.; LOPES, N.P.; MACEDO, A.J. Natural Green coating inhibits adhesion of clinically important bacteria. **Sci Rep**, v.5, p.1-10, 2015.
- VIEIRA, P. DE B.; FEIJÓ SILVA, N.L.; SILVA, D. B.; LOPES, N. P.; DA SILVA, A. G.; DA SILVA, M. V.; BASTIDA, J.; MACEDO, A. J.; TASCA, T. The Caatinga endemic *Manilkara rufula* possesses remarkable activity against *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. **Exp Parasitol**, v.173, p.18-28, 2017.
- YADAV, A. K.; SARASWAT, S.; SIROHI, P.; RANI, M.; SRIVASTAVA, S.; SINGH, M. P.; SINGH, N. K. Antimicrobial action of methanolic seed extracts of *Syzygium cumini* Linn. on *Bacillus subtilis*. **AMB Express**, v.1, p.196, 2017.
- YENUGU, S.; HAMIL, K.G.; FRENCH, F.S.; HALL, S.H. Antimicrobial actions of human and macaque sperm associated antigen (SPAG) 11 isoforms: influence of the N-terminal peptide. **Mol Cell Biochem**, v.284, p.25-35, 2006.

APÊNDICE B - Artigo Evaluation of cytotoxic potential, oral toxicity, genotoxicity, and mutagenicity of organic extracts of *Pityrocarpa moniliformis* publicado em JOURNAL OF TOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL HEALTH, PART A: CURRENT ISSUES

JOURNAL OF TOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL HEALTH, PART A
2019, VOL. 82, NO. 3, 216–231
<https://doi.org/10.1080/15287394.2019.1576563>



Evaluation of cytotoxic potential, oral toxicity, genotoxicity, and mutagenicity of organic extracts of *Pityrocarpa moniliformis*

Tamiris Alves Rocha ^a, Danielle Feijó de Moura ^a, Marlllyn Marques da Silva^b, Talita Giselly dos Santos Souza ^c, Maria Aparecida da Conceição de Lira^d, Dayane de Melo Barros ^e, Alexandre Gomes da Silva^{f,g}, Rafael Matos Ximenes^b, Emerson Peter da Silva Falcão^d, Cristiano Aparecido Chagas^h, Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior^h, Noêmia Pereira da Silva Santos^b, Marcia Vanusa da Silva^{a,g}, and Maria Tereza dos Santos Correia^{a,g}

^aLaboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil; ^bLaboratório de Nanotecnologia, Biotecnologia e Cultura de Células (NANOIOCEL), Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil; ^cLaboratório de Biotecnologia e Fármacos, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brazil; ^dLaboratório de Síntese e Isolamento Molecular (SIM), Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão; ^eLaboratório de Microbiologia de Alimentos, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil; ^fDepartamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil; ^gNúcleo de Bioprospecção da Caatinga, Instituto Nacional do Semiárido, Paraíba, Brazil; ^hLaboratório de Biotecnologia e Fármacos, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brazil

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the cytotoxicity of organic extracts of *P. moniliformis* *in vitro* and identify the acute toxicity and genotoxicity *in vivo*. The leaves were extracted using three organic solvents (cyclohexane [EP1], ethyl acetate [EP2], and methanol [EP3]). Phytochemical qualitative analysis was performed by thin layer chromatography (TLC). Cytotoxicity tests were performed on human embryonic kidney (HEK) cells and J774 murine macrophages. Acute toxicity in mice was measured after intraperitoneal (ip) administration of 2000 mg/kg, while evaluation of genotoxicity and mutagenicity were assessed using the comet assay and the micronucleus (MN) test, respectively. The TLC analysis of the extracts revealed the presence of flavonoids, triterpenes, steroids, and saponins. In the cytotoxicity assay, extracts EP1 and EP3 altered proliferation of HEK cells, and all organic extracts increased the viability of J774 cells. In the toxicity tests, no deaths or behavioral alterations were observed in mice exposed to the acute dose of the extracts. Although some extracts led to changes in hematological and histological parameters, these results did not indicate physiological changes. In relation to the MN test and comet assay, no significant changes were detected in the DNA of the animals tested with the extracts EP1, EP2, and EP3. Thus, extracts of *P. moniliformis* were not considered to be toxic and did not induce formation of MN or damage to cellular DNA in the genotoxicity tests.

KEYWORDS

Genotoxicity; medicinal plants; *Pityrocarpa moniliformis*; risk assessment; toxicological safety

Introduction

The use of medicinal plants has increased considerably over the past few years, and these substances are now widely used in empirical popular medicine for treatment of various diseases owing to their diverse therapeutic properties (Gontijo et al. 2018; Meneguelli et al. 2017; Tuttis et al. 2018). In addition, the low purchasing power of most of the population has increased the demand for alternative medicines that reduce drug costs (Almeida et al. 2006, 2005), which has, directly and indirectly to the discovery of new drugs. Although the importance of plant species for therapeutic applications is well established, studies on

plant-induced toxicity are scarce (Franco et al. 2015). In light of this fact, it is necessary to provide vital information on the toxicological and pharmacological profiles of a medicinal plant to identify its safety and efficacy (Jesus et al. 2012; Rody et al. 2018). Toxicity testing is a necessary parameter for any *in vivo* or *in vitro* study including acute and chronic toxicity, genotoxicity, mutagenicity, or cytotoxicity, which aim to (1) characterize the potential toxic effects of the active components of a product, (2) estimate the degree of danger related to the use of the product, and (3) determine the underlying mechanisms of product-induced toxicity (Purchase et al. 1998).

CONTACT Tamiris Alves Rocha tamialvesinsl@gmail.com Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

Color versions of one or more of the figures in the article can be found online at www.tandfonline.com/uteh.

© 2019 Taylor & Francis

Caatinga is a biome located in the northeastern region of Brazil that, when compared to other plant formations, exhibits complex and peculiar characteristics to which it influences the synthesis of plant metabolites such as: high solar radiation, high annual average temperature, low relative humidity (which determines the main ecological processes of this ecosystem), as well as the seasonality of drought and rainy seasons (Prado 2003).

Thus, this seasonality differentiates this semi-arid region from others along the same latitudinal range provides the observed vegetation. However, periods of abundance and water stress influence the production of secondary metabolites and consequent bioactivities of these plants (Larcher 2004). As for the phytochemical profile of the secondary metabolites, several compounds such as flavonoids, alkaloids, terpenes, and protoantocyanidins were identified. These metabolites are commonly extracted based upon eluotropic series solvents (solvents in order of polarity). It is thus possible to select the best solvent to be used for a given separation (Collins, Braga, and Bonato 2006; Vogel 2002). The secondary metabolites are directly related to the potential biological activities generated by the caatinga plants that might act as antiviral, antioxidant, anti-hemorrhagic, hormonal, anti-inflammatory and antimicrobial agents (Guimarães, Serafini, and Quintans-Júnior 2014; Moura 2015).

Among the caatinga species with potential biological activities, *Pityrocarpa moniliformis* (Benth.) Luckow & R.W. belonging to the family Fabaceae – Leguminosae aroused interest of the scientific community through its use as an antimicrobial and antioxidant agent (2013; Silva et al. 2011; Trentin et al. 2015). As for the empirical use, *P. moniliformis* popularly known as “catanduva” has been commonly employed in the treatment of inflammation in the prostate in the form of infusion tea or licker (Silva et al. 2015); however, data on potential adverse effects remain scarce, which makes it necessary to conduct studies assessing the risk/benefit ratio of its use through toxicological testing, based upon traditional knowledge, information is not sufficient to legitimize this species for use as a safe and effective medicine (França et al., 2008).

The toxicological testing is intended to (1) characterize potential adverse effects of the active components, (2) estimate the degree of danger and (3)

elucidate the mechanism underlying toxicity induced by plant species (Purchase et al. 1998). Bearing this in mind, this investigation aimed to assess *in vivo* toxicity, cytotoxicity and genotoxicity of the organic extracts obtained from *P. moniliformis* leaves.

Materials and methods

Collection of material and preparation of extracts

The leaves of *P. moniliformis* (verified at <http://www.theplantlist.org>), known as Catanduva, were collected in the Parque Nacional do Catimbáú, in Buíque, Pernambuco-Brazil, in 2015 (8°36'35" S and 37°14'40" W). The samples were identified in accordance with accepted taxonomic techniques, deposited in the IPA Herbarium of the Agronomic Institute of Pernambuco (code 84.048). The plant material was placed in a forced air circulation oven (40–45°C) for a period of 3–4 days and processed in a bench mill. Subsequently, 20 g of plant material, together with 10 g of diatomaceous earth were extracted successively with cyclohexane (EP1), ethyl acetate (EP2), and methanol (EP3) in ASE 350 Dionex automatic extractor, for 15 min at 40°C and 1500 psi, with a solvent flow of 5 ml/min. The extracts filtered into the ASE were dried in the Rocket Evaporator™ and left at room temperature (22–23°C) until the solvent was completely removed.

Phytochemical analysis

The phytochemical qualitative analysis was performed by thin layer chromatography (TLC) in accordance with the method of Wagner, Bladt, and Zgainsky (1984). Pre-coated plates of silica gel 60 F254 (Merck*) and suitable visualization techniques (Dragendorff, Neu-PEG-KOH ethanol, Liebermann-Burchard, vanillin-sulfuric acid, and other reagents as per the method) were used.

The extracts EP2 and EP3 were also submitted to High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) in order to identify their major phytochemicals. It should be noted that EP1 was not included in this test because of the reduced number of chemical constituents found in the TLC analysis. The samples were dissolved in methanol and acetonitrile (MeOH:

ACN 75:25) and sonicated for 15 min until complete solubilization, resulting in a final concentration of 5 mg/ml. Subsequently, samples were treated with EFS cartridges (phase-solid extraction) aimed at removal of compounds that interact permanently with stationary phase, then were injected 10 μ L in the HPLC (Agilent 1260 infinity with quaternary pump, automatic injector, column oven and DAD detector) equilibrated with the mobile phase (Milliq) CH₃COOH 1% (A) and acetonitrile (Lichrosolv \square) (B), following a linear gradient from 95% (A) to 5% (A) (0 to 30 min) with flow 2.4 ml/min and a temperature of 30°C. The separation occurred on a Zorbax \square , SB-C18 5 μ m column; 4.6 x 250mm with pre-column Zorbax \square , SB-C18 5 μ m; 4.6 x 12.5 mm with complete detection from 190 to 400 nm and acquisition of the working chromatogram at 254 nm.

Cytotoxic activity

Cytotoxic activity was evaluated by using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (Mosmann 1983). The cell lines J774.A1 (murine macrophages) and HEK-293 (Human Embryonic Kidney) cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium culture supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotic solution (penicillin and streptomycin). The cells were cultured in an incubator maintained at 37 °C with a humidified atmosphere enriched with 5% CO₂. Both cell types were seeded in 96-well plates (10⁴–10⁵ cells/ml) and incubated for 24 hr. Subsequently, the extracts (EP1, EP2, and EP3) dissolved in 1% dimethyl sulfoxide (DMSO), were added to the wells at final concentrations of 200, 100, 50, 25, or 12.5 μ g/ml. Following incubation for 24 and 48 hr exposure intervals as utilized by Yu et al. (2014) and Al-Faifi et al. (2017), 25 μ L MTT (5 mg/ml) was added and cells were incubated for a further 3 hr. The supernatant was then aspirated, 100 μ L DMSO was added to each well, and absorbance read at 490 and 630 nm using a microplate reader (Elx808 Biotek). The experiments were performed in quadruplicate and results were expressed as % control cell viability: (A570 of treated cell population \times 100/A570 of the untreated cell population) (Santos et al. 2005).

Animals

In vivo assays were performed using Swiss male mice (*Mus musculus*) with a body weight of 38–50 g. The animals were kept in the Biotherm of the Centro Acadêmico de Vitória/Universidade Federal de Pernambuco in appropriate polypropylene boxes, at a temperature of 21 \pm 1°C, a relative humidity of 50% \pm 5%, a 12:12 hr light/dark cycle, and given free access to food (Labina) and water. The Animal Ethics Committee of the Federal University of Pernambuco approved all the experimental procedures (case number 008/2018).

Acute oral toxicity in vivo

The acute oral toxicity of the organic extracts obtained from *P. moniliformis* was determined by the 2000 mg/kg limit dose test in accordance with OECD/OECD guideline 423 (OECD, 2008). Mice were culled in four groups (n = 3 animals). The control group were administered 10% DMSO and PBS, which was used as the diluent for the extracts; and the remaining three groups were administered hexane extract (EP1), ethyl acetate extract (EP2), and methanolic extract (EP3). All treatments were administered orally.

After administration, animals were observed continuously for the first 2 hr and then every 24 hr for 14 days to evaluate any changes in behavior, physiological activity, and mortality. On the 14th day of treatment, mice were euthanized and blood samples collected for hematological and biochemical analysis and organs including liver, kidneys, and spleen, which were removed for histological analysis. The experiments were performed in duplicate and the biochemical and hematological parameters were evaluated by Student's t-test, p \leq 0.05.

Tissue preparation and histomorphometric analysis

Fragments of liver, kidney, and spleen were fixed in neutral buffered formalin 10% for 48 h. Tissues were then dehydrated in ethanol, solubilized in xylene, impregnated and embedded in paraffin. The blocks were cut in microtome (Leica RM2245) adjusted to 4 μ m, stained with hematoxylin and eosin (H.E.). The

slides were photographed with a digital camera (Moticam 3000) coupled to an optical microscope (Nikon E-200), under fixed focus and clarity to the field, with 100x and 400x magnification. Photomicrographs were evaluated by using the ImageJ software version 1.8.0_112 (Research Services Branch, US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Genotoxicity test

Groups of mice (n = 5 animals) were treated with 10% DMSO (negative control), cyclophosphamide (25 mg/kg; positive control), or organic extracts (EP1, EP2, and EP3) at a dose of 1000 mg/kg body weight, according to Collins et al. (2008) and Oliveira et al. (2016). Only cyclophosphamide, a mutagenic agent was administered intraperitoneally (ip). Mice were anesthetized ip at 48 hr after treatment, and peripheral blood was collected by retro-orbital puncture (Collins et al. 2008). The experiments were performed in duplicate. Soon after blood collection, the animals were euthanized in accordance with CEUA/UFPE parameters.

Comet assay

The comet assay was performed in accordance with the method of Umbunzeiro and Roubicek (2006). The collected blood was homogenized with low melting point agarose and deposited on slides previously prepared with a standard agarose coating. The slides were covered with coverslips and then placed in a refrigerator at 4 °C for 10 min. After cooling, the coverslips were removed, and slides immersed in lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM TRIS, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10). The entire procedure after collection of the material was performed under red light (in the absence of white light), to avoid DNA damage. After 48 hr, the lysed cells were subjected to electrophoresis at 300 mA and 32 V for 20 min in a well of alkaline solution (1 M NaOH and 200 mM EDTA, pH 13). Subsequently, the slides were neutralized in 0.4 M Tris-HCl, pH 7.5, and stained with 30 μ l ethidium bromide (0.0002%, w/v).

The evaluation was performed in an epifluorescence microscope (Zeiss M2) with an Alexa Fluor

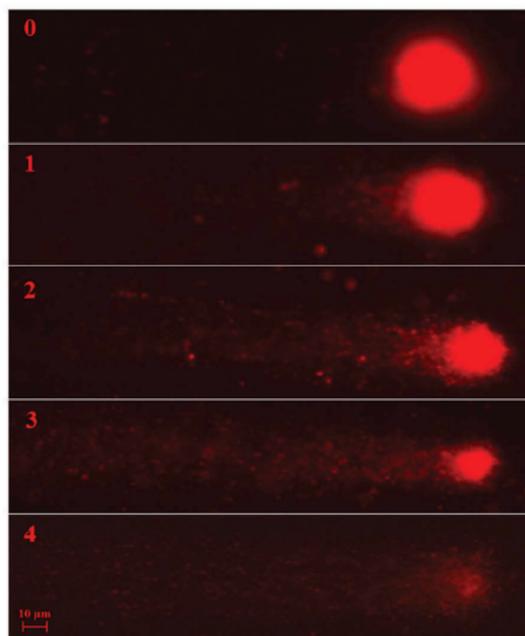


Figure 1. Classification of DNA damage of cells submitted to comet assay; 0 (no apparent damage); 1 (little apparent damage); 2 (average damage); 3 (moderate damage with longer tail) and 4 (maximum damage).

546 filter. Two slides were prepared for each animal; 100 nucleoids per animal were observed and the relationship between the length of the tail and the size of the head of the comet was measured (Collins et al. 2008; Coelho et al. 2018). Each analyzed nucleoid was visually classified into one of 5 classes: 0 (no apparent damage); 1 (with little apparent damage); 2 (average damage); 3 (medium damage with longer tail), and 4 (maximum damage). Thus, the values obtained for each individual ranged from 0 (no damage: 100 cells \times 0) to 400 (with maximum damage: 100 cells \times 4) and were considered to represent the damage index (ID) per animal. The frequency of damage (FD) was also calculated in accordance with % all nucleoids with some damage (class 1 to class 4) in relation to the total number of nucleoids counted from class 0 to class 4 (total number) (Figure 1) (Collins et al. 2008).

Micronucleus (MN) test

For this test, the technique described by Hayashi et al. (1994) was used. Peripheral blood (8 μ l) was placed on slides previously prepared with acridine orange and covered with a cover slip to ensure an

even spread the material. For each animal, 2000 polychromatic erythrocytes were analyzed for the presence of MN. The analyses were performed utilizing an epifluorescence microscope (Zeiss M2) with an Alexa Fluor 488 filter (OECD 2016).

Statistical analysis

The results of the cytotoxic activity are expressed as the mean \pm SD. Analysis of variance (ANOVA) was performed and followed by the Bonferroni test for multiple comparisons, with values of $p < 0.05$ considered significant. For the histomorphometric analysis, a normality test was performed using the Smirnov Kolmogorov program; this verified that the data were not normally distributed. Therefore, a non-parametric (Mann-Whitney U) test computed by SPSS 15.0 (Statistical Package for the Social Sciences) was used to analyze these data. Data are expressed as the mean \pm SD, with values of $p < 0.05$ compared with the control considered significant.

In addition, for genotoxic analysis, the Kruskal-Wallis test, computed by with software R, was employed to compare the treatments with each other (with the exception of the positive control group). To verify the efficiency of the methods, the positive control group was compared with the negative control group by using the Mann-Whitney U test. In both tests, p values of <0.05 were considered statistically significant.

Results and discussion

Phytochemical screening

The results of the phytochemical screening are presented in Table 1. TLC analysis revealed that the obtained extracts contained varying compositions of secondary metabolites. The extracts EP2 and EP3 contained flavonoids, triterpenes, steroids, saponins, monoterpenes, sesquiterpenes, proanthocyanidins, and leucoanthocyanidins, whereas EP1 extract contained only triterpenes, steroids, monoterpenes, and sesquiterpenes. In the EP3 extract, higher content of saponins was found through the use of methanol, which is justified given the polarity of the compound, as methanol is most polar among the solvents tested. It should be noted that, as

Table 1. Phytochemical profile of the organic extracts of *P. moniliformis* leaves.

Class of Secondary Metabolites	EP1	EP2	EP3
Flavonoids	-	+(1)	++(1)
Phenylpropanoids	-	-	-
Triterpenes and Steroids	+	+	+
Saponins	-	+	+++
Monoterpenes and Sesquiterpenes	tr	tr	tr
Alkaloids, Coumarins and Quinones	-	-	-
Proanthocyanidins and Leucoanthocyanidins	-	-	tr
Hydrolysable tannins	-	-	-

(-) absent; (+) weak; (++) medium; (+++) strong; (tr) traces.

(1) 3',4'-OH flavonoids (aglycones), mono, di, and triheterosides of 3'-OH and 3',4'-OH flavonoids.

saponins are glycosides, that is, polar substances (Monteiro et al. 2005), a solvent with higher polarity may have greater success against extraction of this phytochemical agent (Vardanega 2013). Silva et al. (2013) investigated the phytochemical composition of the hydroalcoholic extract of the leaves of *P. moniliformis* and also identified the same secondary metabolites, which revealed that the main classes of compounds present in the extract were triterpenes, saponins, and flavonoids.

The compounds belonging to the various classes of secondary metabolites detected in the extracts of *P. moniliformis* were reported to exert antimicrobial (Shandukani et al. 2018; Yuniati et al. 2018), antioxidant (Liu et al. 2018; Mikropoulou et al. 2018), anti-inflammatory (Endale et al. 2013; Yin et al. 2018), antiviral (Sarwar et al. 2018) and antihypertensive (Bhargava et al. 2017) effects. Despite the innumerable biological activities of components extracted from medicinal plants, these metabolites were previously reported to exert cytotoxic, genotoxic, and/or mutagenic action (Varanda 2006), which may contribute significantly to the development of cancer (Meyer et al. 2011). Thus, it was emphasized for the need to evaluate the adverse effects of extracts obtained from *P. moniliformis*.

The extracts EP2 and EP3 were submitted to HPLC analysis and, through a DAD detector, the compounds with the highest area and with highest ultraviolet (UV) absorption were defined as major ones by means of a scan between 190 and 400 nm (Figure 2). At the time the compounds with maximum UV absorption of λ_{\max} 254 were defined as major. Analysis by HPLC showed the presence of two major compounds in EP2 with Retention times (Rt) 9.09 and 12.5 min. While EP3 presented the compound with Rt of 1.73 as the

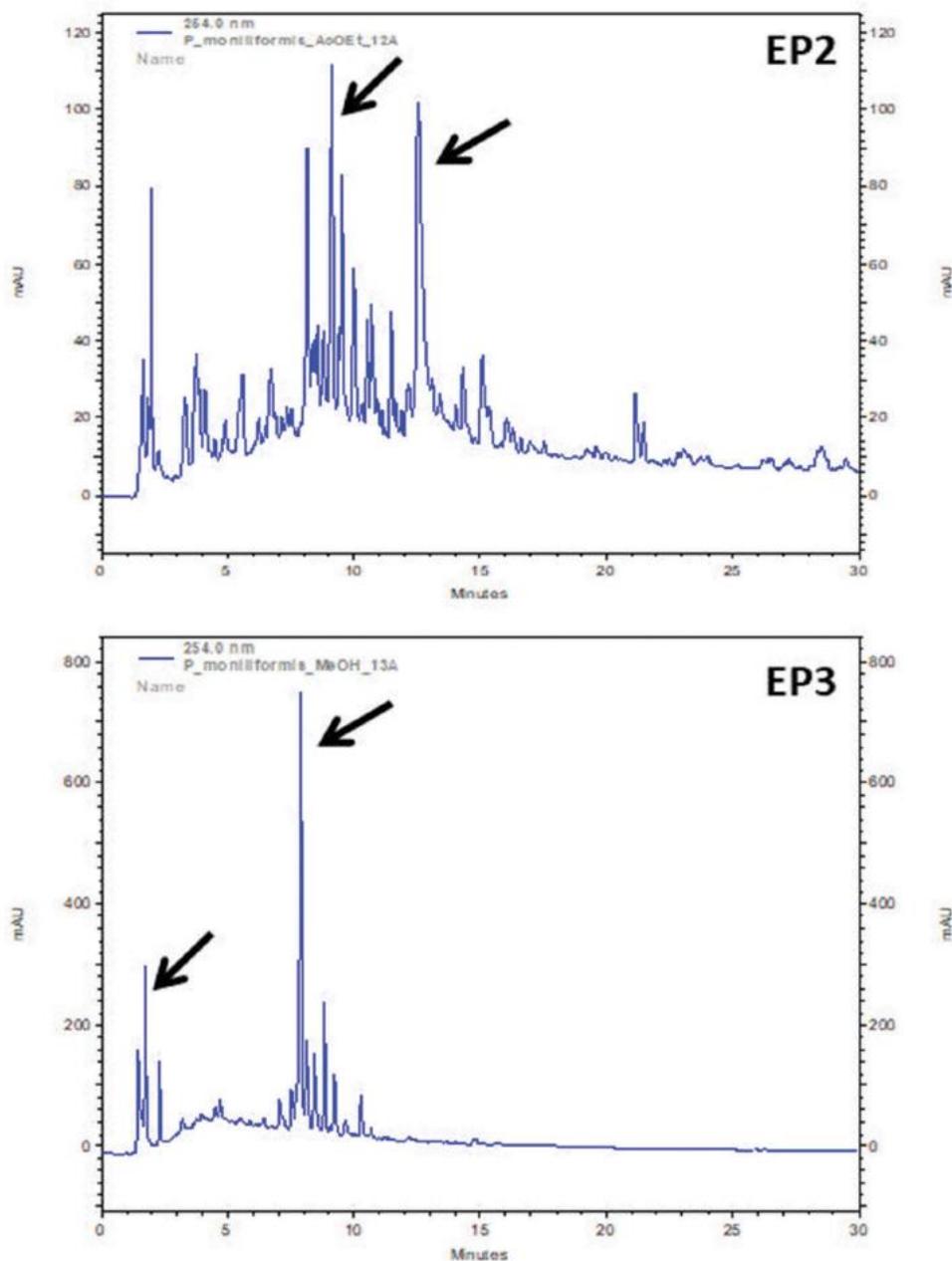


Figure 2. Chromatogram (HPLC/UV, $\lambda = 254$ nm) of extracts obtained from *P. moniliformis*. Arrows indicating chromatographic peaks of major compounds.

major, followed by the compound with Rt of 7.90, in which has not yet been identified.

Recent phytochemical studies of extracts with different solvents of *P. moniliformis* demonstrated the presence of some compounds such as α -tocopherol and α -tocotrienol, as well as quercetagenin-3'-methoxy-7-O-glucoside, isorhamnetin-7-O-glucosyl (1 \rightarrow 6) rhamnoside and syringetin 3-O- α -rhamnoside-7-O- β -glucoside (Silva 2013). However, the Rt values

did not coincide with the values of the compared standards, and more detailed studies regarding this analysis are necessary.

Cytotoxic activity

In the cell viability assay for the J774A.1 lineage, data obtained showed that the extracts analyzed were not cytotoxic; indeed, increased cell proliferation was found (Figure 3). In EP1 there was proliferation of

222 T. A. ROCHA ET AL.

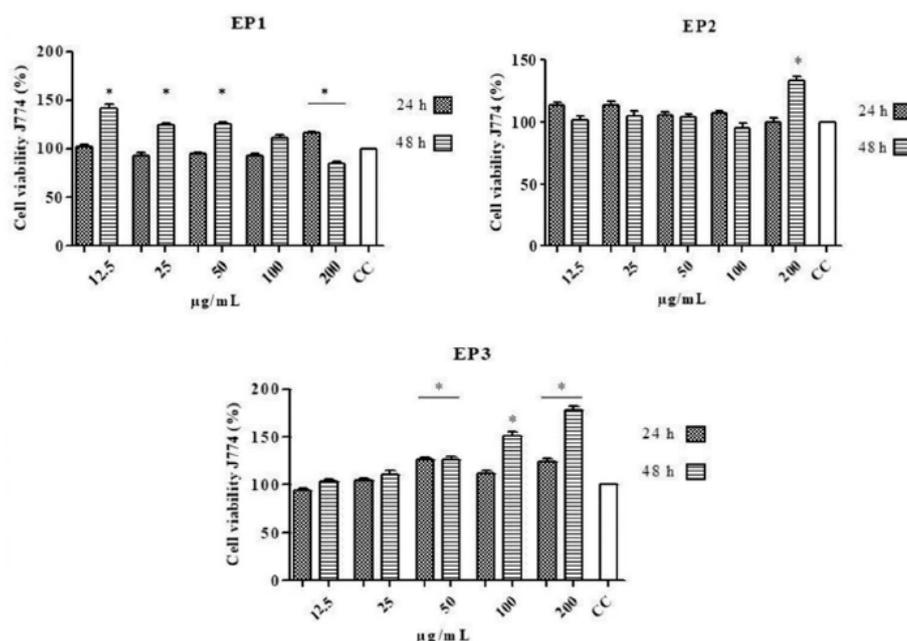


Figure 3. Percentage viability of J774.1 cells. The cells were treated with different concentrations of the organic extracts of *P. moniliformis* for 24 and 48 hr. NC: Negative control; EP1: Hexane extract; EP2: Ethyl acetate extract; EP3: Methanolic extract. *P < 0.05 compared with the growth control.

macrophages following 24 hr treatment at 200 µg/ml ($115.87\% \pm 3.24\%$). The rise in cell viability also occurred over treatment for 48 hr when compared with control; at concentrations of 12.5, 25, 50, or 200 µg/ml, cell viability of $141.4\% \pm 8.07\%$, $124.3\% \pm 4.05\%$, $125.4\% \pm 5.08\%$, and $84.14\% \pm 7.05\%$ was observed, respectively. EP2 (200 µg/ml) also resulted in enhanced cell proliferation, with a viability greater than 100% ($133.6\% \pm 5.86\%$) noted after 48 hr incubation. EP3 also induced similar responses at concentrations of 50 and 200 µg/ml ($126.18\% \pm 4.59\%$ and $123.80\% \pm 6.8\%$, respectively) after 24 hr and at 50, 100, and 200 µg/ml ($126.3\% \pm 6.80\%$, $151\% \pm 7.79\%$, $178\% \pm 7.27\%$, respectively) after 48 hr. The stimulation of macrophage cell growth might be attributed to the antioxidant capacity of *P. moniliformis*, as sensitization of macrophages to lipopolysaccharide (LPS) leads to a series of chemical reactions found to induce inflammatory responses. During the inflammatory process, reactive oxygen species (ROS) are formed, promoting oxidative stress. Subsequently, this is neutralized by antioxidant activity in *P. moniliformis* (Cyboran et al. 2015; Silva et al. 2011).

Thus, organic extracts of *P. moniliformis* provide a quantitative elevation of viable macrophages compared to controls. Among the bioactive compounds of *P. moniliformis* that display the capacity to protect the immune system, the following stand out: flavonoids, saponins, triterpenes and steroids, indicating potential capacity to become therapeutic drugs due to their influence on the defenses of the phagocytic system, acting to combat infections and chronic diseases (Khajanchi and Banerjee 2017). The action of flavonoids on B and T lymphocytes, macrophages, natural killer (NK) cells, basophils, neutrophils, eosinophils, and monocytes are well known (Cerqueira et al. 2003; Chirumbolo 2010; Middleton, Kandaswami, and Theoharides 2000). Several studies were carried out that report the activity of flavonoids in the activation of T lymphocytes (CD8) and cytotoxic NK cells. However, it is not known whether any single mechanism of action exists that may clarify this phenomenon, although it is presumed to be due to inhibition of cyclooxygenase (COX), since prostaglandins (PGs) are able to eliminate T lymphocytes (Havsteen 2002). Saponins have been extensively studied and have demonstrated a strong adjuvant

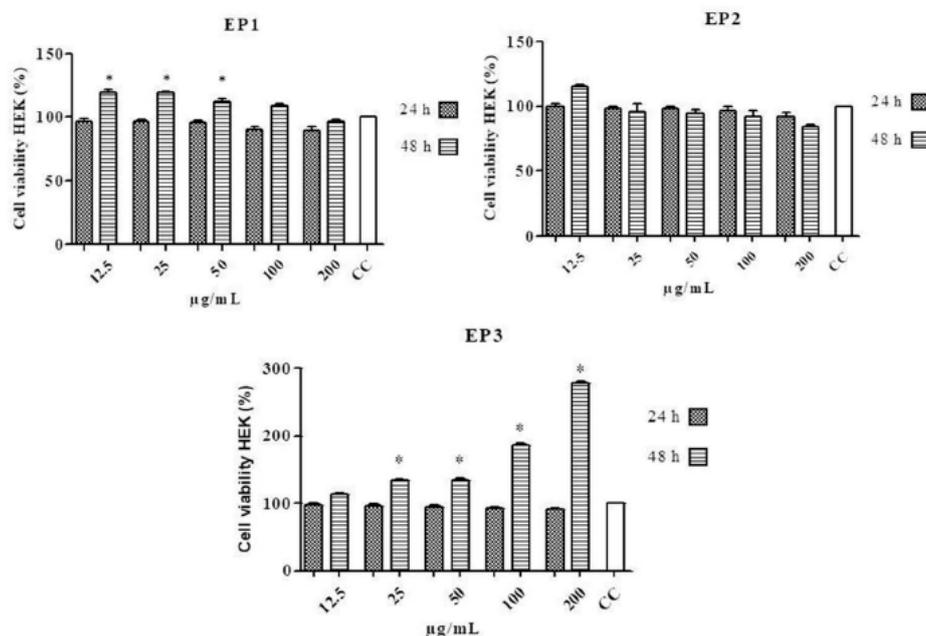


Figure 4. Cell viability of HEK-293 cells after treatment with different concentrations of the organic extracts of *P. moniliformis* leaves for 24 and 48 hr. NC: Negative control; EP1: Hexane extract; EP2: Ethyl acetate extract; EP3: Methanolic extract. * $p < 0.05$ compared with the growth control.

potential that appears to be related to their ability to induce cytokine production. (Mathias 2018; Singh and O'Hagan 2003). Triterpenes and steroids also exhibited numerous advantages such as anti-inflammatory, anti-cancer and immune system protection (Quílez, García-Lorda, and Salas-Salvado 2003).

In HEK 293 cells, it was observed that the extracts did not exert adverse effects after incubation for either 24 and 48 hr. After exposure for 24 hr, there were no significant differences in cell growth relative to controls. However, a significant increase in number of viable cells was noted after treatment with extracts EP1 and EP3 for 48 hr (Figure 4). In EP1, this rise was found after treatment with lower concentrations: 12.5, 25, or 50 µg/ml in cell viability of 119.4%±4.4%, 119.2%±1.31% and 114.0%±6.9%, respectively. The cell proliferation in EP3 extract was detected at concentrations of 25, 50, 100, and 200 µg/ml, which resulted in cell viability of 133.7%±3.3%, 133.8%±5.8%, 185.5%±7.1%, and 277.6%±6.62%, respectively. These data are of importance, as HEK 293 cell line is often used to determine the basic cytotoxicity profiles of candidate drug molecules. In addition,

when comparing the activity of different extracts, it may be confirmed that EP3 was more bioactive, since it provided greater cell proliferation in the cells tested (J774A.1 and HEK-293) (Figure 5).

Acute oral toxicity in vivo

No deaths or any other sign of toxicity were observed in animals treated with 2000 mg/kg extracts throughout the study. Similarly, no significant difference in water or food intake was noted between treated groups and control, in addition to no marked changes in the weight of the animals. No motor and/or sensory alterations were observed.

Serological, blood, and anatomopathological experiments were performed to examine whether treatment induced toxicity in detoxifying organs, such as liver, kidneys, and lungs, or in a rapidly proliferating fraction of cells, such as spleen and circulating blood cells. None of the evaluated biochemical parameters demonstrated significant differences compared with control and between groups treated with 2000 mg/kg body weight of extracts (Table 2).

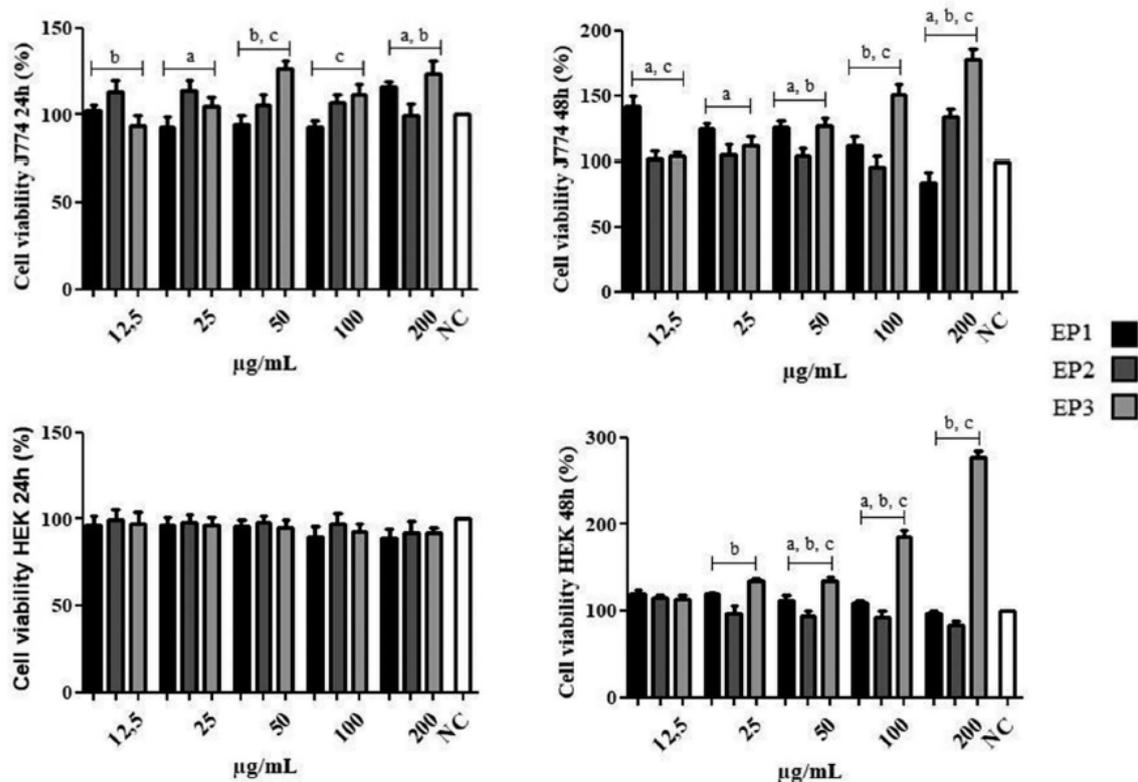


Figure 5. Comparison of cell viability between EP1, EP2 and EP3 extracts against cell lines JJ74A.1 and HEK-293 (24 and 48hr). ^a $p < 0.05$ EP1 vs EP2; ^b $p < 0.05$ EP2 vs EP3; ^c $p < 0.05$ EP1 vs EP3.

Table 2. Biochemical parameters of the blood of mice treated orally with the organic extracts of *P. moniliformis* for 14 days.

Parameters	Control (10% DMSO+PBS)	EP1 (2000 mg/kg)	EP2 (2000 mg/kg)	EP3 (2000 mg/kg)
AST-TGO U/L	142.56 ± 29.42	112.16 ± 0.64	106.65 ± 24.02	131.29 ± 24.02
ALT-TGP U/L	36.61 ± 7.41	81.70 ± 41.57	57.91 ± 34.09	59.68 ± 18.57
Albumin (g/L)	3.06 ± 0.11	2.8 ± 0.26	2.6 ± 0.25	2.96 ± 0.05
Cholesterol (g/dL)	127.81 ± 10.54	112.25 ± 15.78	122.67 ± 15.13	117.56 ± 2.85
Glucose (mg/dL)	183.23 ± 25.65	232.13 ± 67.09	140.36 ± 44.10	222.66 ± 82.85
Total Protein (g/dL)	4.83 ± 0.11	4.4 ± 0.65	4.5 ± 0.36	5.0 ± 0.10
Triglycerides (mg/dL)	171.92 ± 10.19	132.82 ± 12.95	153.38 ± 26.19	144.68 ± 22.13

EP1: Hexanic extract; EP2: Ethyl acetate extract; EP3: Methanolic extract. Statistically significant difference by t-test; ^a $p < 0.05$ compared with the control; ^b $p < 0.05$ EP1 vs EP2; ^c $p < 0.05$ EP2 vs EP3; ^d $p < 0.05$ EP1 vs EP3.

The hematological parameters showed that hematocrit value was relatively lower for groups treated with EP1 and EP2 extracts compared to control. In addition, there was a significant difference between EP1 and EP3. Significant changes in platelet counts were observed in all treated groups compared between each other and with control (Table 3). In view of the obtained results data suggest that the rise in the number of lymphocytes is due to the fact that

in the composition of the extract there are constituents that may produce tissue injury (such as saponin), consequently leading to enhanced lymphocyte recruitment, indicating the activation of the immune system as a defense mechanism of the organism (Fischer et al. 2008). Although the hematological analysis demonstrated significant changes, these results did not lead to physiological changes, as there was no compromise in the general health of

Table 3. Blood hematological parameters of mice orally administered the organic extracts of *P. moniliformis* for 14 days.

Parameters	Control (10% DMSO+PBS)	EP1 (2000 mg/kg)	EP2 (2000 mg/kg)	EP3 (2000 mg/kg)
Hematocrit (HCT) (%)	40.20 ± 3.25	8.00 ± 2.64 ^{a,d}	18.50 ± 12.20 ^a	28.80 ± 9.11
Hemoglobin (g/dL ⁻¹)	10.00 ± 1.02	9.23 ± 6.72	13.30 ± 2.2	12.56 ± 0.55
MCV (fL)	53.57 ± 1.51	105.46 ± 16.45	81.56 ± 32.52	69.16 ± 29.93
MCH (pg)	13.37 ± 0.44	39.40 ± 3.90	39.03 ± 35.04	31.86 ± 14.16
MCHC (g/dL)	25.21 ± 0.25	60.40 ± 19.77	58.06 ± 16.77	47.16 ± 17.32
Platelets (10 ³ /mm ³)	722.57 ± 82.39	193.66 ± 11.01 ^{a, b, d}	896.0 ± 31.74 ^{a, b, c}	390.66 ± 57.45 ^{a, c, d}
Lymphocytes (%)	75.01 ± 6.52	93.83 ± 0.25 ^a	90.86 ± 2.48 ^{a, c}	94.86 ± 1.35 ^a
Leukocytes (%)	2.00 ± 0.79	5.13 ± 3.98	3.90 ± 0.81	8.33 ± 3.90
Erythrocytes (10 ⁶ /mm ³)	7.51 ± 0.58	0.22 ± 0.18	2.81 ± 2.75	4.61 ± 2.30
RDW-CV	27.62 ± 2.04	29.76 ± 1.35	31.16 ± 2.57	31.63 ± 5.39

EP1: Hexanic extract; EP2: Ethyl acetate extract; EP3: Methanolic extract. MCV: mean corpuscular volume; MCH: mean corpuscular hemoglobin; MCHC: mean concentration of corpuscular hemoglobin; RDW-CV: Red cell distribution width. The data are expressed as the mean±SD. Statistically significant difference by t-test, ^ap<0.05 compared with the control; ^bp<0.05 EP1 vs EP2; ^cp<0.05 EP2 vs EP3; ^dp<0.05 EP1 vs EP3.

Table 4. Relative mass of the organs after euthanasia of the male mice treated with the organic extracts of *P. moniliformis*.

Parameters	Control (10% DMSO+PBS)	EP1 (2000 mg/kg)	EP2 (2000 mg/kg)	EP3 (2000 mg/kg)
Spleen (g)	0.150 ± 0.02	0.162 ± 0.01	0.142 ± 0.00 ^c	0.212 ± 0.03
Heart (g)	0.205 ± 0.01	0.207 ± 0.01	0.199 ± 0.00	0.247 ± 0.05
Stomach (g)	0.303 ± 0.00	0.491 ± 0.05 ^a	0.504 ± 0.05 ^a	0.531 ± 0.03 ^a
Liver (g)	2.198 ± 0.20	2.293 ± 0.04	2.144 ± 0.11 ^c	2.640 ± 0.17 ^a
Right lung (g)	0.175 ± 0.08	0.146 ± 0.02	0.122 ± 0.02	0.193 ± 0.06
Left lung (g)	0.072 ± 0.02	0.093 ± 0.01	0.089 ± 0.01	0.102 ± 0.02
Right kidney (g)	0.299 ± 0.01	0.283 ± 0.02	0.288 ± 0.01	0.336 ± 0.04
Left kidney (g)	0.291 ± 0.01	0.295 ± 0.02	0.281 ± 0.01	0.341 ± 0.03

EP1: Hexanic extract; EP2: Ethyl acetate extract; EP3: Methanolic extract. The data are expressed as the mean±SD of n = 3 animals per each group. Statistically significant difference by t-test, ^ap<0.05 vs control; ^bp<0.05 EP1 vs EP2; ^cp<0.05 EP2 vs EP3; ^dp<0.05 EP1 vs EP3.

Table 5. Histomorphometric analysis of the liver, kidney, and spleen of mice exposed to the organic extracts of *P. moniliformis* leaves.

Groups	Liver		Kidney		Spleen		
	Hepatocyte (%)	Kupffer cell (%)	Corpuscle (µm ²)	Glomerulus (µm ²)	Stroma (%)	Red pulp (%)	White pulp (%)
EP1	30.28 ± 7.00 ^{c, d}	18.23 ± 5.11 ^{a, d}	3507.4 ± 1474.5 ^{a,d}	2617.2 ± 1186.5 ^{a,d}	3.86 ± 1.62	43.63 ± 11.50	52.50 ± 10.91 ^a
EP2	27.35 ± 7.48 ^{b, c}	17.51 ± 9.09 ^c	3445.9 ± 1306.1 ^{a, c}	2600.4 ± 1039.4 ^c	3.51 ± 1.52	43.60 ± 11.57	53.07 ± 11.06
EP3	37.65 ± 9.42 ^{a, c, d}	27.13 ± 7.34 ^{a, c, d}	4363.1 ± 1962.1 ^c	3297.6 ± 1519.0 ^c	3.79 ± 1.76 ^a	41.63 ± 11.92	53.44 ± 10.92 ^a
Control	28.75 ± 7.9	14.75 ± 4.86	4315.2 ± 1500.0	2961.0 ± 1115.9	3.21 ± 2.22	38.69 ± 14.58	58.09 ± 14.08

EP1: Hexanic extract; EP2: Ethyl acetate extract; EP3: Methanolic extract. Statistically significant difference by Mann-Whitney test at 5%; ^ap<0.05 compared with the negative control; ^bp<0.05 EP1 vs EP2; ^cp<0.05 EP2 vs EP3; ^dp<0.05 EP1 vs EP3. The data are expressed as the mean±SD of n = 3 animals per group.

the animals, which confirmed the low toxicity of the extracts.

Macroscopic analysis did not demonstrate significant changes in vital organs, as no signs of ischemia, bleeding, fibrosis, or degenerative proliferation were observed in the treated mice. A significant increase in the weight the stomach was observed in all treatment groups compared with control. The EP3 extract also induced elevation in relative liver mass (Table 4), possibly due to the increase in the number of hepatocytes verified in the histomorphometric analysis, thus suggesting the presence of liver lesion (Marinho et al. 2017)

Histomorphometric analysis

Histomorphometric analyses of the liver, kidneys, and spleen of mice exposed to organic extracts (EP1, EP2, and EP3) are presented in Table 5. Data demonstrated that there was a significant increase in total number of hepatocytes in animals treated with EP3 (Figure 6). This abnormal proliferation of hepatocytes may be indicative of possible regeneration of liver tissue to circumvent pathological and/or experimental conditions influenced by several factors (Marinho et al. 2017). Investigators showed that some medicinal plants induce hepatotoxicity owing

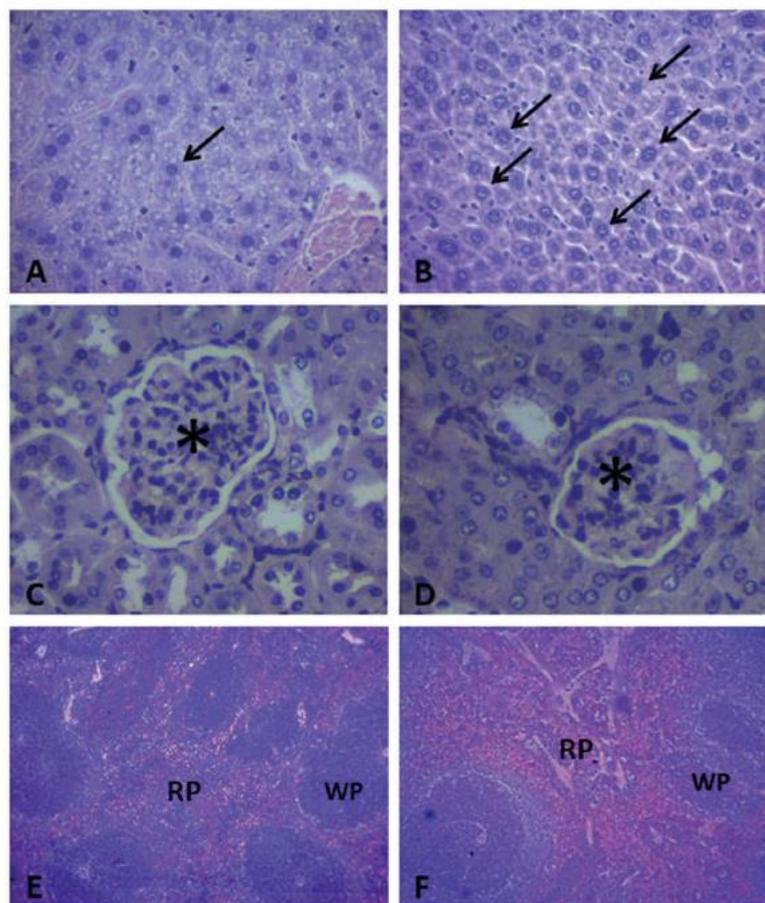


Figure 6. Photomicrographs of different tissues submitted to acute toxicity studies. A (control) and B (treated) – Note an increase in the number of hepatocytes in the liver of animals treated with EP3; Hepatocyte (arrow). C (Control) and D (Treated) – Decreased corpuscle area and kidney glomerulus of animals treated with EP1 and EP2. Glomerulus (asterisk). E (Control) and F (Treated) – Observe reduction of white pulp of the spleen of animals treated with EP1. RP (Red Pulp), WP (white pulp). Hematoxylin-eosin; 400x.

to their constituent substances, especially when these substances are generated by extract from alcohols such as methanol (Paz et al. 2005; Santos et al. 2010). In addition, EP3 contained a higher amount of saponins when compared to other extracts, and the presence of saponins in this extract may account for elevation in number of hepatocytes (Diamantino 2018). The EP1 and EP3 extracts resulted in a rise in Kupffer cells, which may be an indication of inflammatory processes and liver damage (Figure 6). However, additional tests are required, using, for example, pro-inflammatory markers such as TNF and IL-6. These cells play a key role in phagocytosis of foreign particles and are of importance for maintaining liver function in pathological and physiological conditions (Arii and Imanura, 2000). In addition, Kupffer cells contribute significantly to the inflammatory response by eliminating harmful

substances and modulating the immune response. Thus, the cellular activation of the inflammatory processes may be related to the morphological signs of activation and to the increase in the cellular population that release biologically active substances, such as cytokines, to promote the pathological process after activation (Eguchi, McCuskey, and McCuskey 1991; Tsutsui and Nishiguchi 2014). Thus, this increase in number of Kupffer cells may be related to the pathogenesis of hepatic injury due to exposure to toxins, chemicals, and/or pharmacological agents (Ito et al. 2003; Kolios, Valatas, and Kouroumalis 2006; Luckey and Petersen 2001; Ono et al. 2004).

Decreases in the area of corpuscles and renal glomeruli were observed after treatment with extracts EP1 and EP2 (Figure 6) (Table 5), suggesting a deficiency in filtration rate, as the glomerulus is the

initial site of exposure to chemical substances, which may promote modifications in its structure and function. In some situations, these substances may lead to altered permeability and proteins with modification in size and load; and therefore the development of lesions at this site (Klaassen 2007). There was a significant rise in the stroma in the group treated with EP3. Data presented in Table 6 also show that there was a significant decrease in white pulp in the group treated with EP1. It is of interest that white pulp houses T lymphocytes and hence the defenses of an organism reliant on the spleen may be compromised (Aguiar et al. 2008; Christopher 2003; Torres et al. 2000).

Given the obtained data, it is considered that the organic extracts obtained from *P. moniliformis* exhibit low acute toxicity and are classified as class 5 according to the classification recommended by OECD 423, as the estimate of LD₅₀ was higher than 2000 mg/kg (OECD, 2008). Based upon this, it is possible that the oral use of *P. moniliformis* did not produce physiological damage to the lineage of the mice examined in the present study, although an experimental evaluation in humans is necessary in order to strengthen these results. Souza (2017) examined the aqueous extract of *Libidibia ferrea* (belonging to the Fabaceae family) at a dose of 2000 mg/kg, which confirmed that the species did not present any toxicological effect in an experimental animal model. It should be noted that most of the plant species used by the Brazilian population do not exhibit a proven pharmacological or toxicological effect (Bacchi, 1995; Boscolo and Valle 2008). In addition, the caatinga biome is considered the least studied in the country and its contribution to the rich Brazilian biodiversity is still underestimated (Foncesca, 2017; Leal et al. 2005).

Comet assay

In the comet assay, the organic extracts (EP1, EP2, and EP3) of *P. moniliformis* leaves were determined. A dose of 1000 mg/kg, corresponding to half of the dose used for the acute toxicity, was used for all extracts and established owing to the difficulty of dilution of the extracts.

According to the calculated results for the damage index, extracts EP1, EP2, EP3 were not genotoxic

Table 6. Mutagenicity and genotoxicity assessment using the micronucleus test and comet assay.

Groups	Tests		
	MN Mean±SD	ID Mean±SD	FD Mean±SD
EP1	1.2 ± 1.3	127.0 ± 29.3	79.6 ± 17.7
EP2	2.8 ± 1.4	166.2 ± 61.4	92.4 ± 6.3
EP3	3.2 ± 0.8	147.6 ± 44.5	76.8 ± 11.3
Control	1.0 ± 0.7	53.4 ± 33.5	85.6 ± 3.5
Cyclophosphamide	25.4 ± 12.3*	331.4 ± 38.1*	98.2 ± 3.5*

EP1: Hexanic extract; EP2: Ethyl acetate extract; EP3: Methanolic extract. SD: standard deviation; MN: micronucleus; ID: damage index by comet assay; FD: percentage damage factor by comet assay; * Significant difference compared with the negative control, by the Mann-Whitney test.

using the comet assay, obtaining values of 127.0, 166.2 and 147.6, respectively, while the damage factor values were 85.3, 92.4 and 76.8, respectively, indicating no significant difference compared between doses and with negative control. However, there was a significant difference when the evaluated compounds were compared with positive control (Table 6).

Since DNA damage by the comet assay was not detected, it may be inferred that the test substances did not display genotoxicity (Mendonça et al. 2010). According to Abdelmigid (2013) to submit information on genotoxicity is a prerequisite for commercial authorization and registration of medicinal plants in certain countries products. In the regulatory framework, the safety assessment of herbal medicines range from the introduction of safety data to withdrawal from the market. It is noteworthy that the comet assay is considered one of the most important tools for the assessment of damage to DNA with high sensitivity that is employed in a wide variety of cells as a standard method in the safety analysis of new drugs (Tice et al. 2000).

Micronucleus test

Polychromatic erythrocytes with micronuclei (EPCMN) from animals treated with the extracts (EP1, EP2, and EP3) were also analyzed. The statistical analyses verified that there were no significant differences between groups treated with negative control and between the test compounds. Therefore, the treated agents were not considered to induce mutagenicity in the MN test. Corroborating the results of the present study, Düsman et al. (2013) demonstrated the

228  T. A. ROCHA ET AL.

non-cytotoxic and antimutagenic action of aqueous extracts of *Bauhinia forficata* (belonging to the Fabaceae family) administered *in vivo* model, using the MN assay in Wistar rats.

Compounds present in plant extracts may produce irreversible damage to health and consequent mortality owing to their natural mutagenic and genotoxic substances (Verschaeve et al. 2017). Therefore, the interest in the evaluation of genotoxicity and mutagenicity *in vivo* after exposure to *P. moniliformis* extracts is warranted, because it is widely used by a particular community and linked to its culture.

Conclusions

The organic extracts (EP1, EP2, and EP3) from the leaves of *P. moniliformis* did not produce toxicity in treated animals. No deaths or biochemical and hematological alterations were observed. Despite this, the EP3 extract produced hepatic damage as observed by microscopy. The results of the cytotoxicity test demonstrated that no extracts induced toxicity to normal human cells (J774.A1 and HEK-293), which indicated the potential as a reliable source for the discovery of future phytopharmaceutical compounds. Further, the genotoxicity and *in vivo* mutagenicity assays revealed that the extracts led to no marked changes or DNA damage in the cells analyzed. Although additional *in vivo* assays and *in vitro* toxicity studies are required in other normal human cell lines for confirmation of the efficacy and safety of preclinical use, the results for *P. moniliformis* extracts obtained here demonstrate that it exerts no adverse effects, which may indicate the potential use of this plant species in folk medicine.

Funding

The authors thank the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE; IBPG-0630-2.08/14), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for support; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);

ORCID

Tamiris Alves Rocha  <http://orcid.org/0000-0001-5961-6377>

Danielle Feijó de Moura  <http://orcid.org/0000-0002-8258-0541>

Talita Giselly dos Santos Souza  <http://orcid.org/0000-0001-5254-3056>

Dayane de Melo Barros  <http://orcid.org/0000-0002-0738-9288>

References

- Abdelmigid, H. M. 2013. New trends in genotoxicity testing of herbal medicinal plants. In *New insights into toxicity and drug testing*, ed.. S. Gowder, 89–120. Rijeka: InTech. doi:10.5772/54858.
- Aguiar, G. L. M., J. H. P. M. Barreto, L. R. Morais, and A. R. Da Silva Filho. 2008. Anatomic study of the splenic artery segmentation. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões* 35:311–14. doi:10.1590/S0100-69912008000500007.
- Al-Faifi, Z. I., Y. S. Masrahi, M. S. Aly, T. A. Al-Turki, and T. Dardeer. 2017. Evaluation of cytotoxic and genotoxic effects of *Euphorbia triaculeata* Forssk. extract. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 18:771–77. doi:10.22034/APJCP.2017.18.3.771.
- Almeida, C. F. C. B. R., E. L. C. Amorim, U. P. Albuquerque, and M. B. S. Maia. 2006. Medicinal plants popularly used in the Xingó region – A semi-arid location in Northeastern Brazil. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 2:1–7. doi:10.1186/1746-4269-2-15.
- Almeida, C. F. C. B. R., T. C. Lima E Silva, E. L. C. Amorim, M. B. D. S. Maia, and U. P. Albuquerque. 2005. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the caatinga (Northeast Brazil). *J. Arid Environ.* 62:127–42. doi:10.1016/j.jaridenv.2004.09.020.
- Arii, S., and M. Imamura. 2000. Physiological role of sinusoidal endothelial cells and kupffer cells and their implication in the pathogenesis of liver injury. *Journal Of Hepato-biliary-pancreatic Surgery* 7:40–48. doi:10.1007/s005340050152.
- Arii, S., and M. Imamura. 2000. Physiological role of sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells and their implication in the pathogenesis of liver injury. *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.* 7:40–48. doi:10.1007/s005340050152
- Bacchi, E. M. 1995. Controle de qualidade de fitoterápicos. In *Plantas medicinais brasileiras: Arte e Ciência: Um guia de estudo interdisciplinar*, ed. L. C. Di Stasi (Org.), 231. São Paulo: UNESP.
- Bhargava, S., T. Patel, R. Gaikwad, U. K. Patil, and S. Gayen. 2017. Identification of structural requirements and prediction of inhibitory activity of natural flavonoids against Zika virus through molecular docking and Monte Carlo

- based QSAR simulation. *Nat. Prod. Res.* 6419:1–7. doi:10.1080/14786419.2017.1413574.
- Boscolo, O. H., and L. S. Valle. 2008. Plantas de uso medicinal em Quissamã. *Iheringia* 63:263–77.
- Cerqueira, F., A. C. Silva, N. Araújo, H. Cidade, A. Kijjoa, and M. S. J. Nascimento. 2003. Inhibition of lymphocyte proliferation by prenylated flavones; Artelastin as a potent inhibitor. *Life Sci.* 73:2321–34. doi:10.1016/S0024-3205(03)00627-1.
- Chirumbolo, S. 2010. The role of quercetin, flavonols and flavones in modulating inflammatory cell function. *Inflamm. Allergy Drug Targets* 9:1–23. doi:10.2174/187152810793358741.
- Christopher, M. M. 2003. Cytology of the spleen. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 33:135–52. doi:10.1016/S0195-5616(02)00082-7.
- Coelho, I. D. D. S., C. J. C. L. Neto, T. G. S. Souza, M. A. Silva, C. A. Chagas, and K. R. P. Santos. 2018. Protective effect of exogenous melatonin in rats and their offspring on the genotoxic response induced by the chronic consumption of alcohol during pregnancy. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 18:52–60. doi:10.1016/j.mrgentox.2018.06.018.
- Collins, A. R., A. A. Oscoz, G. Brunborg, I. Gaivão, L. Giovannelli, M. Kruszewski, C. C. Smith, and R. Štětina. 2008. The comet assay: Topical issues. *Mutagen.* 23:143–51. doi:10.1093/mutage/gem051.
- Collins, C. H., G. L. Braga, and P. S. Bonato. 2006. *Fundamentos de cromatografia*, 452 p. Campinas: UNICAMP.
- Cyboran, S., P. Strugała, A. Włoch, J. Oszmiański, and H. Kleszczyńska. 2015. Concentrated green tea supplement: Biological activity and molecular mechanisms. *Life Sci.* 126:1–9. doi:10.1016/j.lfs.2014.12.025.
- Diamantino, G. M. L. 2018. *Fotosensibilização por Brachiaria ruziziensis em ovinos: Avaliações clínica, patológica, micológica e fitoquímica por LC-MS/MS*, 98f. Belo Horizonte: Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais.
- Düsman, E., I. V. D. Almeida, A. C. Coelho, T. J. Balbi, L. T. Düsman Tonin, and V. E. P. Vicentini. 2013. Antimutagenic effect of medicinal plants *Achillea millefolium* and *Bauhinia forficata* in vivo. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2013:1–6. doi:10.1155/2013/893050.
- Eguchi, H., P. A. McCuskey, and R. S. McCuskey. 1991. Kupffer cell activity and hepatic microvascular events after acute ethanol ingestion in mice. *Hepatol.* 13:751–57. doi:10.1002/(ISSN)1527-3350.
- Endale, M., S. C. Park, S. Kim, S. H. Kim, Y. Yang, J. Y. Cho, and M. H. Rhee. 2013. Quercetin disrupts tyrosine-phosphorylated phosphatidylinositol 3-kinase and myeloid differentiation factor-88 association, and inhibits MAPK/AP-1 and IKK/NF- κ B-induced inflammatory mediators production in RAW 264.7 cells. *Immunobiology* 218:1452–67. doi:10.1016/j.imbio.2013.04.019.
- Fischer, G., S. O. Hübner, G. D. Vargas, and T. Vidor. 2008. Imunomodulação pela própolis. *Arq. Inst. Biol.* 75:247–53.
- Fonseca, M. A. Fragmentação, conservação e restauração da caatinga. 2017. *Tese (Doutorado em Ecologia) - Centro de Biociências*, 103f. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- França, I. S. X. D., J. A. Souza, R. S. Baptista, and V. R. D. S. Britto. 2008. Medicina popular: Benefícios e malefícios das plantas medicinais. *Rev. Bras. Enferm.* 61:201–08. doi:10.1590/S0034-71672008000200009.
- Franco, E. S., M. E. B. Mélo, G. C. G. Militão, R. E. T. Rocha, L. T. G. A. Silva, B. J. A. Jatobá, P. B. N. Silva, A. L. B. D. Santana, A. A. R. Silva, T. G. Silva, et al. 2015. Evaluation of the acute toxicity, cytotoxicity, and genotoxicity of *Chresta martii* (Asteraceae). *J. Toxicol. Environ. Health A* 78:1083–93. doi:10.1080/15287394.2014.1004007.
- Gontijo, D. C., M. A. N. Diaz, G. C. Brandao, P. C. Gontijo, A. B. De Oliveira, L. G. Feitto, and J. P. V. Leite. 2018. Phytochemical characterization and antioxidant, antibacterial and antimutagenic activities of aqueous extract from leaves of *Alchornea glandulosa*. *J. Toxicol. Environ. Health A* 81:805–18. doi:10.1080/15287394.2018.1492479.
- Guimarães, A. G., M. R. Serafini, and L. J. Quintans-Júnior. 2014. Terpenes and derivatives as a new perspective for pain treatment: A patent review. *Expert. Opin. Ther. Pat.* 24:243–65. doi:10.1517/13543776.2014.870154.
- Havsteen, B. H. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Ther.* 96:67–202. doi:10.1016/S0163-7258(02)00298-X.
- Hayashi, M., R. R. Tice, J. T. MacGregor, D. Anderson, D. H. Blakey, M. Kirsh-Volders, F. B. Oleson, F. Pacchierotti, F. Romagna, and H. Shimada. 1994. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutat. Res. Environ. Mutagen. Relat. Subj.* 312:293–304. doi:10.1016/0165-1161(94)90039-6.
- Ito, Y., N. W. Bethea, E. R. Abril, and R. S. McCuskey. 2003. Early hepatic microvascular injury in response to acetaminophen toxicity. *Microcirc.* 10:391–400. doi:10.1038/sj.mn.7800204.
- Jesus, N. Z. T., I. F. Silva Júnior, J. C. S. Lima, E. M. Colodel, and D. T. O. Martins. 2012. Hippocratic screening and subchronic oral toxicity assessments of the methanol extract of *Vatairea macrocarpa* heartwood in rodents. *Braz. J. Pharmacog.* 22:1308–14. doi:10.1590/S0102-695X2012005000090.
- Khajanchi, S., and S. Banerjee. 2017. Quantifying the role of immunotherapeutic drug T11 target structure in progression of malignant gliomas: Mathematical modeling and dynamical perspective. *Math Biosci.* 289:69–77. doi:10.1016/j.mbs.2017.04.006.
- Klaassen, C. D. 2007. *Casarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons*. 7th ed. New York: McGraw-Hill.
- Kolios, G., V. Valatas, and E. Kouroumalis. 2006. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. *World J. Gastroenterol.* 12:7413–20. doi:10.3748/wjg.v12.i46.7413.
- Larcher, W. 2004. *Ecofisiologia Vegetal*, 531. São Carlos: RiMa.

- Leal, I. R., J. D. Silva, M. Tabarelli, and T. E. Lacher Jr. 2005. Mudando o curso da conservação da biodiversidade na Caatinga do Nordeste do Brasil. *Megadiversidade* 1:139–46.
- Liu, X., X. Yan, J. Bi, J. Liu, M. Zhou, X. Wu, and Q. Chen. 2018. Determination of phenolic compounds and antioxidant activities from peel, flesh, seed of guava (*Psidium guajava* L.). *Electrophoresis* 39:1654–62. doi:10.1002/elps.201700479.
- Luckey, S. W., and D. R. Petersen. 2001. Activation of Kupffer cells during the course of carbon tetrachloride-induced liver injury and fibrosis in rats. *Exp. Mol. Pathol.* 71:226–40. doi:10.1006/exmp.2001.2399.
- Marinho, K. S., N. Do, E. A. Antonio, C. V. N. S. Silva, K. T. da Silva, V. É. W. Teixeira, F. C. A. de Aguiar Júnior, K. R. R. P. dos Santos, N. H. da Silva, and N. P. S. Santos. 2017. Hepatic toxicity caused by PLGA-microspheres containing usnic acid from the lichen *Cladonia stellata* (AHTI) during pregnancy in Wistar rats. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 89:1073–84. doi:10.1590/0001-3765201720160650.
- Mathias, F. A. S. M. 2018. *A contribuição de sistemas de associação de adjuvantes no aumento da eficácia vacinal de dois novos imunobiológicos contra a infecção experimental por Leishmania infantum em camundongos Balb/c*, 112f. Minas Gerais: Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Ouro Preto.
- Mendonça, L. M., G. C. dos Santos, R. A. dos Santos, C. S. Takahashi, L. M. Bianchi, and L. M. Antunes. 2010. Evaluation of curcumin and cisplatin-induced DNA damage in PC12 cells by the alkaline comet assay. *Hum. Exp. Toxicol.* 29:635–43. doi:10.1177/0960327109358731.
- Meneguelli, A. Z., S. B. Ribeiro, G. Alves, L. Júnior, E. D. O. Spirotto, J. Henrique, and S. G. De. 2017. A utilização de plantas medicinais e fitoterápicos na saúde pública brasileira. *Revista de Enfermagem e Saúde Coletiva* 1:2–12.
- Meyer, A., P. C. B. Alexandre, J. de Rezende Chrisman, S. B. Markowitz, R. J. Koifman, and S. Koifman. 2011. Esophageal cancer among Brazilian agricultural workers: Case-control study based on death certificates. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 214:151–55. doi:10.1016/j.ijheh.2010.11.002.
- Middleton, E., C. Kandaswami, and C. Theoharides. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Exp. Ther.* 52:673–751.
- Mikropoulou, E. V., K. Vougiannopoulou, E. Kalpoutzakis, A. D. Sklirou, Z. Skaperda, J. Houriet, J. L. Wolfender, I. P. Trougakos, D. Kouretas, M. Halabalaki, et al. 2018. Phytochemical composition of the decoctions of Greek edible greens (chórta) and evaluation of antioxidant and cytotoxic properties. *Mol.* 23:1–16. doi:10.3390/molecules23071541.
- Monteiro, J. M., U. P. Albuquerque, E. L. Araujo, and E. L. C. Amorim. 2005. Taninos: Uma abordagem da química à ecologia. *Química Nova* 28:892–96. doi:10.1590/S0100-40422005000500029.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65:55–63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- Moura, P. A. 2015. *Screening das atividades antioxidantes e anticoagulantes de plantas do bioma Caatinga*, 79f. Recife: Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco.
- OECD. 2016. *Test no. 474: Mammalian erythrocyte micronucleus test. OECD Guidelines for the testing of chemicals. Section 4*. Paris: OECD Publishing. doi:10.1787/9789264264762-en.
- OECD/OCDE. 2008. Acute oral toxicity – up-and-down-procedure (UDP). *OECD Guidelines Test. Chem.* 425:1–27. doi:10.1787/9789264203785-en.
- Oliveira, A. M., M. F. Nascimento, M. R. A. Ferreira, D. F. Moura, T. G. De, Souza, S. Dos, G. C. Silva, E. H. Da, Ramos, S. Da, P. M. G. Paiva, et al. 2016. Evaluation of acute toxicity, genotoxicity and inhibitory effect on acute inflammation of an ethanol extract of *Morus alba* L. (Moraceae) in mice. *J. Ethnopharmacol.* 194:162–68. doi:10.1016/j.jep.2016.09.004.
- Ono, M., B. Yu, E. G. Hardison, M. A. A. Mastrangelo, and D. J. Tweardy. 2004. Increased susceptibility to liver injury after hemorrhagic shock in rats chronically fed ethanol: Role of nuclear factor- κ B, interleukin-6, and granulocyte colony-stimulating factor. *Shock* 21:519–25. doi:10.1097/01.shk.0000126905.75237.07.
- Paz, K., R. A. Lopes, M. A. Sala, C. Friedrichi, and M. Semprini. 2005. Hepatotoxicity of medicinal plants. XXI. action of *Mikania hirsutissima* D.C. infusion in rats. *Regaloch Investigaçao - Revista Científica da Universidade de Franca* 5:78–85.
- Prado, D. E. 2003. As caatingas da América do Sul. In *Ecologia e conservação da caatinga*, ed. I. R. Leal, M. Tabarelli, and J. M. C. Silva. Recife: Editora Universitária da Universidade Federal de Pernambuco. 3
- Purchase, I. F. H., P. A. Botham, L. H. Bruner, O. P. Flint, J. M. Frazier, and W. S. Stokes. 1998. Workshop overview: Scientific and regulatory challenges for the reduction, refinement, and replacement of animals in toxicity testing. *Toxicol. Sci.* 43:86–101. doi:10.1006/toxs.1998.2450.
- Quilez, J., P. García-Lorda, and J. Salas-Salvado. 2003. Potential uses and benefits of phytosterols in diet: Present situation and future directions. *Clin. Nutr.* 22:343–51. doi:10.1016/S0261-5614(03)00060-8.
- Rody, H. V. S., R. C. Gontijo, V. P. M. Coelho, M. C. Ventrella, R. M. de Padua, L. G. Fietto, and J. P. V. Leite. 2018. Mutagenic activity and chemical composition of phenolic-rich extracts of leaves from two species of *Ficus* medicinal plants. *J. Toxicol. Environ. Health A* 81:862–72. doi:10.1080/15287394.2018.1498420.
- Santos, A. M. R., C. M. Motta, E. C. A. Souza, and S. G. Moraes. 2010. Análise histomorfológica do fígado de ratas e de seus fetos/Histomorphological analysis of livers of rats and their fetuses. *Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba* 12:10–14.

- Santos, N. P., S. C. Nascimento, J. F. Silva, E. C. G. Pereira, N. H. Silva, N. K. Honda, and N. S. Santos-Magalhães. 2005. Usnic acid-loaded nanocapsules: An evaluation of cytotoxicity. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 15:355–61. doi:10.1016/S1773-2247(05)50065-0.
- Sarwar, M. W., A. Riaz, S. M. R. Dilshad, A. Al-Qahtani, M. S. Nawaz-Ul-Rehman, and M. Mubin. 2018. Structure activity relationship (SAR) and quantitative structure activity relationship (QSAR) studies showed plant flavonoids as potential inhibitors of dengue NS2B-NS3 protease. *BMC Struct. Biol.* 18:1–10. doi:10.1186/s12900-018-0084-5.
- Shandukani, P. D., S. C. Tshidino, P. Masoko, and K. M. Moganedi. 2018. Antibacterial activity and in situ efficacy of *Bidens pilosa* Linn and *Dichrostachys cinerea* Wight et Arn extracts against common diarrhoea-causing waterborne bacteria. *BMC Complement. Altern. Med.* 18:1–10. doi:10.1186/s12906-018-2230-9.
- Silva, C. G., M. G. V. Marinho, M. F. A. Lucena, and J. G. M. Costa. 2015. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais em área de Caatinga na comunidade do Sítio Nazaré, município de Milagres, Ceará, Brasil. *Rev. Bras. Pl. Med.* 17:133–42. doi:10.1590/1983-084X/12_055.
- Silva, L. C. N., C. A. Silva, R. M. Souza, A. José Macedo, M. V. Silva, and M. T. Santos Correia. 2011. Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. *Food Chem. Toxicol.* 49:2222–28. doi:10.1016/j.fct.2011.06.019.
- Silva, M. F. S. 2013. *Estudo Químico e Avaliação da Atividade Antibacteriana de Pityrocarpa moniliformis (BENTH) LUCKON & R. W. JOBSON (Fabaceae)*, 147. Petrolina-Pe : Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Semiárido da Universidade Federal do Vale do São Francisco, Mestrado em Recursos Naturais Do Semiárido.
- Silva, N. L. C., J. Messias Sandes, M. M. Paiva, J. M. Araújo, R. C. B. Q. Figueiredo, M. V. Silva, and M. T. D. S. Correia. 2013. Anti-*Staphylococcus aureus* action of three Caatinga fruits evaluated by electron microscopy. *Nat. Prod. Res.* 27:1492–96. doi:10.1080/14786419.2012.722090.
- Singh, M., and D. T. O'Hagan. 2003. Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. *Int. J. Parasitol.* 33:469–78. doi:10.1016/S0020-7519(03)00053-5.
- Souza, C. S. V. 2017. *Avaliação da atividade antiobesidade do extrato aquoso dos frutos de Libidibia ferrea (Mart.) L.P. Queiroz EM RATOS WISTAR*, 86f. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Patologia do Centro de Ciências da Saúde), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco.
- Tice, R. R., E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J. C. Ryu, and Y. F. Sasaki. 2000. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35:206–21. doi:10.1002/(SICI)1098-2280-(2000)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J.
- Torres, O. J. M., E. L. Macedo, E. R. G. Picciani, P. M. S. Nunes, J. V. G. Costa, A. B. Carvalho, and P. S. Lobato Júnior. 2000. Histological study of splenic regeneration in rats underwent to subtotal splenectomy. *Acta Cir. Bras.* 15:107–13. doi:10.1590/S0102-86502000000200006.
- Trentin, D. S., D. B. Silva, A. P. Frasson, O. Rzhapishevskaya, M. V. Silva, E. L. Pulcini, G. James, G. V. Soares, T. Tasca, and M. Ramstedt. 2015. Natural green coating inhibits adhesion of clinically important bacteria. *Sci. Rep.* 5:1–10. doi:10.1038/srep08287.
- Tsutsui, H., and S. Nishiguchi. 2014. Importance of Kupffer cells in the development of acute liver injuries in mice. *Int. J. Mol. Sci.* 15:7711–30. doi:10.3390/ijms15057711.
- Tuttis, K., D. L. M. G. da Costa, H. L. Nunes, A. F. L. Specian, J. M. Serpeloni, L. C. dos Santos, E. A. Varanda, W. Viegas, W. Martinez-Lopez, and I. M. S. Collus. 2018. Pouteria rami-flora (Mart.) Radik extract: Flavonoids quantification and chemopreventive effect on HepG2 cells. *J. Toxicol. Environ. Health A* 81:792–804. doi:10.1080/15287394.2018.1491911.
- Umbunzeiro, G. A., and D. A. Roubicek. 2006. Genotoxicidade ambiental. In *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações*, ed. P. A. Zagatto and E. Bertoletti, 327–46. 2nd ed. São Carlos: RiMa.
- Varanda, E. A. 2006. Atividade mutagênica de plantas medicinais. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* 27:1–7.
- Vardanega, R. 2013. *Obtenção de saponinas de raízes de ginseng brasileiro (Pfaffia glomerata) por extração dinâmica a baixa pressão assistida por ultrassom*, 124f. Campinas: Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas.
- Verschaeve, L., H. Edziri, R. Anthonissen, D. Boujnah, F. Skhiri, H. Chehab, M. Aouni, and M. Mastouri. 2017. In vitro Toxicity and genotoxic activity of aqueous leaf extracts from four varieties of *Olea europaea* (L). *Pharmacogn. Mag.* 13:6368. doi:10.4103/0973-1296.203980.
- Vogel, A. I. 2002. *Análise Química Quantitativa*. 6th ed. Rio de Janeiro: Editora LTC.
- Wagner, H., S. Bladt, and E. M. Zgainsky. 1984. *Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas*, 320. Berlin: Springer. doi:10.1007/978-3-662-02398-3.
- Yin, L., E. Guan, Y. Zhang, Z. Shu, B. Wang, X. Wu, J. Chen, J. Liu, X. Fu, and W. Sun. 2018. Chemical profile and anti-inflammatory activity of total flavonoids from *Glycyrrhiza uralensis* fisch. *Iranian J. Pharm. Res.* 17:726–34.
- Yu, H. Y., S. O. K. Kim, C. Y. Jin, G. Y. Kim, W. J. Kim, Y. H. Yoo, and Y. H. Choi. 2014. b-Lapachone induced apoptosis of human gastric carcinoma AGS cells is caspase-dependent and regulated by the PI3K/Akt pathway. *Biomol. Ther.* 22:184–92. doi:10.4062/biomolther.2014.026.
- Yuniati, Y., N. Hasanah, S. Ismail, S. Anitasari, and S. Paramita. 2018. Antibacterial activity of Dracontomelon Dao extracts on methicillin-resistant *S. Aureus* (Mrsa) and *E. Coli* multiple drug resistance (Mdr). *Afr. J. Infect. Dis.* 12:62–67. doi:10.2101/Ajid.12v1S.

**APÊNDICE C- CAPÍTULO PUBLICADO NO LIVRO DIGITAL BASES
CONCEITUAIS DE SAÚDE 4**



ISBN 978-85-7247-135-0

DOI 10.22533/at.ed.350191502

CAPÍTULO 3

ANÁLISE DO POTENCIAL HEMOLÍTICO DOS EXTRATOS ORGÂNICOS DE *PITYROCARPA MONILIFORMIS*

Tamiris Alves Rocha

Mestre em Bioquímica e Fisiologia Humana,
Departamento de Bioquímica, Universidade
Federal de Pernambuco/UFPE, Recife-PE

Danielle Feijó de Moura

Mestre em Saúde Humana e Meio Ambiente,
Centro Acadêmico de Vitória-CAV, Universidade
Federal de Pernambuco/UFPE, Vitória de Santo
Antão-PE

Dayane de Melo Barros

Mestre em Saúde Humana e Meio Ambiente,
Centro Acadêmico de Vitória-CAV, Universidade
Federal de Pernambuco/UFPE, Vitória de Santo
Antão-PE

Maria Aparecida da Conceição de Lira

Mestre em Saúde Humana e Meio Ambiente,
Centro Acadêmico de Vitória-CAV, Universidade
Federal de Pernambuco/UFPE, Vitória de Santo
Antão-PE

Marllyn Marques da Silva

Mestre em Saúde Humana e Meio Ambiente,
Centro Acadêmico de Vitória-CAV, Universidade
Federal de Pernambuco/UFPE, Vitória de Santo
Antão-PE

Silvio Assis de Oliveira Ferreira

Mestre em Bioquímica e Fisiologia Humana,
Departamento de Bioquímica, Universidade
Federal de Pernambuco/UFPE, Recife-PE

Márcia Vanusa da Silva

Professora adjunta, Departamento de Bioquímica,
Universidade Federal de Pernambuco/UFPE,
Recife-PE

Maria Tereza dos Santos Correia

Professora Permanente do Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia (PPGBF
Departamento de Bioquímica, Universidade
Federal de Pernambuco/UFPE, Recife-PE

RESUMO: A *Pityrocarpa moniliformis* é uma espécie endêmica da caatinga, bastante utilizada pela comunidade local para fins terapêuticos. Apesar de ser usada na medicina tradicional, os estudos que caracterizam esta espécie quanto as suas atividades biológicas são escassos, mas alguns estudos têm demonstrado propriedades biológicas como atividade antimicrobiana e antioxidante. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade hemolítica *in vitro* dos extratos orgânicos das folhas de *P. moniliformes*. As folhas de *P. moniliformes* foram coletadas no Parque Nacional do Catimbá, em Buíque, Pernambuco. Os extratos foram obtidos em aparelho soxhlet seguindo a série eluotrópica utilizando os solventes ciclohexano, acetato de etila e metanol. A atividade hemolítica foi realizada com eritrócitos humanos obtidos por punção venosa e colocados em tubos heparinizados de voluntários saudáveis, com consentimento informado por escrito do indivíduo doador espontâneo. Os extratos orgânicos de *P. moniliformis* não apresentou

ação hemolítica visto que não foi observada formação de hemólise em nenhuma das concentrações dos extratos testados (125, 250 e 500 μ mL). O extrato hexânico foi o que apresentou % de hemólise maior em relação aos extratos de acetato de etila e metanólico na concentração de 500 μ g/mL. Este teste torna-se necessário para verificar a segurança e eficácia do uso da espécie vegetal. Além disso, a ausência da atividade hemolítica em eritrócitos sugere que esta planta possui um potencial biológico promissor, podendo ser útil em futuras preparações farmacológicas.

PALAVRAS-CHAVE: atividade antioxidante; caatinga; plantas medicinais.

ABSTRACT: *Pityrocarpa moniliformis* is an endemic species of caatinga, widely used by the local community for therapeutic purposes. Although they have been used in traditional medicine, studies that have more characteristics regarding their biological activities are scarce, but some studies have as reference the biological properties as an antimicrobial and antioxidant activity. The present work had as objective to evaluate the in vitro hemolytic activity of the organic extracts of *P. moniliformes* leaves. The leaves of *P. moniliformes* were collected in the National Park of Catimbau, in Buíque, Pernambuco. The extracts were obtained in soxhlet apparatus following the eluotropic series using the solvents cyclohexane, ethyl acetate and methanol. Hemolytic activity was performed with human erythrocytes obtained by venipuncture and placed in heparinized tubes of healthy volunteers, with written informed consent of the spontaneous donor individual. The organic extracts of *P. moniliformis* did not present hemolytic activity since no hemolysis formation was observed in any of the extracts tested (125, 250 and 500 μ mL). The hexanic extract was the one with the highest haemolysis percentage in relation to extracts of ethyl acetate and methanolic at the concentration of 500 μ g/mL. This test becomes necessary to verify the safety and effectiveness of the use of the vegetal species. In addition, the absence of hemolytic activity in erythrocytes suggests that this plant has a promising biological potential and may be useful in future pharmacological preparations.

KEYWORDS: antioxidant activity; caatinga; medicinal plants.

1 | INTRODUÇÃO

As espécies vegetais produzem uma grande variedade de substâncias químicas que podem apresentar diversas atividades biológicas e constituem ainda hoje um recurso terapêutico relevante para uma parcela significativa da população mundial que, não tem acesso aos medicamentos industrializados (TÓRRES et al., 2005). No uso popular, muitas dessas espécies são utilizadas sem que haja estudos toxicológicos, que segundo o conhecimento da comunidade no qual a planta por apresentar origem natural, provavelmente não acarreta riscos à saúde, reforça ainda mais a necessidade de extrema preocupação com relação ao seu uso. Algumas dessas espécies possuem estudos químicos e/ou farmacológicos oferecendo suporte para a sua utilização, outras

são empregadas baseadas apenas em conhecimento empírico ou tradicional (SIMÕES et al., 2001). Diante dessas informações faz-se necessária a implementação dos estudos toxicológicos com as plantas, garantindo a segurança no uso das mesmas.

Um dos modelos experimentais *in vitro* utilizados para analisar os efeitos tóxicos de plantas é o ensaio com eritrócitos, que tem a finalidade de investigar a ação tóxica e protetora de uma grande variedade de substâncias. O eritrócito é um tipo de célula que possui altas concentrações de ácidos graxos polinsaturados, oxigênio molecular e íons ferro no estado ligado (NIKI et al., 1991), fazendo com que sua membrana celular fique muito vulnerável a reações envolvendo radicais livres e que também fique muito susceptível a hemólise (BRANDÃO et al., 2006).

A detecção da atividade citotóxica é uma das medidas primordiais, visto que vários compostos químicos podem ter a capacidade de causar efeitos tóxicos e modificar a informação genética contida no DNA. Portanto, a obtenção de dados sobre a toxicidade desses agentes deve ser assegurada por experimentos que forneçam, com uma razoável margem de segurança, indicações sobre os riscos envolvidos na sua utilização (BENIGNI, 2005). A avaliação citotóxica através da quantificação da hemólise é um modelo simples para estudar o efeito tóxico ou protetor de uma grande variedade de substâncias ou situações que são associadas ao estresse oxidativo (LEXIS et al., 2006).

Um exemplo de espécie pouco estudada, porém, utilizada popularmente para fins medicinais é a *Pityrocarpa moniliformis*, que possui poucos relatos sobre sua caracterização físico-química, biológica, segurança e eficácia. A *Pityrocarpa moniliformis* é uma planta arbórea do Nordeste do Brasil, ocorrendo disjunta em florestas secas da região de Sucre (Venezuela). Por ser uma planta endêmica da caatinga, que apresenta várias espécies vegetais com grande potencial terapêutico e farmacológico (MELO et al., 2010; COSTA et al., 2017; MALAFAIA et al., 2017; VIEIRA et al., 2017) e ser uma espécie ainda pouco explorada, há a necessidade de estudos mais profundos acerca de suas atividades biológicas. Estudos recentes revelaram um potencial antioxidante significativo, como também atividade antimicrobiana promissora (DA SILVA et al., 2011; SILVA, 2013; TRENTIN et al., 2015).

Tendo em vista que poucos estudos foram realizados a fim de melhor o entendimento das atividades biológicas e o efeito tóxico causado pela *P. moniliformis*, este trabalho visou avaliar a ação tóxica dos extratos orgânicos desta espécie através do ensaio *in vitro* de atividade hemolítica de eritrócitos. Além disto, o estudo serviu para julgar a viabilidade de uso do teste de ação hemolítica e sua aplicação para avaliação preliminar da toxicidade de plantas.

2 | METODOLOGIA

As folhas de *P. moniliformis* foram coletadas no Parque Nacional do Catimbaus,

em Buíque, Pernambuco. O material foi levado à estufa de circulação de ar forçado (40-45°C) por um período de três a quatro dias. As amostras também foram identificadas conforme as técnicas taxonômicas habituais e depositado no Herbário IPA, do Instituto Agrônomo de Pernambuco. O material vegetal foi processado em moinho de bancada e submetidos a extração em aparelho de Soxhlet seguindo a ordem eluotrópica dos solventes: ciclohexano, acetato de etila e metanol. As amostras foram rotaevaporadas e deixadas em temperatura ambiente para secagem completa do solvente. Todos os extratos obtidos foram armazenados a -20 °C para análises adicionais. Para os ensaios de atividade hemolítica in vitro foram utilizados 5mL de sangue obtidos por punção venosa e colocado em tubos heparinizados de voluntários saudáveis, com consentimento informado por escrito do indivíduo doador espontâneo. Os eritrócitos humanos foram isolados por centrifugação (1500 rpm, 10 min a 4 °C) e lavados três vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS; pH 7,4). Cada tubo recebeu 1,1 mL de suspensão de eritrócitos (1%) e 0,4 mL de várias concentrações dos extratos (125, 250 e 500 µg/mL). Os controles foram apenas solventes (negativo) e Triton X-100 (positivo). Após 60 min de incubação as células foram centrifugadas e a absorvência do sobrenadante foi registrada a 540 nm. A atividade hemolítica foi expressa pela fórmula seguinte: atividade hemolítica (%) = $(A_a - A_s) \times 100 / (A_c - A_s)$, onde: A_a =absorbância da amostra; A_s =absorbância do solvente; A_c = absorbância do controle positivo.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

No ensaio hemolítico, os extratos orgânicos obtidos de *P. moniliformis* não apresentou ação hemolítica visto que não foi observada formação de hemólise em nenhuma das concentrações dos extratos testados (menos de 10% na concentração mais alta testada - 500 µg/mL) (Figura 1), permanecendo límpida a solução de soro fisiológico após a centrifugação, ou seja, as hemácias permaneceram íntegras no fundo dos tubos, com a formação de um precipitado, sem que tenha havido a lise das células. O extrato hexânico foi o que apresentou % de hemólise maior em relação aos extratos de acetato de etila e metanólico na concentração de 500 µg/mL.

Um resultado similar foi encontrado no experimento realizado por Silva e Lima (2010), no qual o efeito hemolítico dos extratos do Juazeiro foi avaliado em cultura de eritrócitos de camundongos (2%), em que foi encontrada a ausência de atividade hemolítica dos extratos brutos e subfrações das cascas e folhas em concentrações abaixo de 200 µg/mL.

As plantas medicinais apresentam em sua composição princípios ativos responsáveis pelas propriedades terapêuticas a elas atribuídas. Apesar disso, reações adversas podem aparecer em decorrência de uso indevido ou contado direto com a mesma.

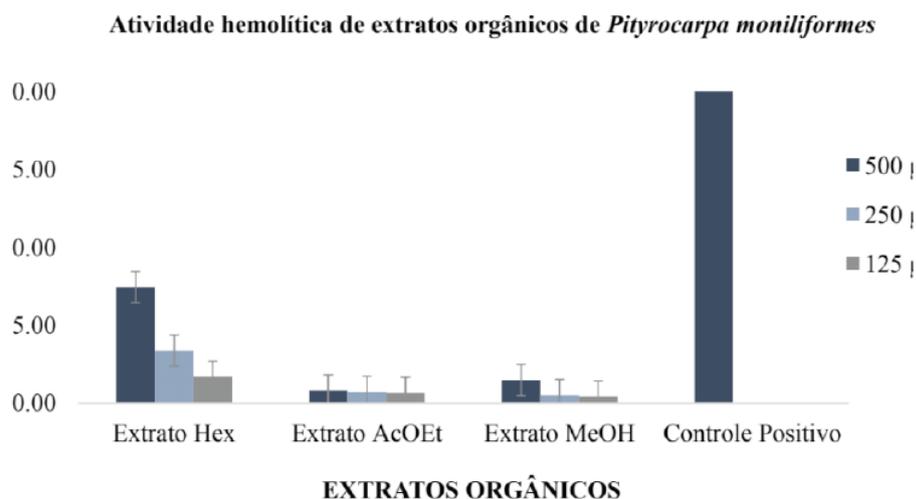


Figura 1- Atividade hemolítica dos extratos orgânicos das folhas de *P. moniliformis*.

O efeito tóxico de alguns produtos naturais já é bem conhecido. Dewick (2002) afirma que os alcalóides, mesmo em pequenas quantidades, são substâncias naturalmente, tóxicas. Da mesma forma, a habilidade dos taninos, de interagir com proteínas e outras macromoléculas lhe conferem atividades tóxicas e aglutinantes (SILVA, 1999; MONTEIRO et al., 2005).

Outro grupo de compostos naturais associado a toxicidade são as saponinas triterpênicas que possui alta capacidade de produzir hemólise. Esse efeito é resultante da sua capacidade de interagir com os componentes da membrana celular dos eritrócitos, principalmente com as moléculas de colesterol, induzindo uma deformação na membrana com consequente extravasamento do conteúdo intracelular (DEWICK, 2002; GLAUERT et al., 1967; KARABALIEV et al., 2003).

A atividade hemolítica das saponinas faz parte do sistema de proteção do vegetal contra ataques de predadores (insetos, vírus, fungos e bactérias) (BRUNETON, 1999). A ação antimicrobiana atribuída a várias plantas, muitas vezes, está relacionada à presença de tais compostos (LACAILLE-DUBOIS; WAGNER, 1996).

Em laboratórios, o teste de hemólise *in vitro* vem sendo empregado rotineiramente em estudos de toxicidade de plantas medicinais e de interesse pecuário mostrando-se positivo, sobretudo, a espécies que apresentam saponinas em sua constituição (PEQUENO; SOTO-BLANCO, 2006).

A realização deste teste torna-se necessário, pois a hemólise é caracterizada pela ruptura do eritrócito com liberação de hemoglobina e a hemoglobina livre no plasma é prejudicial à saúde causando sérios danos em órgãos vitais tais como fígado, rins e coração, sendo necessário dessa maneira a observação da referida atividade (CARVALHO et al., 2007). Sendo assim, estes resultados se mostraram bastante

significativos para a utilização desta planta que revelaram um potencial antioxidante significativo, como também atividade antimicrobiana promissora (DA SILVA et al., 2011; DA SILVA, 2013; TRENTIN et al., 2015)

Embora estudos fitoquímicos demonstrem a presença de alguns compostos tóxicos como saponinas e taninos em extratos de *P. moniliformis* (DA SILVA, 2013), o ensaio de toxicidade *in vitro* desta planta não evidenciou a atividade hemolítica dos seus extratos. Visto que, em nenhuma das concentrações testadas, 500 a 125 $\mu\text{g/ml}$, os extratos de *P. moniliformis* não causaram danos à membrana do eritrócito, isto é bastante relevante, visto que os eritrócitos têm um papel importante no transporte de gases (O_2 e CO_2) e também no controle da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) no organismo (IGNARO, et al., 1999). Entretanto tal resultado, não exclui a existência de uma ação tóxica, uma vez que maiores concentrações dos extratos ainda não foram testadas e poucos estudos com a espécie são encontrados na literatura.

4 | CONCLUSÕES

Os extratos orgânicos de *Pityrocarpa moniliformis* não apresentaram atividade hemolítica *in vitro* nas concentrações de 500, 250 e 125 $\mu\text{g/ml}$. Desta forma, os resultados negativos obtidos nesse trabalho se tornam interessantes, pois confirmam que esta planta apresenta um potencial biológico promissor, podendo ser útil em futuras preparações farmacológicas. No entanto, testes adicionais são necessários para avaliar a atividade hemolítica com concentrações mais elevadas dos extratos orgânicos.

5 | AGRADECIMENTOS

Os autores expressam agradecimento à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco- FACEPE pelo auxílio financeiro para a execução deste trabalho.

REFERÊNCIAS

BRANDÃO, R.; LARA, F.S.; PAGLIOSA, L.B.; SOARES, F.A.; ROCHA, J.B.T.; NOGUEIRA, C.W.; FARINA, M. **Hemolytic effects of sodium selenite and mercuric chloride in human blood.** Drug and Chemical Toxicology, v. 28, p. 397-407, 2006.

BRUNETON, J. **Triterpenes and Steroids.** In: BRUNETON, J. Pharmacognosy, Phytochemistry,, Medicinal Plants. Londres: Intercept Ltd, v.2, cap. X, p. 661-719, 1999.

CARVALHO et al. **Efeito da bomba de infusão de soluções sobre os graus de hemólise em concentrados de hemácias.** Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. V.29, n. 2. p. 149-152, 2007.

COSTA, M. D. C. M. F. D.; SILVA, A. G. D.; SILVA, A. P. S. D.; LIMA, V. L. M.; BEZERRA-SILVA, P. C.; ROCHA, S. K. L. D.; NAVARRO, D. M. D. A. F.; CORREIA, M. T. D. S.; NAPOLEÃO, T. H.; SILVA, M. V. D.; PAIVA, P. M. G. **Essential Oils from Leaves of Medicinal Plants of Brazilian Flora: Chemical Composition and Activity against Candida Species**. Medicines (Basel). v. 4, p. 1-27, 2017.

DA SILVA, L.C.N.; SILVA-JÚNIOR, C.A.; SOUZA, R.M.; MACEDO, A.J.; SILVA, M.V.; CORREIA, M.T.S. **Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of Anadenanthera colubrina, Libidibia ferrea and Pityrocarpa moniliformis fruits**. Food and Chemical Toxicology, 49, 2222–2228, 2011.

DA SILVA, M. F. S. **Estudo Químico e Avaliação da Atividade Antibacteriana de Pityrocarpa moniliformis (BENTH) LUCKON & R. W. JOBSON (Fabaceae)**, Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Semiárido da Universidade Federal do Vale do São Francisco, Mestrado em Recursos Naturais Do Semiárido, Petrolina-Pe. 147, p. 2013.

DEWICK, P.M. **Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach**. John Wiley & Sons LTD, 2^o ed., p.291-300, 2002.

GLAUERT, A.M.; DINGLE, J.T.; LUCY, J.A. **Action of saponin on biological cell membranes**. Nature, v.196, p.952-955, 1962.

IGNARO, L. J.; CIRINO, G. CASINI, A.; NAPOLI, C. **Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: in overview**. Journal of Cardiovascular Pharmacology, v. 34, p.879-886, 1999.

KARABALIEV, M.; KOCHEV, V. **Interaction of solid supported thin lipid films with saponin**. Sensors and Actuators B, v.88, p.101-105, 2003.

LACAILLE-DUBOIS, M.A.; WAGNER. H. **A review of the biological and pharmacological activities of saponins**. Phytomedicine, v.2, p. 363-386, 1996.

LEXIS, L.A.; FASSETT, R.G.; COOMBES, J.S. **α -Tocopherol and α -lipoic acid enhance the erythrocyte antioxidant defence in cyclosporine Atreated rats**. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, v. 98, p. 68-73, 2006.

MALAFIA, C. B., JARDELINO, A. C. S., SILVA, A. G., DE SOUZA, E. B., MACEDO, A. J., CORREIA, M. T. D. S., SILVA, M. V. **Effects of Caatinga Plant Extracts in Planktonic Growth and Biofilm Formation in *Ralstonia solanacearum***. Microb Ecol., 2017.

MELO, A. F. de; FRANÇA, D. S. de; SILVA, R. F. da; OLIVEIRA, E. do N.; ARRUDA, L. V. de; FREITAS, R.; ALVES, C. A. B. **Caracterização e diversidade fitossociológica da Serra da Jurema, Guarabira-PB**. XVI Encontro Nacional dos Geógrafos: AGB, Porto Alegre, 2010.

MONTEIRO, J.M.; ALBUQUERQUE, U.P.; NETO, E.M.F. L.; ARAÚJO, E.L.; ALBUQUERQUE M.M. & AMORIM E.L.C. **The effects of seasonal climate changes in the Caatinga on tannin levels in *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All. and *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan**. Brazilian Journal of Pharmacognosy, v.16, n.3, p.338-344, 2006.

NIKI, E.; YAMAMOTO, Y.; KOMURO, E.; SATO, K. **Membrane damage due to lipid oxidation**. The American Journal of Clinical Nutrition, v. 53, p. S201-S205, 1991.

PEQUENO, N. F. & SOTO-BLANCO, B. **Toxicidade in vitro de plantas tóxicas: avaliação do teste de ação hemolítica**. Acta Scientia e Veterinariae, v.34, n.1, p.45-48, 2006.

SILVA, T. S. S. **Estudo de tratabilidade físico-química com uso de taninos vegetais em água de abastecimento e de esgoto**. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, p.10-17, 1999.

SIMÕES, C.M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L. APETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora Universidade/ UFRGS/ Ed. Da UFSC, 2001.

TÔRRES, A.R. et al. **Estudo sobre o uso de plantas medicinais em crianças hospitalizadas da cidade de João Pessoa: riscos e benefícios**. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.15, n.4, p.373-380, 2005.

TRENTIN, D.S., Silva, D.B., Frasson, A.P., Rzhepishevskaja, O., Da Silva M.V., Pulcini, E. De L., James, G., Soares, G.V., Tasca, T., Ramstedt, M., Giordani, R.B., Lopes, N.P., Macedo, A.J. **Natural Green coating inhibits adhesion of clinically important bacteria**. Sci Rep. v. 5, p. 1-10, 2015.

VIEIRA, P. DE B.; FEIJÓ SILVA, N.L.; SILVA, D. B.; LOPES, N. P.; DA SILVA, A. G.; DA SILVA, M. V.; BASTIDA, J.; MACEDO, A. J.; TASCA, T. **The Caatinga endemic *Manilkara rufula* possesses remarkable activity against *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus***. Exp Parasitol., v. 173, p. 18-28, 2017.