

AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DA GARRAFADA DE CAROBINHA

1ª EDIÇÃO

 DIGITAL
EDITORA

ORGANIZADOR

Diego Sousa Campelo
Thaís Portela Teixeira Campelo
Alexandre de Barros Falcão Ferraz

WWW.DIGITALEEDITORA.COM.BR

AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DA GARRAFADA DE CAROBINHA

1ª EDIÇÃO

 DIGITAL
EDITORA

ORGANIZADOR

Diego Sousa Campelo
Thaís Portela Teixeira Campelo
Alexandre de Barros Falcão Ferraz

WWW.DIGITALEEDITORA.COM.BR

Diego Sousa Campelo
Thaís Portela Teixeira Campelo
Alexandre de Barros Falcão Ferraz

(ORGANIZADORES)

AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DA GARRAFADA DE CAROBINHA

1ª EDIÇÃO

TERESINA - PI



2021

AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DA GARRAFADA DE CAROBINHA



10.48140/digitaleditora.2021.006.0

Designer da Capa: Agência Mirai

Imagens da capa: www.elements.envato.com

Projeto gráfico: Agência Mirai

Diagramação: Agência Mirai

Revisão de Texto: os autores

Editoração: Digital Editora

Produção Digital:

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

A945

Avaliação das características químicas e biológicas da garrafada de carobinha / Diego Sousa Campelo, Thaís Portela Teixeira Campelo, Alexandre de Barros Falcão Ferraz (Orgs.). – Teresina: Digital Editora; Canoas: ULBRA, 2021.

200 p.

ISBN: 978-65-89361-05-3

Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada – Mestrado Profissional da Universidade Luterana do Brasil.

1. Fitoterápicos. 2. Carobinha. 3. Avaliação química. 4. Avaliação biológica. I. Campelo, Diego Sousa. II. Campelo, Thaís Portela Teixeira. III. Ferraz, Alexandre de Barros Falcão.

CDD: 615.32

Catalogação na publicação: Leandro de Sousa Sant'Anna - CRB 13/667

Digital Editora- CNPJ: 37.684.427/0001-66

© 2020- Digital Editora- Todos os direitos reservados.

Rua Luis Pires de Lima, 3770 – São João

Teresina – PI – CEP: 64.047-020

E-mail: contato@digitaleditora.com.br

Site: www.digitaleditora.com.br

Telefone: (86) 9 9495-7677

Publique seu livro com a Digital Editora. Para mais informações envie um e-mail para contato@digitaleditora.com.br

AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DA GARRAFADA DE CAROBINHA

ISBN: 978-65-89361-05-3 (e-Book)

Copyright © 2021 by Digital Editora

Copyright © 2021 Texto by Autores

Todo o conteúdo apresentado nesta obra é de responsabilidade do(s) autor(es), incluindo a correção, revisão ortográfica e gramatical do texto. O(s) mesmo(s) empenha(m-se) para citar adequadamente e dar os devidos créditos a todos os detentores de direitos autorais de qualquer material utilizado neste livro, dispondo-se a possibilitar acertos caso, inadvertidamente, a identificação de algum deles tenha sido omitida.

A editora não se responsabiliza pelo conteúdo, manutenção, atualização e idioma dos sites referidos pelo(s) autor(es) nesta obra. Comentários dos leitores, bem como correções ou sugestões que possibilitem o aprimoramento de edições futuras podem ser encaminhados à Digital Editora pelo e-mail contato@digitaleditora.com.br



Todos os direitos estão reservados e protegidos por Lei. Esta obra de acesso aberto (Open Access) está licenciada com uma Licença Creative Commons Atribuição-NãoComercial-SemDerivações 4.0 Internacional, sendo permitido o download da obra e compartilhamento desde que atribuído o crédito aos autores, sem alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Marcas Registradas: Todos os termos mencionados e reconhecidos como Marca Registrada e/ou Comercial são de responsabilidade dos seus proprietários. A editora informa não estar associada a nenhum produto e/ou fornecedor apresentado no livro.

CONSELHO EDITORIAL

Dr. Francisco das Chagas Araujo Sousa - <http://lattes.cnpq.br/6348603123335586>

Dr. Alvaro Francisco Lopes de Sousa - <http://lattes.cnpq.br/1255771708736991>

Dra. Ana Carla Marques da Costa - <http://lattes.cnpq.br/6002336421734300>

Phd. Jacenir Reis dos Santos Mallet - <http://lattes.cnpq.br/9643185827631520>

Dra. Khelyane Mesquita de Carvalho - <http://lattes.cnpq.br/3803143158962612>

Dr. Estélio Silva Barbosa - <http://lattes.cnpq.br/9917115701695838>

Msc. Laianny Luize Lima e Silva - <http://lattes.cnpq.br/3509411339767194>

Msc. Rosalba Maria Costa Pessôa - <http://lattes.cnpq.br/1947023382963441>

Msc. Wenysson Noletto dos Santos - <http://lattes.cnpq.br/8599251418329909>

Msc. Felipe Santana e Silva - <http://lattes.cnpq.br/5625927643552537>

Msc. Carlos Antonio da Luz Filho - <http://lattes.cnpq.br/3472862979228236>

Msc. Maria do Amparo Moura Alencar Rocha - <http://lattes.cnpq.br/7586848020525141>

Msc. Tiago Leal Catunda Martins - <http://lattes.cnpq.br/4495021777852960>

Msc. Francisco Braz Milanez Oliveira - <http://lattes.cnpq.br/1930356820921070>

Esp. Josilenni de Alencar Fonseca Santos - <http://lattes.cnpq.br/9059443475093525>

Esp. Paulo Ricardo Alves dos Reis Santos - <http://lattes.cnpq.br/0047521500954576>

BIBLIOTECÁRIO

Leandro Sousa Sant'Anna - CRB. Nº 13/667

Este trabalho foi desenvolvido nas instalações do Laboratório Farmacognosia e Fitoquímica, Laboratório de Genética Toxicológica e Laboratório de Biologia do Câncer da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA).

Dedico este trabalho

Aos meus pais José Arnodson Coelho de Sousa Campelo e Janira Sousa Campelo, a minha filha Maria Eduarda e minha esposa Thais Portela Teixeira Campelo, que sempre me apoiaram e entenderam a importância de manter-se sempre vivendo com a justiça e buscando a perfeição, ajudando gratuitamente sem esperar algo como retribuição.



AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por permitir que eu viva grandes momentos e me acompanhe por onde passo, abrindo as portas e tornando pacífica minha caminhada.

Agradeço ao meu orientador Prof. Alexandre de Barros Falcão Ferraz por toda sua contribuição na construção desta dissertação, sua paciência e horas de dedicação, sua disponibilidade e sobretudo seus conhecimentos transmitidos.

À Dr^a. Dione Silva Correia pela colaboração com os testes de HPLC e disponibilidade e paciência sempre que solicitada.

À Dr^a. Jaqueline Picada pela colaboração com os testes de mutagenicidade e disponibilidade para esclarecimentos.

À Dr^a. Ivana Grivicich pelo acolhimento e permissibilidade de fácil interação.

Aos professores do PPGGTA da ULBRA por todos os conhecimentos transmitidos.

A todos os colegas de mestrado pelo convívio nos momentos em que estávamos descobrindo este novo mundo e pelo companheirismo de todos, em especial ao, Leandro Mendes, Wilson Lelis, Luis Bernards, Natiely, Stela Braun, Eliane Tascheto, Rafael e Marcela S. dos Santos pela especial paciência e colaboração nos esclarecimentos de dúvidas e companheirismo, sempre ajudando quando solicitada.

Aos bolsistas de iniciação científica Maria Luiza e Suele Vencato pela ajuda na realização das atividades e pelo convívio em laboratório, vocês foram fundamentais para a conclusão desta dissertação.

Principalmente à minha família, meu pai Arnodson Campelo, minha mãe Janira Campelo, minha esposa Thais Portela Campelo e minha filha Maria Eduarda Campelo, vocês foram especiais nessa conquista.



SUMÁRIO

2021	AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DA GARRAFADA DE CAROBINHA	
	LISTA DE FIGURAS	9
	LISTA DE TABELAS	11
	LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	11
	RESUMO	11
	ABSTRACT	11
	1 INTRODUÇÃO 1.1 Plantas que constituem a garrafada da carobinha 1.1.1 <i>Carobinha (Calliandra fernandesii Barneby)</i> 1.1.2 <i>Jatobá (Hymenaea courbaril)</i> 1.1.3 <i>Uxi-amarelo (Endopleura uchi)</i> 1.1.4 <i>Cana-da-Índia (Costus spiralis)</i> 1.1.5 <i>Chapada (Terminalia actinophylla)</i> 1.2 Plantas medicinais na Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC)	11
	2 OBJETIVOS 2.1 Objetivo Geral 2.2 Objetivos Específicos	11

3 MATERIAIS E MÉTODOS 3.1 Material vegetal 3.2 Produção da Amostra 3.3 Análise fitoquímica 3.4 Determinação do teor de compostos fenólicos totais 3.5 Determinação do teor de taninos totais 3.6 Determinação do teor de flavonoides totais 3.7 Avaliação da capacidade antioxidante por DPPH 3.8 Efeito antiproliferativo 3.8.1 <i>Cultura celular</i> 3.8.2 <i>Estudos da inibição do crescimento celular</i> 3.9 Análise Cromatográfica por CLAE 3.10 Teste de mutagenicidade (Ames)	40
4 RESULTADOS 4.1 Screening fitoquímico 4.2 Doseamentos 4.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) 4.4 Análise antiproliferativa 4.5 Teste de Mutagenicidade (Ames)	66
5 DISCUSSÃO	66
6 CONCLUSÕES	66
7 REFERÊNCIAS	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Foto das partes aéreas de <i>Calliandra fernandesii</i>	18
Figura 2. Estrutura química do ácido oleanólico (A) e pulcherrimasaponina (B).....	19
Figura 3. Foto da árvore adulta e das cascas do jatobá-do-cerrado (<i>Hymenaea courbaril</i>).....	20
Figura 4. Foto da árvore adulta e das cascas de <i>Endopleura uchi</i>	22
Figura 5. Estrutura química das isocumarinas isoladas de <i>Endopleura uchi</i>	22
Figura 6. Foto das folhas de <i>Costus spiralis</i>	24
Figura 7. Foto da árvore adulta e das cascas da chapada (<i>Terminalia actinophylla</i>).	26
Figura 8. Estrutura química do ácido arjunólico	27
Figura 9. Curva analítica de calibração de quercetina para o doseamento de flavonoides.	34
Figura 10. Cromatograma dos padrões ácidos fenólicos e flavonoides em 254 nm. Os números indicados no cromatograma correspondem aos padrões usados: 1- ácido gálico; 2- ácido caféico; 3- ácido clorogênico; 4- rutina; 5- ácido elágico; 6- ácido rosmarínico; 7- quercetina.	36
Figura 11. Cromatograma da garrafada de dia 1.....	42
Figura 12. Cromatograma da garrafada 30 dias.....	42
Figura 13. Cromatograma da garrafada 60 dias.....	43
Figura 14. Sobreposição dos cromatogramas das garrafadas de 1 dia (vermelho), 30 (azul) e 60 dias (preto).....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados das plantas utilizadas na garrafada de carobinha (nome científico, nome popular, peso (g) do material e percentual)	39
Tabela 2. Resultado do screening fitoquímico de cada planta utilizada na confecção da “garrafada” analisada.	40
Tabela 3. Resultado do doseamento para flavonoides totais, fenólicos totais, taninos e DPPH das garrafadas de 1, 30 e 60 dias.	41
Tabela 4. Resultado das substâncias encontradas nas amostras das garrafadas de 1, 30 e 60 dias conforme análise dos padrões ácidos fenólicos e flavonoides.	44
Tabela 5. Efeito citotóxico (IC ₅₀ µg/ml) dos extratos das garrafadas de 1, 30, 60 dias e etoposídeo, em linhagens de células neoplásicas e saudáveis em período de incubação de 48 horas.	45
Tabela 6. Indução de his ⁺ revertentes em cepas <i>S. typhimurium</i> para as garrafadas de 1, 30 e 60 dias frente a TA98, TA97a, TA100 e TA102 sem ativação metabólica (S9 mix).	48
Tabela 7. Indução de his ⁺ revertentes em cepas <i>S. typhimurium</i> para as garrafadas de 1, 30 e 60 dias frente a TA98, TA97a, TA100 e TA102 com ativação metabólica (S9 mix).	49
Tabela 08. Composição química e atividades biológicas das plantas que compõem a garrafada de carobinha	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCD- Cromatografia de Camada Delgada

CN- Controle Negativo

CP- Controle Positivo

DNA- Ácido desoxirribonucléico

DPPH- 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

DRC- Doença renal crônica

EAG- Equivalência de ácido gálico

EQ- Equivalência de quercetina

CLAE- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

IM- Índice de Mutagenicidade

PNPI- Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

RE- Resolução

RPM- Rotações por minuto

SRB- Sulforrodamina B

SUS- Sistema Único de Saúde

UV- Ultravioleta

RESUMO

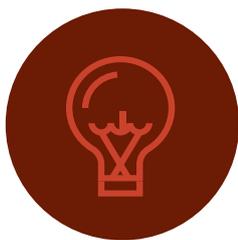
O uso de produtos naturais com fins terapêuticos está enraizado na cultura popular brasileira e na grande maioria dos casos estes produtos não passam por testes que comprovam o real efeito destes produtos. Nesse sentido, os produtos fitoterápicos tradicionais pode representar um risco para o usuário, e no sentido de investigar seus efeitos tóxicos, há a necessidade de avaliações químicas e biológicas utilizando testes pré-clínicos. A garrafada de carobinha é um produto artesanal produzido no mercado municipal de Teresina-PI e vem sendo utilizado por pacientes renais crônicos submetidos a hemodiálise que procuram um tratamento alternativo e complementar. A garrafada é composta por 5 plantas: *Hymenea courbaril* (jatobá); *Caliandra fernandesii* (carobinha); *Terminalia actinophylla* (chapada), *Endopleura uchi* (uchi-amarelo) e *Costus spiralis* (cana-da-índia). Neste estudo foi investigada a composição fitoquímica, assim como os efeitos antioxidantes, antiproliferativos e mutagênicos da garrafada de carobinha em diferentes tempos de armazenamento. O potencial antioxidante foi avaliado através do teste com DPPH, a análise de citotoxicidade foi realizada pelo ensaio de sulforrodamina B (SRB) frente as linhagens HT-29 (adenocarcinoma humano), HepG2 (câncer de fígado), MCF-7 (câncer de mama), U-251 (glioma), KB (célula tumoral geral), além de NIH-3T3 (linhagens de fibroblastos de camundongo), bem como os efeitos mutagênicos através do teste de Ames com as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98, TA97a, TA100 e TA102 com e sem ativação metabólica (S9 mix). Baseado nos dados do screening fitoquímico foi possível observar a presença de flavonoides e ausência de antraquinonas em todas as plantas. Através do teste de DPPH foi possível observar que o potencial antioxidante da amostra de 60 dias frente ao radical livre diminuiu estatisticamente em relação as amostras de 1 e 30 dias, acompanhando o mesmo padrão encontrado para o teor de taninos totais. Também devemos destacar que comparando a garrafada de 30 dias com a de 60 dias evidenciou-se uma redução estatística em todos os parâmetros avaliados (flavonoides, compostos fenólicos, taninos totais e potencial antioxidante pelo DPPH). A análise por CLAE evidenciou entre a garrafada de 1 e 60 dias uma diminuição na concentração de ácido elágico e quercetina e um aumento nos teores de ácido caféico e rutina. Em relação ao ensaio antiproliferativo, todas as amostras apresentaram citotoxicidade frente às linhagens tumorais e de fibroblastos avaliadas e no teste de Ames, obteve-se efeito mutagênico para as linhagens testadas TA98, TA97a e TA102 na concentração de 2500 µg/placa. Uma vez que a garrafada de carobinha apresentou efeitos citotóxicos e mutagênicos podemos sugerir que essa não seja consumida por pacientes em hemodiálise.

PALAVRAS-CHAVES: Análise química, antioxidantes, nefrologia

ABSTRACT

The use of natural products for therapeutic purposes is a common practice in Brazil and in most cases these natural preparations do not pass for tests to prove if they had biological effect. In this way, these herbal medicines can be hazardous for users and in order to investigate its effects it has needed to evaluate the chemical composition and the biological assessments using preclinical tests. The “garrafada of carobinha” is a handmade product produced at municipal market in Teresina-PI and it has been used by patients with chronic renal submitted on hemodialysis treatment. The “garrafada” comprises 5 different herbs: *Hymenea courbaril* (“jatobá”); *Caliandra fernandesii* (“carobinha”); *Terminalia actinophylla* (“chapada”), *Endopleura uchi* (“uchi-amarelo”) and *Costus spiralis* (“cana-da-índia”). In our study, we investigated the chemical composition and the antioxidant effects, the antiproliferative and mutagenic activity of “garrafada of carobinha” in different times of storage. The antioxidant potential was made by DPPH assay, the cytotoxicity evaluation was made by sulforhodamine B (SRB) assay in HT-29 (colorectal adenocarcinoma), HepG2 (hepatocellular carcinoma), MCF-7 (adenocarcinoma mammary), U-251 (glioblastoma), KB (carcinoma) and NIH-3T3 (mouse fibroblast). The mutagenic effects were by Ames test with *Salmonella typhimurium* strains: TA98, TA97a, TA100 and TA102 with and without metabolic activation (S9 mix). By the chemical screening, we detected the presence of flavonoids and the absence of anthraquinones in all plants. Through DPPH assay, we observed that the antioxidant potential of 60 days sample decreased statistically compared to 1 and 30 days samples, showing the same pattern of tannin content. We must highlight that when comparing the 30 days sample with 60 days samples it was observed a statistical reduction in all parameters evaluated (flavonoids, phenolic compounds, tannins and antioxidant potential by DPPH). The HPLC analysis showed that between the day 1 and day 60 “garrafada” a decrease in ellagic acid and quercetin concentrations and an increase in concentration of caffeoyl acid and rutin. In antiproliferative evaluation, all samples showed cytotoxicity against all cell lines tested. In Ames test, it was observed a mutagenic effect in TA98, TA97a and TA102 strains in 2500 µg/plate dose. Once the “garrafada of carobinha” showed cytotoxic and mutagenic effects, we may suggest that hemodialysis patients should not consume it.

KEYWORD: Chemical analysis, antioxidants, nephrology



INTRODUÇÃO

A falência dos rins de forma progressiva e irreversível é denominada de doença renal crônica (DRC), uma afecção multicausal, tratável de várias maneiras, controlável, porém sem cura e com elevada taxa de morbidade e mortalidade. Atualmente, as modalidades para o tratamento da DRC são a hemodiálise, diálise peritoneal ambulatorial contínua, diálise peritoneal automatizada e transplante renal, que permitem a manutenção da vida desses pacientes (FRAZÃO, RAMOS e LIRA, 2011).

A escolha do método de tratamento deve ser de forma individualizada, contemplando os aspectos clínicos, psíquicos e socioeconômicos do paciente. Entre as terapias de substituição da função renal, destaca-se a hemodiálise (HD). O paciente renal crônico em hemodiálise convive constantemente com a negação e as consequências da evolução da doença, além de um tratamento doloroso e com as limitações e alterações que repercutem na sua própria qualidade de vida (CASTRO, CAIUBY e DRAIBE, 2003).

O número de pacientes renais crônicos em tratamento dialítico no Brasil vem crescendo nos últimos anos, sendo considerada a nova epidemia do século XXI. Assim, melhorar a qualidade de vida e a sobrevivência do paciente, bem como prevenir e diminuir as complicações da terapia de substituição da função renal têm sido preocupações constantes dos profissionais de saúde (FRAZÃO, RAMOS e LIRA, 2011).

Os pacientes renais crônicos, geralmente, tornam-se desanimados e desesperados, e muitas vezes por essas razões ou por falta de orientação, abandonam o tratamento ou negligenciam os cuidados que deveriam ter. Este comportamento não cooperativo, assim como as dificuldades relativas à ocupação e à reabilitação são preocupações constantes tanto para os pacientes e familiares, quanto para a equipe interdisciplinar. É nesse cenário que se faz necessária a estimulação das suas capacidades, para que esses pacientes se adaptem de maneira positiva ao novo estilo de vida e assumam o controle do seu tratamento (MARTINS e CESARIANO, 2005).

O nível de escolaridade é um fator primordial, pois reflete de modo direto a assimilação das informações recebidas. A baixa escolaridade desses pacientes torna a compreensão a respeito da sua doença difícil, acarretando uma pouca adesão ao tratamento. Assim, cabe aos profissionais adequar a linguagem nas ações de educação em saúde, para que estes doentes crônicos possam compreender e colaborar no tratamento da sua enfermidade (FRAZÃO, RAMOS e LIRA, 2011).

A busca por produtos naturais como método terapêutico está presente de forma marcante na cultura popular. Muitos fatores têm contribuído para a utilização de plantas medicinais, entre eles, o difícil acesso

da população à assistência médica e farmacêutica, o custo dos medicamentos industrializados, bem como a influência exercida pelos meios de comunicação para consumo de produtos vindos de fontes naturais (VEIGA JUNIOR et al., 2005).

Com base no conhecimento empírico acumulado, desenvolvido através de uma dinâmica própria, as práticas médicas populares vão se adequando às realidades que o tempo histórico vai delineando; segundo, os diferentes contextos socioculturais, nos quais se inserem (CAMARGO, 2011). Isso permitiu que, mesmo com o desenvolvimento dos fármacos sintéticos, as plantas medicinais permanecessem como forma alternativa de tratamento em várias partes do mundo, observando-se nas últimas décadas a valorização do emprego de preparações à base de plantas para fins terapêuticos (TORULLA e NASCIMENTO, 2006). Mesmo com o desenvolvimento dos fármacos sintéticos, as plantas medicinais permaneceram como forma alternativa de tratamento em várias partes do mundo, observando-se nas últimas décadas a valorização do emprego de preparações à base de plantas para fins terapêuticos (BADKE, 2012).

Segundo Sra. Josefa de Sousa Marques (comunicação pessoal), a garrafada de carobinha é a mais vendida no mercado municipal na cidade de Teresina, Piauí, para pacientes com problemas renais que realizam hemodiálise e procuram esse tipo de tratamento alternativo mesmo não abandonando as seções de hemodiálise. A garrafada de carobinha é composta por uma mistura de cinco plantas: carobinha (*Calliandra fernandesii*); jatobá (*Hymenaea courbari*); uxi-amarelo (*Endopleura uchi*); cana-da-índia (*Costus spiralis*) e chapada (*Terminália actinophylla*).

PLANTAS QUE CONSTITUEM A GARRAFADA DA CAROBINHA

Carobinha (*Calliandra fernandesii* Barneby)

Calliandra fernandesii Barneby é uma espécie nativa do Brasil, que apresenta florescimento exuberante de coloração branca, rosa ou vermelho (Figura 1). Essa espécie é utilizada isoladamente como planta ornamental ou como cerca viva, mas na região nordeste também é utilizada como alimento para animais (LORENZI e SOUZA 2001; PAIVA 2003). Segundo Nia et al. (1999), esta planta é tradicionalmente utilizada por ter propriedades anticonvulsivante, antimicrobiana, analgésica, anti-helmíntica, antidepressiva, laxante e antitussígena (AGUNU et al., 2005). No Brasil, o extrato aquoso dos ramos de desta planta é usado como um remédio para a malária e leishmaniose (MILIKEN, 1997).

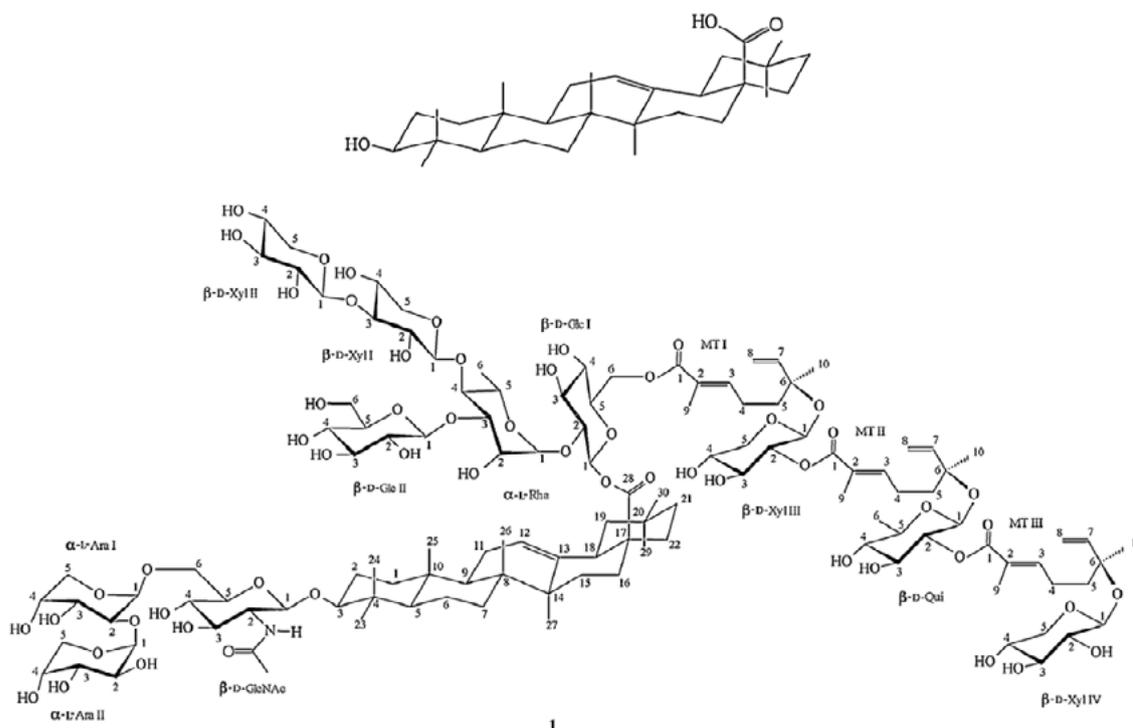
Figura 1. Foto das partes aéreas de *Calliandra fernandesii*.



Fonte: Fotografia do autor

Uma saponina triterpênica, chamada pulcherrimasaponina foi isolada a partir das folhas de *Calliandra pulcherrima*, a qual possui semelhanças estruturais com a saponina de quilaia (*Quillaja saponaria* Molina) que possui potencial adjuvante (SILVA et al., 2005). Em estudo realizado por Silva e Parente (2013) os autores demonstraram que a resposta imunológica da pulcherrimasaponina foi inexistente, mas tem um bom potencial para ser utilizada como adjuvante em vacinas.

Figura 2. Estrutura química do ácido oleanólico (2) e pulcherrimasaponina (1)



Fonte: Silva e Parente, 2013.

A atividade analgésica da raiz e folhas da *Calliandra portoricensis* foi verificada quando os extratos metanólicos foram testados por ensaios de contorção induzida por formalina e ácido acético em ratos com sua propriedade analgésica sendo evidenciada com a supressão da constrição abdominal induzida por ambas as substâncias (AGUNU et al., 2005). Correia e Calisto (1993), corroborando os estudos de Agunu et al. (2005), sugerem que extratos de raízes e folhas de *C. portoricensis*, apresentam propriedades analgésicas aliviando a dor abdominal e seus sinais e sintomas neurogênicos e inflamatórios, constatando aquilo que é popularmente orientado.

Jatobá (*Hymenaea courbaril*)

O termo jatobá refere-se às espécies arbóreas do gênero que pertencem a família Fabaceae. O jatobazeiro (Figura 3), conhecido também por jataí ou jutaí, é uma leguminosa típica do cerrado brasileiro, ocorrendo no Distrito Federal e nos estados de Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso, Bahia e São Paulo (SILVA et al., 2001).

Figura 3. Foto da árvore adulta e das cascas do jatobá-do-cerrado (*Hymenaea courbaril*).

Fonte: Fotografia do autor

O fruto do jatobazeiro é utilizado na produção de alguns produtos como biscoitos e farinhas. A árvore é considerada própria para ornamentação urbana, com madeira apreciada para construção civil e naval, podendo extrair de sua entrecasca, por meio de cozimento uma tinta de cor vermelha (EMBRAPA, 2010).

O chá produzido a partir das cascas do jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) é utilizado na medicina popular como analgésico, antisséptico, cicatrizante, expectorante, laxante, purgativo, sedativo, estimulante e tônico. Além disso, é indicado para tratar problemas nos rins, fígado e infecções intestinais (LORENZI e MATOS, 2002; EMBRAPA, 2010).

Quanto a composição química dos extratos das cascas de jatobá já foram relatados diterpenos, sesquiterpenos, flavonóides, e oligossacárideos (VEGGI et al., 2014). Sabe-se que o elevado conteúdo de compostos fenólicos presentes em extratos de jatobá é devido à presença de procianidinas. As procianidinas, são flavonoides que podem formar taninos condensados, os quais são conhecidos por possuir alto poder antimicrobiano, antifúngico, antioxidante, anti-inflamatório, antireumático, além de poder inibir a transcriptase reversa do HIV (SHAD, 2012).

Uxi-amarelo (*Endopleura uchi*)

Endopleura uchi (Umiriaceae) é uma espécie brasileira encontrada em florestas de terra firme (não-alagadas) espalhada por toda a bacia Amazônica que é popularmente conhecido como uxi-amarelo (Figura 4). A planta é conhecida localmente como uxi, uxi-amarelo, cumatê, pururu, uxi-liso, uxi-ordinário ou uxi-pucu.

A decocção das cascas dessa planta é utilizada na medicina como um agente anti-inflamatório e para tratar a artrite, colesterol, diabetes, infecções uterinas e miomas (NUNOMURA et al., 2009).

Figura 4. Foto da árvore adulta e das cascas de *Endopleura uchi*.

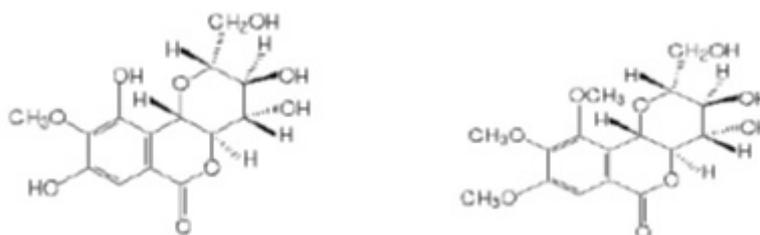


Fonte: http://ursasentada.blogspot.com/2005_08_01_archive.html

Estudos fitoquímicos com essa espécie levaram ao isolamento das isocumarinas bergenina e 8,10 dimetoxibergenina (Figura 5). Além desses constituintes químicos, o estudo com o extrato aquoso liofilizado das cascas de *Endopleura uchi* verificou a presença de açúcares redutores, taninos, lactonas sesquiterpênicas e outras lactonas (POLITI, 2009).

Segundo Veggi et al. (2014), o elevado conteúdo de compostos fenólicos presentes em extratos de jatobá é devido à presença de taninos condensados, os quais são conhecidos por possuir atividade antioxidante, e anti-carcinogênica (mama, próstata, pele e estômago) (SHAD et al., 2012).

Figura 5. Estrutura química das isocumarinas isoladas de *Endopleura uchi*



Fonte: Magalhães et al., 2007.

Politi (2009) em análise de citotoxicidade em células de mamíferos indicaram que os extratos aquoso, etanólico e hidroalcoólico exibiram IC_{50} com valores maiores do que a maior concentração utilizada, mostrando que eles não apresentam um risco quando consumidos sob essas condições.

Os resultados dos testes de toxicidade oral aguda em camundongos não revelaram sinais de toxicidade sistêmica com a administração por gavagem do extrato das cascas de *E. uchi* obtido por decoção. Neste estudo, não foram observadas mortes, tampouco alterações fisiológicas ou comportamentais em nenhum dos animais. Segundo os autores, estes dados indicam o decocto das cascas de *E. uchi* como pouco tóxico (POLITI et al., 2010). Embora não tenham sido realizados estudos para confirmar a sua eficácia ou segurança, as cascas desta planta são largamente vendidas em feiras, mercados e farmácias magistrais em todo o país para o tratamento de artrite, colesterol, diabetes, inflamação e doenças intestinais (POLITI et al., 2010).

Cana-da-Índia (*Costus spiralis*)

A cana-da-Índia, espécie pertencente à família Zingiberaceae, é uma planta medicinal, nativa (Figura 6) principalmente na mata atlântica e região Amazônica (SILVA JUNIOR, 1998). Essa espécie é restrita a ambientes encharcados e sombreados e está sob forte pressão antrópica, pois suas folhas, hastes e rizomas são empregados na medicina tradicional de longa data (EMBRAPA 2002).

Figura 6. Foto das folhas de *Costus spiralis*.



Fonte: Fotografia do autor.

Na medicina popular as folhas de cana-da-Índia são utilizadas devido a sua ação depurativa e diurética, aliviando infecções urinárias e auxiliando na eliminação de pedras renais (LORENZI e MATOS, 2002). Segundo o conhecimento empírico, a cana-da-Índia também auxilia no tratamento de sífilis, gonorreia e *diabetes mellitus* (EMBRAPA 2002). Parente e Silva (2000, 2003) mencionam que cana-da-Índia também é utilizada para o tratamento de constipações, dor de garganta, disenteria e diarreia.

As folhas da *C. spiralis* são amplamente utilizadas pela medicina popular como diurética, hipotensora, citotóxica, antidiarreica, antiespasmódica, antiurolítica, antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, antiesmaniose, anti-inflamatória e antidematogênica (LORENZI e MATTOS, 2002).

Em estudo com plantas usadas na medicina tradicional no Brasil, Braga et al (2007) descreveram que *C. Spirallis* é indicada no tratamento de sífilis, nefrite e cistite, como agente antimicrobiano, antifúngico, e leishmanicida. Kistler e Obeyesekere (2007) também descreveram a utilidade popular do suco de folhas de *C. spiralis* no tratamento de taquicardia.

Com base no uso tradicional, o efeito do extrato aquoso de *C. spiralis* foi avaliado no tratamento oral para impedir a formação e crescimento de cálculos renais induzidos com oxalato de cálcio em ratos. Os dados mostraram uma redução no crescimento dos cálculos urinários em ratos com litíase induzida experimentalmente, confirmando informações populares sobre o efeito do extrato (VIEL et al.,1999).

Segundo Gouveia e Magnata (2011), o extrato aquoso obtido por decocção das folhas apresenta potencial anti-inflamatório, comprovado através da redução significativa do edema induzido por car-

ragenina em patas de camundongos fêmeas, após administração por via oral quando comparado ao grupo controle, além de não apresentar letalidade ou toxicidade da determinação de DL50.

A análise fitoquímica das folhas de *C. spiralis* revelou a presença de flavonoides como 3,5-dihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona e 3-O-neohesperidosídeo (ANTUNES et al., 2000; BRAGA et al., 2007). Além disso, foi descrita a presença de ácido oxálico, taninos, sistosterol, saponinas, esteroides, alcalóides, mucilagens, e pectinas (VIEIRA e ALBUQUERQUE, 1998; BRAGA et al., 2007).

Chapada (*Terminalia actinophylla*)

Terminalia actinophylla pertence à família Combretaceae, é uma árvore amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais do Brasil (Figura 7). A casca seca e triturada da árvore tem sido usada em uma preparação medicinal popular e sob forma de infusão em água quente para fins anti-diarréicos e hemostático no estado do Piauí (Brasil). Análises fitoquímicas qualitativas indicaram que o extrato metanólico de *T. chebula* contém taninos, flavonoides e saponinas, enquanto que cumarinas e alcalóides não foram encontrados. (SOFOWARA, 2009).

As cascas de várias espécies do gênero *Terminalia* são ricas em compostos fenólicos, incluindo flavonoides (arjunona, arjuna, luteolina), ácido gálico, ácido elágico, proantocianidinas oligoméricas, fenilpropanóides e taninos (GRAF et al., 1984; KAUR et al., 2000; DWIVEDI, 2007).

Investigações fitoquímicas com espécies do gênero *Terminalia* também indicaram a presença de triterpenos (ácido arjúnico, ácido arjunólico, arjugenina), saponinas (arjunina, arjunglucosídeo I sericosídeo, terminaliasídeo e iverosídeo C), fitosteróis, cálcio, magnésio, zinco e cobre (DWIVEDI, 2007; CAO et al., 2010; PONOU et al., 2010).

Figura 7. Foto da árvore adulta e das cascas da chapada (*Terminalia actinophylla*).



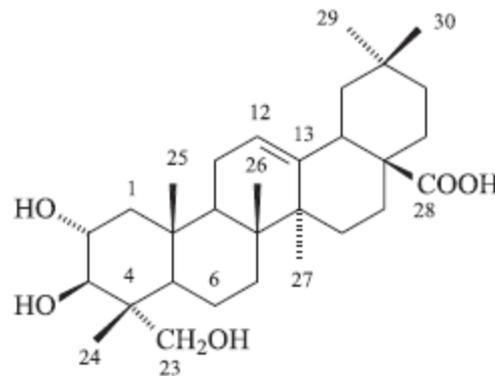
Fonte: Fotografia do autor.

Outras espécies de *Terminalia* tiveram seus compostos isolados e estes têm sido alvo de pesquisas sobre suas atividades farmacológicas. Estudo realizado por Manna et al. (2006) demonstrou que o extrato aquoso de cascas de *Terminalia arjuna* impediu efeitos hepatotóxicos e nefrotóxicos induzida por tetracloreto de carbono (CCl_4), assim como o extrato metanólico de *T. arjuna* administrado por via oral com (400 mg/kg) apresentou atividade gastroprotetora frente a úlceras gástricas induzidas por

diclofenaco de sódio em ratos (DEVI et al., 2007).

Segundo Bhawani et al. (2013), o ácido arjunólico (Figura 8) é um triterpeno extraído das cascas de *T. arjuna* que demonstrou significativa proteção cardíaca, uma vez que aumentou os níveis de antioxidantes como superóxido dismutase, catalase, glutathiona, alfa-tocoferol e ácido ascórbico. Esta associação também é sugerida por Devi et al. (2007) que baseados em seu estudo, afirmaram que *T. arjuna* atua como um agente gastroprotetor, provavelmente devido a sua atividade de eliminação de radicais livres.

Figura 8. Estrutura química do ácido arjunólico



Fonte: Vieira et al., 2004.

PLANTAS MEDICINAIS NA POLÍTICA NACIONAL DE PRÁTICAS INTEGRATIVAS E COMPLEMENTARES (PNPIC)

A institucionalização de abordagens de atenção à saúde, voltadas para a medicina tradicional no Brasil, levou a criação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no SUS, instituída pela Portaria do Ministério da Saúde (MS) nº 971, de 03 de maio de 2006 (BRASIL, 2006). Com este impulso, passou a ser muito importante avaliar as características químicas, biológicas e toxicológicas de preparações com elevado consumo, visando proteger a população.

As garrafadas são consideradas herdeiras das velhas triagas, fórmulas secretas conhecidas dos reis e desde a antiguidade e preparadas pelos médicos. A utilização de garrafadas para os mais variados tratamentos é um costume que permanece marcante na cultura do nordestino até os dias atuais e com crescimento nos últimos anos. O estudo das garrafadas é uma tarefa difícil, pois centra-se nas plantas indicadas pelo informante, cujos nomes vulgares confundem o pesquisador. Porém, existem curadores que preparam-nas com as plantas que têm à sua disposição, nas imediações das áreas onde habitam. Nestas condições, torna-se possível a coleta das plantas mencionadas pelo informante, assim como o retorno do pesquisador àquelas áreas, se necessário, para a obtenção das espécies quando em tempo de floração, para a devida identificação botânica (CAMARGO, 2011). Formulações com uma única planta ou com combinações de plantas são utilizadas com frequência para vários objetivos terapêuticos. Entretanto, muitas vezes, as formulações são utilizadas baseadas na justificativa de que os constituintes obtidos da natureza são atóxicos ou menos tóxicos que medicamentos sintéticos (WOJCIKOWSKI, JOHNSON e GOBÉ, 2004).

Nesse sentido, o Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos instituído em 2007, busca garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e

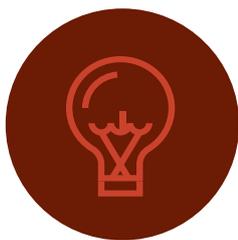
da indústria nacional (BADKE, 2012). Contudo, para o uso racional de plantas medicinais é essencial uma profunda abordagem de tais produtos, visando prevenir seus efeitos indesejáveis (FERNANDES, RAVANHANI e BERTONCIN, 2009).

A determinação dos níveis de compostos fenólicos totais em tecidos vegetais é a etapa inicial de qualquer investigação. A capacidade redutora destes compostos pode ser uma das prioridades utilizadas para nortear a quantificação inicial, porém em vegetais a presença de outros interferentes requer uma metodologia confiável para tais avaliações (ANTOLOVICH et al., 2000).

Os radicais livres e outros oxidantes, vem sendo considerados nos últimos anos como grandes causadores de doenças como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune, disfunções cerebrais e diabetes mellitus tipo I (SOUSA et al., 2007). A produção de radicais livres ocorre naturalmente durante ações catalíticas de enzimas, no metabolismo celular ou pela exposição à fatores exógenos (BARREIROS et al., 2006; BIANCHI et al., 1999). De acordo com Sousa et al. (2007), denominam-se antioxidantes, as substâncias que presentes em concentrações baixas, comparadas ao substrato oxidável, retardam significativamente ou inibem a oxidação do substrato (BARREIROS et al., 2006). Assim, pesquisas têm se voltado para o desenvolvimento de produtos naturais com atividade antioxidante. É possível que a presença de flavonoides nos compostos de qualquer produto possa ser uma importante fonte para redução do estresse oxidativo (NASCIMENTO et al., 2011).

Com o crescimento do uso de plantas medicinais no Brasil nas últimas décadas, observa-se a quantidade de informações sobre o risco potencial que essas plantas oferecem a saúde. Por conter substâncias químicas conhecidas como mutagênicas e/ou carcinogênicas, muitas plantas são correlacionadas com o surgimento de tumores e cânceres (MOREIRA et al., 2002). Nesse sentido, visando conhecer o potencial toxicológico de extratos vegetais, a avaliação das substâncias em relação à mutagenicidade e genotoxicidade é uma importante ferramenta baseada na combinação de testes que servem para a detecção dos possíveis danos genéticos associados a doenças humanas. Mesmo que se considere que nenhum único ensaio detecte todos os possíveis danos ao DNA, o teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (conhecido como teste de Ames) deve ser aplicado a qualquer nova substância antes da mesma chegar à população, para constatação do seu possível potencial mutagênico (OECD, 1997).

Segundo a informação da Sra. Josefa, o prazo de validade da garrafada de carobinha é indeterminado e quanto mais tempo passar armazenada, melhor será o efeito. Além disso, como o tempo mínimo para consumo de uma garrafada é de um mês, surge a preocupação com a estabilidade, pois a garrafada é constituída por 5 plantas distintas e isso envolve inúmeros constituintes, os quais podem estar sendo degradados nesta preparação que, por informações coletadas, não necessita de nenhum cuidado de armazenamento. Portanto, este estudo busca investigar a composição química e propriedades biológicas da garrafada de carobinha e a influência do tempo de armazenamento desta preparação.



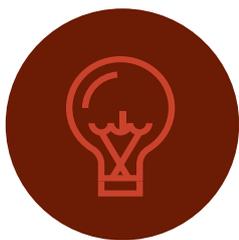
OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Investigar a composição fitoquímica assim como os efeitos antioxidantes, antiproliferativos e mutagênicos da garrafada de carobinha em diferentes tempos de armazenamento.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar através dos ensaios qualitativos do *screening* fitoquímico a constituição de cada espécie presente na garrafada.
- Determinar o teor de compostos fenólicos, taninos e flavonoides totais nas amostras em diferentes tempos de armazenamento.
- Caracterizar o perfil cromatográfico por CLAE das amostras em diferentes tempos de armazenamento.
- Determinar o potencial antioxidante por DPPH das amostras em diferentes tempos de armazenamento.
- Avaliar o potencial citotóxico *in vitro* das amostras em diferentes tempos de armazenamento frente a linhagens celulares de mamíferos.
- Verificar o efeito mutagênico *in vitro* das amostras em diferentes tempos de armazenamento frente a linhagens de *Salmonella typhimurium*.



MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL

A garrafada de carobinha foi preparada a partir do jatobá (*Hymenaea courbaril*) (TEPB 30310); uxi-amarelo (*Endopleura uchi*); cana-da-índia (*Costus spiralis*) (TEPB 30374), chapada (*Terminalia actinophylla*) (TEPB 30375) e carobinha (*Calliandra fernandesii*) (TEPB 30231). Todas as espécies foram obtidas no estado do Piauí e suas partes aéreas foram coletadas para confecção das exsicatas e posterior registros botânicos no herbário da Universidade Federal do Piauí – UFPI.

PRODUÇÃO DA AMOSTRA

Foram preparadas 3 amostras da garrafada de carobinha no laboratório de fitoquímica da ULBRA, após a pesagem das cascas (chapada, jatobá, uxi-amarelo e carobinha), preparo da infusão com as folhas de cana-da-índia e acréscimo do vinho usado na composição até o volume conforme a quantidade dos ingredientes usados na preparação artesanal informado pela Sra. Josefa de Sousa Marques (comunicação pessoal).

Para obtenção do extrato, as garrafadas foram filtradas e concentradas até *secura* em evaporador rotatório com temperatura inferior a 50°C. Para o cálculo do peso, foi separado individualmente o material de cada planta para três garrafadas. Posteriormente, as amostras de cada planta foram pesadas e calculou-se seu peso médio e desvio padrão. As amostras foram avaliadas quanto a sua estabilidade mantidas em estufa a temperatura de 40°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) conforme indicado por RE nº1, de 29 de julho de 2005. Cada garrafada foi processada nos períodos de 1, 30 e 60 dias e analisadas quanto a suas características químicas e biológicas.

ANÁLISE FITOQUÍMICA

Esta análise busca determinar, através de uma metodologia qualitativa colorimétrica quais metabólitos secundários estão presentes nas amostras. O *screening* foi realizado com as cascas de *Calliandra fernandesii*, *Hymenaea courbaril*, *Endopleura uchi*, *Terminalia actinophylla* e as folhas de *Costus spiralis*, seguindo as metodologias descritas por Falkenberg, Santos e Simões (2007) e Harbone (1998). Para confirmar os resultados negativos, foi realizada análise através da cromatografia de camada delgada (CCD) utilizando sistemas eluentes e reveladores propostos por Wagner e Bladt (1996).

DETERMINAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

O conteúdo total de compostos fenólicos presentes nas amostras foi determinado pelo método Folin-Ciocalteu. Para a preparação da curva de calibração foi utilizada 1 mL das soluções de ácido gálico em etanol nas concentrações de 0,015; 0,024; 0,075 e 0,105 mg/mL que foram misturadas com 5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (1:10) e 4 mL de carbonato de sódio (75 g/L) (SINGLETON e ROSSI, 1965). A absorção foi lida após 30 minutos no comprimento de onda de 765 nm. Para o teste, foi utilizado 1 mL do extrato na concentração de 0,1 mg/mL. Foi adicionado 5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (1:10) e 4 mL de carbonato de sódio (75 g/L). Após 1h, foi lida a absorbância em 765 nm. A quantidade total de compostos fenólicos foi expressa em equivalentes de ácido gálico (EAG) por mg/g de extrato (MILIAUSKAS et al., 2004).

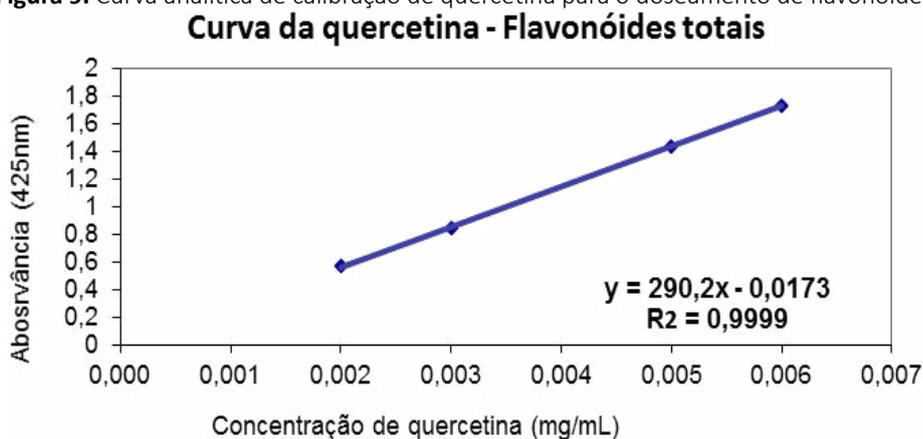
DETERMINAÇÃO DO TEOR DE TANINOS TOTAIS

O conteúdo total de taninos também foi determinado pelo método Folin-Ciocalteu (SINGLETON e ROSSI, 1965). Logo após a dosagem de fenólicos totais foi adicionada caseína a mesma solução para precipitação dos taninos. Foi separado 10 mL do extrato previamente preparado e adicionado 0,10 g de caseína, ficando estes sob agitação vigorosa por 60 minutos. Após o tempo estabelecido, essa solução foi centrifugada por 15 minutos a 1500 RPM. Em seguida foram retirados 5 mL do sobrenadante e diluídos em 25 mL de água destilada. Logo após, foi transferido 2 mL dessa solução para um balão de 25 mL, onde foi adicionado 1 mL do reagente Folin-Ciocalteu (1:10), 10 mL de água destilada e completado o volume com a solução de carbonato de sódio (75 g/L). Após 30 minutos, foi medida a absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 760 nm, utilizando o branco de solução, preparado da mesma forma, apenas substituindo o extrato por água. Para o teste, foi utilizado 1 mL do extrato na concentração de 0,1 mg/mL. Foram adicionados 5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (1:10) e 4 mL de carbonato de sódio (75 g/L). Após 1h, foi lida a absorbância em 765 nm e o valor determinado com base na curva de calibração do ácido gálico. A quantidade total de taninos foi expressa em equivalentes de ácido gálico (EAG) por mg/g de extrato (MILIAUSKAS et al., 2004)

DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS

A quantificação de flavonoides presentes nas amostras foi realizada através da metodologia descrita por Woisky e Salatino (1998) que utiliza solução de cloreto de alumínio a 2,5%. Essa técnica baseia-se na formação de complexos estáveis entre o cátion alumínio e os flavonoides presentes na amostra. Iniciou-se o teste, pesando-se 0,05 g do extrato aquoso liofilizado e o diluindo em 25 mL de etanol (EtOH). Transferindo-se 2 mL da solução anterior para um balão volumétrico de 25 mL, adicionou-se 1 mL de solução de cloreto de alumínio a 2,5% e completou-se o volume com etanol até a demarcação presente no balão. Para a preparação do branco, dilui-se 1 mL da solução de cloreto de alumínio com etanol em balão volumétrico de 25 mL. Após 30 minutos foi realizada a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 425 nm. O teor de flavonoides foi calculado através da equação da reta obtida na curva de calibração de quercetina (Figura 9), onde se substituiu o y pela absorbância encontrada e obteve-se a relação de miligramas de flavonoides equivalentes de quercetina (EQ) por mililitro de extrato. A curva foi construída da mesma maneira que as amostras testadas, nas concentrações de 0,002 até 0,008 mg/mL. O valor obtido através da substituição da absorbância do teste na curva foi convertido para expressar o resultado em flavonoides equivalentes de quercetina por grama de extrato liofilizado.

Figura 9. Curva analítica de calibração de quercetina para o doseamento de flavonoides.



Avaliação da capacidade antioxidante por DPPH●

Para a avaliação antioxidante das amostras foi utilizado o método *in vitro* com o radical livre estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). Primeiramente, realizou-se um pré-teste para avaliar a faixa de concentração que a solução teste possui. Pesou-se 10 mg do extrato bruto e diluiu-se em metanol (MeOH) para a obtenção das concentrações desejadas. Transferiu-se 2,5 mL de amostra para cubetas de 3,5 mL e adicionou-se 1 mL da solução de DPPH na concentração de 0,2 mg/mL. Para cada amostra, foi confeccionado um controle negativo, que consiste na amostra sem o DPPH e o controle positivo, que consiste em apenas 1 mL de DPPH diluído em 2,5 mL de metanol. Após 30 minutos foi medida a absorbância em espectrofotômetro em comprimento de onda de 517 nm (MENSOR et al., 2001). Estabeleceu-se a faixa em que o extrato apresentou o início da atividade antioxidante e procedemos às seguintes diluições para o teste: 2 µg/mL; 8 µg/mL; 16 µg/mL; 32 µg/mL e 40 µg/mL. A porcentagem de inibição de DPPH, que diz respeito à atividade antioxidante, foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ de Inibição de DPPH} = [(Abs_{\text{controle}(+)} - Abs_{\text{amostra}}) \times 100] / Abs_{\text{controle}(+)}$$

Após a obtenção das porcentagens de inibição, esses dados foram utilizados para calcular a concentração inibitória para 50% de radicais livres (IC_{50}) através do software Prism 5 for Windows.

EFEITO ANTIPROLIFERATIVO

Cultura celular

Para a avaliação do efeito antiproliferativo foram utilizadas as linhagens derivadas de tumores humanos como adenocarcinoma humano (HT-29), células de câncer de fígado (HepG2), células de câncer de mama (MCF-7), glioma (U-251), célula tumoral geral (KB) além da linhagem de fibroblasto de camundongos sem carcinoma NHI-3T3. As células foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640 contendo 2% de glutamina (p/v) e 10% de soro fetal bovino (v/v) à temperatura de 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade.

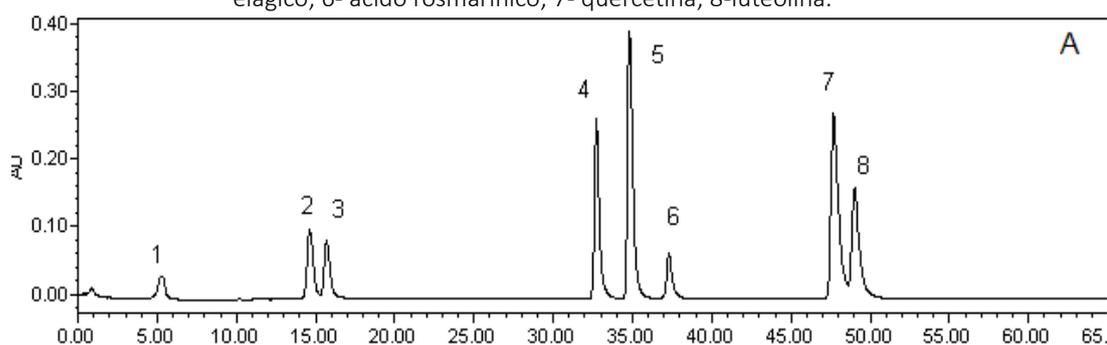
Estudos da inibição do crescimento celular

Todas as linhagens celulares foram inoculadas em placas de microtitulação de 96 poços e estabilizadas por 24 horas. Após, foram tratadas por 72 horas com os extratos a concentrações de 100 µg/mL. As respostas celulares foram determinadas usando o ensaio sulforrodamina B (SRB), envolvendo fixação com ácido tricloroacético, marcação com SRB, e avaliação colorimétrica da quantidade de SRB ligada às células. Os extratos foram avaliados quanto ao seu potencial de inibição de crescimento celular através do IC_{50} (concentração mínima necessária para inibir 50% do crescimento celular) nas seis linhagens em doses crescentes de 0-100 µg/mL (SKEHAN et al., 1990).

ANÁLISE CROMATOGRÁFICA POR CLAE

As amostras foram submetidas à análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para verificar a presença de ácidos fenólicos (ácidos gálico, cafeico, clorogênico, elágico e rosmarínico) e flavonoides (rutina, quercetina e luteolina. Para essa análise, utilizou-se o cromatógrafo Waters, modelo 2690, equipado com detector de UV/VIS Waters 2487 Dual Absorbance. A fase móvel utilizada foi uma mistura de acetonitrila (eluente A), água e ácido acético a 0,25% (eluente B). Como gradiente de eluição, utiliza-se: (0-10 min) 1-20% A; (10-25 min) 30% A; (25-30 min) 30-1% A e 5 min isocrático 1%. Como fase fixa empregou-se uma coluna Waters Spherisorb 5µm ODS2 (4,6x250 mm). As amostras e os padrões foram solubilizados em metanol. Para essa análise cromatográfica, foram injetados 20 µL de amostra sob o fluxo constante de 0,80 mL/min. Os comprimentos de onda avaliados foram 254 e 290 nm. O teor dos produtos foi quantificado a partir de uma curva de calibração padrão e os resultados foram expressos em µg/mL do extrato. Todos procedimentos cromatográficos ocorreram em triplicata e a temperatura ambiente.

Figura 10. Cromatograma dos padrões ácidos fenólicos e flavonoides em 254 nm. Os números indicados no cromatograma correspondem aos padrões usados: 1- ácido gálico; 2- ácido caféico; 3- ácido clorogênico; 4- rutina; 5- ácido elágico; 6- ácido rosmarínico; 7- quercetina; 8- luteolina.

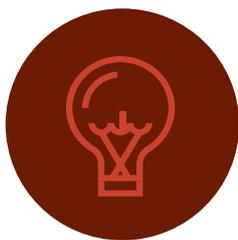


TESTE DE MUTAGENICIDADE (TESTE DE AMES)

No teste de Ames (1984) empregou-se as linhagens de *Salmonella typhimurium*, auxotróficas para histidina (*his*-), apresentando diferentes mutações no operon deste aminoácido. Tais linhagens são construídas para detectar mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura ou substituição de pares de bases no DNA. Vários procedimentos podem ser empregados na realização do teste de mutação gênica reversa em bactérias. As variações podem se referir à forma de exposição das bactérias ao agente genotóxico, bem como à utilização de diferentes volumes máximos de amostra por tratamento.

A cultura bacteriana, a amostra e o sistema de metabolização foram misturados em um tubo e pré-incubados por 20 a 30 minutos antes de receber o ágar de superfície e posterior plaqueamento. As linhagens que foram utilizadas são as de *Salmonella typhimurium* auxotróficas para histidina, TA98, TA100, TA97a, TA102. Os ensaios foram realizados na presença e ausência de um sistema de ativação metabólica, contendo fração microsomal S9 composta por um homogeneizado de células de fígado de ratos pré-tratados com Aroclor-1254. A fração S9 é acrescida de cofatores e necessita de condições de pH específicas para que as reações de metabolização possam ocorrer. Utilizou-se como controles positivos compostos comprovadamente mutagênicos, em concentrações já padronizadas para cada linhagem.

As amostras foram testadas até o limite de sua solubilidade e citotoxicidade, dissolvidas em água. A solubilidade foi medida visualmente, pela precipitação observada na mistura ou na placa. A citotoxicidade foi verificada através de observação visual da alteração do crescimento de fundo (conhecido como *background*), pela redução do número de colônias revertentes por placa em relação ao controle negativo, ou ainda pelo decréscimo de sobrevivência celular, calculando-se a viabilidade das culturas tratadas e não tratadas com a amostra teste. O ensaio incluiu 4 doses da amostra com três repetições por dose. Os resultados do ensaio foram submetidos a análise de variância (ANOVA). A amostra foi considerada positiva quando apresentou: ANOVA significativa ($p < 0,05$); índice ou razão de mutagenicidade (IM/RM) = 2,0 para as linhagens TA98, TA100, TA97a, TA102.



RESULTADOS

As garrafadas de carobinha utilizadas neste estudo foram produzidas no laboratório de fitoquímica da ULBRA de acordo com o modo de preparo da Sra. Josefa de Sousa Marques (comunicação pessoal) (Tabela 1). Todas as plantas foram coletadas e tiveram confeccionadas suas respectivas exsicatas depositadas no Herbário Graziela Barroso – TEPB/UFPI.

Tabela 1. Dados das plantas utilizadas na garrafada de carobinha (nome científico, nome popular, peso (g) do material e percentual)

Nome científico	Nome Popular	Peso Médio \pm DP(g) *	Percentual
<i>Hymenaea courbaril</i>	Jatobá	107,94 \pm 1,53g	33,81%
<i>Calliandra fernandesii</i>	Carobinha	84,94 \pm 3,96g	26,56%
<i>Terminalia actinophylla</i>	Chapada	83,14 \pm 4,76g	26,04%
<i>Endopleura uchi</i>	Uxi Amarelo	35,71 \pm 6,93g	11,19%
<i>Costus spiralis</i>	Cana-da-índia	7,66 \pm 0,31g	2,40%
Total	-	319,39g	100%

DP- Desvio padrão das amostras das plantas.

A tabela 1 também apresenta o peso médio de cada planta utilizada na preparação da garrafada, assim como, sua relação percentual com a massa total utilizada nesta preparação. Com isso, foi possível observar que *Hymenaea courbaril*; *Calliandra fernandesii*, *Terminalia actinophylla*; correspondem a mais de 85% em peso médio (g) do material utilizado para a produção da garrafada.

Foi realizada uma análise para verificar o pH das amostras, conforme armazenamento seguindo critérios para teste de estabilidade indicado por RE nº1, de 29 de julho de 2005 (estufa a 40°C \pm 2), onde foi encontrado como resultado de pH para amostra de 1 dia (3,77), 30 dias (4,37) e 60 dias (3,90).

SCREENING FITOQUÍMICO

Conforme metodologia descrita anteriormente, realizou-se testes para as classes de metabólitos secundários: alcalóides, antraquinonas, cumarinas, flavonoides, saponinas e taninos. Os testes foram realizados com os extratos obtidos das cascas (caroba, uchi-amarelo, jatobá e chapada) e folhas (cana-da-Índia). Observa-se na tabela 2 a presença de flavonoides e a ausência de antraquinonas em todas as plantas, assim como os demais resultados do *screening* fitoquímico. Além disso, a presença de alcalóides e cumarinas foi encontrada apenas nas folhas da cana-da-Índia e nas cascas do uchi-amarelo, respectivamente.

Tabela 2. Resultado do *screening* fitoquímico de cada planta utilizada na confecção da garrafada analisada.

Classe Química	Carobinha	Cana-da-índia	Uchi	Jatobá	Chapada
Alcalóides	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
Antraquinonas	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cumarinas	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
Flavonoides	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Saponinas	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
Taninos	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo

DOSEAMENTOS

De acordo com os dados apresentados na tabela 3, é possível observar que houve um aumento no teor de flavonoides totais e fenólicos totais quando comparamos a amostra de 1 dia com a amostra de 30 dias. Contudo, os teores de flavonoides totais da amostra de 60 dias são estatisticamente inferiores ao de 30 dias. Além disso, é possível identificar que não houve variação com significância estatística entre as amostras de 1 dia e 30 dias na concentração de taninos totais, contudo o teor da amostra de 60 dias é estatisticamente inferior a de 30 dias.

Tabela 3. Resultado do doseamento para flavonoides totais, fenólicos totais, taninos e DPPH das garrafadas de 1, 30 e 60 dias.

	Garrafada 1 dia	Garrafada 30 dias	Garrafada 60 dias
Flavonoides totais	3,29 ± 0,08	3,92 ± 0,02 ^a	3,77 ± 0,02 ^{b,c}
Fenólicos totais	296,59 ± 3,68	337,31 ± 2,93 ^a	289,91 ± 2,10 ^c
Taninos totais	112,15 ± 8,22	109,72 ± 5,01	83,58 ± 4,82 ^{b,c}
DPPH	49,48 ± 1,39	46,78 ± 3,03	55,95 ± 0,99 ^{b,c}
DPPH quercetina	18,22 ± 2,22		

Valores apresentados como média e desvio padrão; apresentando significância estatística para Test *t* (*student*), com diferença estatística de $p < 0,05$ para todas as análises, representados pela letra (a) a diferença entre as garrafadas de 1 e 30 dias; (b) a diferença entre as garrafadas de 1 e 60 dias e (c) a diferença entre as garrafadas de 30 e 60 dias.

Quanto às análises com o radical livre DPPH, é interessante observar que as diferenças estatísticas demonstradas nas amostras (1, 30 e 60 dias) quanto ao potencial antioxidante acompanharam mesmo padrão encontrado para o teor de taninos totais considerando a significância estatística, onde não houve variação entre as amostras de 1 e 30 dias e a amostra de 60 dias é estatisticamente inferior à de 30 dias.

A influência do tempo de extração e temperatura influenciou na análise quantitativa das substâncias analisadas nas amostras (Tabela 3), comparando a garrafada de 1 dia com a garrafada de 30 dias, é possível identificar um aumento dos compostos fenólicos e flavonoides, e uma equivalência estatística entre os níveis de taninos e o potencial antioxidante.

Comparando-se a garrafada de 1 dia com a garrafada de 60 dias, é possível identificar um aumento nos níveis de flavonoides e de taninos e uma redução no potencial antioxidante do DPPH conforme diferença estatística. Devemos destacar que comparando a garrafada de 30 dias com a de 60 dias evidenciou-se uma redução estatística em todos os parâmetros avaliados (flavonoides, compostos fenólicos, taninos totais e potencial antioxidante pelo DPPH).

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

O perfil cromatográfico das três amostras da garrafada (1, 30 e 60 dias) foi analisado em duplicata (Figura 11, 12 e 13) e posteriormente foi gerado um cromatograma que sobrepõe os resultados obtidos das análises de cada amostra (Figura 14). A análise comparativa dos cromatogramas mostra uma similaridade entre os picos detectados nas três amostras.

Figura 11. Cromatograma da garrafada de dia 1.

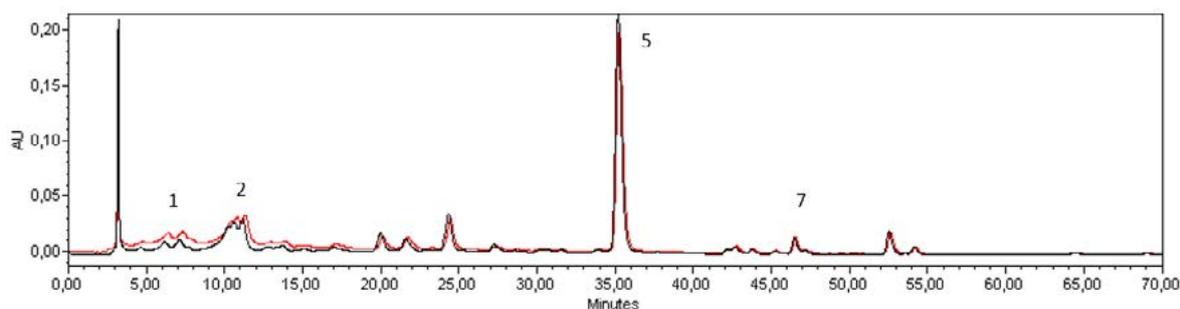


Figura 12. Cromatograma da garrafada 30 dias.

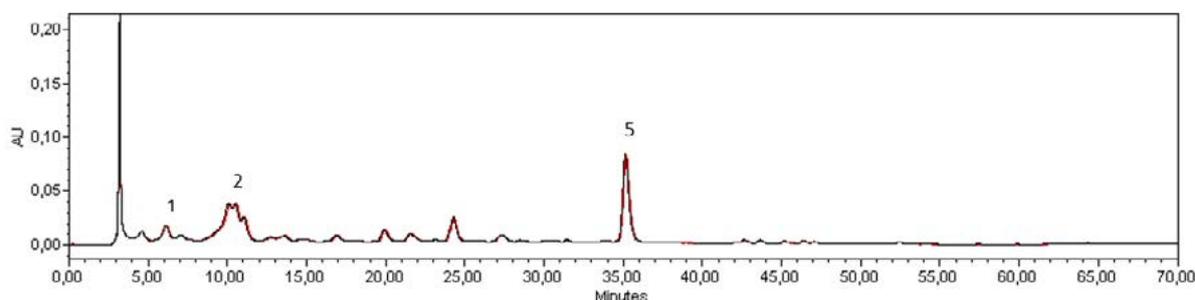


Figura 13. Cromatograma da garrafada 60 dias.

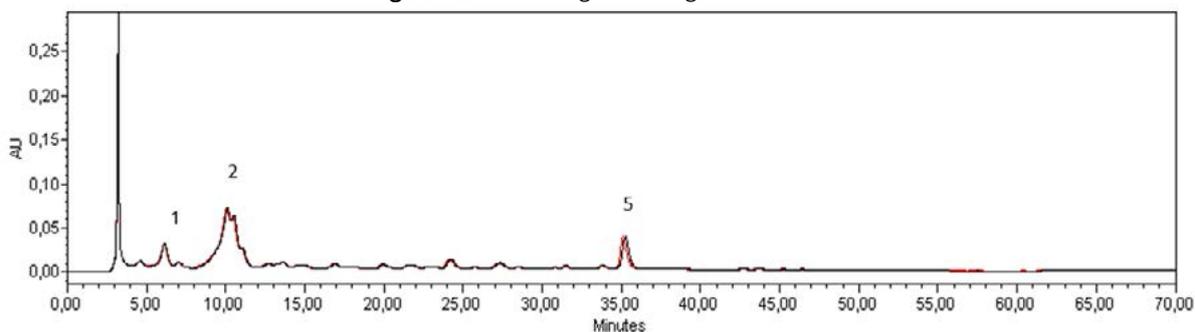
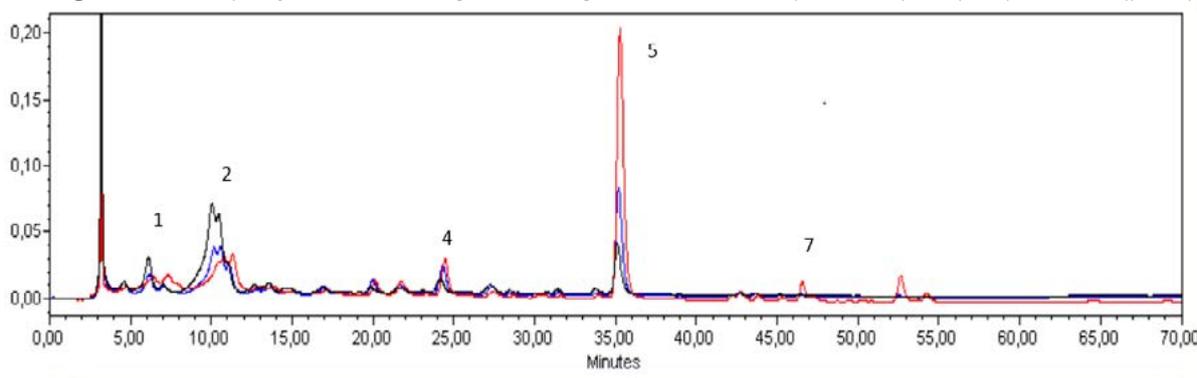


Figura 14. Sobreposição dos cromatogramas das garrafadas de 1 dia (vermelho), 30 (azul) e 60 dias (preto).



Com a sobreposição dos cromatogramas das garrafadas de 1, 30 e 60 dias, é possível identificar um aumento da substância do pico 1 (ácido gálico) com concentração de 30 dias > 60 dias > 1 dia em µg/g, 2 (ácido cafeico) com concentração de 60 dias > 30 dias > 1 dia em µg/g e 4 (rutina) com concentração de 60 dias > 30 dias = 1 dia em µg/g, uma redução da substância 5 (ácido elágico) com concentração de 1 dia > 30 dias > 60 dias em µg/g e 7 (quercetina) com concentração de 1 dia > 30 dias em µg/g.

De acordo com os resultados das substâncias encontradas nas amostras da garrafada de 1, 30 e 60 dias (Tabela 4) para análise dos padrões foram encontrados os ácido gálico, cafeico e elágico além dos flavonoides rutina e quercetina.

Tabela 4. Resultado das substâncias encontradas nas amostras das garrafadas de 1, 30 e 60 dias conforme análise dos padrões ácidos fenólicos e flavonoides.

	Padrões	Tempo Retenção (min)	Garrafada (mg/g)	Períodos (dias)
1	Ácido gálico	4,9	< 3,9 20,21 19,17	1 30 60
2	Ácido cafeico	14.6	566,99 1111,22 1982,92	1 30 60
3	Ácido clorogênico	15.2	-----	-----
4	Rutina	32.8	<0,023 <0,023 982,83	1 30 60
5	Ácido elágico	34.6	175872,04 67782,37 25745,03	1 30 60
6	Ácido rosmarínico	37.9	-----	-----
7	Quercetina	48.0	1252,92 585,65 -----	1 30 60
8	Luteolina	49.3	-----	-----

Dentre os ácidos fenólicos, podemos verificar que a concentração do ácido cafeico aumentou progressivamente sua concentração passando de 566,99 µg/g na amostras de 1 dia, para 1982,92 mg/g na amostra de 60 dias, representando um aumento de 3,5 vezes em relação ao conteúdo inicial. Por

outro lado o ácido, elágico foi a substância que apresentou maior redução passando de 175872,04 mg/g no dia 1 para 25745,03 µg/g após 60 dias, representando uma diminuição de quase 7 vezes do conteúdo inicial.

O mesmo comportamento foi encontrado para os flavonoides, contudo de maneira mais intensa, pois a quercetina que estava presente nas amostras de 1 dia (1252,92 mg/g) e 30 dias (585,65 mg/g) não foi detectada na amostra de 60 dias. Curiosamente, ocorreu o inverso quanto a presença da rutina, pois este flavonoide pouco presente nas amostras 1 e 30 dias (<0,023 mg/g) e apresentou um aumento mais de 4000 vezes (982,83 mg/g) em relação as amostras anteriores (tabela 04).

ANÁLISE ANTIPROLIFERATIVA

Nesse estudo, buscou-se analisar, o potencial de inibição celular do extrato das garrafadas (1, 30 e 60 dias) frente a seis diferentes linhagens celulares de mamíferos. Os resultados mostram que as três amostras ocasionaram diminuição da população celular nas linhagens utilizadas (Tabela 5).

Variações na inibição celular das amostras frente às linhagens celulares conforme o tempo de estocagem indicou uma falta de estabilidade das garrafadas que pode influenciar diretamente sobre o IC₅₀ (µg/ml).

Através da análise estatística verifica-se que frente as linhagens HepG2 e NHI-3T3, a amostra de 30 dias é estatisticamente menos ativa do que amostra de 1 dia, assim como para HepG2, KB e HT-29 a amostra de 60 dias é estatisticamente menos ativa do que amostra de 1 dia. Por outro lado, amostra de 30 dias é estatisticamente mais ativa do que amostra de 1 dia frente as células de HT-29.

Tabela 5. Potencial de inibição celular (IC50 µg/ml) dos extratos das garrafadas de 1, 30, 60 dias e etoposídeo, em linhagens de células neoplásicas e sadias em período de incubação de 48 horas.

IC50 µg/mL (média ± DP; n=6)				
Linhagem celular	Garrafada 1 dia	Garrafada 30 dias	Garrafada 60 dias	Etoposídeo
HT-29	65,3 ± 1.9	54,3 ± 4,3a	67,7 ± 3,4 a	1,2 ± 0,1c
HepG2	51,1 ± 4.0	62,3 ± 3,6b	69,8 ± 3,5b	21,0 ± 3,0c
KB	69,4 ± 4.9	62,8 ± 3,9	80,0 ± 4,3 a	3,5 ± 0,5c
MCF-7	54,3 ± 5,5	56,5 ± 6,8	45,4 ± 2,9	1,5 ± 0,05c
U-251	SA	SA	79,3 ± 3,9	8,3 ± 1,3c
NHI-3T3	47,0 ± 4,0	55,5 ± 0,7 a	41,9 ± 1,6	20,3 ± 2,8c

Valores apresentados com significância estatística; com letras (a) estatisticamente diferente para 1 dia (p<0,05); (b) estatisticamente diferente para 1 dia (p<0,001); (c) etoposídeo estatisticamente diferente para 1 dia (p<0,001). SA = Sem atividade.

Além disso, todas as amostras foram estatisticamente menos ativas do que o etoposídeo, contudo deve-se salientar que todas as amostras apresentaram potencial citotóxico.

TESTE DE MUTAGENICIDADE (AMES)

A tabela 6 mostra o número médio de revertentes/placa e o índice de mutagenicidade (IM) das garrafadas de 1, 30 e 60 dias nas concentrações de 500, 1000, 2500 e 5000 µg/placa, observadas em linhagens de *S. typhimurium* TA98, TA97a, TA100 e TA102 na presença (+S9) e na ausência (-S9) de ativação metabólica.

A linhagem TA98 apresentou efeito mutagênico somente na ausência da ativação metabólica, o que pode ser verificado através dos valores de IM, que foram maiores que 2 para as concentrações de 1000 e 2500 µg/placa, e do aumento no número médio de revertentes para todas as concentrações com significância estatística quando comparadas ao controle negativo. Na linhagem TA97a houve efeito mutagênico somente na ausência da ativação metabólica, verificado através do IM maiores que 2 para as concentrações de 2500 e 5000 µg/placa e do aumento, com significância, no número de revertentes para as mesmas concentrações para as três amostras da garrafada.

Na linhagem TA100, utilizada para detectar mutação do tipo substituição de pares de bases, não houve efeito mutagênico, tanto na presença quanto na ausência de ativação metabólica, o que pode ser evidenciado através dos valores do IM menores que 2 e da ausência de significância estatística entre o número médio de revertentes para todas as concentrações das três amostras analisadas. Na linhagem TA102 também apresentou efeito mutagênico somente na ausência de ativação metabólica, o que pode ser evidenciado pelo valor de IM da concentração de 2500 µg/placa maior que 2, bem como pela significância estatística apresentada entre o número médio de revertentes para as concentrações de 500, 1000 e 2500 µg/placa para a garrafada de 1 dia, significância para as concentrações de 2500 e 500 µg/placa com IM maior que 2 para a garrafada de 30 dias e significância para todas as concentrações e IM maior que 2 para as concentrações de 1000, 2500 e 5000 µg/placa na garrafada de 60 dias.

Cabe destacar que na presença de S9 *mix* os IM foram menores e quando comparados ao IM obtidos na ausência do S9 *mix*. Nenhuma significância estatística foi observada entre as médias de revertentes na presença do S9 *mix* e que a linhagem TA100 não apresentou efeito mutagênico na presença e nem na ausência do S9 *mix*. Na ausência da ativação metabólica, a concentração de 2500 µg/placa apresentou aumento com significância estatística do número médio de revertentes/placa.

Para as linhagens TA98, TA97a, TA100 e TA102, na ausência de S9 *mix*, é possível observar um aumento do efeito mutagênico progressivo até a dose de 2500 µg/placa quando fica evidente uma diminuição da mutagenicidade na dose de 5000 µg/placa, que está associado a uma citotoxicidade nesta concentração

Tabela 6. Indução de *his+* revertentes em cepas *S. typhimurium* para as garrafadas de 1, 30 e 60 dias frente a TA98, TA97a, TA100 e TA102 sem ativação metabólica (S9 mix).

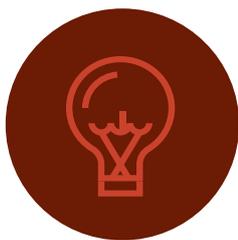
Amostra	Concentração (µg/placa)	TA98		TA97a		TA100		TA102	
		Rev/placa ^a	IM ^b	Rev/placa ^a	IM ^b		IM ^b		IM ^b
CN ^c		18,7±5,7	-	78,0±15,7	-	133,2±25,0	-	343,0±14,7	-
Garrafada 1 dia	500	33,3±3,1 *	1,8	91,0±11,8	1,2	105,0±28,6	0,8	577,7±163,9 *	1,7
	1000	45,3±2,1 ***	2,4	103,7±43,2	1,3	102,0±8,7	0,8	613,7±43,0 *	1,8
	2500	46,3±7,5 ***	2,5	200,3±53,1**	2,6	105,7±16,5	0,8	844,3±123,8 ***	2,5
	5000	33,3±2,3 *	1,8	167,3±41,0*	2,1	129,7±11,6	1,0	539,3±34,5	1,6
Garrafada 30 dias	500	26,0±5,6	1,4	56,3±18,6	0,7	136,3±36,2	1,0	458,0±3,6	1,3
	1000	32,3±2,1 *	1,7	105,3±5,9	1,4	156,7±26,2	1,2	524,7±94,6	1,5
	2500	37,7±6,5 **	2,0	146,7±21,9 **	1,9	177,3±25,0	1,3	947,7±126,4 ***	2,8
	5000	35,0±6,0 *	1,9	134,0±21,7 *	1,7	174,7±7,4	1,3	756,3±160,6 **	2,2
Garrafada 60 dias	500	34,7±4,2 **	1,8	99,0±6,0	1,3	149,0±25,6	1,1	528,7±1,5 *	1,5
	1000	44,0±1,0 ***	2,4	119,0±16,8	1,5	169,7±37,6	1,3	764,3±107,6 ***	2,2
	2500	45,7±5,0 ***	2,5	169,7±18,5 **	2,2	172,0±9,5	1,3	998,7±27,5 ***	2,9
	5000	40,3±6,7 **	2,2	151,3±41,3 **	1,9	169,0±30,3	1,3	707,3±127,1 ***	2,1
CP ^d	0,5 (4NQO) 1,0 (NaN ₃)	180,7±29,7 ***	9,7	379,0±15,8 ***	4,9	3498,7±134,9 ***	26,3	1201,3±280,5 ***	3,5

^aNúmero de revertentes/placa: média de três experimentos independentes ± DP; ^bIM: Índice mutagênico (nº. de *his+* induzidos na amostra/nº. de *his+* espontâneos no controle negativo); ^cCN: controle negativo: água destilada (100 µl) utilizado como solventes para extratos; ^dCP: controle positivo: azida sódica para TA100; 4-nitroquinolina N-óxido para TA97a, TA98 e TA102. Significativamente diferente em relação ao controle negativo. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 (ANOVA, Dunnett's test).

Tabela 7. Indução de *his+* revertentes em cepas *S. typhimurium* para as garrafadas de 1, 30 e 60 dias frente a TA98, TA97a, TA100 e TA102 com ativação metabólica (S9 mix).

Amostra	Concentração (µg/placa)	TA98		TA97a		TA100		TA102	
		Rev/placa ^a	IM ^b	Rev/placa ^a	IM ^b		IM ^b		IM ^b
CN ^c		34,0±8,2	-	67,0±24,8	-	149,7±13,4	-	467,7±69,5	-
Garrafada 1 dia	500	29,0±7,2	0,9	968,0±11,5	1,0	144,3±14,0	1,0	479,3±13,7	1,0
	1000	32,3±6,5	1,0	56,7±5,0	0,9	137,0±11,5	0,9	497,3±34,1	1,1
	2500	27,7±7,1	1,5	57,7±20,5	0,9	161,0±12,8	1,1	474,3±43,8	1,0
	5000	30,3±9,0	0,9	72,5±3,5	1,1	128,7±15,5	0,9	528,0±30,8	1,1
Garrafada 30 dias	500	30,0±1,7	0,9	70,3±2,1	1,1	149,0±16,5	1,0	397,0±24,1	0,9
	1000	26,0±3,5	0,8	62,0±10,4	0,9	130,7±13,2	0,9	364,0±78,1	0,8
	2500	31,0±6,2	0,9	46,3±9,7	0,7	169,0±15,6	1,1	366,7±38,7	0,8
	5000	23,0±1,7	0,7	39,3±13,8	0,6	158,3±15,5	1,1	553,7±20,5	1,2
Garrafada 60 dias	500	36,3±5,5	1,1	52,7±4,9	0,8	135,3±17,0	0,9	454,3±25,3	1,0
	1000	34,0±7,1	1,0	61,3±26,0	0,9	150,0±12,5	1,0	478,7±84,9	1,0
	2500	26,3±2,9	0,8	58,7±28,2	0,9	155,0±20,3	1,0	360,0±83,8	0,8
	5000	30,7±1,2	0,9	63,0±6,6	0,9	150,0±12,3	1,0	398,3±59,7	0,9
CP ^d	1 (AFB-1)	629,3±112,5 ***	18,5	273,0±16,1 ***	4,1	788,3±37,6 ***	5,3	1372,0±74,3 ***	2,9

^aNúmero de revertentes/placa: média de três experimentos independentes ± DP; ^bIM: Índice mutagênico (nº. de *his+* induzidos na amostra/nº. de *his+* espontâneo no controle negativo); ^cCN: controle negativo: água destilada (100 µl) utilizado como solventes para extratos; ^dCP: controle positivo: aflatoxina B1 (AFB₁); Significativamente diferente em relação ao controle negativo. *** p<0,001 (ANOVA, Dunnett's test).



DISCUSSÃO

Através do *screening* fitoquímico encontramos flavonoides e saponinas em cascas de *Calliandra fernandesii*, corroborando estes dados Silva et al. (2005) isolaram das folhas de *Calliandra pulcherrima* uma saponina, chamada *pulcherrimasaponina*. Segundo Silva et al. (2005) estudos sobre a composição química tem demonstrado que as plantas que compõem o gênero *Calliandra* são produtoras de flavonoides e saponinas.

Nas folhas de *Costus spiralis* a presença de alcaloides e flavonoides identificadas neste estudo também foi citado por Antunes et al., (2000) e Braga et al. (2007). Um estudo com folhas de *C. spiralis* que revelou a presença de flavonoides como 3,5-di-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona e 3-O-neohesperidosídeo. Braga et al. (2007) relataram a presença de alcaloides e flavonoides e esteroides na fração metanólica de *C. spiralis*, assim como Brito et al. (2011) citaram a presença de flavonoides, e taninos como metabólitos secundários desta espécie. Resultados estes que também foram encontrados nessa pesquisa, contudo, divergimos quanto a presença de taninos que não foram identificados através do *screening* fitoquímico.

Nas cascas do uchi-amarelo foram encontrados cumarinas, flavonoides, saponinas e taninos, essas substâncias também foram citadas por Politi (2009) em estudos com essa espécie vegetal. Silva e Teixeira (2015) relataram através do *screening* fitoquímico a predominância de taninos, cumarinas e saponinas como principais classes de metabólitos secundários. A presença de cumarinas pode ser confirmada com base no isolamento das cumarinas bergenina e seu derivado dimetilado, a dimetilbergenina das cascas do uchi-amarelo (LUNA et al., 2001)

Flavonoides, saponinas e taninos foram evidenciados nas cascas do jatobá. No estudo realizado por Veggi et al. (2014) com cascas de *Hymenea courbaril* os autores detectaram a presença de compostos fenólicos, como flavonoides e ácidos fenólicos, além da presença de taninos condensados. Aguiar (2009) relatou em extratos das cascas através de estudos fitoquímicos com a espécie *H. courbaril* a presença de flavonoides, procianidinas, taninos, óleos essenciais e terpenos.

Nas cascas de *Terminalia fagifolia* (GARCEZ et al., 2006) e *T. chebula* (VERMA, 2014) os autores relataram a presença de taninos, saponinas e flavonoides através de análises qualitativas. Além disso estudos identificando a presença de flavonoides (arjunona, arjuna e luteolina) e saponinas (arjunina, arjunglucosídeo I sericosídeo, terminaliasídeo e iverosídeo) em espécies de *Terminalia* corroboram com estes resultados (GRAF et al., 1984; KAUR et al., 2000; DWIVEDI, 2007).

De acordo com os resultados encontrados no doseamento para flavonoides e compostos fenólicos totais, os níveis destes sofreram redução significativa entre o intervalo de 30 e 60 dias de exposição à temperatura (Tabela 3). Os estudos de Moure et al. (2001) e Andreo e Jorge (2006) corroboram resultados semelhantes. Segundo estes autores, a estabilidade dos compostos fenólicos durante a desidratação e extração é afetada por degradações químicas e enzimáticas e pela volatilização dos compostos, mas a decomposição térmica tem sido apontada como a maior causadora da redução do conteúdo de compostos fenólicos. Na decomposição térmica, os compostos fenólicos podem reagir com outros componentes e impedir sua extração. Evidências da influência da temperatura na redução destes compostos também foram encontradas por Conde et al. (2001), quando mostraram que a temperatura durante a extração pode afetar os compostos bioativos de diferentes maneiras. Na amostra de 60 dias todos os compostos fenólicos apresentaram uma diminuição estatística em seus teores em relação a amostra de 30 dias (Tabela 3). Este fato pode estar associado a exposição das garrafadas à temperatura de $42^{\circ}\text{C} \pm 2$ utilizada no teste de estabilidade conforme indicado por RE nº1, de 29 de julho de 2005 e adotado como metodologia nesta pesquisa.

Para taninos totais, resultados semelhantes foram encontrados por Dias et al. (2012) quando identificou teores de taninos totais reduzidos em folhas de hortelã em média em torno de 50% devido a degradação térmica (50°C , 60°C e 70°C) destes compostos. A redução de taninos das garrafadas ocorreu em 25,47% da garrafada de 1 dia para a de 60 dias e de 23,82% da garrafada de 30 dias para a de 60 dias. A degradação térmica de taninos também foi citada em estudos realizados por Rakic et al. (2004) que afirmam que o teor de taninos no carvalho nativo era de 11,69%, enquanto que no tratado termicamente a 60°C por 10 dias diminuiu em 3,14%, ficando com valor final de 8,55%.

Dias et al. (2012) em estudo com as folhas de hortelã descreveram que a secagem melhorou o processo de extração de taninos, devido à concentração durante a eliminação de água, apesar de perdas em relação às quantidades totais. No entanto, temperaturas acima de 70°C resultaram na diminuição do teor de taninos. Sobre o processo de degradação de taninos totais, verifica-se a diminuição estatística dos teores de taninos totais na amostra de 60 dias.

A degradação de taninos hidrolisados pode gerar moléculas de ácido gálico (Tabela 4) conforme resultados encontrados por CLAE (Figura 11,12,13 e 14), o que justificaria a elevação dos níveis do ácido gálico entre as amostras de 1 dia e 30 dias. Battestin, Matsuda e Macedo (2004) e Helbig (2000) afirmam que os taninos hidrolisados pertencem a grupos de compostos fenólicos definidos por polímeros fenólicos solúveis em água, e quando são degradados por enzimas liberam moléculas de glicose e ácido gálico.

Ao avaliar a capacidade antioxidante nas amostras, foi observado que houve uma redução da atividade antioxidante das amostras de 1 e 30 dias para a amostra de 60 dias. Neste caso, a redução do efeito antioxidante evidenciado pode estar associada à diminuição da concentração de todos os compostos fenólicos neste mesmo período, pois Lamdim et al. (2013) afirma que a atividade antioxidante não depende somente da quantidade, mas também do tipo de compostos biologicamente ativos (taninos, flavonoides, compostos fenólicos) redutores de radicais livres presentes na amostra. Tendo em vista, que a atividade antioxidante não é produto de um ou outro composto isolado e sim da interação entre os mesmos, resultando na atividade antioxidante total. Contudo, a redução do potencial antioxidante na garrafada de 60 dias parece estar associada a degradação dos taninos, pois segundo Moure et al. (2001), os polifenóis poliméricos são antioxidantes mais potentes do que os fenólicos monoméricos. Para Bernardes et al. (2011) isto significa que os taninos condensados e hidrolisáveis possuem maior habilidade antioxidante que seus respectivos compostos fenólicos monoméricos.

Relatos da atividade antioxidante das plantas que compõem a garrafada também são encontradas na literatura conforme citado por Silva et al. (2011) quando avaliaram os extratos brutos dos caules e folhas verdes e secas de *Costus spiralis* quanto ao seu potencial antioxidante. Silva e Teixeira (2015)

em estudo realizado com cascas de uchi-amarelo (*Endopleura uchi*), determinaram o potencial antioxidante por DPPH do extrato hidroalcoólico ($IC_{50} = 33 \mu\text{g/mL}$). Além disso, recentemente, foi descrito por Abreu et al. (2008) o isolamento de bergenina a partir das cascas de *Endopleura uchi*, e segundo Takahashi et al. (2003) apresenta alta atividade antioxidante.

Para Surveswaran et al. (2007), plantas do gênero *Terminalia* possuem o ácido gálico, uma molécula com reconhecido potencial antioxidante. Este produto foi encontrado através da análise por CLAE em níveis elevados nas amostras de 1, 30 e 60 dias. Mesmo com sua redução progressiva, pode em parte ser associado as atividades encontradas em nosso estudo, pois, conforme Davi (2008) afirma o ácido elágico possui atividades antimutagênica, anticarcinogênica e antioxidante.

Através da atividade citotóxica da garrafada de 1 dia é possível evidenciar que apenas na linhagem U-251 não foi determinado IC_{50} (Tabela 5), com ou sem interferência de tempo ou temperatura. Este fato pode estar associado a resistência apresentada por este tipo de células, algo que normalmente é evidenciado. Segundo Oliveira (2013), em estudo de citotoxicidade de alcaloides *in vitro* identificou que a linhagem U-251 foi a mais sensível comparada a linhagem GL-15 (glioblastoma humano).

Relatos da atividade citotóxica das plantas que compõem a garrafada também são encontrados na literatura. Silva et al. (2011) quando avaliaram os extratos brutos dos caules e folhas verdes e secas de *Costus spiralis* quanto ao seu potencial citotóxico os resultados obtidos mostraram que seus extratos brutos em etanol de folhas e caules verdes apresentaram maior potencial citotóxico quando comparado aos extratos brutos de folhas e caules secos. Ainda, Gouveia e Magnata (2011) observaram que o extrato bruto aquoso das folhas de *Costus spicatus* apresentou propriedades antitumorais, com uma inibição do carcinoma de Ehrlich *in vivo* de aproximadamente 15,71% em comparação ao grupo controle. Sobre o potencial antiproliferativo da chapada, Sivalokanathan, Vijayababu, Balasubramanian (2006) citam que *Terminalia arjuna* foi capaz de inibir a proliferação das linhagens celulares humanas de hepatocarcinoma (HepG2).

Quanto ao potencial citotóxico das cascas de *Endopleura uchi* a literatura mostra que esta planta pode colaborar com o efeito antiproliferativo da garrafada, pois parece estar associada a presença de um polissacarídeo tipo arabinogalactano, que exibiu efeito antiproliferativo contra as células HeLa, sugerindo um efeito citotóxico (BORGES 2010; BENTO, NOLETO e PETKOWICZ, 2014). Segundo Politi (2011), nos testes de citotoxicidade com células de fibroblasto, nenhum dos extratos de *Endopleura uchi* testados mostrou ser tóxico, e todos os valores de sobrevivência de células foram de 100%.

De acordo com Verma, Singh, Mishra (2013) o ácido gálico tem diversos efeitos em vários tipos de tumores em diferentes níveis. O estudo realizado por Russell et al. (2012) que avaliaram a atividade do ácido gálico em linhagem de células de câncer de próstata, demonstrou que sua ação antitumoral está relacionada à indução da apoptose nessa linhagem celular. O ácido gálico mostrou a citotoxicidade seletiva para células cancerosas (UM1, UM2, SCC-4, SCC-9) e tem muito menos toxicidade para as células normais (queratinócitos humanos orais normal) (CHIA et al., 2010). Corroborando este estudo, Barrajón-Catalán (2010), afirma que o ácido gálico é um composto que apresenta atividades antioxidante e antitumoral. Tan et al. (2015) realizaram um teste com ácido gálico (0- 200 μM) frente as células de câncer de fígado humano (HepG2) em 24, 48 e 72 horas e encontraram maior citotoxicidade deste composto nas maiores concentrações e após maior tempo de exposição.

Uma vez que a garrafada envolve cinco espécies distintas, esta amostra passa a ser vista como uma mistura complexa que segundo o *screening* fitoquímico apresenta alcaloides, cumarinas, flavonoides, saponinas e taninos. Dentre estas classes, segundo Viana (2011) as cumarinas podem causar mudanças significativas na regulação da resposta imune, crescimento e diferenciação celular em células leucêmicas humanas (HL-60). Ainda nesse sentido, estudos têm mostrado que as cumarinas inibem

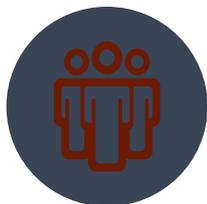
o crescimento *in vitro* de linhagens celulares tumorais humanas como o carcinoma brônquico (NSCLC-N6), câncer de pulmão (A549) e carcinoma hepatocelular humano (HepG2).

Através do teste de Ames, observamos mutagenicidade da garrafada nas linhagens TA98, TA97a e TA102 sem ativação metabólica (S9 *mix*). Entretanto, este efeito não foi mantido quando foram avaliadas sob ativação metabólica sugerindo uma ação direta das amostras da garrafada sobre as linhagens de *Salmonella tiphymurium*, pois quando submetidos a metabolização não mantiveram a mutagenicidade. Estudos de mutagenicidade ainda são escassos quando envolvem as espécies utilizadas na composição da garrafada. Pádua et al. (2013) afirmam que a literatura não relata qualquer estudo sobre a genotoxicidade de extrato etanólico de *Terminalia actinophylla*, embora extratos de *Terminalia catappa* e *Terminalia sericea* não demonstraram efeitos mutagênicos no ensaio de *Salmonella tiphymurium* em linhagem de TA98. Sforzolini et al. (1999) afirmam que ensaios de antigenotoxicidade com teste de micronúcleo e cometa *in vivo* mostraram que extratos etanólicos de *Terminalia arjuna* são eficientes na redução de danos ao DNA. Um efeito inibidor contra a atividade mutagênica de 2-aminoantraceno foi observado quando o teste de Ames foi realizado com TA98 e TA100 com decocto dos frutos de *Terminalia chebula* (Pellati et al., 2013).

Além destes, não foram encontrados outros estudos envolvendo as espécies que compõem a garrafada e ensaios de mutagenicidade. Contudo, a diminuição do efeito mutagênico apresentado pela garrafada na concentração de 2500 µg/placa para a concentração de 5000 µg/placa, parece estar associada a uma toxicidade dos compostos da amostra frente a cepas de *Salmonella tiphymurium*. Corroborando esta afirmativa, Volpato (2005) relacionada a toxicidade de substâncias presentes em vegetais, com efeito tóxico renal causado por espécies que contêm saponinas. Uma vez que a presença de saponinas foi detectada em quatro espécies que formam a garrafada de carobinha, não podemos excluir os vários relatos na literatura de toxicidade associada a esta classe. Além das saponinas, outras classes de metabólitos secundários como cumarinas e alcaloides presentes nas plantas que compõem a garrafada também podem contribuir para o efeito mutagênico verificado. Para Hughes et al. (2006) uma fração de alcalóides, apresentou citotoxicidade pelo teste de MTT na concentração mais elevada (30 µg/mL). Este efeito foi anteriormente demonstrado em eritrócitos expostos a alcalóides, mostrando significativa hemólise devido a lesão da membrana.

Tabela 08. Composição química e atividades biológicas das plantas que compõem a garrafada de carobinha.

Nome científico	Nome popular	Parte utilizada	Constituintes	Efeitos Biológicos
<i>Hymenaea courbaril</i>	Jatobá	Casca	Ácidos fenólicos, taninos	Antioxidantes; Antiulcerogênico, Antiinflamatório (Veggi, et al, 2014)
<i>Caliandra fernandesii</i>	Carobinha	Casca	Flavonóides	Antimicrobiano (Chan et al, 2014)
			Saponinas	Atividade Hemolítica (Silva, Parente 2013)
<i>Terminalia actinophylla</i>	Chapada	Casca	Taninos Flavonoides Ácidos fenólicos	Antioxidantes (Saha & Verma, 2014)
			Taninos e flavonoides	Anticarcionagênico; Antimutagênico (Ahmad et al, 2013)
<i>Endopleura uchi</i>	Uxi Amarelo	Casca	Cumarina	Hepatoprotetora (Magalhães et al, 2007)
			Arabinogalactana	Citotóxico (Bento, Noleto, Petkowicz, 2013)
<i>Costus spiralis</i>	Cana-da-índia	Folhas	Flavonoides, xantonas e taninos	Antihipertensivo (Brito et al, 2011)
			Flavonoides	Antimicrobiano (Awosan et al, 2014)



CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo de avaliação das características químicas e biológicas da garrafada de carobinha permitem concluir a partir do *screening* fitoquímico que foram encontrados em *Hymenea coubaril* (cascas): flavonoides, saponinas e taninos; *Calliandra fernandesii* (cascas): alcaloides e flavonoides; *Terminalia actinophylla* (cascas): flavonoides, saponinas e taninos; *Endopleura uchi* (cascas): cumarinas, flavonoides, saponinas e taninos; e *Costus spiralis* (folhas): alcaloides e flavonoides. Além disso, o *screening* fitoquímico indicou a presença de flavonoides e a ausência de antraquinonas em todas as plantas.

O teor de compostos fenólicos totais presentes no extrato das garrafadas de 1, 30 e 60 dias apresentou diferença estatística aumentando de 1 dia para 30 dias e diminuindo de 30 para 60 dias, assim como o teor de flavonoides totais, contudo, não houve diferença estatística para esta classe entre a garrafada de 1 dia e de 60 dias. Por outro lado, o teor de compostos taninos totais presentes no extrato das garrafadas apresentou uma diminuição estatística somente quando comparamos as amostras de 1 com 60 dias e 30 com 60 dias.

A avaliação do potencial antioxidante com DPPH, mostrou que a amostra de 60 dias diminuiu estatisticamente sua capacidade antioxidante em relação a amostra de 1 e 30 dias, acompanhando o mesmo padrão encontrado para o teor de taninos totais, que parece estar associada a diminuição estatística do potencial antioxidante. Contudo, não podemos deixar de salientar que houve uma diminuição estatística de todas as classes quantificadas entre as amostras das garrafadas de 1 dia a 60 dias.

A análise por CLAE das amostras determinou a presença de ácidos fenólicos e flavonóides que através da similaridade dos cromatogramas sobrepostos é possível determinar que ácido gálico, ácido caféico e rutina aumentaram da amostra de 1 dia até a de 60 dias, enquanto que ácido elágico e quercetina diminuíram da amostra de 1 dia até a de 60 dias.

Com base no ensaio SRB, nota-se que as linhagens tumorais KB, HT-29, HepG2, MCF-7 foram as mais sensíveis. Outro dado que merece destaque foi a citotoxicidade de todas as amostras das garrafadas frente a linhagem de fibroblastos normais de camundongos (NHI-3T3). Nesse sentido a mutagenicidade sem S9 *mix* reforça o risco do consumo destas garrafadas, principalmente para pacientes debilitados como os submetidos a hemodiálise.

REFERÊNCIAS

ABREU, H.A., LAGO, I.A.S., SOUZA, G.P., PILO-VELOSO, D., DUARTE, H.A., FLÁVIO, A. Antioxidant activity of (+)-bergenin: a phytoconstituent isolated from the bark of *Sacoglottis uchi* Huber (Humireaceae). *Organic & Biomolecular Chemistry*, v. 6, p. 2713-2718, 2008.

ANDREO, D., JORGE, N. Antioxidante naturais: técnicas de extração. *Boletim do centro de pesquisa e processamento de alimentos – BCEPPA, Curitiba*, v. 24, p. 319-336, 2006.

ANTOLOVICH, M., PRENZLER, K.R., RYAN, D. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst*, v. 125, p. 989-1009, 2000.

ANTUNES, A.S., SILVA, B.P., PARENTE, J.P. Flavonol glycosides from leaves of *Costus spiralis*. *Fitoterapia*, v.71, p.507-510, 2000.

AGUIAR, J.C.D. Estudo fitoquímico e biológico de *Hymenaea courbaril* L. Fortaleza, 2009. 139p. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) Universidade Federal do Ceará.

AGUNU, A., ABDURAHMAN, E.M., SHOK, M., YUSUF, S.A. Analgesic activity of the roots and leaves extracts of *Calliandra portoricensis*. *Fitoterapia*, v. 76, p. 442-225, 2005.

ALBUQUERQUE, U.P., MEDEIROS, P.M., ALMEIDA, A.L.S., MONTEIRO, J.M., NETO, E.M.F.L., MELO, J.G., SANTOS, J.P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach, *Journal Ethnopharmacology*, v.114 p. 325–354, 2007.

AHERNE, S.A., O'BRIEN, N.M. Mechanism of protection by the flavonoids, quercetin and rutin, against tert-butylhydroperoxide- and menadione induced

DNA single strand breaks in Caco-2 cells. *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 29, p. 507–514, 2000.

BARREIROS, A.L.B.S., DAVID, J.M., DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa dos organismos. *Química Nova*, v. 29, p.113-123, 2006.

BADKE, M.R., BUDÓ, M.L.D., ALVIM, N.A.T., ZANETTI, G.D., HEISLER, E.V. Saberes e práticas populares de cuidado em saúde com o uso de plantas medicinais. *Texto & Contexto Enfermagem*, v. 21, p. 363-70, 2012.

BARRAJÓN-CATALÁN, E., FERNANDÉS-ARROYO, S., SAURA, D., GUILLÉN, E., FERNANDÉZ-GUTIÉRREZ, A., SEGURA-CARRETERO, A., MICOL, V. Cistaceae aqueous extracts containing ellagitannins show antioxidant and antimicrobial capacity, and cytotoxic activity against human cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, vol. 48, p. 2273- 2282, 2010.

BATTESTIN, V., MATSUDA, L.K., MACIDO, G.A. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. *Alimentos e Nutrição*. v. 15, p 63-72, 2004.

BHAWANI, G., KUMAR, A., MURTHY, K.S.N., KUMARI, N., SWAMI, C.G. A retrospective study of effect of *Terminalia arjuna* and evidence based standard therapy on echocardiographic parameters in patients of dilated cardiomyopathy. *Journal of Pharmacy Research*, v. 6, p.493- 498, 2013.

BIANCHI M.L.P., ANTUNES L.M.G. Radicais Livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de Nutrição, Campinas*, v. 12, p.123-130, 1999.

BORGES, J.C.M. Acetilbergenina: obtenção e avaliação das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória. Belém, 2010. 122p. Dissertação (Mestrado Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Federal do Pará.

BRAGA, F.G., BOUZADA, M.L., FABRI, R.L., DE MATOS, M., MOREIRA, F.O., SCIO, E. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 111, p. 396–402, 2007.

BRITTO, R.M., SANTOS, A.L., CRUZ, J.S., GONDIM, A.N.S., SANTOS, S.L., LARA, A., GUATIMOSIM, S., VASCONCELOS, C.M.L., ESTEVAM, C.S., DIAS, A.S., OLIVEIRA, E.D., LIMA, A.K., SOUZA, R.C., GARCIA, E.A.C. Aqueous fraction from *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe leaf reduces contractility by impairing the calcium inward current in the mammalian myocardium. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 138, p. 382-389, 2011.

CAMARGO, M.T.L.A. A garrafada na medicina popular: uma revisão historiográfica. *Dominguezia*, v. 27, p.41-49, 2011.

CASTRO, M., CAIUBY, A.V.S, DRAIBE, S.A. Qualidade de vida de pacientes com insuficiência renal crônica em hemodiálise avaliada através do instrumento genérico SF- 36. *Revista da Associação Médica Brasileira*. v. 49, p. 245-249, 2003.

CHIA, Y.C., RAJBANSHI, R., CALHOUN, C., CHIU, R.H. Anti-neoplastic effects of gallic acid, a major component of *Toona sinensis* leaf extract, on oral squamous carcinoma cells. *Molecules*. v.15, p. 8377-8389, 2010.

CORREA, C.R., CALIXTO, J.B. Evidence for participation of B1 and B2 kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. *Brazilian Journal Pharmacology*, v. 110, p. 193-198, 1993.

DALLAQUA, B., DAMASCENO, D.C. Comprovação do efeito antioxidante de plantas medicinais utilizadas no tratamento do Diabetes mellitus em animais: artigo de atualização. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 13, p. 367-373, 2011.

SILVA, B.P., PARENTE, J.P. New steroidal saponins from rhizomes of *Costus spiralis* *Zeitschrift fur Naturforschung C. Journal of Biosciences*, v. 59, p. 81-85, 2004.

DIAS, R.A.L., SOUZA, P.S., ALSINA, O.L.S. Efeito da temperatura de secagem sobre o rendimento na extração de taninos totais e óleos essenciais da hortelã (*Mentha villosa* Hudson). *Revista Brasileira de Farmacologia*, v. 93, p. 431-438, 2012.

DI STASI, L.C. Plantas medicinais verdadeiras e mentiras: o que os usuários e os profissionais de saúde precisam saber. São Paulo: Ed. UNESP; cap. 1, p. 19-36, 2007.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Estratégias para conservação em manejo de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas: resultados da primeira reunião técnica / Roberto Fontes Vieira, et al.– Brasília: EMBRAPA Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) / Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), 2002.

FALKENBERG, M.B., SANTOS, R.I., SIMÕES, C.M.O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, CMO;

- SCHENKEL, EP; GOSMANN, G; MELO, JCP; MENTAZ, LA; PETROVICK, PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Florianópolis: Ed. da UFSC, Porto Alegre, UFRGS, ed. 6, p. 229-245, 2007.
- FERNANDES, S.D., RAVANHANI, V.P., BERTONCIN, A.L.F. Uso de medicamentos por pacientes renais crônicos. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 90, p. 327-333, 2009.
- FRAZÃO, C.M.F.Q., RAMOS, V.P., LIRA, A.L.B.C. Qualidade de vida de pacientes submetidos a hemodiálise. Revista de Enfermagem, v.19, p. 577-582, 2011.
- FURLONG, E.B., COLLA, E., BORTOLATO, D.S., BAISCH, A.L.M., SOARES, L.A.S. Avaliação do potencial de compostos fenólicos em tecidos vegetais. Vetor, v. 13, p. 105-114, 2003.
- GARCEZ, F.R., GARCEZ, W.S., SANTANA, A.L.B.D., ALVES, M.M., MATOS, M.F.C., SCALIANTE, A.M. Bioactive flavonoids and triterpenes from Terminalia fagifolia (Combretaceae). Journal of the Brazilian Chemical Society. v. 17; p.1223- 1228, 2006.
- GOUVEIA, A.L.M., MAGNATA, S.S.L.P. Análise da atividade anti-inflamatória e antitumoral da Cana do Brejo. In: XIX CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, 2011. Pernambuco. Trabalho apresentado no XIX congresso de iniciação científica da UFPE. Pernambuco: CONIC, 2011.
- HARBONE, J.B. Phytochemical methods. 3.ed. London: Chapman & Hall, p.302, 1998.
- HELBIG, E. Ação da maceração prévia ao cozimento do feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*, L) nos teores de fitatos e taninos e consequências sobre o valor protéico. Campinas, 2000. 67p. Dissertação (Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição) – Universidade Estadual de Campinas.
- HUGHES, J.B., SILVA, V.D.A., SILVA, A.R., SOUZA, C.S., SILVA, A.M.M., VELOZO, E.S., BATATINHA, M.J.M., COSTA, M.F.D., TARDY, M., EL-BACHÁ, R.S., COSTA, S.L. Cytotoxicity effect of alkaloids extract from *Prosopis juliflora* Sw. D. C. (Algaroba) pods on glial cells. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v. 43, p. 50-58, 2006.
- ISAAC, V.L.B., CEFALI, L.C., CHIARI, B.G., OLIVEIRA, C.C.L.G., SALGADO H.R.N., CORRÊA, M.A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v. 29, p. 81-96, 2008.
- ISERHARD, A.R.M., BUDÓ, M.L.D., NEVES, E.T., BADKE, M.R. Práticas culturais de cuidados de mulheres mães de recém-nascido de risco do Sul do Brasil. Escola Anna Nery, v. 13, p. 116-122, 2009.
- JUNIOR, V.F., PINTO, A.C., MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? Química Nova, v. 28, p. 519-528, 2005.
- KISTLER, P.M., OBEYESEKERE, M.N. Pharmacological management of tachycardia. Australian Family Physician, v. 36, p. 500-505, 2007.
- LAMDIM, A.S.R.L., CUNHA, E.M.F., ARAUJO, M.A.M., SILVA, K.J.D., ROCHA, M.M., ARAUJO, R.S.R.M. Conteúdo de fenólicos totais, antocianinas, taninos e atividade antioxidante de três cultivares de feijão-caupi. III Congresso Nacional de Feijão Caupi- CONAC, Recife, 2013.
- LAPORNIK, B., PROSEK, M., WONDRA, A. G. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. Journal of Food Engineering, v. 71, p. 214-222, 2005.
- LEITÃO, A.P.S. O mercado de flores e plantas ornamentais (palestra ministrada). In: XIV Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais, I Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas.

Lavras-MG. v. 59, p. 2-5, 2003.

LORENZI, H., SOUZA, H.M. Plantas ornamentais no Brasil – Arbustivas, herbáceas e trepadeiras. Plantarum 3 ed., Nova Odessa, p. 1088, 2001.

LORENZI, H., MATOS, F.J.A. Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Instituto Plantarum. 4 ed. Nova Odessa. p. 544, 2002.

LUNA, J.S., SILVA, T.M., BENTO, E.S., SANT`ANA, A.E.G. Isolamento e identificação estrutural dos constituintes químicos de *Endopleura uchi* (Humiriaceae). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 23, 2000b, Poços de Caldas: Livro de Resumos, 2000, v. 2.

MAGALHÃES, L.A.M., LIMA, M.P., MARINHO, H.A., FERREIRA, A.G. Identificação de bergenina e carotenoides no fruto do uchi (*Endopleura uchi*, Umiriaceae. *Acta Amazônica*. v. 37, p 447-450, 2007.

MARTINS, M.R., CESARIANO, C.B. Qualidade de vida de pessoas com doença renal crônica em tratamento hemodialítico. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, v. 13, p. 670-676, 2005.

MARTINS, M.D., MARQUES, M.M., BUSSADORI, S.K., FERRARI, R.A.M., PAVESI, V.C.S., WADT, N.S., FERNANDES, K.P. Citotoxicidade in vitro de extratos de arnicabrasileira (*Solidago microglossa*) e arnica paulista (*Porophyllum ruderale*). *Conscientia e Saúde*, v.8, p. 99-104, 2009.

MAYER, J.L.S., CARDOSO, N.A., CUQUEL, F., BONA, C. Formação de raízes em estacas de duas espécies de *Calliandra* (Leguminosae- Mimosoideae). *Rodriguésia*, v. 59, p. 487-495, 2008.

MENSOR, L.L., MENEZES, F.S., LEITÃO, G.G., REIS, A.S., dos SANTOS, T.C., COUBE, C.S., LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research*, v.15, p.127-130, 2001.

MIYAKE, M., IDE, K., SASAKI, K., MATSUKURA, Y., SHIJIMA, K., FUJIWARA, D. Oral administration of highly oligomeric procyanidins of jatoba reduces the severity of collagen induced arthritis, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v.72, p.1781-1788, 2008.

MILIAUSKAS, G., VENSKUTONIS, P.R., VAN BEEK, T.A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal plants and aromatic plant extract. *Food Chemistry*, v. 85, p. 231-237, 2004.

Ministério da Saúde (BR). Secretaria Executiva. Secretaria de Atenção a Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia em Insumos Estratégicos. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS. Brasília: (DF), 2006.

MOREIRA, R.R.D., SANTOS, L.E., VERELLA, S.D., VARANDA, E.A., VILEGAS, W. Avaliação da atividade mutagênica do extrato etanólico bruto de *Paepalanthus latipes* (Eriocaulaceae) e dos compostos flavonoilicos 7-metoxilados relacionados. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.12, p.11-19, 2002.

MOURE, A., CRUZ, J.M., FRANCO, D., DOMINGUEZ, J.M., SINEIRO, J., DOMINGUEZ, H., NÚÑEZ, M.J., PARAJÓ, J.C. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, v. 72, p. 145-171, 2001.

NASCIMENTO, J.C., LAGE, L.F.O., CAMARGOS, C.R.D., AMARAL, J.C., COSTA, L.M., SOUSA, N.A., OLIVEIRA, F.Q. Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonoides totais em extratos de folhas da *Bauhinia variegata* L. Belo Horizonte- MG, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 92, p. 327-332, 2011.

NUNOMURA, R.C.S., OLIVEIRA, V.G., SILVA, S.L., NUNOMURA, S.M. Characterization of bergenin in *Endopleura uchi* bark and its anti-inflammatory activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 20, p.1060-1064, 2009.

OECD (1997), Oslo Manual. Proposed Guidelines for Collecting and Interpreting Technological Innovation Data (second edition), Paris.

OLIVEIRA, L.A.R., MACHADO, R.D., RODRIGUES, A.J.L. Levantamento sobre o uso de plantas medicinais com a terapêutica anticâncer por pacientes da Unidade Oncológica de Anápolis. *Revista Brasileira de Medicina do Piauí*. v.16, p. 32-40, 2014.

OLIVEIRA, M.N. Prospecção Farmacológica de compostos sintéticos “Alkaloides-Like” para o tratamento de gliomas malignos. Feira de Santana, 2013. 102p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Estadual de Feira de Santana.

PADUA, P.F.M.R., DIHL, R.R., LEHMANN, M., ABREU, B.R.R., RICHTER, M.F., ANDRADE, H.H.R. Genotoxic, antigenotoxic and phytochemical assessment of *Terminalia actinophylla* ethanolic extract. *Food and Chemical Toxicology*, v.62, p.521-527, 2013.

PARENTE, J.P., SILVA, B.P. Flavonol glycosides from *Costus spicatus*. *Phytochemistry*, v. 53, p. 87-92. 2000.

PARENTE, J.P.; SILVA, B.P. Bioactive polysaccharides from *Costus spicatus*. *Carbohydrate Polymers*. v. 51, p. 239-242. 2003.

PARK, Y.K., ALENCAR, S.M., SCAMPARINI, A.R.P., AGUIAR, C.L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. *Ciência Rural*, v.32, p. 997-1003, 2002.

PELLATI, F., BRUNI, R., RIGHI, D., GRANDINI, A., TOGNOLINI, M., PRENCIPE, F.P., POLI, F., BENVENUTI, S., DEL RIO, D., ROSSI, D. Metabolite profiling of polyphenols in a *Terminalia chebula* Retzius ayurvedic decoction and evaluation of its chemopreventive activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 147, p. 277-285, 2013.

PITANGA, B.P.S. Efeitos de flavonoides sobre a ativação microglial e viabilidade de células de glioblastoma. Salvador, 2012. 87p. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde)- Universidade Federal da Bahia.

POLITI, F.A.S. Estudos farmacognósticos e avaliação de atividades biológicas de extratos obtidos das cascas pulverizadas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. (Humiriaceae). Araraquara, 2009. 124p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

POLITI, F.A.S., MELLO, J.C.P., MIGLIATO, K.F., NEPOMUCENO, A.L.A., PIETRO, R.C.L.R. Antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activities and determination of the total tannin content of bark extracts *Endopleura uchi*. *International Journal of Molecular Sciences*, v.12, p. 2757-2768, 2011.

POILITI, F.A.S., SALGADO, H.R.N., MOREIRA, R.R.D., PIETRO, R.C.L.R. Preliminary tests on acute oral toxicity and intestinal motility with extract of pulverized bark of *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. (Humiriaceae) in mice. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v.1, p.187-189, 2010.

PONOU, B.K., TEPONNO, R.B., RICCIUTELLI, M., QUASSINTI, L., BRAMUCCI, M., LUPIDI, G., BARBONI, L., TAPONDJOU, L.A. Dimeric antioxidant and cytotoxic triterpenoid saponins from *Terminalia ivorensis*. *Phytochemistry*, v.7, p. 2108-2115, 2010.

RAKIC, A., MALETIC, R., PERUNOVIC, M., SVRZIC, G. Influence of thermal treatment on tannin content and antioxidant effect of oak accord *Quercus cerris* extract. *Journal of Agricultural Sciences*, v. 49, p.97-107, 2004.

RUSSELL, L.H., MAZZIO, E., BADISA, R.B., ZHU, Z.P., AGHARAHIMI, M., ORIAKU, E.T., GOODMAN, C.B. Autoxidation of gallic acid induces ROS-dependent death in human prostate cancer LNCaP cells. *Anti-cancer Research*, v. 32, p. 1595-602, 2012.

SALAMONI, A.T., SIERAKOWSKI, M.R., EL JAZIRI, M., QUOIRIN, M. Xyloglucans from *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* seeds affect *Arabidopsis thaliana* seedling growth by enhancing lateral root development. *Revista Brasileira de Botânica*, v.33, p.539-545, 2010.

SCASSELLATI-SFORZOLINI. G., VILALRINI, L.M., MARCARELLI, L.M., PASQUINI, R., FATIGONI, C., KAUR, L.S. Antigenotoxic properties of *Terminalia arjuna* bark extracts. *Journal Environmental Pathology, Toxicology & Oncology*. v.18, p.119-125, 1999.

SHAD, M.A., NAWAZ, H., REHMAN, T., AHMAD, H.B., HUSSAIN, M. Optimization of extraction efficiency of tannins from *Cichorium intybus* L.: application of response surface methodology, *Journal Medicinal Plants Research*, v. 6, p.4467-4474, 2012.

SILVA, B.P., SOARES, J.B.R.C., SOUZA, E.P., PALATNIK, M., SOUSA, C.B.P., PARENTE, J.P. Pulcherrimasapinin, from the leaves of *Calliandra pulcherrima*, as adjuvant for immunization in the murine model of visceral leishmaniasis. *Vaccine*, v. 23, p.1061-1071, 2005.

SILVA, L.M., SILVA, L.C.D., MARÇAL, M.A., FONSECA, R.M., NASCIMENTO, I.A., CLAUDINO, G.P. Avaliação da atividade citotóxica e antioxidante das espécies: *Costus spiralis* Rosc. e *Citrus limonum*. 51º Congresso Brasileiro de Química: Meio Ambiente e Energia. São Luís-MA, 2011.

SILVA, L.M., OLIVEIRA, V.G., YANO, T., NUNOMURA, R.C.S. Atividade antimicrobiana de bergenina isolada da *Endopleura uchi*. Sociedade brasileira de Química. 31ª Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ). 2008

SILVA, L.R., TEXERA, S. Phenolic profile and biological potential of *Endopleura uchi* extracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 15, p. 1-9, 2015.

SILVA, M.R., SILVA, M.S., MARTINS, K.A., BORGES, S. Utilização tecnológica dos frutos de jatobá-do-cerrado e de jatobá-da-mata na elaboração de biscoitos fontes de fibra alimentar e isentos de açúcares. *Ciência Tecnologia de Alimentos*. Campinas, v. 21, p. 176-182, 2001.

SINGLETON, V.L., ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, v.16, p. 144–158, 1965.

SKEHAN, P., STORENG, R., SCUDIERO, D., MONKS, A., MCMAHON, J., VISTICA, D., WARREN, J.T., BOKESCH, H., KENNEY, S., BOYD, M.R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal National Cancer Institute*, v. 82, p.1107-1112, 1990.

SOFOWARA, A. *Medicinal Plants and Traditional Medicine in Africa*, Spectrum Books Ltd, Ibadan, Nigeria, p.289. 2009.

SOUSA, C.M.M., SILVA, H.R., VIEIRA, G.M., AYRES, M.C.C., COSTA, C.S., ARAÚJO, D.S. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, v. 30, p. 351-355, 2007.

SOUZA, E.R.S., QUEIROZ, L.P. Duas novas espécies de *Calliandra* Benth. (Leguminosae- Mimosoideae)

da Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*. v. 27, p. 615-619, 2004.

SURVESWARAN, S., CAI, Y., CORKE, H., SUN, M. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chemistry*, v. 102, n. 3, p. 938-953, 2007.

TAKAHASHI, H., KOSAKA, M., WATANABE, Y., NAKADE, K., FUKUYAMA, Y. Synthesis and neuroprotective activity of bergenin derivatives with antioxidant activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 11, p. 1781-1788, 2003.

TAN, S., GUAN, X., GRUN, C., ZHOU, Z., SCHEPERS, U., NICK, P. Gallic acid induces mitotic catastrophe and inhibits centrosomal clustering in HeLa cells. *Toxicology in vitro*, p. 1-8, 2015.

TESSE, C.D., BARROS, N.F. Medicalização social e medicina alternativa e complementar do Sistema Único de Saúde SUS. *Revista Saúde Pública*, v. 42, p. 914-920, 2008.

TOMAINO, A., CIMINO, F., ZIMBALATTI, V. Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. *Food Chemistry*, v.89, p. 549-554, 2005.

TRESVENZOL, L.M., PAULA, J.R., RICARDO, A.F., FERREIRA, H.D., ZATTA, D.T. Estudo sobre o comércio informal de plantas medicinais em Goiânia e cidades vizinhas. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v 3, p. 22-28, 2006.

TUROLLA, M.S.R., NASCIMENTO, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Revista Brasileira Ciência e Farmacognosia*, v. 42, p. 189-306, 2006.

VEGGI, P.C., PRADO, J.M., BATAGLION, G.A., EBERLIN, M.N., MEIRELES, A.A. Obtaining phenolic compounds from jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) bark by supercritical fluid extraction. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 89, p. 68-77, 2014.

VERMA, S.S.R.J. Antioxidant activity of polyphenolic extract of *Terminalia chebula* Retzius fruits. *Journal of Taibah University for Science*, p.1-28, 2014.

VIEIRA, L.S., ALBUQUERQUE, J.M. Fitoterapia tropical – manual de plantas medicinais. FCAP – Serviço e documentação. Belém, Brasil, 1998.

VIEL, T.A., DOMINGOS, D.C., MONTEIRO, A.P.S., LIMA-LANDMAN, M.T.R., LAPA, A.J., SOUCCAR, C. Evaluation of the antiurolithiatic activity of the fraction of *Costus spiralis* Roscoe in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 66, p. 93-198, 1999.

VOLPATO, A.M.M. Investigação do potencial antibacteriano de *Calendula officinalis* (Asteraceae) para seu emprego como fitoterápico. Curitiba, 2005. 115p. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde)- Universidade Federal do Paraná.

WAGNER, H., BLADT, S. *Plant drug analysis*. 2.ed. New York: Springer Verlag, 1996.

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

WOJCIKOWSKI, K., JOHNSON, D.W., GOBÉ, G. Medicinal herbal extracts-renal friend or foe Part one: The toxicities of medicinal herbs. *Nephrology*, v.9, p. 313-318, 2004.