



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E**  
**CONSERVAÇÃO**



**ESTUDO DO POTENCIAL CITOGENOTÓXICO, ANTIOXIDANTE E**  
**HIPOGLICEMIANTE DA *MANSOA HIRSUTA* D.C. (BIGNONIACEAE)**

**JOQUEBEDE RODRIGUES PEREIRA**

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



**Jequié-BA**  
**2016**

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



**JOQUEBEDE RODRIGUES PEREIRA**

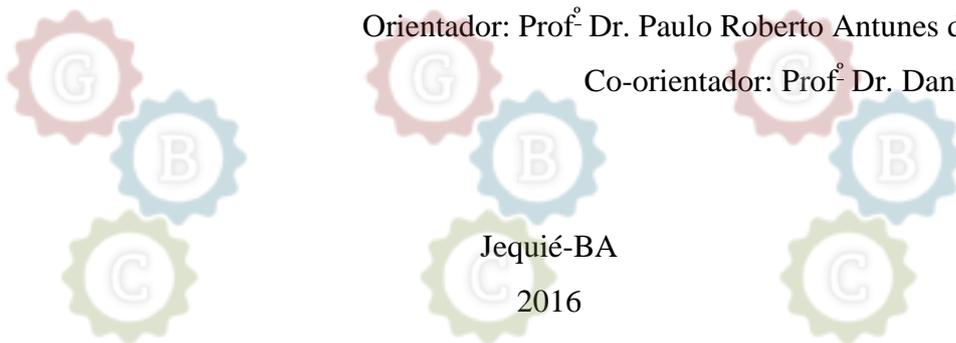
Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



**ESTUDO DO POTENCIAL CITOGENOTÓXICO, ANTIOXIDANTE E HIPOGLICEMIANTE DA *MANSOA HIRSUTA* D.C. (BIGNONIACEAE)**

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, para obtenção do título de Mestre em Genética, Biodiversidade e Conservação.



Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr. Paulo Roberto Antunes de Mello Affonso  
Co-orientador: Prof<sup>o</sup> Dr. Daniel de Melo Silva

Jequié-BA  
2016

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Pereira, Joquebede Rodrigues.

P492 Estudo do potencial citogenotóxico, antioxidante e hipoglicemiante da *Mansoa hirsuta* D.C. (Bignoniaceae)/Joquebede Rodrigues Pereira.- Jequié, UESB, 2016.

77 f: il.; 30cm. (Anexos)

Dissertação de Mestrado (Pós-graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação)-Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2016. Orientador: Profº. Drº. Paulo Roberto Antunes de Mello Affonso.

1. *Mansoa hirsuta* D.C. (Bignoniaceae) no semiárido brasileiro – Potencial citogenotóxico, antioxidante e hipoglicemiante 2.

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E  
CONSERVAÇÃO

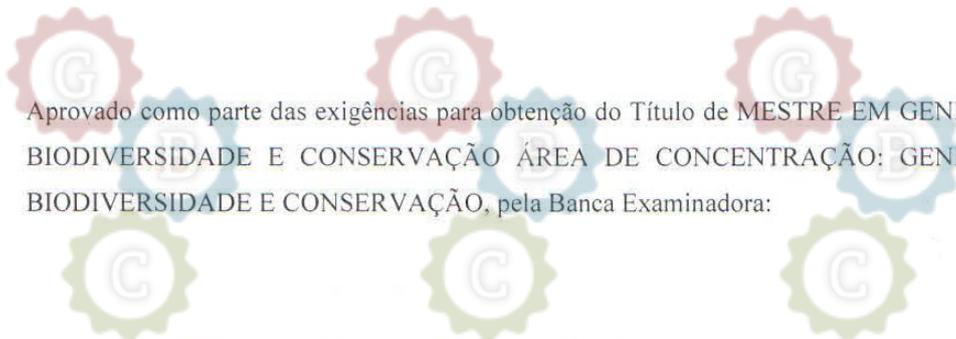
Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação  
Campus Jequié-BA

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

**Título:** Estudo do potencial tóxico, antioxidante e hipoglicemiante da *Mansoa hirsuta* D.C. (Bignoniaceae).

**Autor (a):** Joquebede Rodrigues Pereira

**Orientador (a):** Dr. Paulo Roberto Antunes de Mello Affonso



Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO, pela Banca Examinadora:

Prof. D. Sc. Paulo Roberto Antunes de Mello Affonso – UESB / Jequié-BA

Prof. D. Sc. Daniel de Melo Silva – UFBA / Vitória da Conquista-BA

Prof. D. Sc. José Fernando Oliveira Costa – UNIFACS / Salvador-BA



Data de realização: 28 de março de 2016.

Avenida José Moreira Sobrinho, s/n – Jequiezinho – Jequié/BA – CEP 45.206-190.  
Telefones: (0\*\*73) 3528-9725 – E-mail: ppggbc@uesb.edu.br

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



## AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar ao meu lado me encorajando em todos os momentos, me amparando e mostrando o caminho a ser seguido, pela força nas horas difíceis, pelo amor incondicional, pelo cuidado diário e proteção constante.

À minha querida família. Meu pai Carlito, minha mãe Maria Santina, meus irmãos Clécio, Josiane e Geisiane, cunhados e sobrinhos, minha fortaleza, meu porto seguro e minha fonte de inspiração, pela compreensão da ausência, lição de vida, amor, fé, paciência e persistência.

Vocês são inigualáveis.

Aos meus orientadores, Paulo Roberto Antunes de Mello Affonso e Daniel de Melo Silva, exemplos de profissionais corretos e competentes, pela confiança, pelo incentivo, ajuda e por acreditar nesse trabalho. Minha sincera admiração e gratidão.

Ao professor Raphael Ferreira Queiroz pela valiosa orientação, colaboração e apoio. Meus sinceros agradecimentos e admiração.

Ao meu namorado Silvano Almeida Junior. Obrigado pela força e por estar ao meu lado sempre. Meu presente de Deus!

A Isnanda, pela amizade, convívio e força.

A Vilma. Pelo companheirismo e força nas horas difíceis.

Aos meus amigos, irmãos que Deus me deu, pela amizade sincera, força, companheirismo e apoio.

Aos amigos e colegas de Laboratório, Léia, Tássia, Jorge e Gleiza por me ajudarem a concretizar esse trabalho.



Aos colegas do Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco, em especial Erlânia, Ilca e a Professora Ana pelo acolhimento e contribuição para realização desse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação – UESB, por tornar possível a concretização desse trabalho.



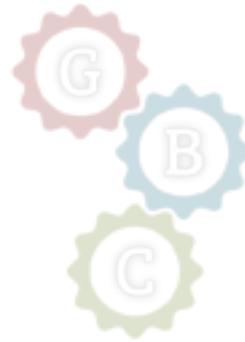
Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



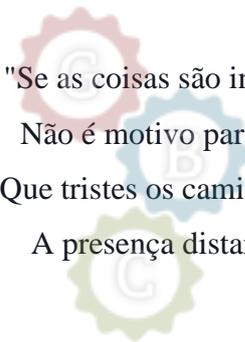
Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



"Se as coisas são inatingíveis... ora!  
Não é motivo para não querê-las...  
Que tristes os caminhos, se não fora  
A presença distante das estrelas!"

Mario Quintana

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



## RESUMO

A *Mansoa hirsuta* D.C. (Bignoniaceae) é uma planta nativa do semiárido brasileiro que apresenta ação antimicrobiana, hipoglicemiante, vasodilatadora, imunossupressora e antioxidante. Porém, pouco se conhece sobre as propriedades farmacológicas e possíveis efeitos tóxicos dos compostos ativos dessa espécie. O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade biológica e citoprotetora do extrato etanólico bruto e frações da *M. hirsuta* além de analisar a citogenotoxicidade e possíveis efeitos quimioprotetores da mistura isomérica de ácidos ursólico e oleanólico (1:1) isolados dessa planta. Os fenólicos totais foram quantificados pelo método de Folin-Ciocalteu e a atividade antioxidante *in vitro* foi determinada pelos métodos de co-oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico e de captura dos radicais livres  $\text{DPPH}^{\bullet}$  e  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ . Foi avaliada também a viabilidade celular através do método do MTT e a atividade citoprotetora foi determinada através da investigação da capacidade do extrato e frações de *M. hirsuta* em proteger os fibroblastos contra o dano oxidativo causado por  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Para a determinação da atividade antioxidante em modelo celular, foi utilizada a sonda fluorescente DCFH mediada pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A atividade hipoglicemiante *in vitro* foi determinada através da inibição da enzima  $\alpha$ -amilase. A prospecção fitoquímica revelou a presença de esteroides, triterpenos, saponinas, flavonóis, flavanonóis, flavanonas, xantonas e também de fenóis, taninos, antocianinas, antocianidinas e flavonóides no extrato bruto e frações testadas. A fração acetato de etila foi a mais eficiente em inibir a cascata de peroxidação lipídica enquanto a fração hidroalcoólica demonstrou maior potencial em capturar os radicais  $\text{DPPH}^{\bullet}$  e  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ . Além disso, a fração hidroalcoólica também apresentou o maior teor de fenólicos totais. Além de não apresentarem atividade citotóxica, o extrato bruto e suas frações protegeram as células da morte celular, com destaque para os ácidos ursólico e oleanólico. Esses compostos também foram os mais eficientes em reduzir a oxidação intracelular. A atividade da enzima  $\alpha$ -amilase foi inibida apenas pela fração isolada da *M. hirsuta*. A mistura dos ácidos ursólico e oleanólico não interferiu significativamente no comprimento médio das raízes, índice mitótico e na frequência de alterações cromossômicas e nucleares no sistema teste *Allium cepa*. Além disso, esses ácidos apresentaram atividade protetora, com redução de danos ao DNA nas concentrações de 0,001 e 0,1 mg/mL. Portanto, os ácidos ursólico e oleanólico dessa planta além de não serem tóxicos, citotóxicos, genotóxicos nem mutagênicos, apresentaram atividade hipoglicemiante. Em suma, foi confirmado o potencial antioxidante, atóxico e citoprotetor de compostos de *M. hirsuta*, sendo esta uma nova alternativa para tratamento de doenças inflamatórias e diabetes. Esses dados mostram a importância da conservação da biodiversidade da caatinga, uma vez que ela representa uma fonte em potencial de novos bioprodutos e de importância para a medicina popular.

**Palavras-chave:** *Allium cepa*; Bioensaio; Lianas; Medicina Popular; Semiárido; Toxicidade.



## ABSTRACT

*Mansoa hirsuta* D.C. (Bignoniaceae) is a native plant species from Brazilian semiarid region with antimicrobial, hypoglycemic, immunosuppressive and antioxidant activity. However, little is known about the pharmacological properties and possible toxic effects of active compounds of this species. The goal of this study was to evaluate the biological and cytoprotective properties of the raw ethanol extract and fractions of *M. hirsuta*, besides analyzing the cytogenotoxicity and eventual chemioprotector effects of the isomeric mixture of ursolic and oleanolic acids (1:1) isolated from this plant species. Total phenolics were quantified by Folin-Ciocalteu method and the *in vitro* antioxidant activity was determined by co-oxidation of  $\beta$ -carotene/linoleic acid and capture of  $\cdot$ DPPH and ABTS $^{*+}$  free radicals. The cell viability was also assessed by MTT method while the cytoprotective activity was determined according to the capacity of extraction and fractions of *M. hirsuta* in protecting fibroblasts against oxidative damages caused by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The antioxidant activity was determined in cellular model using the DCFH fluorescent probe mediated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The *in vitro* hypoglycemic activity was determined by the inhibition of  $\alpha$ -amylase enzyme. The phytochemical prospection revealed the presence of steroids, saponins, flavonols, flavanols, flavanones, xanones as well as phenols, tannins, anthocyanins, anthocyanidins and flavonoids in the raw extract and tested fractions. The ethyl acetate fraction was the most efficient in inhibiting the cascade of lipid peroxidation while the hydroalcoholic fraction was more efficient in capturing  $\cdot$ DPPH and ABTS $^{*+}$  radicals. Besides, the hydroalcoholic fractions also presented the highest content of total phenols. Besides the absence of cytotoxic activity, the raw extract and fractions prevent the cells against cell death, with particular efficiency for ursolic and oleanolic acids. These compounds were also the most efficient in reducing the intracellular oxidation. The activity of  $\alpha$ -amylase was inhibited only by the isolated fraction of *M. hirsuta*. The mixture of ursolic and oleanolic acids has no significant effects over the mean length of roots, mitotic index and frequency of chromosomal and nuclear changes in the system test *Allium cepa*. Moreover, both acids presented protective effects, causing reduced DNA damages at concentrations of 0.001 and 0.1 mg/mL. Therefore, the ursolic and oleanolic acids of this plant had neither toxic, cytotoxic, genotoxic nor mutagenic effects, besides presenting hypoglycemic activity. In conclusion, the antioxidant, cytoprotective and non-toxic effects of *M. hirsuta* compounds were confirmed, representing a new alternative to the treatment of inflammatory diseases and diabetes. These datasets show the importance of conserving biodiversity from caatinga since it provides a potential source of new bioproducts of importance to popular medicine.

**Keywords:** *Allium cepa*; Bioassay; Lianas; Popular Medicine; Semiarid; Toxicity.

## LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. *Mansoa hirsuta* D.C. coletada em Boninal, BA (Silva, 2009). 6

Figura 2. Espécies de Bignoniaceae endêmicas da caatinga (Lemos & Zappi, 2012). 7

### CAPÍTULO 1

Figura 1. (A) *M. hirsuta* D.C. coletada em Morro do Chapéu. (B) Estrutura química do ácido ursólico. (C) Estrutura química do ácido oleanólico. 27

Figura 2. Viabilidade celular (%) após incubação de fibroblastos com extrato etanólico bruto (EEB), fração hidroalcoólica (FHA), fração alcoólica (FAA), fração acetato de etila (FAE) e ácidos ursólico e oleanólico (AUO) da *M. hirsuta* na concentração de 100 µg/mL por 24 h a 37°C seguido por incubação com MTT. Controle positivo (C+): Triton X-100 (1%). Controle negativo (C-): células sem adição do extrato e frações. \* $p > 0,05$ , quando comparado com o controle negativo. 35

Figura 3. Atividade citoprotetora (%) do extrato etanólico bruto (EEB), fração hidroalcoólica (FHA), fração alcoólica (FAA), fração acetato de etila (FAE) e ácidos ursólico e oleanólico (AUO) de *M. hirsuta*. As células foram incubadas com o extrato e frações (10 µg/mL). Após 24 h foram lavadas com PBS e incubadas por 4 h com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µM), sendo a viabilidade celular residual determinada pelo ensaio do MTT. 35

Figura 4. Atividade antioxidante em modelo celular do extrato etanólico bruto (EEB), fração hidroalcoólica (FHA), fração alcoólica (FAA), fração acetato de etila (FAE) e ácidos ursólico e oleanólico (AUO) de *M. hirsuta*. Fibroblastos em cultura foram incubados com extrato e frações (10 µg/mL). Após 24 h, as células foram lavadas com PBS e incubadas por 4 h com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µM). Após lavagem com PBS, as células foram incubadas com a DCFH-DA (10 µM) por 30 min, sendo a oxidação DCFH monitorada por fluorescência. 36

Figura 5. Curva de concentração *versus* efeito da inibição da  $\alpha$ -amilase pela fração isolada da *M. hirsuta* quando comparada com a acarbose. O valor de IC<sub>50</sub> foi determinado por ajuste hiperbólico dos dados no programa GraphPad (C+: Acarbose; FOU: Ácidos ursólico e oleanólico). 37

### CAPÍTULO 2

Fig. 1. (A) *Mansoa hirsuta* D.C. coletada em Morro do Chapéu. (B) Estrutura química do ácido ursólico. (C) Estrutura química do ácido oleanólico. 51

Fig. 2. Alterações cromossômicas em células meristemáticas de *Allium cepa* expostas aos ácidos ursólico e oleanólico de *Mansoa hirsuta*: (A) broto nuclear; (B) micronúcleo; (C) C-metáfase; (D) perda cromossômica; (E) ponte cromossômica; (F) anáfase com perda cromossômica. 55



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



## LISTAS DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

Tabela 1. Prospecção fitoquímica qualitativa dos extratos e frações das folhas da *M. hirsuta*. 33

Tabela 2. Atividade antioxidante do extrato etanólico bruto e frações hidroalcoólica, alcoólica, acetato de etila e da mistura dos ácidos ursólico e oleanólico da *M. hirsuta*. 33

Tabela 3. Inibição da  $\alpha$ -amilase pelo extrato bruto e frações da *M. hirsuta* a 200  $\mu\text{g/mL}$ . 36

### CAPÍTULO 2

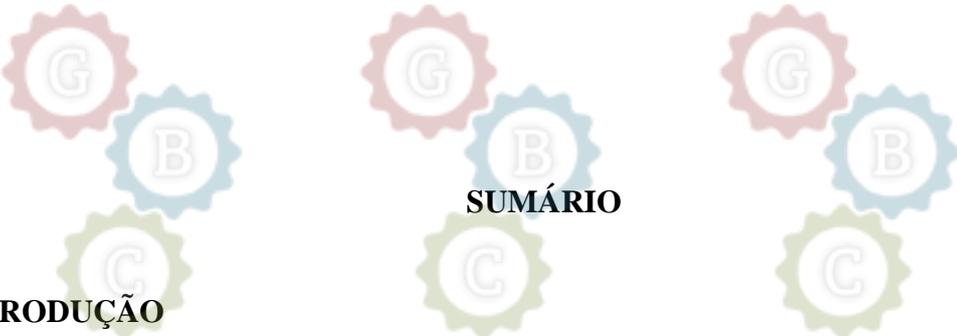
Tabela 1. Valor do comprimento médio das raízes (VCMR) e índice mitótico (IM), observadas em células meristemáticas após a exposição de raízes de *Allium cepa* a diferentes concentrações dos ácidos ursólico e oleanólico de *Mansoa hirsuta*. 54

Tabela 2. Frequência de alterações cromossômicas e nucleares presentes nas diferentes concentrações dos ácidos ursólico e oleanólico de *Mansoa hirsuta* analisadas com o sistema-teste *Allium cepa*. 56

Tabela 3. Frequência de alterações cromossômicas e nucleares presentes nas diferentes concentrações dos ácidos ursólico e oleanólico seguida de exposição ao metil metanosulfonato (MMS), avaliadas com o sistema-teste *Allium cepa*. 56

## LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS <sup>•+</sup>	2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
C5	Seis unidades de isopreno
CAT	Catalase
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH <sup>•</sup>	1,1-difenil-2-picrilidrazil
ECA	Enzima conversora da angiotensina
EROS	Espécies reativas de oxigênio
GR	Glutathione redutase
GSHPx	Glutathione peroxidase
HBV	Vírus da hepatite B
HCV	Vírus da hepatite C
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HSV	Vírus Herpes simplez
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IM	Índice mitótico
INPI	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
IPA	Instituto Agrônomo de Pernambuco
IPCS	Programa Internacional de Segurança Química
MMS	Metilmetano sulfonato
MN	Micronúcleo
OMS	Organização Mundial de Saúde
QC	Quebra cromossômica
SOD	Superóxido dismutase
UNEP	Programa Ambiental das Nações Unidas
VCMR	Comprimento médio das raízes



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	4
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	5
2.1 Espécie botânica	5
2.2 Ácidos ursólico e oleanólico	7
2.3 Estresse oxidativo e plantas medicinais	9
2.4 Diabetes mellitus e plantas medicinais	10
2.5 Toxicidade de plantas medicinais	11
2.6 Teste <i>Allium cepa</i> L.	12
<b>3 OBJETIVOS</b>	14
3.1 Objetivo geral	14
3.2 Objetivos específicos	14
<b>4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	15
<b>5 CAPÍTULO 1 - Atividades antioxidante e hipoglicemiante da <i>Mansoa hirsuta</i> D.C. (Bignoniaceae)</b>	25
<b>6 CAPÍTULO 2 - Avaliação do potencial citogenotóxico dos ácidos ursólico e oleanólico isolados da <i>Mansoa hirsuta</i> D.C. (Bignoniaceae), uma planta do semiárido brasileiro com potencial bioativo</b>	49
<b>7 CONCLUSÕES GERAIS</b>	67

## 1 INTRODUÇÃO

Produtos naturais continuam sendo amplamente utilizados como uma fonte importante de novos fármacos, adjuvantes e medicamentos fitoterápicos, desempenhando um papel relevante na prevenção, tratamento e progressão de diversas doenças. Estima-se que 52% dos medicamentos lançados no mercado foram produtos naturais ou originados de produtos naturais (Chin *et al.*, 2006). Além disso, aproximadamente 80% da população mundial utilizam plantas medicinais com fins de cura, tratamento e prevenção de doenças por ser uma terapia economicamente acessível (Duraipandiyan *et al.*, 2006).

Assim, apesar da ênfase sobre fármacos sintéticos, o interesse em plantas medicinais tem aumentado. Os metabólitos secundários, componentes bioativos sintetizados pelas plantas medicinais, estão envolvidos na sobrevivência da planta ao meio atuando como protetores contra diversos patógenos, além de absorverem a luz ultravioleta. Dentre os metabólitos secundários produzidos por espécies de plantas medicinais estão os flavonóides, alcalóides, saponinas, taninos, terpenóides, cumarinas, antraquinonas e glicosídeos. Estes componentes fitoquímicos são responsáveis por algumas das atividades terapêuticas atribuídas às plantas medicinais, tais como ação antioxidante, anti-inflamatória, analgésica, antidiabética, antitumoral, antimicrobiana, anestésica, neuroprotetora e antiplaquetária (Tsuchiya, 2015). Assim, diversas drogas têm sido desenvolvidas a partir desses compostos naturais e seus derivados (Yokosuka, 2015).

Nessa perspectiva, o Brasil merece destaque como fonte de novos fármacos de produtos naturais uma vez que abriga mais de 55 mil espécies de plantas catalogadas, sendo considerado o país com maior diversidade genética vegetal (Guerra e Nodari, 2006). No entanto, apesar do grande potencial da biodiversidade brasileira, apenas 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal (Pinto *et al.*, 2002), o que demonstra a importância e necessidade de mais estudos sobre os usos e benefícios que essas espécies possuem. Pesquisas dessa natureza tornam-se ainda mais importantes com o avançado estado de degradação dos ecossistemas brasileiros de tal forma que compostos potencialmente úteis podem não ser identificados devido à extinção de algumas espécies.

Outro aspecto a ser ressaltado é que poucas das plantas utilizadas para fins medicinais ou alimentares já foram avaliadas quanto à sua qualidade, segurança e eficácia, além do seu potencial farmacológico. Geralmente essas espécies, aparentemente benéficas ao organismo, são usadas com base no conhecimento popular, podendo trazer efeitos adversos à saúde do

usuário a curto ou a longo prazo. De fato, a Organização Mundial de Saúde (OMS) aprova o uso de plantas medicinais com fins terapêuticos, mas recomenda mais estudos para garantir a segurança e eficácia terapêutica dos produtos naturais, além das análises de interações farmacológicas, da prescrição e da posologia indevidas.

Sendo as plantas medicinais fonte potencial de novas moléculas com atividade farmacológica e a sua relevância como recurso terapêutico para comunidades e grupos étnicos de países em desenvolvimento justificam o interesse em identificar as ações farmacológicas e possíveis efeitos danosos às biomoléculas (Calixto, 2005). Essas etapas visam garantir o desenvolvimento de medicamentos novos e seguros, além de contribuir com a identificação, prevenção e monitoramento de possíveis danos em relação ao uso popular.

No caso do nordeste brasileiro, o grande número de espécies vegetais ainda não estudadas, o vasto uso pela população de plantas medicinais e o risco de extinção de espécies nativas da flora tornam urgentes pesquisas que visem avaliar o potencial farmacológico e a segurança da utilização de produtos naturais locais. Dessa forma, esse trabalho buscou investigar as possíveis ações farmacológicas e toxicológicas de uma espécie de planta típica do semiárido nordestino para definir parâmetros de eficácia e segurança no uso desse recurso terapêutico, como também seu uso como fonte para descobertas de novas moléculas com atividade farmacológica.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Espécie botânica

A família Bignoniaceae é predominantemente neotropical, incluindo 82 gêneros e 827 espécies de lianas, arbustos e árvores lenhosas (Olmstead *et al.*, 2009). O Brasil, considerado como centro da diversidade dessa família, apresenta 32 gêneros e 350 espécies distribuídas por diversos biomas, como cerrado, mata atlântica e floresta amazônica (Gentry, 1980; Silva & Queiroz, 2003). Considerada uma das famílias de maior importância econômica e biológica, Bignoniaceae inclui espécies utilizadas na construção civil, indústria madeireira e em projetos de ornamentação urbana, a exemplo de *Jacaranda brasiliana* (Jacarandá), *Tabebuia alba* e *T. avellandaea* (ipês amarelo e roxo) (Gentry, 1980).

Numerosas espécies dessa família ainda são utilizadas com fins ritualísticos como corantes ou alucinógenos, na horticultura, na culinária e na medicina popular como adstringentes, antitérmicos e para o tratamento de diversas doenças como reumatismo,

diarreia, câncer e infecções microbianas (Gentry, 1980). Diversas atividades biológicas para espécies dessa família também têm sido observadas experimentalmente. Entre elas, podemos citar a inibição de *Staphylococcus aureus* para o extrato etanólico e metoxiflavonas do caule de *Zeyheria tuberculosa* (Bastos *et al.*, 2009); atividade antioxidante para os extratos metanólicos de folhas, flores e frutos de *Catalpa bignonioides* (Dvorská *et al.*, 2007); atividade analgésica e anti-inflamatória do extrato etanólico das folhas de *Zeyheria montana* (Guenka *et al.*, 2008) e atividade antidiabética do extrato aquoso das folhas de *Tecoma stans* (Aguilar-Santamaría *et al.*, 2009). Assim, é notório o interesse em estudar espécies de Bignoniaceae do ponto de vista farmacológico e fitoquímico.

*Mansoa* é um gênero diversificado da família Bignoniaceae, o qual inclui espécies com grande variedade morfológica e conhecidas popularmente como "cipó-de-alho" devido ao cheiro característico. Os representantes desse gênero são encontrados tanto em florestas tropicais úmidas quanto secas; No caso da caatinga, há registro de ocorrência de quatro espécies de *Mansoa*. Dentre elas, destaca-se *Mansoa hirsuta* D.C. (Figura 1) por se tratar de uma espécie de trepadeira lenhosa (cipó ou liana) endêmica da região semiárida (Figura 2) (Silva, 2009; Lemos & Zappi, 2012).



Figura 1. *Mansoa hirsuta* D.C. coletada em Boninal, BA (Silva, 2009).

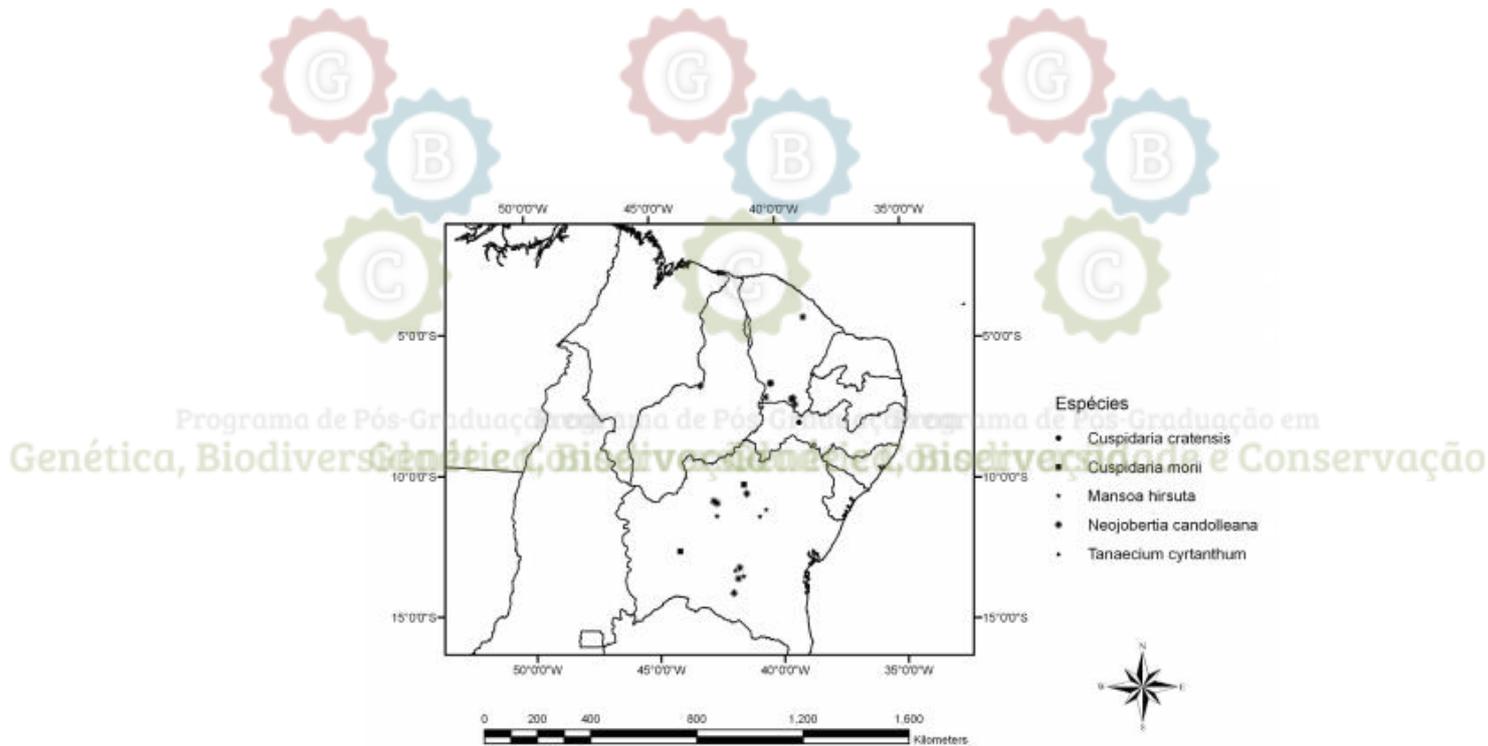


Figura 2. Espécies de Bignoniaceae endêmicas da caatinga (Lemos & Zappi, 2012).

O primeiro estudo fitoquímico detalhado dessa espécie demonstrou a presença de diversos metabólitos secundários como flavonoides, triterpenos, esteroides, fenóis, taninos condensados e saponinas (Silva, 2009). Algumas atividades biológicas dessa espécie foram propostas, incluindo atividade antifúngica e antitumoral e uso potencial no tratamento de diabetes (Chaves & Reinhard, 2003; Agra *et al.*, 2008). Silva (2009) também relatou inibição significativa da produção de óxido nítrico (57,92%, 0,01 mg/mL) e da linfoproliferação (99,92%) da fração acetato de etila da *M. hirsuta*.

Rocha *et al.* (2004) ainda demonstraram que o extrato etanólico dessa espécie inibiu o crescimento de culturas padronizadas de *Aspergillus niger* e *Fusarium oxysporum*. Adicionalmente, foi observado que proantocianidinas isoladas do extrato etanólico da *Mansoa hirsuta* apresentaram ação vasodilatadora e inibitória da enzima conversora da angiotensina (ECA) (Campana, 2008). A potencial atividade anti-hipertensiva de compostos dessa espécie também foi demonstrada por Braga *et al.* (2000) em ensaios *in vitro* com o extrato etanólico bruto, o qual inibiu 54% da ECA na concentração de 0,33 mg/mL.

## 2.2 Ácidos ursólico e oleanólico

O estudo com a *M. hirsuta* possibilitou o isolamento e a identificação estrutural da mistura do ácido ursólico e seu isômero, o ácido oleanólico da fração acetato de etila. Esse trabalho resultou na criação de patente registrada no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) com o número: BR102015008180 com o intuito de aplicação em

formulações de novos suplementos, alimentos funcionais, fitofármacos e fitoterápicos (Silva *et al.*, 2015). De fato, estudos prévios haviam verificado que a mistura destes triterpenos apresentava atividade imunossupressora por meio da inibição da proliferação de linfócitos (acima de 99%) e da inibição de óxido nítrico (44,1 e 41,5%, respectivamente) (Silva, 2009).

Os ácidos ursólico e oleanólico fazem parte do grupo dos triterpenos pentacíclicos constituídos por seis unidades de isopreno (C5), formados por 5 anéis e pertencentes ao grupo dos ursanos e oleananos, respectivamente (Yin, 2015). Os triterpenóides constituem uma importante classe de produtos naturais de acentuada diversidade estrutural com diversas funções nas plantas e na saúde humana, estando relacionados com uma ampla gama de efeitos farmacológicos (analgesia, hepatoproteção, sedação, ação antiviral e anti-inflamatória) (Vasconcelos *et al.*, 2006; Roberts, 2007; Bishayee *et al.*, 2011; Hill & Connolly, 2011). Assim, sendo um grupo promissor de metabólitos secundários das plantas, o interesse pelos triterpenóides tem aumentado já que esses costumam ser caracterizados por baixa toxicidade e diversas atividades biológicas (Bishayee *et al.*, 2011).

Os ácidos ursólico e oleanólico possuem estrutura química semelhante, diferindo apenas na localização do grupo metila no anel E. Por conseguinte, esses ácidos frequentemente ocorrem em conjunto, sendo isolados simultaneamente (Jesus *et al.*, 2015; Vasconcelos, 2006). Por serem semelhantes estruturalmente, compartilham muitas atividades farmacológicas, justificando o crescente interesse de isolar e determinar a atividade desses compostos com o objetivo de orientar o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (Liu, 1995).

Têm sido demonstradas atividades biológicas importantes dos ácidos ursólico e oleanólico como inibição da inflamação, analgesia e potencial antioxidante (Jesus *et al.*, 2015; Vasconcelos *et al.*, 2003). Diversos trabalhos também analisaram a ação desses ácidos contra diferentes bactérias como *Mycobacterium tuberculosis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* e *Pseudomonas aeruginosa* (Woldemichael *et al.*, 2003; Horiuchi *et al.*, 2007; Cunha *et al.*, 2010). São descritas ainda atividade contra *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus* para o ácido ursólico (Kim *et al.*, 2011), demonstrando o potencial dessas substâncias para o desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas.

Além disso, estudos demonstram que os ácidos ursólico e oleanólico atuam de maneira eficaz contra parasitas protozoários como *Plasmodium falciparum* (Steele *et al.*, 1999), *Trypanosoma cruzi* (Cunha *et al.*, 2006) e *Leishmania* sp. (Tan *et al.*, 2002). Estudos também

tem sugerido que novos medicamentos antivirais podem ser desenvolvidos a partir desses ácidos já que estes apresentam atividade contra os vírus da hepatite B e C (HBV e HCV, respectivamente), da imunodeficiência humana (HIV) e da *Herpes simplex* (HSV) (Jesus *et al.*, 2015).

Outras propriedades atribuídas aos ácidos ursólico e oleanólico incluem efeito anti-hiperlipidêmico (Somova *et al.*, 2003), hipoglicêmico (Matsouda *et al.*, 1998) e hepatoprotetor (Liu *et al.*, 1995). Recentemente, foi relatado ainda que esses triterpenos apresentaram atividade protetora dos danos causados pelo agente antineoplásico doxorrubicina, com redução significativa da frequência de micronúcleos em ratos Balb/c, tratados com a mistura dos ácidos na concentração de 80 mg/kg (Resende *et al.*, 2006).

### 2.3 Estresse oxidativo e plantas medicinais

Espécies reativas de oxigênio (EROS), como o superóxido ( $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $O_2 + e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$ ) e a hidroxila ( $H_2O_2 + e^- \rightarrow OH^{\bullet} + OH^{\bullet}$ ) são moléculas formadas através de processos metabólicos no corpo humano ou provenientes de agentes oxidantes exógenos e inalados durante a respiração como o monóxido de carbono (Meena *et al.*, 2012). As EROS desempenham várias funções no organismo como produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular e sinalização intercelular (Alves *et al.*, 2010; Narayanaswamy & Balakrishnan, 2011).

Devido à intensa exposição dos tecidos a agentes oxidantes, o organismo dispõe de importantes defesas antioxidantes que atuam eliminando ou inibindo os radicais livres através da sua estabilização ou desativação, retardando ou inibindo assim a oxidação do substrato (Alves *et al.*, 2010). Os agentes antioxidantes podem ser de origem endógena, como as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GSHPx) e glutatona redutase (GR), ou provenientes da dieta alimentar (antioxidantes não enzimáticos), como o ácido ascórbico (vitamina C), o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), polifenóis, selênio e o  $\beta$ -caroteno (Silva & Gonçalves, 2010).

Quando ocorre um aumento de agentes oxidantes ou uma diminuição no sistema antioxidante, favorecendo a formação de radicais livres, é gerado o estresse oxidativo. Essa condição é capaz de danificar várias biomoléculas como lipídios, proteínas e DNA, podendo contribuir no desencadeamento de doenças degenerativas e cardiovasculares, aterosclerose, inflamação, cirrose e câncer (Maxwell, 1995; Aruoma, 1998; Silva & Gonçalves, 2010).

A relação entre essas doenças e os efeitos danosos dos radicais livres ao corpo humano tem marcado a busca e o isolamento por substâncias que protegem o organismo contra o dano oxidativo (Katalinic *et al.*, 2006; Alves *et al.*, 2010). Estudos mostram que as plantas medicinais são potenciais antioxidantes naturais, sendo seu uso benéfico para o tratamento de diversas doenças associadas ao estresse oxidativo (Alves *et al.*, 2010; Krishnaiah *et al.*, 2011; Meena *et al.*, 2012). Estas contêm uma ampla variedade de moléculas antioxidantes como vitaminas, flavonoides, quinonas, cumarinas, lignanas, estilbenos, taninos, carotenoides e proantocianidinas (Masoko & Eloff, 2007; Saeed *et al.*, 2012).

Os métodos mais amplamente utilizados para determinar a atividade antioxidante de uma substância são aqueles em que substâncias antioxidantes neutralizam os radicais livres gerados. Dentre estes, destaca-se o teste de 1,1-difenil-2-picrilidrazil (DPPH), que é baseado na capacidade do radical livre estável DPPH<sup>•</sup> de coloração roxa em reagir com a substância antioxidante que o reduz a 4-hidroxifenil-2-fenil-1-picrilo hidrazina, sendo esta detectada pela coloração amarela pálida (Masoko & Eloff, 2007; Alves, 2010).

Outro teste utilizado é o ABTS<sup>•+</sup> (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), que consiste em avaliar a capacidade do composto antioxidante em reagir com o radical ABTS<sup>•+</sup> na presença de persulfato de potássio decrescendo sua cor, com consequente redução da absorvância (Re *et al.*, 1999). Por fim, o sistema teste do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico constitui um ensaio espectrofotométrico adicional baseado na habilidade de uma substância em prevenir que radicais livres produzidos na peroxidação do ácido linoleico oxidem o  $\beta$ -caroteno (Alves *et al.*, 2010).

#### **2.4 Diabetes mellitus e plantas medicinais**

Diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica crônica que tem se tornado um problema de saúde pública mundial com altos índices de morbidade e mortalidade (Pang *et al.*, 2015; Hossain *et al.*, 2016). Responsável por 5% de mortes por ano em todo o mundo, em 2012 a doença afetou 371 milhões de pessoas estimando-se que deverá afetar 60,9 milhões em 2025 (Abdulazeez, 2013; Telagarie & Hullatti, 2015).

De etiologia múltipla, a diabetes é caracterizada por aumento da glicemia sanguínea e alterações no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas. Tais alterações causam complicações micro e macrovasculares, aumentam o risco de doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral e doença vascular arterosclerótica, podendo causar também insuficiência renal, cegueira e dano ou falência de vários órgãos (Hossain *et al.*, 2016).

Três tipos de DM são reconhecidos com base na sua etiologia. O diabetes mellitus tipo 1 (DM1), também conhecido como diabetes juvenil ou diabetes mellitus insulino-dependente, caracteriza-se pela deficiência da secreção de insulina devido à destruição de células  $\beta$ -pancreáticas pelo sistema auto imune (Ashcroft & Rorsman, 2012). O tratamento para DM1 baseia-se na administração de insulina com o objetivo de normalizar o nível de glicose no sangue e evitar os riscos da doença a longo prazo (Ashcroft & Rorsman, 2012).

O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é a forma mais prevalente da doença, estando relacionada à resistência à insulina ou pela deficiência na secreção de insulina (Choi *et al.*, 2013), enquanto que o diabetes mellitus gestacional ocorre quando há um aumento da glicemia durante a gravidez (Hossain *et al.*, 2016). As estratégias de tratamento em ambos os casos preconizam o uso de medicamentos antidiabéticos orais (sulfoniuréias, meglitinidas, biguanidas e tiazolidinodionas), dieta e exercício físico (Safamansouri *et al.*, 2014).

No caso do DM2, outra abordagem terapêutica inclui o uso de inibidores das enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase (Tiwari e Rao, 2002). A  $\alpha$ -amilase é uma enzima que catalisa a clivagem inicial do amido em oligossacarídeos, exercendo papel primordial no início desse processo (Sales *et al.*, 2012) enquanto que as  $\alpha$ -glicosidasas são responsáveis pela hidrólise desses oligo e dissacarídeos em monossacarídeos de modo que inibidores dessas enzimas auxiliam no tratamento da hiperglicemia pós-prandial (Mahomoodally *et al.*, 2012). No entanto, esses medicamentos possuem efeitos colaterais como diarreia, dores abdominais e elevação das transaminases (Sudha *et al.*, 2011). Assim, tem-se investigado o potencial de fitoconstituintes quanto à inibição dessas enzimas, devido ao menor custo e redução de efeitos colaterais (Telagari & Kirankumar, 2015).

## 2.5 Toxicidade de plantas medicinais

Apesar dos efeitos benéficos de muitas plantas medicinais e seus metabólitos, várias espécies podem ser tóxicas ao organismo e causar reações adversas desde reações alérgicas a efeitos mutagênicos (Alves, 2004). Essas reações adversas estão relacionadas ao uso de muitas plantas medicinais baseando-se apenas no conhecimento popular e também ao fato que os mecanismos de ação dos compostos bioativos não são totalmente conhecidos (Silveira *et al.*, 2008). Além disso, o uso a longo prazo pode também provocar toxicidade no organismo exposto podendo ser um risco para a saúde (Kalantari *et al.*, 2013).

Além de toxicidade intrínseca, referentes à constituição química da planta como toxicidade previsível, a sobredose, as interações com outros fármacos e reações

idiossincráticas podem acarretar em efeitos adversos, potencializados por reações extrínsecas como adulteração, contaminação, identificação incorreta do material vegetal, substituições e falta de padronização (Silveira *et al.*, 2008). No entanto, os possíveis efeitos adversos relacionados às plantas medicinais são ainda pouco elucidados e desconhecidos pela população que as utiliza, provocando danos crônicos que podem ser irreversíveis e que dificultam o posterior tratamento alopático (Silveira *et al.*, 2008). Dessa forma, o estudo de potenciais efeitos adversos das plantas medicinais permite traçar o seu perfil de segurança como fonte de produtos biologicamente ativos.

A citotoxicidade, a genotoxicidade e a mutagenicidade são algumas das reações adversas causadas por algumas plantas ou compostos de produtos naturais. Tais reações devem ser estudadas e monitoradas, já que podem causar várias desordens genéticas e fisiológicas (Brambilla & Martelli, 2009). Os agentes genotóxicos são aqueles que têm a capacidade de induzir alterações no material genético, produzindo danos em sua estrutura e função, como formação de adutos, quebra da molécula de DNA e oxidação de bases (Natarajan & Palliti, 2008). Esses danos ao DNA induzem várias respostas celulares como ativação do mecanismo de reparo ou apoptose. Por outro lado, um agente mutagênico é aquele que gera alterações que são mantidas no material genético podendo ser transmitidas para as células filhas e desencadear perda de função tecidual ou mesmo surgimento de tumores malignos (Abhilash & Singh, 2009).

Várias plantas utilizadas popularmente podem ter efeitos farmacológicos de interesse simultâneos aos danos no material genético (Marques *et al.*, 2003). Assim, os testes de genotoxicidade e mutagenicidade são imprescindíveis na detecção e avaliação de potenciais efeitos tóxicos que substâncias bioativas encontradas nessas plantas medicinais possam causar.

## 2.6 Teste *Allium cepa* L.

Espécies vegetais superiores são consideradas sistemas excelentes para detectar agentes genotóxicos e mutagênicos, sendo amplamente utilizadas em bioensaios (Majer *et al.*, 2005). Logicamente, se uma determinada substância química é capaz de induzir danos ao DNA de uma planta, esses dados podem ser extrapolados para outros eucariotos e indicar riscos a outros organismos que a consumam, incluindo os seres humanos (Fernandes *et al.*, 2007).

Nesse sentido, o teste de *Allium cepa* destaca-se dentre os diversos ensaios utilizados para avaliação da toxicidade de plantas medicinais, aditivos alimentares, inseticidas, herbicidas e derivados de petróleo. Esse método permite medir os danos nos sistemas que estão expostos a potenciais agentes tóxicos e avaliar o efeito destes danos através da observação de alterações cromossômicas em células do meristema de cebola (*A. cepa*).

As vantagens da utilização da *A. cepa* como modelo de estudo incluem o número reduzido de cromossomos por conteúdo diplóide ( $2n=16$ ), ciclo celular relativamente curto e controlável em condições estáveis (cerca de 14 horas a 25 °C) e baixo custo, rapidez e fácil manuseio (Fiskesjo, 1985). Outra vantagem do teste com *A. cepa* é a possibilidade de expor o organismo-teste diretamente em misturas complexas sem a necessidade do tratamento prévio da amostra (Rank & Nielsen, 1994).

Esse teste tem demonstrado também alta confiabilidade e correlação significativa com outros sistemas, incluindo mamíferos (Fiskejö, 1985; Grant, 1994; Kuras *et al.*, 2006; Bagatini *et al.*, 2007; Leme & Marin-Morales, 2009). Consequentemente, esse método é reconhecido e validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) como um teste eficiente para análise e monitoramento da genotoxicidade de diversas substâncias (Cabrera & Rodriguez, 1999).

Por meio do teste *A. cepa* é possível avaliar a toxicidade com base na análise do crescimento médio das raízes expostas à substância em estudo em relação ao controle negativo (usualmente água destilada/ultrapura) e da análise de alterações cromossômicas, as quais incluem brotos nucleares, células binucleadas, células poliploides, perdas cromossômicas e pontes cromossômicas. Além disso, esse teste ainda permite analisar o potencial mutagênico a partir da observação de micronúcleos e quebras cromossômicas significativas nas células meristemáticas de *A. cepa* expostas ao composto testado. Em contrapartida, também pode ser avaliado o potencial antimutagênico do composto em estudo frente a danos causados por substâncias reconhecidamente mutagênicas (Majer *et al.*, 2005).

O índice mitótico (IM), definido como o número total de células em divisão no ciclo celular, também é outro parâmetro importante para a avaliação da citotoxicidade uma vez que índices mitóticos maiores que o controle negativo revelam aumento da divisão celular (Leme e Marin-Morales, 2009). Por outro lado, uma redução significativa do IM em relação ao controle negativo pode indicar alterações derivadas da ação química do agente sobre o crescimento e desenvolvimento do organismo exposto (Leme & Marin-Morales, 2009).



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Investigar o potencial citogenotóxico, antioxidante e hipoglicemiante da *Mansoa hirsuta* do sudoeste baiano.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* e em modelo celular do extrato bruto, frações e compostos isolados de *M. hirsuta*.
- Avaliar a atividade mitocondrial em células viáveis incubadas com extratos e frações.
- Avaliar a atividade citoprotetora do extrato e frações de *M. hirsuta*.
- Avaliar a propriedade hipoglicêmica de extratos e frações da *M. hirsuta*.
- Avaliar a toxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade e antimutagenicidade das diferentes concentrações dos ácidos ursólico e olenanólico isolados da *Mansoa hirsuta* utilizando o sistema teste *Allium cepa* L.

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULAZEEZ, S.S. 2013. Diabetes treatment: A rapid review of the current and future scope of stem cell research. Saudi Pharmaceutical Journal, vol 23, no. 4, p.333–340.

ABHILASH, P.C.& SINGH, N. 2009. Pesticide use and application: An Indian scenario. Journal of Hazardous Materials, vol.165, no.1-3, p. 1–12.

AGRA, M.F.; SILVA, K.N.; BASÍLIO, J.L.D.; FRANÇA, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. 2008. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. Brazilian Journal of Pharmacognosy, vol.18, no.3, p.472-508.

ASHCROFT, F.M.; RORSMAN, P. 2012. Diabetes Mellitus and the  $\beta$  Cell: The Last Ten Years. Cell, vol. 148, no.6, p. 1160–1171.

AGUILAR-SANTAMARÍA, L.; RAMÍREZ, G.; NICASIO, P.; ALEGRÍA-REYES, P. & HERRERA-ARELLANO, A. 2009. Antidiabetic activities of *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth. Journal of Ethnopharmacology, vol.124, no.2, p.284–288.

ALVES, CQ.; DAVID, JM.; DAVID, JP.; BAHIA, MV. & AGUIAR, RM. 2010. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. Química Nova, vol.33 no.10, p. 2202-2210.

ALVES, NDC. 2004. Avaliação da adequação técnica das indústrias de medicamentos fitoterápicos e oficinais do estado do Rio de Janeiro a partir dos instrumentos regulamentatórios específicos. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Dissertação de mestrado em Vigilância Sanitária. 83 p.

ARUOMA, OI. 1998. Free radicals, oxidative trace and antioxidants in human health and diseases. Journal of the American Oil Chemistry Society, vol.75, no.2, p.199–212.

BAGATINI, MD.; SILVA, AF. & TEDESCO, S.B. 2007. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. Revista Brasileira de Farmacognosia, vol. 17, no.3, p. 444-447.

BASTOS, MLA.; LIMA, MRF.; CONSERVA, LM.; ANDRADE, VS.; ROCHA, EMM.; & LEMOS, RPL. 2009. Studies on the antimicrobial activity and brine shrimp toxicity of *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bur. (Bignoniaceae) extracts and their main constituents. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, vol.8, no.16, p.1-6.

BISHAYEE, A.; AHMED, S.; BRANKOV, N. & PERLOFF, M. 2011. Triterpenoids as potential agents for the chemoprevention and therapy of breast cancer. Frontiers in Bioscience: A Journal e Biblioteca Virtual, vol.16, p. 980-996.

BRAGA, FC.; WAGNER, H.; LOMBARDI, JA. & OLIVEIRA, A.B. 2000. Screening the Brazilian flora for anti-hypertensive plant species for in vitro angiotensin-I-converting enzyme inhibiting activity. Phytomedicine, vol. 7, no.3, p. 245-250.

BRAMBILLA, G. & MARTELLI, A. 2009. Genotoxicity and carcinogenicity studies of analgesics, anti-inflammatory drugs and antipyretics. Pharmacological Research, vol. 60, no.1, p. 1-17.

CABRERA, GL. & RODRIGUEZ, DMG. 1999. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. Mutation Research, vol. 426, no.2, p.211-214.

CALIXTO, JB. 2005. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A personal view. Journal of Ethnopharmacology, vol.100, no. 1-2, p. 131–134.

CAMPANA, PRV. 2008. Fitoquímica e atividade vasodilatadora in vitro de *Mansoa hirsuta* D.C. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia. Dissertação de Mestrado Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. 127f.

CHAVES, S.M. & REINHARD, K.J. 2003. Paleopharmacology and pollen: theory, method, and application. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, vol 98, no.1, p.207-211.

CHIN, YW.; BALUNAS, MJ.; CHAI, HB. & KINGHORN, A. D. 2006. Drug Discovery From Natural Sources. The AAPS Journal, vol. 8, no.2, p. 39-53.

CHOI, S.B.; LEE, J.H.; KIM, S.; HAN, S.D.; KIM, I.H.; NOH, Y.H. 2013. Improvement of  $\beta$ -cell function after achievement of optimal glycaemic control via long-term continuous subcutaneous insulin infusion therapy in non-newly diagnosed type 2 diabetic patients with suboptimal glycaemic control. Diabetes/Metabolism Research and Reviews Journal, vol. 29, p. 473–482.

CUNHA, WR.; CREVELIN, EJ.; ARANTES, GM.; CROTTI, AE.; ANDRADE E SILVA, ML.; FURTADO, NA.; ALBUQUERQUE, S. & FERREIRA, DS. 2006. A study of the trypanocidal activity of triterpene acids isolated from *Miconia* species. Phytotherapy Research, vol. 20, no. 6, p. 474–478.

CUNHA, WR.; DE MATOS, GX.; SOUZA, MG.; TOZATTI, MG.; ANDRADE E SILVA, ML.; MARTINS, CH.; DA SILVA, R. & DA SILVA FILHO, AA. 2010. Evaluation of the antibacterial activity of the methylene chloride extract of *Miconia ligustroides*, isolated triterpene acids, and ursolic acid derivatives. Pharmaceutical Biology, vol.48, no.2, p.166–169.

DURAI PANDIYAN, V.; AYYANAR, M. & IGNACIMUHU, S. 2006. Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by Paliyar tribe from Tamil Nadu, India, BMC Complementary and Alternative Medicine, v.6, no.35, p. 35-41.

DVORSKÁ, M.; ZEMLICKA, M.; MUSELÍK, J.; KARAFIÁTOVÁ, J. & SUCHÝ, V. 2007. Antioxidant activity of *Catalpa bignonioides*. Fitoterapia, vol.78, no.6, p.437-439

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D.E.; MARIN-MORALES, M. A. 2007. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. Pesticide Biochemistry and Physiology, vol. 88, no.3, p. 252–259.

FISKESJO, G. 1985. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, vol.102, no.1 , p.99-112.

GENTRY, AH. 1980. Bignoniaceae: part I, tribes crescentieae and tourrentieae. *Flora Neotropica*, vol. 25, no. 1, p. 1-130.

GRANT, W.F. 1994. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. *Mutation Research*, vol. 310, no.2, p. 175-185.

GUENKA, LC.; GOMES, RC.; MELO, VL.; KITANISHI, CR.; PEREIRA, PS.; FRANÇA, SC.; COUTO, LB. & BELEBONI, R. O. 2008. Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of *Zeyheria montana* (Bignoniaceae) ethanol extract. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol.103, no.8, p.768-772.

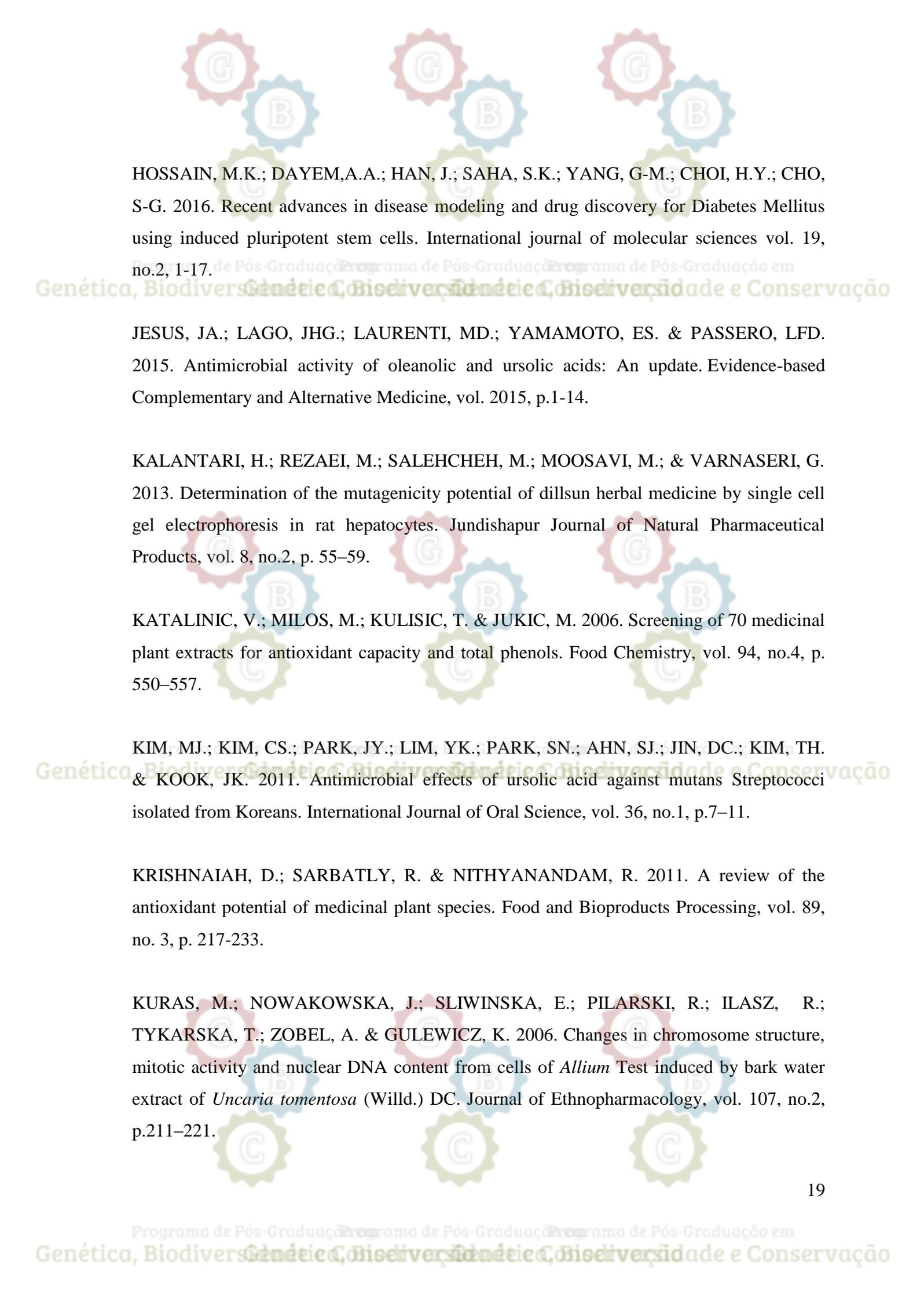
GUERRA, MP. & NODARI, RO. 2006. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, CM.; SCHENKEL, EP.; GOSMANN, G.; MELLO, JCP.; MENTZ, LA.; PETROVICK, PR. (org.) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS/ Editora da UFSC. p. 13-26.

LEME, DM. & MARIN-MORALES, MA. 2009. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research*, vol. 682, no.1, p.71-78.

MARQUES, RCP.; MEDEIROS, SRB.; DIAS, CS.; FILHO, JMB. & LIMA, LFA. 2003. Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by the Ames Test. *Mutation Research*, vol.536, no.1-2, p. 117-120.

HILL, RA. & CONNOLLY, JD. 2011. Triterpenoids. *Natural Product Reports*, vol.28, no.6, p.1087–1117.

HORIUCHI, K.; SHIOTA, S.; HATANO, T.; YOSHIDA, T.; KURODA, T. & TSUCHIYA, T. 2007. Antimicrobial activity of oleanolic acid from *Salvia officinalis* and related compounds on vancomycin-resistant enterococci (VRE). *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, vol. 30, no.6, p.1147–1149.



HOSSAIN, M.K.; DAYEM, A.A.; HAN, J.; SAHA, S.K.; YANG, G-M.; CHOI, H.Y.; CHO, S-G. 2016. Recent advances in disease modeling and drug discovery for Diabetes Mellitus using induced pluripotent stem cells. International journal of molecular sciences vol. 19, no.2, 1-17.

JESUS, JA.; LAGO, JHG.; LAURENTI, MD.; YAMAMOTO, ES. & PASSERO, LFD. 2015. Antimicrobial activity of oleanolic and ursolic acids: An update. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, vol. 2015, p.1-14.

KALANTARI, H.; REZAEI, M.; SALEHCHEH, M.; MOOSAVI, M.; & VARNASERI, G. 2013. Determination of the mutagenicity potential of dill herb medicine by single cell gel electrophoresis in rat hepatocytes. Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products, vol. 8, no.2, p. 55–59.

KATALINIC, V.; MILOS, M.; KULISIC, T. & JUKIC, M. 2006. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. Food Chemistry, vol. 94, no.4, p. 550–557.

KIM, MJ.; KIM, CS.; PARK, JY.; LIM, YK.; PARK, SN.; AHN, SJ.; JIN, DC.; KIM, TH. & KOOK, JK. 2011. Antimicrobial effects of ursolic acid against mutants *Streptococci* isolated from Koreans. International Journal of Oral Science, vol. 36, no.1, p.7–11.

KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R. & NITHYANANDAM, R. 2011. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. Food and Bioproducts Processing, vol. 89, no. 3, p. 217-233.

KURAS, M.; NOWAKOWSKA, J.; SLIWINSKA, E.; PILARSKI, R.; ILASZ, R.; TYKARSKA, T.; ZOBEL, A. & GULEWICZ, K. 2006. Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium* Test induced by bark water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. Journal of Ethnopharmacology, vol. 107, no.2, p.211–221.

LEMOS, JR. & ZAPPI, DC. 2012. Distribuição geográfica mundial de plantas lenhosas da Estação Ecológica de Aiuaba, Ceará, Brasil. Revista brasileira de Biociências, vol.10, no.4 , p.446-456.

LIU, J.; LIU, Y. & KLAASSEN, CD. 1995. Protective effect of oleanolic acid against chemical-induced acute necrotic liver injury in mice. Zhongguo Yao Li Xue Bao., vol. 16, no.2, p. 97–102.

MAHOMOODALLY, M.F.; SUBRATTY, A.H.; GURIB-FAKIM, A.M.; CHOUDHARY, I.; KHAN, N.S. 2012. Traditional medicinal herbs and food plants have the potential to inhibit key carbohydrate hydrolyzing enzymes *in vitro* and reduce postprandial blood glucose peaks *in vivo*. Scientific World Journal, vol. 2012, no. 2012, p.1-9.

MAJER, BJ.; GRUMMT, T.; UHL, M. & KNASMÜLLE, S. 2005. Use of plant bioassays for the detection of genotoxins in the aquatic environment. Acta Hydrochimica et Hydrobiologica, vol. 33, no. 1, p. 45–55.

MATSOUDA, H.; LI, Y.; MURAKAMI, T.; MATSUMURA, N.; YAMAHARA, J. & YOSHIKAWA, M. 1998. Antidiabetic principles of natural medicines. III. Structure-related inhibitory activity and action mode of oleanolic acid glycosides on hypoglycemic activity. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, vol. 46, no.9, p. 1399-1998.

MASOKO, P. & ELOFF, J. 2007. Screening of twenty-four South African *Combretum* and six *Terminalia* species (Combretaceae) for antioxidant activities. African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines, vol.4, no.2, p. 231-239.

MAXWELL, SR. 1995. Prospect for the use of antioxidant therapies. Drugs, vol.49, no.3, p. 345–361.

MEENA, H.; PANDEY, KH.; PANDEY, P.; ARYA, MC. & AHMED, Z. 2012. Evaluation of antioxidant activity of two important memory enhancing medicinal plants *Bacopa monnieri* and *Centella asiatica*. Indian Journal of Pharmacology, vol. 44, no. 1, p.114-117.

NARAYANASWAMY, N. & BALAKRISHNAN, KP. 2011. Evaluation of some medicinal plants for their antioxidant properties. International Journal of PharmTech Research, vol. 3, no.1, p. 381-385.

NATARAJAN, AT. & PALLITI, F. 2008. DNA Repair and Chromosomal Alterations. Mutation Research, vol. 657, no.1, p. 3-7.

OLMSTEAD, RGD.; ZJHRA, ML.; LOHMANN, LG; GROSE, SO. & ECKERT, AJ. 2009. A molecular phylogeny and classification of Bignoniaceae. American Journal of Botany, vol. 96, no. 9, p.1731–1743.

PANG, B.; YU, X.T., ZHOU, Q.; ZHAO, T.Y.; WANG, H.; GU, C.J.; TONG, X.L. 2015. Effect of *Rhizoma coptidis* (Huang Lian) on treating Diabetes Mellitus. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, vol. 2015, no.2015,p. 1-10.

PINTO, AC.; SILVA, DHS.; BOLZANI, VS. & ALMEIDA EPIFANIO, RA. 2002. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. Quimica Nova, vol. 25, no. 1, p.45-61.

RANK, J. & NIELSEN, MH. 1994. Evaluation of the Allium anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. Mutation Research, vol. 312, no.1, p.17-24.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M. & RICE-EVANS, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine, vol.26, no.9-10, p.1231-1237.

RESENDE, F.A.; BARCALA, C.A.M.A.; FARIA, M.C.S.; KATO, F.H.; CUNHA, W.R.; TAVARES, D.C. 2006. Antimutagenicity of ursolic acid and oleanolic acid against doxorubicin-induced clastogenesis in Balb/c mice. Life Sciences., vol. 79,no.13, p.1268-73.

ROBERTS, SC. 2007. Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. Nature Chemical Biology, vol.3, no.7, p.387-395.

ROCHA, A.D; OLIVEIRA, A.B.; FILHO, J.D.S.; LOMBARDI, J.A.; BRAGA, F.C. 2004. Antifungal constituents of *Clytostoma ramentaceum* and *Mansoa hirsuta*. *Phytotherapy Research*, vol.18, no.6, p.463–467.

SAEED, N.; KHAN, MR. & SHABBIR, M. 2012. Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol.12, no.221, p.1-12.

SAFAMANSOURI, H.; NIKAN, M.; AMIN, G.; SARKHAIL, P.; GOHARI, A.R.; KUREPAZ-MAHMOODABADI, M.; SAEIDNIA, S. 2014.  $\alpha$ -Amylase inhibitory activity of some traditionally used medicinal species of Labiatae. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*, vol.13, no.4, p.1-14.

SALES, P.M.; SOUZA, P.M.; SIMEONI, L.A.; MAGALHÃES, P.O.; SILVEIRA, D. 2012.  $\alpha$ -Amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 15, no.1, p.141 – 183.

SILVA, MM. & QUEIROZ, LP. 2003. A família Bignoniaceae na região de Catolés, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. *Sitientibus Série Ciências Biológicas*, vol. 3, no. 1/2, p. 3-21.

SILVA, AA. & GONÇALVES, RC. 2010. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. *Ciência Rural*, vol.40, no.4, p.994-1002.

SILVA, DM. 2009. Perfil metabolônico da *Mansoa hirsuta* D.C.(Bignoniaceae). Alagoas: Universidade Federal de Alagoas. Dissertação de mestrado em Química e Biotecnologia. 126 p.

SILVA, D. M ; SANT'ANA, A.E.G.; CASTRO, M.M.S.; QUEIROZ, L.P.; SOARES, M.B.; COSTA, J.F.O. 2015. Isolamento de triterpenos pentacíclicos: ácido ursólico e oleanólico, e fitoesteróides: estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol extraídos das folhas da *Mansoa*

*hirsuta* D.C. bignoniaceae, para aplicação em formulações de suplementos, alimentos funcionais e fitoterápicos. BR. Pat 102015008180, 01 abr. 2015. 19p.

SILVEIRA, PF.; BANDEIRA, MAM. & ARRAIS, PSD. 2008. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. Revista Brasileira de Farmacognosia, vol.18, no.4, p. 618-626.

SOMOVA, LO.; NADAR, A.; RAMMANAN, P. & SHODE, FO. 2003. Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidante effect of oleanolic acid and ursolic acid in experimental hypertension. Phytomedicine, vol.10, no.2-3, p.115-121.

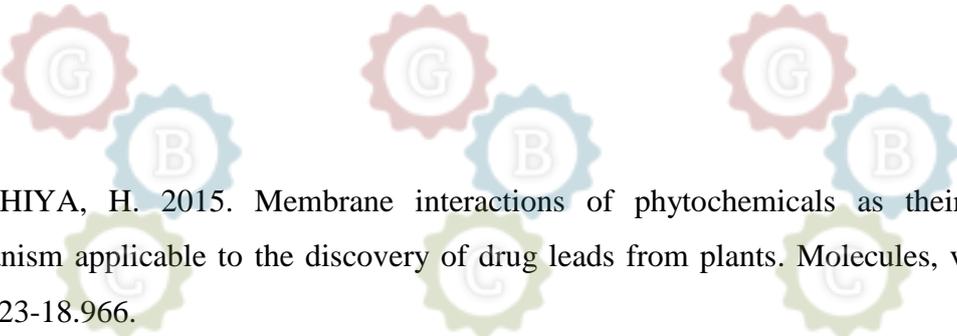
STEELE, JCP.; WARHURST, DC.; KIRBY, GC. & SIMMONDS, MSJ. 1999. *In vitro* and *in vivo* evaluation of betulinic acid as an antimalarial. Phytotherapy Research, vol. 13, no. 2, p. 115–119.

SUDHA, P.; ZINJARDE, S.S.; BHARGAVA, S.Y.; KUMAR, A.R. 2011. Potent  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of Indian Ayurvedic medicinal plants. BMC Complementary Alternative Medicine, vol.11, no.5, p.1-10.

TAN, N.; KALOGA, M.; RADTKE, OA.; KIDERLEN, A.F.; OKSUZ, S.; ULUBELEN, A. & KOLODZIEJ, H. 2002. Abietane diterpenoids and triterpenoic acids from *Salvia cilicica* and their antileishmanial activities. Phytochemistry, vol. 61, no. 8, p. 881–884.

TELAGARIE, M.; HULLATTI, K. 2015. In-vitro  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of *Adiantum caudatum* Linn. and *Celosia argentea* Linn. extracts and fractions. Indian Journal of Pharmacology, vol.47, no. 4, p.425-429.

TIWARI, A.K.; RAO, J.M. 2002. Diabetes mellitus and multiple therapeutic approaches of phytochemicals: Present status and future prospects. Current Science, vol. 83, no. 1, p. 30-38.



TSUCHIYA, H. 2015. Membrane interactions of phytochemicals as their molecular mechanism applicable to the discovery of drug leads from plants. *Molecules*, vol.20, n.10, p.18.923-18.966.

VASCONCELOS, MA.; ROYO, VA.; FERREIRA, DS.; CROTTI, AE.; ANDRADE E SILVA, ML.; CARVALHO, JC.; BASTOS, JK. & CUNHA, WR. 2006. *In vivo* analgesic and anti-inflammatory activities of ursolic acid and oleanoic acid from *Miconia albicans* (Melastomataceae). *Zeitschrift fur Naturforschung C*, vol.61, no.7-8, p. 477-482.

WOLDEMICHAEL, GM; FRANZBLAU, SG; ZHANG, F; WANG, Y. & TIMMERMANN, BN. 2003. Inhibitory effect of sterols from *Ruprechtia triflora* and diterpenes from *Calceolaria pinnifolia* on the growth of *Mycobacterium tuberculosis*. *Planta Medica*, vol.69, no.7, p.628–631.

YIN, M.C. 2015. Inhibitory effects and actions of pentacyclic triterpenes upon glycation. *BioMedicine*, vol. 5, no.3, p. 1- 13.

YOKOSUKA, A. 2015. Discovery of novel biologically active compounds of natural origin, with a focus on anti-tumor activity. *Yakugaku Zasshi*, vol.135, no.10, p.1109-1114.

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Genética, Biodiversidade e Conservação



## 5 CAPÍTULO 1

### Atividades antioxidante e hipoglicemiante da *Mansoa hirsuta* D.C. (Bignoniaceae)

Joquebede Rodrigues Pereira<sup>a</sup>, Raphael Ferreira Queiroz<sup>a,b</sup>, Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana<sup>c</sup>, Paulo Roberto Antunes de Mello Affonso<sup>a,d</sup>, Daniel de Melo Silva<sup>e\*</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Jequié – BA, Brasil

<sup>b</sup>Departamento de Ciências Naturais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Jequié – BA, Brasil

<sup>c</sup>Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió – AL, Brasil

<sup>d</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Jequié – BA, Brasil

<sup>e</sup>Departamento de Química e Exatas, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Jequié – BA, Brasil

\*correspondência para: Departamento de Química e Exatas, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Av. José Moreira Sobrinho, Jequié – BA, Brasil.

Endereço de email: dms366@bol.com.br

### RESUMO

A *Mansoa hirsuta* (Bignoniaceae) é uma planta medicinal registrada somente em áreas de caatinga, bioma do semiárido brasileiro com rica diversidade e alto endemismo a despeito do acentuado processo de degradação e escassez de estudos etnofarmacológicos. A medicina tradicional sugere a aplicação dessa planta como antimicrobiano, hipoglicemiante, vasodilatador, imunossupressor e antioxidante, porém os mecanismos subjacentes a esses efeitos não são completamente compreendidos. Considerando o potencial da espécie tanto para o uso popular quanto para a produção de medicamentos fitoterápicos e alimentos funcionais, o presente estudo avaliou a composição fitoquímica, capacidade antioxidante, citoprotetora e hipoglicêmica do extrato bruto, frações e compostos isolados das folhas de *M. hirsuta*. Os constituintes do extrato etanólico bruto e das frações foram avaliados por métodos fitoquímicos clássicos. Em seguida, os fenólicos totais foram quantificados pelo método de Folin-Ciocalteu. A atividade antioxidante *in vitro* foi determinada pelos



métodos de co-oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico e de captura dos radicais livres  $\bullet$ DPPH e ABTS $\bullet^+$ . A toxicidade do extrato e frações de *M. hirsuta* contra fibroblastos murinos foi determinada pelo método do MTT. Em seguida, extrato e frações foram avaliados quanto à capacidade de proteger as células contra o dano oxidativo causado pelo  $H_2O_2$ . A atividade hipoglicemiante *in vitro* foi determinada pela inibição da enzima  $\alpha$ -amilase. A prospecção fitoquímica revelou a presença de esteroides, triterpenos, saponinas, flavonóis, flavononas, flavanonas, xantonas e também de fenóis, taninos, antocianinas, antocianidinas e flavonoides no extrato bruto e frações hidroalcoólica, alcoólica e acetato de etila. A fração acetato de etila foi a mais eficiente em inibir a cascata de peroxidação lipídica. Por outro lado, a fração hidroalcoólica demonstrou maior potencial em capturar os radicais  $\bullet$ DPPH e ABTS $\bullet^+$  e maior teor de fenólicos totais. O extrato bruto e todas as frações não apresentaram atividade citotóxica e, especialmente os ácidos ursólico e oleanólico, protegeram as células da morte celular causada pelo  $H_2O_2$ . Esses compostos também foram os mais eficientes em reduzir a oxidação intracelular da sonda DCFH. A atividade da enzima  $\alpha$ -amilase foi inibida apenas pela fração isolada da *M. hirsuta*. Em conjunto, esses resultados sugerem que a *M. hirsuta* pode ser uma nova estratégia para tratamento de doenças com base inflamatória e oxidativa, incluindo a diabetes.

**Palavras chave:** Caatinga, Fitoquímica, Antioxidante, Hipoglicemiante.

## 1. Introdução

As plantas medicinais são conhecidas há muito tempo na medicina tradicional para a prevenção e o tratamento de diversas doenças. Ademais, exerceram um papel relevante no desenvolvimento de muitos medicamentos clinicamente disponíveis como a aspirina, morfina, reserpina, digoxina, vimblastina e vincristina (Yarnell, 2000). Estima-se que 4 a 5% de aproximadamente 400.000 espécies de plantas superiores conhecidas mundialmente possuam alguma atividade biológica embora apenas uma pequena parcela tenha sido estudada quanto ao perfil químico e farmacológico (Heywood, 2011).

O Brasil é considerado o país com a maior diversidade genética vegetal do planeta, abrigando cerca de 15 a 20% da biodiversidade mundial (Elisabetsky e Costa-Campos, 1996; Guerra e Nodari, 2001). Além da floresta amazônica, são encontradas regiões ricas em fauna e flora como a mata atlântica e o cerrado, considerados *hotspots* de biodiversidade. Outro importante bioma é a caatinga, situada exclusivamente em região semiárida do Brasil, onde são encontrados diversos táxons raros e/ou endêmicos de grande valor terapêutico (Nogueira et al., 2010; Pereira Junior et al., 2014).

Nesse cenário, destaca-se ainda o uso popular das plantas típicas da caatinga que, muitas vezes, constituem o único tratamento para doenças que acometem as comunidades locais (Toledo et al., 2011). De fato, diversos medicamentos hoje comercializados foram desenvolvidos a partir de plantas nativas do Brasil como a pilocarpina extraída das folhas da *Pilocarpus jaborandi*, a emetina, isolada da *Psychotria ipecacuanha* ou *Cephaelis ipecacuanha* e a d-tubocurarina, isolada a partir de *Chondrodendron tomentosum* (Nogueira et al., 2010).

A *Mansoa hirsuta* D.C. (Figura 1A), pertencente à família Bignoniaceae, é um exemplo de espécie endêmica de regiões semiáridas brasileiras (Lemos e Zappi, 2012) que se destaca pelo uso popular e pelo potencial para a produção de medicamentos fitoterápicos e alimentos funcionais (Silva, 2009). Na medicina tradicional, suas folhas têm sido empregadas no tratamento da diabetes (Chaves e Reinhard, 2003; Agra et al., 2008) enquanto o extrato etanólico das folhas inibiu o crescimento de culturas de *Aspergillus niger* e *Fusarium oxysporum* (Rocha et al., 2004). A atividade antioxidante dessa espécie também foi demonstrada por Braga et al. (2000) e proantocianidinas isoladas da *M. hirsuta* foram capazes de inibir a enzima conversora da angiotensina (ECA) (Campana, 2008).

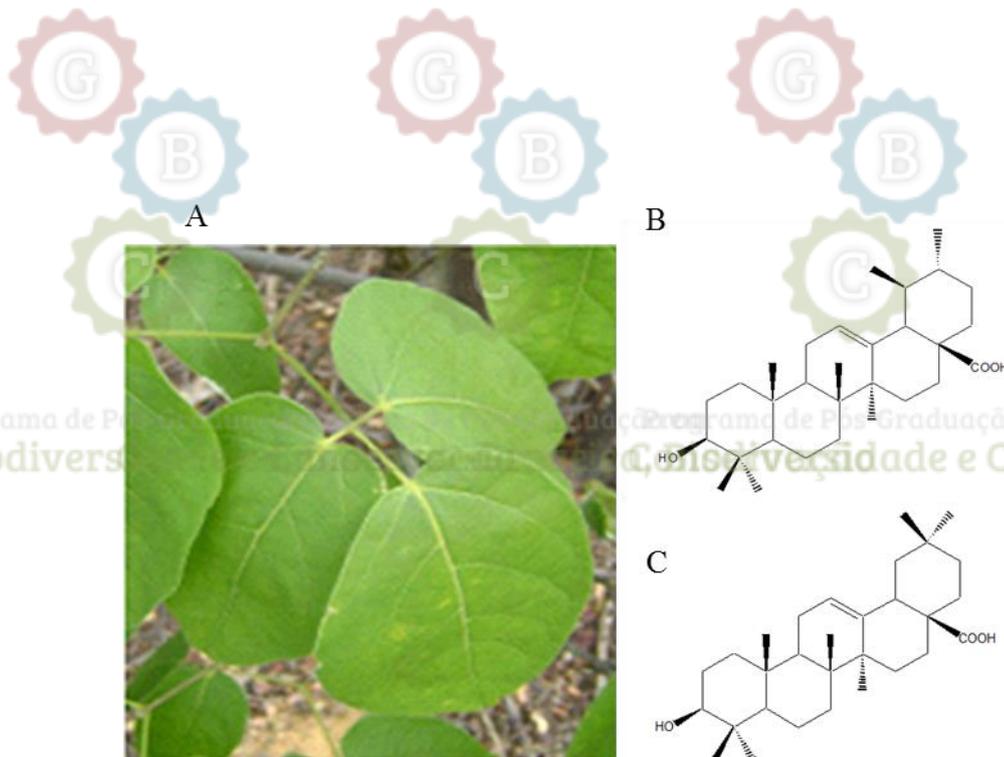


Figura 1. (A) *M. hirsuta* D.C. coletada em Morro do Chapéu. (B) Estrutura química do ácido ursólico. (C) Estrutura química do ácido oleanólico.

No estudo realizado por Silva (2009) com a *M. hirsuta* D.C isolou-se da fração acetato de etila da folha uma mistura (1:1) de ácido ursólico (Figura 1B) e seu isômero, o ácido oleanólico (Figura 1C), cuja patente foi registrada no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) sob o número: BR102015008180 (Silva et al., 2015). Os ácidos ursólico e oleanólico isolados da *M. hirsuta* diminuíram a proliferação de linfócitos (>99%, ambos) e reduziram a formação de óxido nítrico por macrófagos (44,1 e 41,5%, respectivamente) (Silva, 2009).

Considerando o potencial biológico da *M. hirsuta*, a escassez de estudos farmacológicos e etnobotânicos sobre essa espécie e a grande diversidade biológica e cultural da caatinga, o presente estudo objetivou investigar a capacidade antioxidante, citoprotetora e hipoglicêmica do extrato bruto, frações e compostos isolados das folhas de *M. hirsuta*, nativa da caatinga.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 Reagentes e produtos químicos

Álcool etílico foi adquirido da Quemis, enquanto os demais produtos (reagente de Folin-Ciocalteu, \*DPPH ABTS, beta caroteno, BHT, tween 40, ácido gálico, trolox e amilase) utilizados foram da marca Sigma-Aldrich.

## 2.2 Material vegetal

Espécimes de *M. hirsuta* foram coletados em 16 de maio de 2002 entre os municípios de Santo Inácio e Gameleira do Assuruá, no Estado da Bahia, Nordeste do Brasil (11°19'S e 42°40'O). As exsiccatas foram depositadas no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (número: 59456).

## 2.3 Preparo do extrato bruto

As folhas foram secas, moídas, pesadas (15,0 kg) e submetidas à extração hidroalcoólica (50:50) em percolador à temperatura ambiente (27 a 30°C) por 96 h. A destilação do solvente sob pressão reduzida em aparelho rotatório forneceu 1800 g de extrato etanólico concentrado e homogêneo com 12% de rendimento.

## 2.4 Fracionamento do extrato etanólico da *M. hirsuta*

Pesou-se 250 g do extrato etanólico obtido e submeteu-se a um fracionamento em fase reversa em carvão ativo. Após evaporação em aparelho rotatório, foram obtidas cinco frações: hidroalcoólica 1:1 (130 g), alcóolica (35 g), acetato de etila (40 g), clorofórmio (41 g) e hexano (4 g).

O extrato etanólico bruto (EEB) e as frações hidroalcoólica (FHA), alcóolica (FAA), acetato de etila (FAE), fração clorofórmica (FCL) e fração hexânica (FH) foram submetidos à prospecção fitoquímica conforme descrito na literatura (Matos, 1997; Silva, 2006). Para identificação de fenóis e taninos usou-se  $\text{FeCl}_3$  1 mol/L. Flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas foram identificados em reação com magnésio granulado e HCl concentrado. No teste para esteroides e triterpenóides utilizou-se solução clorofórmica,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro e  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. Para o teste de identificação de saponinas observou-se a formação de espuma persistente e abundante. Os alcaloides foram identificados por cromatografia em camada delgada e revelação com o reagente de Dragendorff.

A partir da fração acetato de etila foram isolados, em mistura, os ácidos ursólico e oleanólico por meio do fracionamento cromatográfico em coluna de sílica gel 60 (Merck) e os solventes hexano ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ ), hexano/ clorofórmio 1:1 ( $\text{C}_6\text{H}_{14}/\text{CHCl}_3$ ) e  $\text{CHCl}_3$ . A mistura desses ácidos (1:1) foi obtida do Laboratório de Pesquisa de Química e Recursos Naturais da Universidade Federal de Alagoas como resultado do estudo fitoquímico realizado por Silva (2009).

## 2.6. Quantificação de fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu

A determinação de compostos fenólicos totais presentes nas amostras foi realizada de acordo com o método de Folin-Ciocalteu com modificações (Singleton et al., 1992). As amostras foram diluídas em etanol para uma concentração final de 1 mg/mL. Em tubos de ensaio, foram adicionados 125 µL de cada amostra, 125 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e 1 mL de água destilada. Após 3 min, 125 µL da solução saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> foram adicionadas e incubadas a 37°C. Após 30 min, a absorbância das amostras foi medida a 750 nm. O teor de fenóis totais nas amostras foi determinado através de uma curva padrão de ácido gálico (0,5 a 25 µg), sendo expressos em µg equivalentes de ácido gálico por miligramas de amostra (µg EAG/mg). A equação da curva de calibração do ácido gálico foi  $y = 0,366x + 0,0721$ ,  $R^2 = 0,9932$ .

## 2.7 Determinação da atividade antioxidante do extrato etanólico bruto e frações hidroalcoólica, alcoólica, acetato de etila e da mistura dos ácidos ursólico e oleanólico.

### 2.7.1 Teste de co-oxidação do β-caroteno/ácido linoleico

O sistema β-caroteno/ácido linoleico foi preparado pela mistura de 8 mL da solução de β-caroteno diluído em clorofórmio (0,1 mg/mL), 40 µL de ácido linoleico e 400 µL de tween 40. Após agitação, o clorofórmio foi evaporado e 400 mL de água saturada com oxigênio foram adicionados até a absorbância de 0,7 em 470 nm (UV Mini 1240 Shimadzu Co). A suspensão final (3,0 mL) foi misturada com 40 µL de amostra (1 mg/mL) e a absorbância foi medida imediatamente depois. Após incubação a 45°C, a absorbância foi novamente lida em intervalos de 15 min durante 2 h. Como padrão, utilizou-se o butil-hidroxitolueno (BHT) (Rufino et al., 2007). A atividade antioxidante foi expressa como percentual de inibição da oxidação, calculada em relação a 100% da oxidação do controle (sem amostra).

### 2.7.2 Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre

#### •DPPH

A capacidade antioxidante do extrato bruto e frações da *M. hirsuta* também foi avaliada pelo método de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (•DPPH) de acordo com os métodos propostos por Brand-Willians et al. (1995) e Rufino (2007), com modificações. O extrato e frações foram diluídos em concentrações finais de 50, 100, 200 e 300 µg/mL. A seguir, incubou-se 300 µL de cada diluição com 1700 µL de solução

etanólica de  $\bullet$ DPPH (70  $\mu$ M) por 20 min a 25°C. A medida da absorbância foi realizada no comprimento de onda de 517 nm em espectrofotômetro (UV 340G Gehaka). Etanol foi usado como controle negativo, enquanto ácido gálico e trolox foram empregados como controle positivo. A porcentagem da atividade antioxidante foi plotada graficamente contra a concentração dos extratos, ajustando os dados em equação hiperbólica retangular para obter a CE<sub>50</sub>, definida como concentração da amostra necessária para causar 50% de redução do radical.

### **2.7.3 Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre ABTS<sup>•+</sup>**

A avaliação da capacidade em sequestrar o radical livre ABTS<sup>•+</sup> [2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) foi realizada conforme descrita por Re et al. (1999) com adaptações. Inicialmente, incubou-se 87,5  $\mu$ L da solução de persulfato de amônio (140 mM) em 5 mL da solução ABTS (7 mM) por 16 h à temperatura de 25°C, na ausência de luz, para a formação do radical ABTS<sup>•+</sup>. A solução final foi diluída em etanol até a absorbância de  $0,70 \pm 0,02$  a 734 nm. Extrato e frações foram diluídos (2, 6, 12,5, 25, 50, e 100  $\mu$ g/mL) e 300  $\mu$ L de cada diluição foram incubadas com solução etanólica do ABTS<sup>•+</sup> (1700  $\mu$ L) por 20 min a 25°C. As absorbâncias foram determinadas a 734 nm. O etanol foi empregado como controle negativo, enquanto ácido gálico e trolox como padrões. A porcentagem da atividade antioxidante foi plotada graficamente contra a concentração dos extratos conforme descrito no item 2.7.2.

## **2.8 Cultura celular**

Fibroblastos do hamster V79 foram cultivados em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal, penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100  $\mu$ g/mL) e incubados em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. O meio foi trocado quando as culturas alcançavam 80% de confluência, sendo expandidas para outras garrafas de cultura.

### **2.8.1 Ensaio de viabilidade celular**

O método do MTT (3-[4,5-dimetiltriazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio) avalia a atividade mitocondrial em células viáveis, conforme descrito por Hansen et al. (1989). As células ( $1 \times 10^4$ /poço) foram plaqueadas em placas de 96 poços e pré-incubadas com o extrato e as

frações nas concentrações de 0 a 100 µg/mL a 37°C por 24 h. Foi adicionado MTT a 0,25 mg/mL ao meio e as células foram incubadas a 37°C. Após 3 h, a absorbância foi medida em leitor de microplacas a 570 nm e comprimento de onda de referência a 630 nm. A atividade metabólica residual das células foi calculada como porcentagem do controle negativo. Como controle positivo, foi utilizado Triton X-100 (1%).

### **2.8.2 Determinação da atividade citoprotetora**

As células ( $1 \times 10^4$ /poço) em placas de 96 poços foram pré-incubadas a 37°C com extrato e frações (10 µg/mL). Após 24 h, as células foram lavadas duas vezes com PBS (tampão fosfato salino). O meio foi trocado,  $H_2O_2$  (100 µM) foi adicionado e as células foram incubadas por mais 4 h. A viabilidade celular residual foi determinada pelo ensaio do MTT, conforme descrito acima.

### **2.8.3 Determinação da atividade antioxidante em modelo celular**

Para a determinação da atividade antioxidante, fibroblastos de cultura ( $1 \times 10^4$ /poço) em placas de 96 poços foram pré-incubados com extratos e frações (10 µg/mL) a 37°C por 24 h. As células foram então lavadas duas vezes com PBS, o meio foi repostado com  $H_2O_2$  (100 µM) e incubou-se as células por mais 4 h. Após lavagem com PBS, as células foram incubadas com DCFH-DA (dicloro-hidro fluoresceína diacetato) (10 µM) durante 30 min a 37°C no escuro. O DCFH-DA extracelular foi removido após lavagem das células por duas vezes com PBS. A oxidação do DCFH foi monitorada por fluorescência ( $\lambda_{ex}=485$  nm;  $\lambda_{ex}=520$  nm) em leitor de microplacas e está diretamente relacionada ao estado redox intracelular.

### **2.9 Ensaio de atividade da amilase**

A atividade de inibição da  $\alpha$ -amilase ( $\alpha$ -1-4-4-glucano-glucanohidrolase) foi determinada de acordo com Bernfeld (1955), com adaptações. A  $\alpha$ -amilase pancreática suína (EC 3.2.1.1, tipo VI, Sigma) foi diluída em 4 mL da solução tampão fosfato (10 mM) até 180 µg/mL. A seguir, incubou-se 100 µL da solução de enzima com 5 µL de amostra (200 µL/mL) por 15 min a 37°C. Após esse tempo, a atividade residual da amilase foi determinada com kit comercial Bioclin. Acarbose (EMS Sigma Pharma) foi utilizado como controle positivo enquanto o respectivo solvente (etanol) da amostra foi usado como controle negativo.



## 2.10 Análise estatística

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão amostral. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk ( $p > 0,05$ ). Os dados dos testes antioxidantes foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e Dunn's como pós-teste. A correlação foi feita de acordo com o coeficiente de correlação de Spearman. Os resultados de inibição da  $\alpha$ -amilase foram analisados pelo teste de Mann-Whitney. O nível de significância para as análises estatísticas foi de 5% ( $p < 0,05$ ). Todas as análises foram feitas usando o programa GraphPad Prism (6.0).

## 3. Resultados

### 3.1 Prospecção fitoquímica do extrato e frações da *M. hirsuta*

Os resultados da prospecção fitoquímica do extrato etanólico bruto (EEB) e das frações hidroalcoólica (FHA), alcoólica (FAA), acetato de etila (FAE) e fração isolada constituída da mistura de ácidos ursólico e oleanólico da *M. hirsuta* estão apresentados na Tabela 1. Fenóis, taninos, antocianinas, antocianidinas e flavonóides foram identificados no EEB e em todas as frações. Esteroides e triterpenos estão presentes no EEB e FAE. Também foi encontrado saponinas, flavonóis, flavanonóis, flavanonas, xantonas no EEB, FHA e FAA. As frações clorofórmica e hexânica continham apenas ácidos graxos e não foram empregados neste estudo.

### 3.2 Concentração de fenólicos totais

Os resultados da quantificação de compostos fenólicos totais do EEB e frações da *M. hirsuta* estão demonstrados na Tabela 2. O extrato bruto das folhas da planta apresentou cerca de 20  $\mu\text{g}$  EAG/mg de extrato e, após fracionamento, a maior parte dos compostos fenólicos se concentraram na fração alcoólica ( $\sim 56 \mu\text{g}$  EAG/mg).

Tabela 1. Prospecção fitoquímica qualitativa dos extratos e frações das folhas da *M. hirsuta*.

Constituintes químicos	Extrato e frações					
	EEB	FHA	FAA	FAE	FH	FC
Fenóis	+	+	+	+	-	-
Taninos	+	+	+	+	-	-
Esteroides	+	-	-	+	+	+
Triterpenos	+	-	-	+	+	+
Saponinas	+	+	+	-	-	-
Alcaloides	-	-	-	-	-	-
Flavonóis	+	+	+	-	-	-
Flavanonóis	+	+	+	-	-	-
Flavanonas	+	+	+	-	-	-
Xantonas	+	+	+	-	-	-
Antocianinas	+	+	+	+	-	-
Antocianidinas	+	+	+	+	-	-
Flavonoides	+	+	+	+	-	-

(+) = Presença de reação; (-) = Ausência de reação. EEB: Extrato etanólico bruto; FHA: Fração hidroalcoólica; FAA: Fração alcoólica; FAE: Fração acetato de etila; FH: Fração hexânica; FC: Fração clorofórmica.

Tabela 2. Atividade antioxidante do extrato etanólico bruto e frações hidroalcoólica, alcoólica, acetato de etila e da mistura dos ácidos ursólico e oleanólico da *M. hirsuta*.

Amostras	Total de fenólicos µg EAG/mg	Sistema β- caroteno/ácido linoleico (% IO)	DPPH CE <sub>50</sub> (µg/mL)	ABTS CE <sub>50</sub> (µg/mL)
EEB	20,3±0,8	43,2± 0,1	57,1±5,6 <sup>a</sup>	14,9±1,4
FHA	7,2±0,5	39,3±0,1	29,1±1,1	5,2±0,1
FAA	55,7±2,1	45,2±0,1	45,9±1,8	6,8±0,1
FAE	6,8±0,2	79,4±0,1	59,0±9,9	17,9±0,1
AUO	0,2±0,1	21,6±0,1	49,4±1,7	34,9±3,8 <sup>a</sup>
BHT	-	96,5±0,1	-	-
Trolox	-	-	1,5±0,1	1,2±0,1
Ácido gálico	-	-	1,4±0,1	1,1±0,1

<sup>a</sup>p<0,05, quando comparados com o trolox, segundo teste de Kruskal-Wallis e Dunn's como pós-teste. <sup>b</sup>p<0,05, quando comparados com o ácido gálico, segundo teste de Kruskal-Wallis e Dunn's como pós-teste. <sup>c</sup>p<0,05, quando comparados com o BHT, segundo teste de Kruskal-Wallis e Dunn's como pós-teste 1) EEB: Extrato etanólico bruto; 2) FHA: Fração hidroalcoólica; 3) FAA: Fração alcoólica; 4) FAE: Fração acetato de etila; 5) AUO: Ácidos ursólico e oleanólico. Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=3). (-) Não correspondente para o teste.

### 3.3 Atividade antioxidante do extrato e frações de *M. hirsuta*

O potencial antioxidante do extrato etanólico bruto e das frações hidroalcoólica, alcoólica, acetato de etila e fração isolada da *M. hirsuta* foi inicialmente avaliado pelo método de co-oxidação  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico (Tabela 2). Os resultados demonstraram que a FAE apresentou o maior nível de inibição da oxidação (79,36%), seguido de FHA, EEB, FAA e AUO (45,3%, 43,2%, 39,2 e 21,58%, respectivamente) (Tabela 2).

Por outro lado, FHA foi capaz de capturar o radical  $\bullet$ DPPH mais eficientemente ( $CE_{50}=29,1 \mu\text{g/mL}$ ) quando comparado com FAA ( $CE_{50}=45,9 \mu\text{g/mL}$ ), AUO ( $CE_{50}=49,4 \mu\text{g/mL}$ ), EEB ( $CE_{50}= 57,1 \mu\text{g/mL}$ ) e FAE ( $CE_{50}= 59,0 \mu\text{g/mL}$ ). Já os padrões trolox apresentaram  $CE_{50}=1,5 \mu\text{g/mL}$  e o ácido gálico  $CE_{50}= 1,4 \mu\text{g/mL}$ . Na análise pelo método ABTS $\bullet^+$  (Tabela 2), FHA também apresentou a maior atividade antioxidante ( $CE_{50}= 5,2 \mu\text{g/mL}$ ), seguida da FAA ( $CE_{50}= 6,8 \mu\text{g/mL}$ ), sendo ambas comparáveis ao trolox. EEB ( $EC_{50}= 14,9 \mu\text{g/mL}$ ), FAE ( $EC_{50}= 17,9 \mu\text{g/mL}$ ) e a mistura de ácido ursólico e oleanólico ( $EC_{50}= 34,9 \mu\text{g/mL}$ ) foram os menos eficientes em reduzir o radical.

### 3.4 Efeitos do extrato e frações em modelo celular

Ao incubar os fibroblastos com diferentes concentrações do extrato e frações por 24 h, observou-se que a concentração mais alta das amostras empregada no estudo ( $100 \mu\text{g/mL}$ ) não foi capaz de alterar significativamente a viabilidade celular (Figura 2). Por conseguinte, extrato e frações ( $10 \mu\text{g/mL}$ ) também protegeram as células contra morte celular decorrente da exposição ao  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figura 3). O extrato e todas as frações apresentaram atividade citoprotetora, com destaque para a fração de ácidos ursólico e oleanólico, cuja porcentagem de citoproteção foi a maior (76,8%).

Em paralelo, avaliou-se a capacidade do extrato e diferentes frações ( $10 \mu\text{g/mL}$ ) em reduzir a oxidação intracelular da DFCH mediada por  $\text{H}_2\text{O}_2$  em fibroblastos. Novamente, os ácidos ursólico e oleanólico apresentaram a maior atividade antioxidante por reduzirem a oxidação da DCFH em cerca de 83% (Figura 4).

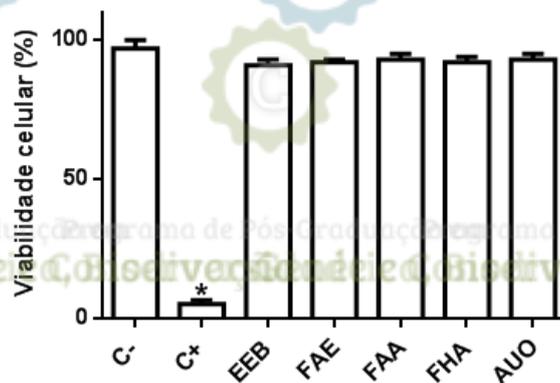


Figura 2. Viabilidade celular (%) após incubação de fibroblastos com extrato etanólico bruto (EEB), fração hidroalcoólica (FHA), fração alcoólica (FAA), fração acetato de etila (FAE) e ácidos ursólico e oleanólico (AUO) da *M. hirsuta* na concentração de 100 µg/mL por 24 h a 37°C seguido por incubação com MTT. Controle positivo (C+): Triton X-100 (1%). Controle negativo (C-): células sem adição do extrato e frações. \*p>0,05, quando comparado com o controle negativo.

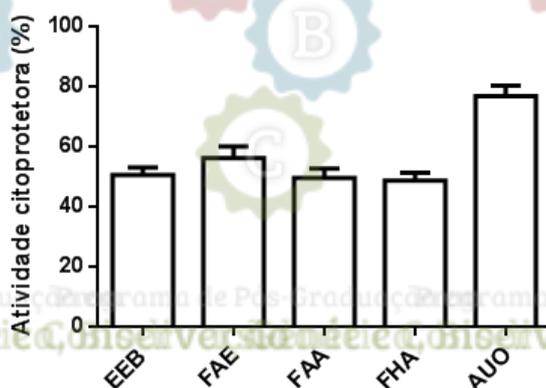


Figura 3. Atividade citoprotetora (%) do extrato etanólico bruto (EEB), fração hidroalcoólica (FHA), fração alcoólica (FAA), fração acetato de etila (FAE) e ácidos ursólico e oleanólico (AUO) de *M. hirsuta*. As células foram incubadas com o extrato e frações (10 µg/mL). Após 24 h foram lavadas com PBS e incubadas por 4 h com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µM), sendo a viabilidade celular residual determinada pelo ensaio do MTT.

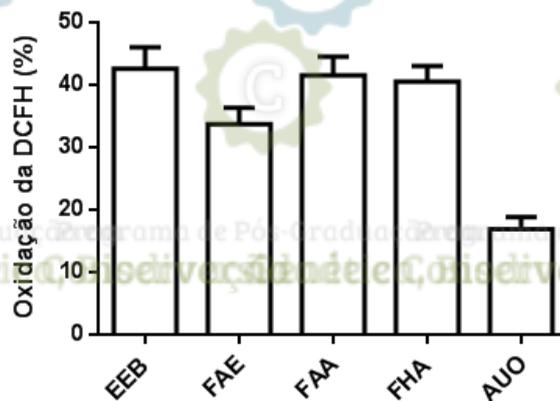


Figura 4. Atividade antioxidante em modelo celular do extrato etanólico bruto (EEB), fração hidroalcoólica (FHA), fração alcoólica (FAA), fração acetato de etila (FAE) e ácidos ursólico e oleanólico (AUO) de *M. hirsuta*. Fibroblastos em cultura foram incubados com extrato e frações (10 µg/mL). Após 24 h, as células foram lavadas com PBS e incubadas por 4 h com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µM). Após lavagem com PBS, as células foram incubadas com a DCFH-DA (10 µM) por 30 min, sendo a oxidação DCFH monitorada por fluorescência.

### 3.5 Inibição da $\alpha$ -amilase pelo extrato e frações

O extrato etanólico bruto e frações da *M. hirsuta* foram finalmente avaliados quanto à capacidade de inibir a atividade glicolítica da  $\alpha$ -amilase. Os resultados dessa triagem (Tabela 3) demonstraram que na concentração de 200 µg/mL, apenas a fração isolada da *M. hirsuta* contendo a mistura dos ácidos ursólico e oleanólico inibiu significativamente a  $\alpha$ -amilase (~72%). Dessa forma, foi construída uma curva de concentração *versus* efeito para essa fração (Figura 5). Baseando-se nos resultados dessa curva, observou-se que a mistura dos ácidos ursólico e oleanólico apresentou IC<sub>50</sub> de 29,6±0,2, valor menor que o da acarbose (IC<sub>50</sub>= 37,2 ±5,2), um conhecido inibidor da enzima e clinicamente disponível.

Tabela 3. Inibição da  $\alpha$ -amilase pelo extrato bruto e frações da *M. hirsuta* a 200 µg/mL.

Extrato e frações	Inibição (%)
EEB	-
FHA	-
FAA	-
FAE	-
AUO	71,8±5,7

EEB: Extrato etanólico bruto; FHA: Fração hidroalcoólica; FAA: Fração alcoólica; FAE: Fração acetato de Etila; AUO: Ácidos ursólico e oleanólico. (-) Ausência de inibição.

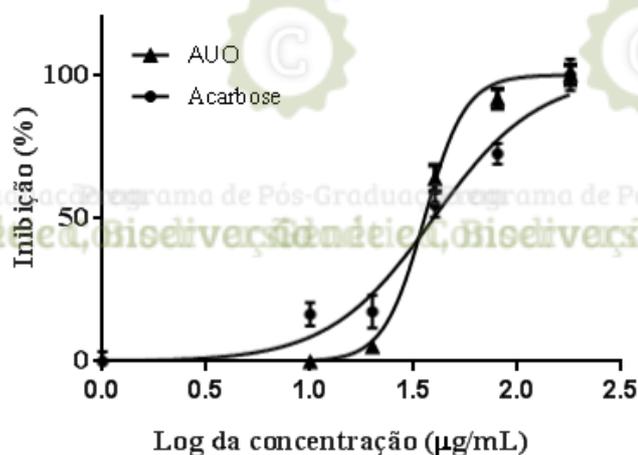


Figura 5. Curva de concentração *versus* efeito da inibição da  $\alpha$ -amilase pela fração isolada da *M. hirsuta* quando comparada com a acarbose. O valor de  $IC_{50}$  foi determinado por ajuste hiperbólico dos dados no programa GraphPad (C+: Aacarbose; FUC: Ácidos ursólico e oleanólico).

#### 4. Discussão

A *M. hirsuta* D.C compreende uma das muitas espécies endêmicas da caatinga, bioma do nordeste brasileiro rico em plantas com alto potencial farmacológico (Albuquerque et al., 2007; Nogueira et al., 2010). No entanto, apesar de ser uma espécie promissora e valiosa em áreas farmacêutica e de alimentos, existem ainda poucos estudos químicos e biológicos a seu respeito (Silva, 2009; Silva et al., 2015).

Assim, tendo em vista a potencialidade dessa espécie quanto a seu valor terapêutico foi feita uma prospecção fitoquímica qualitativa do extrato etanólico bruto e das frações obtidas por partição líquido-líquido do extrato etanólico das folhas da *M. hirsuta* com o objetivo de conhecer e avaliar a presença de seus constituintes químicos. Essa análise demonstrou a presença de diversos metabolitos secundários como saponinas, esteroides, triperpenoides, fenóis, taninos, antocianinas, antocianidinas bem como flavonoides das classes flavonóis, flavononas, flavononóis e/ou xantonas livres ou seus heterosídeos no extrato bruto e nas frações. Esses resultados são compatíveis com os obtidos em outras espécies de Bignoniaceae, demonstrando a relevância dessa família de lianas como fontes de bioprodutos de interesse farmacêuticos (Raju et al., 2011; Choudhury et al., 2011).

Diversos estudos já relacionaram o potencial antioxidante de plantas medicinais com os benefícios no tratamento popular de doenças associadas ao estresse redox e inflamação, incluindo diabetes mellitus tipo 2, hipertensão e doenças degenerativas (Aruoma, 1998;

Alves et al., 2010; Krishnaiah et al., 2011; Meena et al., 2012). Assim, a pesquisa por novas espécies com tais propriedades, com menores efeitos colaterais e que possam ser empregadas clinicamente é recomendada, conforme investigada para o extrato e frações de da *M. hirsuta*.

Embora possua algumas limitações, o método de captura do radical livre estável  $\bullet$ DPPH é amplamente utilizado como modelo de triagem do potencial de compostos naturais e sintéticos em desativarem radicais livres (Masoko & Eloff, 2007; Alves, 2010; Shah et al., 2010). Na avaliação da capacidade antioxidante, a concentração efetiva capaz de reduzir 50% da concentração do radical livre ( $CE_{50}$ ) menor que 50  $\mu$ g/mL é indicativo de atividade antioxidante alta, enquanto valores de 50-100  $\mu$ g/mL, 100-200  $\mu$ g/mL e acima de 200  $\mu$ g/mL indicam moderada, baixa e ausência de atividade antioxidante, respectivamente (Reynertson et al., 2005). No presente estudo, as frações hidroalcoólica e alcoólica apresentaram alta atividade antioxidante, o que é normalmente esperado para frações polares. Além disso, os ácidos ursólico e oleanólico se apresentaram como bons antioxidantes, embora pertençam à classe dos terpenos, o que pode ser explicado pelos grupamentos hidroxila.

Outro método empregado para avaliar o potencial antioxidante do extrato e frações da *M. hirsuta* foi o  $ABTS^{\bullet+}$ , cuja vantagem em relação ao anterior é a capacidade de testar a atividade antioxidante de compostos hidrofílicos e lipofílicos (Wojdyło et al., 2007). O resultado demonstrou que extrato e frações da planta em estudo demonstraram uma capacidade antioxidante elevada frente ao radical  $ABTS^{\bullet+}$ . Assim como no teste do  $\bullet$ DPPH, a fração hidroalcoólica e a fração alcoólica reagiram com  $ABTS^{\bullet+}$  com menores valores de  $CE_{50}$ .

Subsequentemente, o sistema da auto-oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico foi utilizado para avaliar a capacidade de redução da cascata de peroxidação do ácido linoleico (Santos et al., 2015). Conforme esperado, a fração acetato de etila foi a mais ativa (79,4%) quando comparada com as outras amostras, o que pode ser explicado pela polaridade dessa fração, uma vez que esse ensaio ocorre em meio apolar. Portanto, frações menos polares tendem a cessar a cascata de peroxidação com maior eficiência (Rahimi-Nasrabadia et al., 2013). De forma geral, observou-se que ao se comparar os resultados das metodologias utilizadas para determinação da atividade antioxidante do extrato bruto e frações da *M. hirsuta*, as amostras demonstraram atividades antioxidantes distintas, o que pode ser

explicado não apenas pelas classes dos compostos particionados nas frações como também pelas particularidades dos ensaios realizados e mecanismos de reação envolvidos.

Considerando-se que o extrato bruto e frações da *M. hirsuta* apresentaram atividade antioxidante pelos três métodos, avaliou-se o teor de compostos fenólicos totais presentes nessas amostras. De fato, diversos estudos têm demonstrado que essa classe de fitoquímicos relaciona-se com a atividade antioxidante de plantas devido às características estruturais e propriedades redutoras (Othman et al., 2007). Além de compostos fenólicos, outros metabólitos secundários, tais como esteroides (Mooradian, 1993), terpenoides (Graßmann, 2005) e saponinas (Gülçin et al., 2004), também contribuem para a atividade antioxidante em extratos vegetais. Os resultados obtidos neste trabalho não permitiram correlacionar ( $p > 0,05$ ) o teor de fenólicos em *M. hirsuta* e os diferentes métodos de avaliação da atividade antioxidante. Tal fato pode ser explicado em função da diversidade de compostos presentes na planta que, conjuntamente, contribuem com o efeito observado.

Ao se verificar a aplicabilidade terapêutica de um produto natural é importante que exista um equilíbrio entre os efeitos terapêuticos e os efeitos tóxicos deste produto às células normais do organismo. Por esse motivo, verificou-se o potencial citotóxico da *M. hirsuta* contra fibroblastos de cultura murinos V79. Os resultados obtidos demonstraram que não houve diferença significativa entre as células incubadas com o extrato e frações da planta em concentrações até 100  $\mu\text{g/mL}$ . Esse fato estimula estudos posteriores com essa espécie devido à baixa toxicidade aparente.

De forma a complementar os ensaios *in vitro* anteriores, investigou-se a capacidade do extrato e frações de *M. hirsuta* em proteger os fibroblastos contra o dano oxidativo causado pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Após incubação por 24 h, todas as amostras impediram a perda na viabilidade celular, com destaque para os ácidos ursólico e oleanólico. Esses compostos também foram os mais eficientes em reduzir a oxidação intracelular da sonda fluorescente DCFH mediada pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Esses resultados sugerem que os ácidos isolados de *M. hirsuta* induzem uma resposta adaptativa celular de modo a aumentar a defesa antioxidante nessas células (Martin-Aragón et al., 2001). Esses achados são corroborados pelos estudos de Ovesná et al. (2006) que demonstraram o papel desses compostos em proteger linhagens de células leucêmicas contra os danos causados pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Tsai e Yin (2008) também relataram a capacidade antioxidante e citoprotetora dos ácidos ursólico e oleanólico frente ao tratamento de células da linhagem PC12 com  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Finalmente, o presente estudo investigou o efeito hipoglicemiante do extrato bruto e frações da *M. hirsuta*. O interesse em avaliar o potencial antidiabetogênico das plantas medicinais como alternativa aos tratamentos convencionais se justifica pelo fato dos medicamentos atuais poderem causar inúmeros efeitos adversos (Uddin et al., 2014; Rangika et al., 2015). Ademais, a diabetes mellitus (DM) é um dos problemas que mais oneram o sistema público de saúde, pois além do aumento na incidência mundial, a mortalidade e a morbidade decorrentes ao DM também cresceram (Alarcon-Aguilar et al., 2000).

A atividade imunossupressora dos ácidos ursólico e oleanólico (Silva, 2009) os coloca como ótimos candidatos para o tratamento de DM do tipo 2 (Sheng e Sun, 2011). Esses compostos podem ainda agir como anti-hiperlipidêmico (Somova et al., 2003), hepatoprotetor (Liu et al., 1995) ou mesmo inibir a enzima  $\alpha$ -amilase (Ali et al., 2006), responsável por regular a absorção de carboidratos no intestino. Outros efeitos benéficos contra DM também são descritos para esses compostos, mais especificamente o ácido ursólico, por aumentar biossíntese e secreção de insulina e, conseqüentemente, a captação periférica da glicose (Castellano et al., 2013).

Os resultados deste trabalho confirmaram pela primeira vez a habilidade da *M. hirsuta* em inibir a atividade da  $\alpha$ -amilase. A  $\alpha$ -amilase é uma enzima que catalisa a clivagem inicial do amido em oligossacarídeos, exercendo papel primordial no início desse processo (Sales et al., 2012) e, atualmente, inibidores dessa enzima tem sido empregados no tratamento da hiperglicemia pós-prandial e obesidade (Mahomoodally et al., 2012). No caso do presente trabalho, a propriedade inibitória da  $\alpha$ -amilase foi atribuída aos ácidos ursólico e oleanólico isolados da planta, cujo  $IC_{50}$  de 29,6  $\mu$ g/mL foi comparável ao da acarbose (37,2  $\mu$ g/mL), medicamento clinicamente disponível para tratamento da DM2 (Ke et al., 2014).

## Conclusão

Este estudo descreveu qualitativamente os metabólitos secundários do extrato e frações da folha *M. hirsuta*. Além disso, demonstrou-se o potencial antioxidante, citoprotetor e hipoglicemiante das folhas dessa espécie típica do semiárido brasileiro. Em conjunto, os resultados sugerem que a *M. hirsuta* pode se tornar uma nova estratégia para o tratamento de doenças com base inflamatória e oxidativa a exemplo da DM, com especial aplicabilidade na medicina popular nas comunidades locais. Contudo, ainda são necessários estudos adicionais para investigar a farmacodinâmica dos metabólitos da planta além de sua eficácia e segurança.

**Lista de abreviações:** ABTS<sup>++</sup>: 2,2' – azinobis – (3- etilbenzotiazolina-6-sulfônico); AUO: Ácidos ursólico e oleanólico; BHT: butil-hidroxitolueno; CE<sub>50</sub>: concentração do radical livre; DCFH-DA: Dicloro-hidro fluoresceína diacetato; DM: Diabetes mellitus; •DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazila; EEB: Extrato etanólico bruto; FHA: Fração hidroalcoólica; FAA: Fração alcoólica; FAE: Fração acetato de etila; MTT: 3-[4,5-dimetiltriazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio; PBS: Solução salina tamponada com fosfato.

### **Interesses competitivos**

Os autores declaram não possuir conflito de interesses.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem a FAPESB, CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação da UESB pelo apoio institucional.

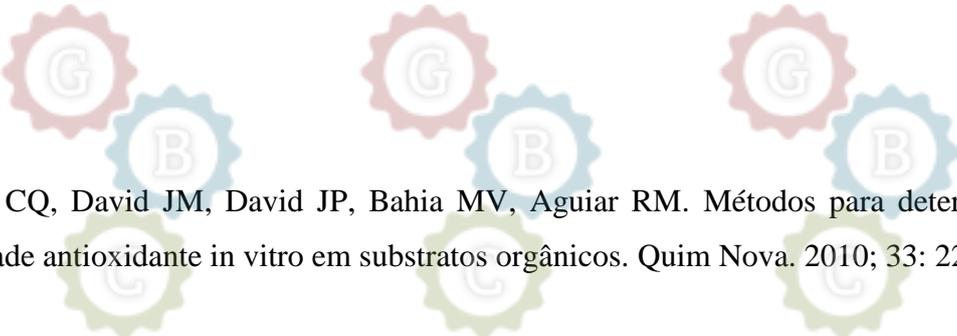
### **Referências**

Agra MF, Silva KN, Basílio JLD, França PF, Barbosa-Filho JM. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Braz J. Pharmacogn.* 2008; 18: 472-508.

Alarcon-Aguilar FJ, Jimenez-Estrada M, Reyes-Chilpa R, Roman-Ramos R. Hypoglycemic effect of extracts and fractions from *Psacalium decompositum* in healthy and alloxan-induced diabetic mice. *J Ethnopharmacol.* 2000; 72: 21-27.

Albuquerque UP, Medeiros PM, Almeida AL, Monteiro JM, Neto EMFL, Melo JGM, Santos JP. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. *J Ethnopharmacol.* 2007, 114: 325-354.

Ali H, Houghton PJ, Soumyanath A. Alpha-amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *J Ethnopharmacol.* 2006; 107: 449-455.



Alves CQ, David JM, David JP, Bahia MV, Aguiar RM. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Quim Nova*. 2010; 33: 2202-2210.

Aruoma OI. 1998. Free radicals, oxidative trace and antioxidants in human health and diseases. *Int J Biomed Sci*. 2008; 4: 89–96.

Bernfeld P. Amylases,  $\alpha$  and  $\beta$ . *Meth. Enzymology*. 1955; 1: 149-158.

Braga FC, Wagner H, Lombardi JÁ, Oliveira AB. Screening the Brazilian flora for anti-hypertensive plant species for in vitro angiotensin-I converting enzyme inhibiting activity. *Phytomedicine*. 2000; 7: 245-250.

Brand-Willians, W, Cuvelier ME, Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci. Technol*. 1995; 28: 25-30.

Campana PR, Braga FC, Cortes SF. Endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta by *Mansoa hirsuta* D.C. *Phytomedicine*. 2009; 16: 456-61.

Castellano JM, Guinda A, Delgado T, Rada M, Cayuela JA. Biochemical Basis of the Antidiabetic Activity of Oleanolic Acid and Related Pentacyclic Triterpenes. *Diabetes*. 2013; 62: 1791-1799.

Chaves SM, Reinhard KJ. Paleopharmacology and pollen: theory, method, and application. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2003; 98: 207-211.

Choudhury S, Datta S, Talukdar AD, Choudhury MD. Phytochemistry of the family Bignoniaceae- a review. *Assam Univ. J. Sci. Technol. Biol. Environ. Sci*. 2011; 7: 145-150.

Elisabetsky E, Costa-Campos L. Medicinal plant genetic resources and international cooperation: the Brazilian perspective. *J Ethnopharmacol*. 1996; 51: 110–120.

Guerra MP, Nodari RO. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Simões CM, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick, PR. (org.)

Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS/ Editora da UFSC; 2006: 13-26.

Graßmann J. Terpenoids as plant antioxidants. *Vitam Horm.* 2005; 72: 505-535.

Gülçin I, Mshvildadze V, Gepdiremen A, Elias R. Antioxidant activity of saponins isolated from ivy: alpha-hederin, hederasaponin-C, hederacolchiside-E and hederacolchiside- F. *Planta Med.* 2004; 70: 561-563.

Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods* 1989; 119: 203-210.

Heywood V. 2011. Ethnopharmacology, food production, nutrition and biodiversity conservation: towards a sustainable future for indigenous peoples. *J Ethnopharmacol.* 2011; 137: 1-15.

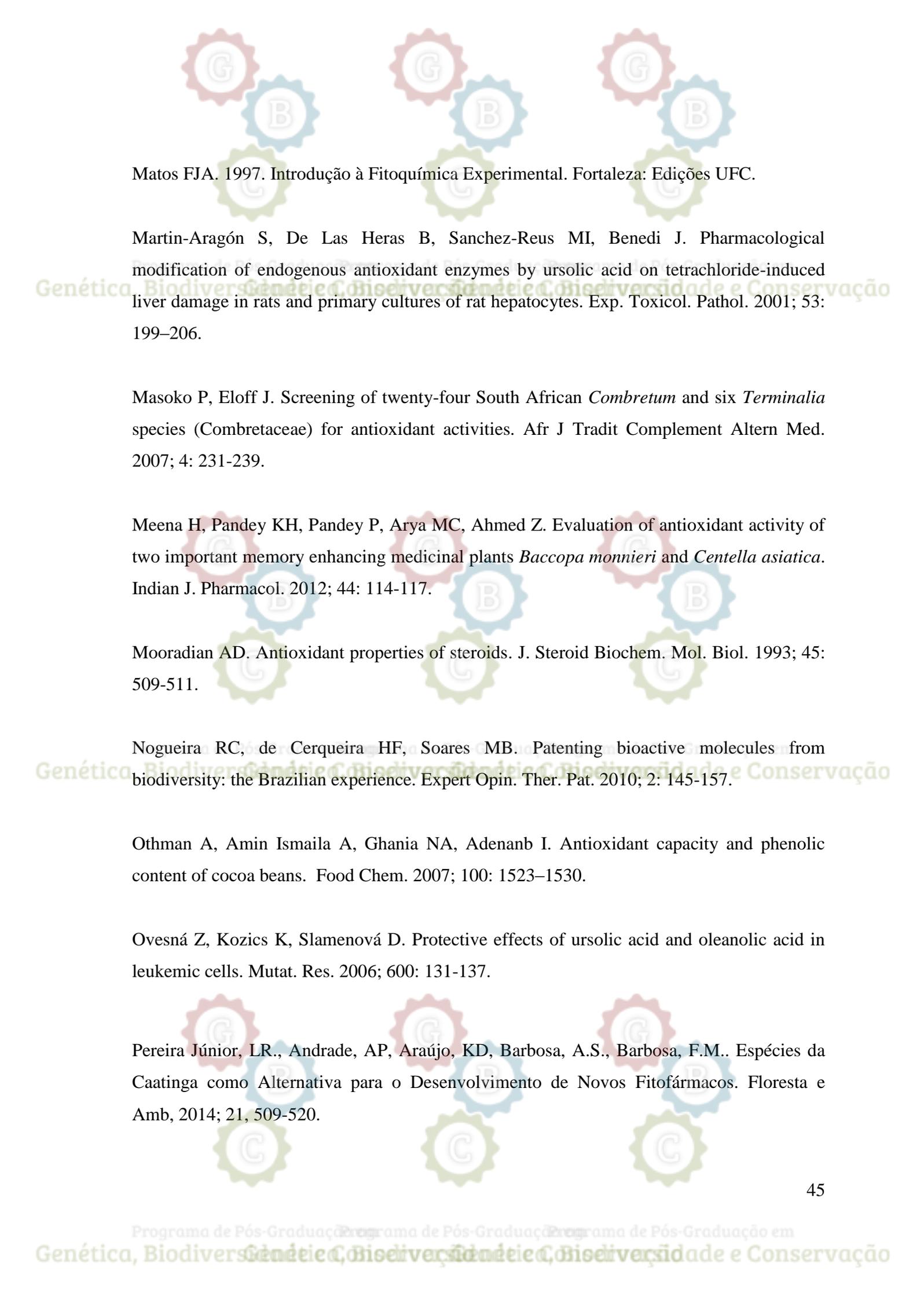
Ke E, Shi JC, Mao XM. Safety and efficacy of acarbose in the treatment of diabetes in Chinese patients. *Ther Clin Risk Manag.* 2014; 10: 505-511.

Krishnaiah D, Sarbatly R, Nithyanandam R. 2011. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing.* 89, 217-233.

Lemos JR, Zappi DC. Distribuição geográfica mundial de plantas lenhosas da Estação Ecológica de Aiuaba, Ceará, Brasil. *R. Bras. Bioci.* 2012; 10: 446-456.

Liu J, Liu Y, Klaassen CD. Protective effect of oleanolic acid against chemical-induced acute necrotic liver injury in mice. *Zhongguo Yao Li Xue Bao.* 1995; 16: 97-102.

Mahomoodally MF, Subratty AH, Gurib-Fakim AM, Choudhary I, Khan NS. Traditional medicinal herbs and food plants have the potential to inhibit key carbohydrate hydrolyzing enzymes *in vitro* and reduce postprandial blood glucose peaks *in vivo*. *Sci. World J.* 2012; 2012: 1-9.



Matos FJA. 1997. Introdução à Fitoquímica Experimental. Fortaleza: Edições UFC.

Martin-Aragón S, De Las Heras B, Sanchez-Reus MI, Benedi J. Pharmacological modification of endogenous antioxidant enzymes by ursolic acid on tetrachloride-induced liver damage in rats and primary cultures of rat hepatocytes. *Exp. Toxicol. Pathol.* 2001; 53: 199–206.

Masoko P, Eloff J. Screening of twenty-four South African *Combretum* and six *Terminalia* species (Combretaceae) for antioxidant activities. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 2007; 4: 231-239.

Meena H, Pandey KH, Pandey P, Arya MC, Ahmed Z. Evaluation of antioxidant activity of two important memory enhancing medicinal plants *Bacopa monnieri* and *Centella asiatica*. *Indian J. Pharmacol.* 2012; 44: 114-117.

Mooradian AD. Antioxidant properties of steroids. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1993; 45: 509-511.

Nogueira RC, de Cerqueira HF, Soares MB. Patenting bioactive molecules from biodiversity: the Brazilian experience. *Expert Opin. Ther. Pat.* 2010; 2: 145-157.

Othman A, Amin Ismaila A, Ghanian NA, Adenanb I. Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chem.* 2007; 100: 1523–1530.

Ovesná Z, Kozics K, Slamenová D. Protective effects of ursolic acid and oleanolic acid in leukemic cells. *Mutat. Res.* 2006; 600: 131-137.

Pereira Júnior, LR., Andrade, AP, Araújo, KD, Barbosa, A.S., Barbosa, F.M.. Espécies da Caatinga como Alternativa para o Desenvolvimento de Novos Fitofármacos. *Floresta e Amb.* 2014; 21, 509-520.

Raju S, Kavimani S, Uma MV, Sreeramulu RK. *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth (Bignoniaceae): ethnobotany, phytochemistry and pharmacology. J. Pharm. Biomed. Sci. 2011; 8: 1-5.

Rangika BS, Dayananda PD, Peiris DC. Hypoglycemic and hypolipidemic activities of aqueous extract of flowers from *Nycantus arbor-tristis* L. in male mice. BMC Complement. Altern. Med. 2015; 15: 1-9.

Rahimi-Nasrabadia M, Pourmortazavib SM, Nazariana S, Farhad Ahmadi F, Hosein Batoolid H. Chemical composition, antioxidant, and antibacterial activities of the essential oil and methanol extracts of *Eucalyptus oleosa* leaves. Int. J. Food Prop. 2013; 16: 1080-1091.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic. Biol. Med. Discipline 1999; 26:1231-1237.

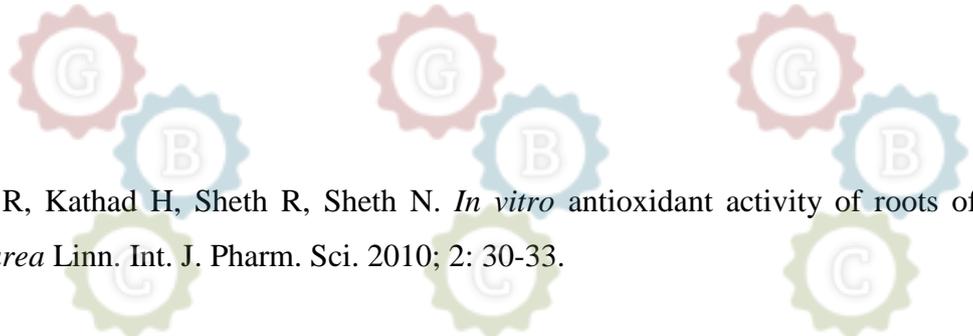
Reynertson KA, Basile MJ, Kennelly EJ. Antioxidant potential of seven myrtaceous fruits. Ethnobotany Res. Appl. 2005; 3: 25-35.

Rocha AD, Oliveira AB, Filho JDS, Lombardi JA, Braga FC. Antifungal constituents of *Clytostoma ramentaceum* and *Mansoa hirsuta*. Phytother. Res. 2004; 18: 463-467.

Rufino MS. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. Embrapa, 2007. Comunicado Técnico 127.

Sales PM, Souza PM, Simeoni LA, Magalhães PO, Silveira D.  $\alpha$ -Amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. Eur. J. Pharm. Sci. 2012; 15: 141-183.

Santos MFG, Mamede RVS, Rufino MSM, Brito ES, Alves RE. Amazonian native palm fruits as sources of antioxidant bioactive compounds. Antioxidants. 2015; 4: 591-602.



Shah R, Kathad H, Sheth R, Sheth N. *In vitro* antioxidant activity of roots of *Tephrosia purpurea* Linn. Int. J. Pharm. Sci. 2010; 2: 30-33.

Sheng H, Sun H.. Synthesis, biology and clinical significance of pentacyclic triterpenes: a multi-target approach to prevention and treatment of metabolic and vascular diseases. Nat. Prod. Rep. 2011; 28: 543–593.

Silva DM, Sant'Ana AEG, Castro MMS, Queiroz LP, Soares MB, Costa JFO. Isolamento de triterpenos pentacíclicos: ácido ursólico e oleanólico, e fitoesteróides: estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol extraídos das folhas da *Mansoa hirsuta* D.C. Bignoniaceae, para aplicação em formulações de suplementos, alimentos funcionais e fitoterápicos. BR. Pat 102015008180, 01 abr. 2015. 19p.

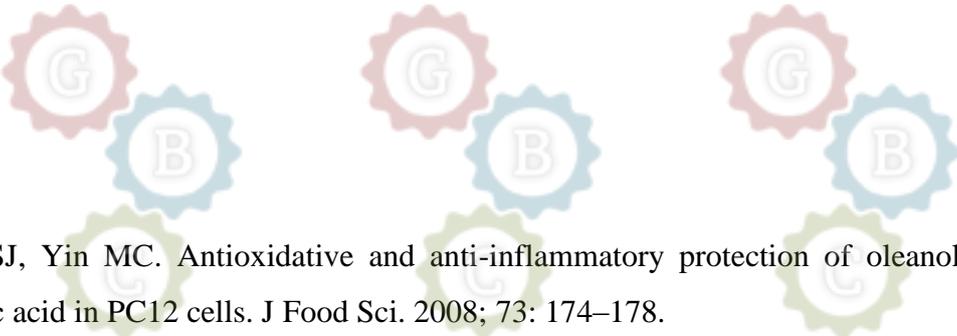
Silva DM. 2009. Perfil metabólico da *Mansoa hirsuta* D.C.(Bignoniaceae). Alagoas: Universidade Federal de Alagoas. Dissertação. Dissertação de mestrado em Química e Biotecnologia. 126 p.

Silva DM. 2006. Estudo químico e de atividades biológicas da *Mansoa hirsuta* D.C. (Bignoniaceae). Alagoas: Universidade Federal de Alagoas. Dissertação de mestrado em Química e Biotecnologia.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela RM.. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods Enzym. 1992; 299: 152-178.

Somova LO, Nadar A, Rammanan P, Shode FO. Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension. Phytomedicine 2003; 10: 115-21.

Toledo CE, Britta EA, Ceole LF, Silva ER, Mello, JC, Dias Filho, BP et al. Antimicrobial and cytotoxic activities of medicinal plants of the Brazilian cerrado, using Brazilian cachaça as extractor liquid. J Ethnopharmacol. 2011; 133: 420-425.

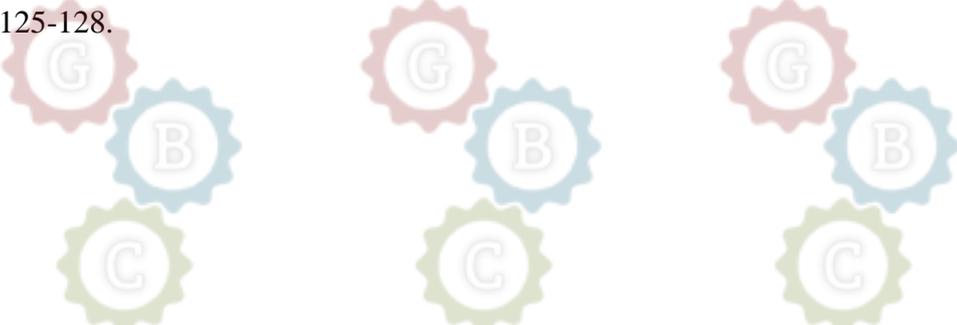


Tsai SJ, Yin MC. Antioxidative and anti-inflammatory protection of oleanolic acid and ursolic acid in PC12 cells. *J Food Sci.* 2008; 73: 174–178.

Uddin N, Hasan MR, Hossain MM, Sarker A, Hasan AH, Islam AF, Chowdhury MM, Rana MS. In vitro  $\alpha$ -amylase inhibitory activity and in vivo hypoglycemic effect of methanol extract of *Citrus macroptera* Montr. fruit. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 2014; 4: 473–479.

Wojdyło A, Oszmiński J, Czemerys R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem.* 2007; 105: 940–949.

Yarnell E. The botanical roots of pharmaceutical discovery. *J. Altern. Complement. Med.* 2000: 125-128.



## 6 CAPÍTULO 2

### **Avaliação do potencial citogenotóxico dos ácidos ursólico e oleanólico isolados da *Mansoa hirsuta* D.C. (Bignoniaceae), uma planta do semiárido brasileiro com potencial bioativo**

Joquebede Rodrigues Pereira<sup>a</sup>, Erlânia Alves de Siqueira<sup>b</sup>, Ana Christina Brasileiro Vidal<sup>b</sup>, Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana<sup>c</sup>, Daniel de Melo Silva<sup>d</sup>, Paulo Roberto Antunes de Mello Affonso<sup>a, e\*</sup>

<sup>a</sup>*Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Jequié – BA, Brasil*

<sup>b</sup>*Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, Brasil*

<sup>c</sup>*Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió – AL, Brasil*

<sup>d</sup>*Departamento de Química e Exatas, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Jequié – BA, Brasil*

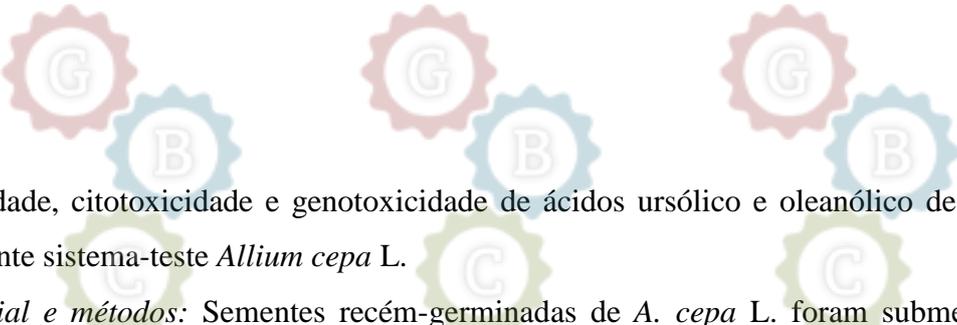
<sup>e</sup>*Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Jequié – BA, Brasil*

\*Correspondência para: Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Av. José Moreira Sobrinho, Jequié – BA, Brasil.

Endereço de email: paulomelloaffonso@yahoo.com.br

### **RESUMO**

*Relevância etnofarmacológica:* O bioma caatinga, exclusivo do semiárido brasileiro, é uma região de elevado endemismo e crescente degradação ambiental. Diversas plantas desse bioma têm sido utilizadas de forma medicinal pela população de baixa renda, embora representem um potencial pouco explorado no desenvolvimento de novos fitoterápicos. Dentre essas, destaca-se a *Mansoa hirsuta* D.C. devido à sua aplicabilidade para diversas enfermidades em função da presença de ácidos ursólico e oleanólico. Sabe-se que esses triterpenos pentacíclicos atuam inibindo a linfoproliferação e a produção de óxido nítrico, porém seus eventuais efeitos tóxicos não são conhecidos. Assim, esse estudo visou avaliar a



toxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade de ácidos ursólico e oleanólico de *M. hirsuta*, mediante sistema-teste *Allium cepa* L.

*Material e métodos:* Sementes recém-germinadas de *A. cepa* L. foram submetidas a três diferentes concentrações da mistura dos ácidos ursólico e oleanólico (0,1; 0,01 e 0,001 mg.mL<sup>-1</sup> de ambos os componentes) diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) 0,1% para determinação da toxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade em nível cromossômico, utilizando a água destilada como controle negativo e o metilmetano-sulfonato (MMS) e trifluralina como controles positivos. Após 24 h, parte das sementes foi transferida para metilmetano sulfonato (MMS, 4.10<sup>-4</sup> Mv) para determinar possíveis efeitos antimutagênicos. Em seguida, foram avaliados os efeitos tóxicos (comprimento médio das raízes); citotóxicos (índice mitótico), genotóxicos (frequência de alterações cromossômicas e nucleares) e mutagênicos em nível cromossômico (frequência de micronúcleos e quebras cromossômicas).

*Resultados:* Os ácidos isolados de *M. hirsuta* não interferiram significativamente no comprimento médio das raízes, índice mitótico, e na frequência de alterações cromossômicas e nucleares. No entanto, não apresentaram atividade antimutagênica.

*Conclusões:* Nas concentrações analisadas, os ácidos ursólico e oleanólico demonstraram potencial antimutagênico, não sendo tóxicos, citotóxicos, genotóxicos nem mutagênicos. A provável segurança e eficácia desses ácidos favorece sua utilização na síntese de novas drogas e formulações, além de validarem a importância de *M. hirsuta* na medicina alternativa em regiões carentes como o semiárido brasileiro.

*Palavras chave:* *Allium cepa*; citotoxicidade; genotoxicidade; mutagênese; triterpenos pentacíclicos



## 1. Introdução

O semiárido do nordeste brasileiro apresenta a segunda maior densidade demográfica do país e altos índices de pobreza, particularmente nas áreas rurais (Batista-Filho e Rissin, 2003). Essa região abriga um bioma exclusivo – denominado caatinga – o qual é caracterizado por notável diversidade e endemismo de espécies a despeito do acentuado processo de degradação de habitat (Albuquerque et al., 2012). Consequentemente, várias substâncias bioativas oriundas de plantas típicas da caatinga estão disponíveis e têm sido utilizadas na medicina popular pelas comunidades locais, que muitas vezes não têm acesso a outros recursos terapêuticos (Albuquerque et al., 2007a).

De fato, muitas espécies típicas da caatinga já são empregadas na produção de fitoterápicos, como *Amburana cearensis* A.C. Smith., *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan e *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Albuquerque et al., 2007b; Canuto et al., 2008; Silva et al., 2012). Apesar desse potencial e dos riscos de extinção de espécies endêmicas frente às ameaças antrópicas, poucos estudos etnofarmacológicos estão disponíveis para a flora da caatinga (Albuquerque et al., 2007b).

Entre os diversos grupos com potencial farmacológico na América do Sul, destacam-se as lianas da família Bignoniaceae, a qual compreende aproximadamente 800 espécies predominantemente neotropicais (Gentry, 1980). O Brasil é considerado o centro da diversidade dessa família, cujas espécies são comumente utilizadas em artesanato, horticultura, culinária, religião, indústria madeireira e tratamento de enfermidades como reumatismo e infecções microbianas (Gentry, 1980; Silva, 2009).

Uma das espécies de Bignoniaceae restrita à caatinga é a *Mansoa hirsuta* D.C. (Fig. 1A), popularmente conhecida como cipó d'alho e tipicamente registrada em serras e chapadas sedimentares do semiárido brasileiro (Lemos e Zappi, 2012). Análises prévias demonstraram que essa espécie apresenta propriedade antifúngica, anti-hipertensiva e antitumoral, sendo ainda utilizada no tratamento de diabetes (Agra et al., 2008; Chaves e Reinhard, 2003). Também são citados outros usos na medicina popular para essa espécie como tratamento de gripe, febre, dor, inflamação, reumatismo e culinária, devido ao odor de alho (Zoghbi et al., 1984).

Estudos fitoquímicos de *M. hirsuta* isolaram uma mistura (1:1) de ácidos ursólico (Figura 1B) e oleanólico (Figura 1C) da fração acetato de etila (Silva, 2009), cuja patente está registrada no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) sob o número: BR102015008180 (Silva et al., 2015). Ambos os ácidos são triterpenos pentacíclicos e

possuem estrutura química semelhante diferindo apenas na localização do grupo metila no anel E e, assim, frequentemente, ocorrem em conjunto (Vasconcelos, 2006; Jesus et al., 2015). Possuem comprovada atividade imunossupressora avaliada através da redução da linfoproliferação (acima de 99%), além de inibirem a produção de óxido nítrico (NO) entre 41,5% a 44,1% (Silva, 2009). Outros trabalhos descreveram atividades hipoglicêmica (Perez et al., 1998), anti-inflamatória (Safayhi e Sailer, 1997), antifúngica (Rocha et al., 2004) e hepatoprotetora (Liu et al., 1995) para esses compostos. Somova et al (2003) também relataram que esses ácidos também apresentaram efeito anti-hipertensor anti-hiperlipidêmico e antioxidante. A capacidade desses ácidos em induzir a apoptose de células cancerígenas do fígado também indica o potencial da sua utilização como agentes antitumorais (Ovesná et al., 2004; Yin, 2015).

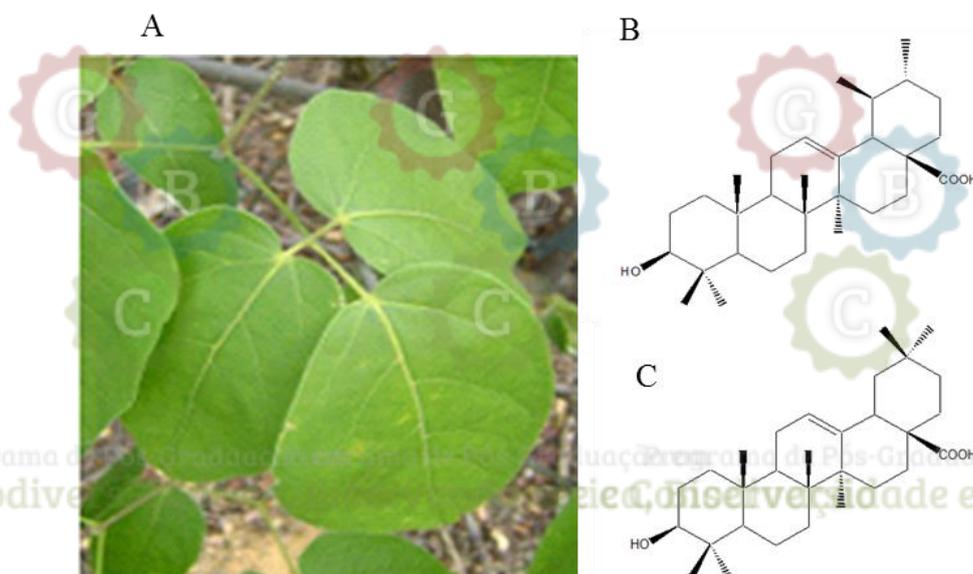


Fig. 1. (A) *Mansoa hirsuta* D.C. coletada em Morro do Chapéu. (B) Estrutura química do ácido ursólico. (C) Estrutura química do ácido oleanólico.

Além disso, o ácido ursólico, em particular, possui ação antibacteriana (Mallavadhani et al., 2004), inibindo a proliferação de *Escherichia. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* (Nascimento et al., 2014). Outro estudo ainda descreve que o ácido ursólico diminui a obesidade e a esteatose hepática, aumentando o gasto energético e a massa muscular esquelética ao mesmo tempo em que reduz a atrofia muscular em camundongos (Kunkel et al., 2012). São ainda descritas para o ácido oleanólico atividades tripanocida (epimastigotas de *T.cruzi*), anti-HIV, além da inibição do sistema complemento e potencial antinociceptivo (Sultana e Ata, 2007).

Considerando que os ácidos ursólico e oleanólico são potenciais compostos protótipos para o desenvolvimento de novas drogas (Silva et al., 2014; Jesus et al., 2015) e de suplementos funcionais, a avaliação dos seus efeitos tóxicos é importante para determinar suas doses seguras e terapêuticas, uma vez que muitos compostos presentes em fitoterápicos podem ser citotóxicos ou genotóxicos (Çelik e Aslantürk, 2010; Karaismailoglu, 2014).<sup>n</sup>

O sistema teste *Allium cepa* L. é um dos ensaios *in vivo* mais utilizados na análise de genotoxicidade de diversas substâncias, incluindo as medicinais. Além de apresentar condições favoráveis para análise microscópicas, como a presença de cromossomos grandes e em número reduzido ( $2n=16$ ), os testes com essa espécie têm demonstrado confiabilidade e correlação com outros sistemas, incluindo mamíferos (Fiskejo, 1985; Grant, 1994; Kuras et al., 2006; Bagatini et al., 2007; Leme e Marin-Morales, 2009). Por exemplo, a sensibilidade do sistema-teste *A. cepa* foi semelhante à observada para linfócitos humanos e apresentou correlação de até 82% com testes de carcinogenicidade em roedores (Fiskesjo, 1985; Rank e Nielsen, 1994). Além da análise da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, esse sistema-teste tem demonstrado sensibilidade para avaliação da antimutagenicidade, que é a capacidade de proteger a célula contra danos no material genético (Roberto et al., 2016), sendo, portanto, uma alternativa na busca por substâncias com atividade quimioprotetora. Dessa forma, este estudo visou avaliar o potencial citotóxico, genotóxico, mutagênico e antimutagênico da mistura dos triterpenos pentacíclicos ácidos ursólico e oleanólico isolados da *M. hirsuta* D.C. utilizando o sistema-teste *A. cepa* na ausência e presença de outros compostos reconhecidamente genotóxicos.

## 2. Material e métodos

### 2.1 Material vegetal

Os indivíduos de *Mansoa hirsuta* (Fig. 1A) foram coletados entre os municípios de Santo Inácio e Gameleira do Assuruá, no Estado da Bahia, Nordeste do Brasil (11°19'S e 42°40'O) e as exsiccatas estão depositadas no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (número: 59456).

As folhas foram secas, moídas e pesadas (15,0 kg) para preparação do extrato hidroalcoólico (etanol/água 50/50, v/v) e a posterior concentração em rotaevaporador forneceu 1800 g de extrato etanólico concentrado e homogêneo com 12% de rendimento.

Um total de 250 g do extrato total obtido foi submetido a fracionamento em fase reversa em carvão ativo. Após evaporação em aparelho rotatório, foram obtidas cinco frações:

hidroalcolica 1:1 (130 g), alcóolica (35 g), acetato de etila (40 g), clorofórmio (41 g) e hexano (4 g). A partir da fração acetato de etila, foram isolados em mistura os ácidos ursólico e oleanólico por meio do fracionamento cromatográfico em coluna de sílica gel 60 (Merck) e dos solventes hexano ( $C_6H_{14}$ ), hexano/ clorofórmio 1:1 ( $C_6H_{14}/CHCl_3$ ) e  $CHCl_3$ . A mistura desses ácidos foi obtida do Laboratório de Pesquisa de Química e Recursos Naturais da Universidade Federal de Alagoas, como resultado do estudo fitoquímico realizado por Silva (2009).

## 2.2 Ensaio *Allium cepa*

No ensaio com *A. cepa* foram testadas três concentrações da mistura de ácido ursólico e ácido oleanólico: 0,1, 0,01 e 0,0001  $mg.mL^{-1}$ , diluídas em DMSO 0,1% (dimetilsulfóxido). A água destilada e o DMSO 0,1% (solvente) foram usados como controles negativos enquanto o MMS (metil metano-sulfonato,  $4 \times 10^{-4}$  Mv), uma droga de ação clastogênica, e o herbicida Trifluralina (0,84 ppm de princípio ativo), uma substância de ação aneugênica, foram selecionados como controle positivo.

As sementes de *A. cepa* (Vale Ouro - IPA 11), fornecidas pelo Instituto Agrônomo de Pernambuco – IPA, foram germinadas em placas de Petri com papel de filtro umedecido com água destilada (150 sementes/placa) a  $25 \pm 5$  °C. Após atingirem cerca de 1 cm de comprimento, foram transferidas para placas de Petri contendo as soluções teste. Após 24 h, as raízes das sementes foram medidas (análise da toxicidade), sendo uma parte destas fixadas em Carnoy (etanol: ácido acético; 3:1; v:v) e estocadas a  $-20$  °C até o momento de confecção das lâminas para análise da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade.

A outra parte das raízes de cada tratamento, com exceção dos controles positivos, foi transferida para placas de Petri contendo MMS para análise da antimutagenicidade da amostra. Após 24 h, todas as raízes foram coletadas, medidas e fixadas para avaliação de potencial antimutagênico.

As lâminas foram preparadas segundo Marin-Morales (2009). As raízes foram lavadas três vezes em água destilada (5 min cada) e hidrolisadas em HCl 1N a 60 °C por 10 min. A seguir, as raízes foram transferidas para frascos de vidro âmbar, contendo o Reativo de Schiff (Merck) e guardadas por 2 h em local escuro. As raízes foram posteriormente lavadas em água destilada até todo o excesso de corante ser retirado. Posteriormente, o meristema da raiz foi retirado e esmagado sobre a lâmina em uma gota de carmim acético (2%) e as lâminas montadas com Entellan.

Foram analisadas 10 lâminas por tratamento (500 células/lâmina, totalizando 5.000 células/tratamento) em microscópio óptico sob objetiva de 40x. Os seguintes parâmetros foram avaliados: o comprimento médio das raízes (toxicidade), índice mitótico (citotoxicidade), índice de alterações cromossômicas (genotoxicidade/antigenotoxicidade) e o índice de quebras cromossômicas e formação de micronúcleos (mutagenicidade/antimutagenicidade em nível cromossômico). Os resultados obtidos foram comparados com o controle negativo (água destilada) para todos os parâmetros avaliados.

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio-padrão amostral. A diferença significativa entre os tratamentos e o controle negativo foi calculada utilizando o teste estatístico de Kruskal-Wallis, seguido do teste a posteriori de Tukey ( $p < 0,05$ ), usando o programa Estatística (versão 8.0).

### 3. Resultados

Os valores do comprimento médio das raízes (VCMR) e do índice mitótico (IM) das células meristemáticas expostas às diferentes concentrações dos ácidos ursólico e oleanólico de *M. hirsuta* e ao DMSO 0,1% não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle negativo (água destilada) para nenhum dos tratamentos analisados (Tabela 1).

Tabela 1. Valor do comprimento médio das raízes (VCMR) e índice mitótico (IM), observadas em células meristemáticas após a exposição de raízes de *Allium cepa* a diferentes concentrações dos ácidos ursólico e oleanólico de *Mansoa hirsuta*.

Tratamentos		VCMR (cm)	IM
Controle negativo	Água destilada	2,03 $\pm$ 0,36	6,06 $\pm$ 0,55
	DMSO 0,1%	1,89 $\pm$ 0,65	6,36 $\pm$ 0,75
Ácidos ursólico e oleanólico	0,001 mg/mL	2,05 $\pm$ 0,42	6,5 $\pm$ 0,64
	0,01 mg/mL	2,11 $\pm$ 0,46	6,38 $\pm$ 0,65
	0,1 mg/mL	1,93 $\pm$ 0,53	5,42 $\pm$ 0,59
Controles positivos	MMS	2,1 $\pm$ 0,31	3,26 $\pm$ 0,51*
	TRI	1,49 $\pm$ 0,31*	4,07 $\pm$ 0,61*

MMS: metilmetano sulfonato; DMSO: dimetilsulfóxido; TRI: Trifluralina.\* $P < 0,05$  em comparação com o controle negativo (teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste a posteriori de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Após 24 horas de exposição às concentrações dos triterpenos pentacíclicos, as células meristemáticas de *A. cepa* apresentaram as seguintes alterações: presença de broto nuclear, micronúcleo, quebra cromossômica, C-metáfase, perda cromossômica e ponte cromossômica (Fig. 2). No entanto, a frequência dessas alterações cromossômicas e nucleares tanto nas três concentrações testadas quanto no DMSO 0,1% foi similar às detectadas no controle negativo (água destilada) (Tabela 2). Do mesmo modo, não houve aumento significativo no índice de genotoxicidade (total de alterações cromossômicas,

IGen) nem de mutagenicidade (MN + QC, IMut) com o aumento das concentrações dos compostos analisados (Tabela 2).

Em contrapartida, as células meristemáticas nos controles positivos apresentaram aumento significativo de alterações cromossômicas. O MMS induziu a formação de micronúcleos e de quebras cromossômicas, apresentando atividade clastogênica, como esperado, e a trifluralina induziu aumento significativo de brotos nucleares, perda cromossômica, ponte cromossômica, como esperado por sua ação aneugênica (Tabela 2).

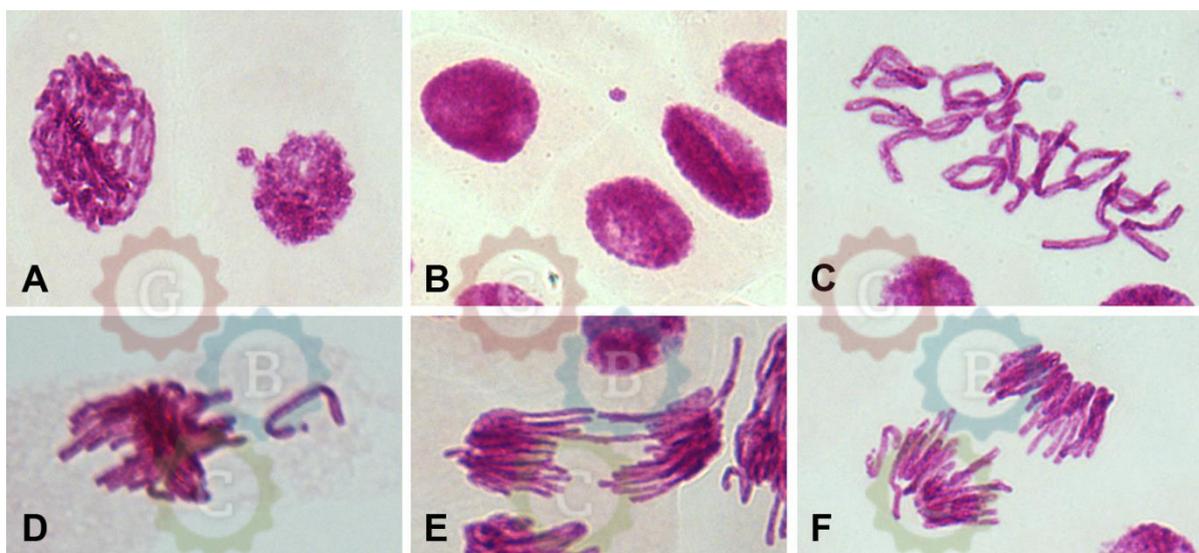


Fig. 2. Alterações cromossômicas em células meristemáticas de *Allium cepa* expostas aos ácidos ursólico e oleanólico de *Mansoa hirsuta*: (A) broto nuclear; (B) micronúcleo; (C) C-metáfase; (D) perda cromossômica; (E) ponte cromossômica; (F) anáfase com perda cromossômica.

Os resultados da avaliação da antimutagenicidade dos ácidos isolados de *M. hirsuta* sobre células de *A. cepa* após a exposição de raízes a diferentes concentrações dos ácidos ursólico e oleanólico seguida de exposição ao MMS demonstraram que todas as concentrações foram diferentes estatisticamente do controle negativo, indicando que os ácidos nas referidas concentrações não protegeram totalmente contra a ação clastogênica do MMS (Tabela 3).

Tabela 2. Frequência de alterações cromossômicas e nucleares presentes nas diferentes concentrações dos ácidos ursólico e oleanólico de *Mansoa hirsuta* analisadas com o sistema-teste *Allium cepa*.

Tratamento (mg/mL)	Alterações cromossômicas e nucleares/ 5.000 células meristemáticas				
	BN	PC	MN	QC	IMut

	(MN + QC)					
CN	<b>0,08 ± 0,24</b>	<b>0,08 ± 0,10</b>	<b>0,13 ± 0,14</b>	<b>0,06 ± 0,09</b>	<b>0,03 ± 0,03</b>	<b>0,07 ± 0,07</b>
DMSO 0,1%	0,04 ± 0,08	0,08 ± 0,13	0,30 ± 0,30	0,04 ± 0,08	0,06 ± 0,05	0,07 ± 0,04
<b>0,001</b>	0,00 ± 0,00	0,06 ± 0,13	0,29 ± 0,26	0,04 ± 0,07	0,26 ± 0,28	0,19 ± 0,15
<b>0,01</b>	0,02 ± 0,06	0,04 ± 0,12	0,18 ± 0,17	0,20 ± 0,20	0,1 ± 0,08	0,06 ± 0,04
<b>0,1</b>	0,02 ± 0,06	0,08 ± 0,10	0,18 ± 0,17	0,16 ± 0,22	0,01 ± 0,05	0,07 ± 0,04
MMS	<b>0,02 ± 0,06</b>	<b>0,40 ± 0,32</b>	<b>7,00 ± 3,94*</b>	<b>4,00 ± 1,27*</b>	<b>2,00 ± 0,83*</b>	<b>0,18 ± 0,10</b>
Trifluralina	<b>0,24 ± 0,20*</b>	<b>0,54 ± 0,37*</b>	<b>2,06 ± 1,37*</b>	<b>1,38 ± 1,51*</b>	<b>0,67 ± 0,37*</b>	<b>0,97 ± 0,65*</b>

Legenda: BN - Brotos Nucleares; PC - Perdas Cromossômicas; MN - Micronúcleos; QC - Quebras Cromossômica, IMut - Índice de Mutagenicidade; IGen - Índice de Genotoxicidade; CN - Controle Negativo (água destilada); DMSO: dimetilsulfóxido MMS- metilmetano sulfonato.

\*P<0,05 em comparação com o controle negativo (teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste a posteriori de Tukey).

Tabela 3. Frequência de alterações cromossômicas e nucleares presentes nas diferentes concentrações dos ácidos ursólico e oleanólico seguida de exposição ao metil metanosulfonato (MMS), avaliadas com o sistema-teste *Allium cepa*.

Tratamento (mg/mL)	Alterações cromossômicas e nucleares/ 5.000 células meristemáticas				
	BN	PC	MN	QC	IAntimut
CN (Água/Água)	<b>0,22 ± 0,20</b>	<b>0,00 ± 0,00</b>	<b>0,31 ± 0,38</b>	<b>0,05 ± 0,11</b>	<b>0,36 ± 0,43</b>
DMSO 0,1%	0,00 ± 0,00	0,06 ± 0,13	3,16 ± 2,58	0,84 ± 0,66	4,00 ± 2,66*
<b>0,001/MMS</b>	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,34 ± 0,65	0,16 ± 0,31	1,50 ± 0,83*
<b>0,01/MMS</b>	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,12	3,50 ± 3,18*	0,38 ± 0,38	3,88 ± 3,68*
<b>0,1/MMS</b>	0,00 ± 0,00	0,08 ± 0,10	2,3 ± 1,35*	0,18 ± 0,24	2,48 ± 1,48*
CP (Água/MMS)	<b>0,00 ± 0,00</b>	<b>0,04 ± 0,08</b>	<b>2,70 ± 2,6*</b>	<b>0,76 ± 0,69*</b>	<b>3,46 ± 2,57*</b>

Legenda: BN - Brotos Nucleares; PC - Perdas Cromossômicas; MN - Micronúcleos; QC - Quebras Cromossômica, IAntimut - Índice de Antimutagenicidade; IAntigen - Índice de Antigenotoxicidade; CN - Controle Negativo; DMSO: dimetilsulfóxido; MMS- metilmetano sulfonato; CP - Controle Positivo.

\*P<0,05 em comparação com o controle negativo (teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste a posteriori de Tukey).

#### 4. Discussão

*Mansoa hirsuta* é uma espécie típica da caatinga, que constitui uma importante planta medicinal utilizada popularmente na prevenção ou tratamento de diversas doenças e com potencial uso na fitoterapia, com destaque para a produção dos triterpenos pentacíclicos ácidos ursólico e oleanólico. Esses ácidos apresentam atividades biológicas importantes de efeito anti-hipertensor, anti-hiperlipidêmico, antioxidante e hipoglicêmico (Somova et al., 2003). Adicionalmente, em concentrações entre 2,5 e 10 µmol/L, os referidos ácidos apresentaram atividade antioxidante e protetora ao reduzir o número de quebras de DNA induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediante teste *in vitro* (Ovesná et al., 2006). Contudo, este é o primeiro

estudo relacionado aos potenciais efeitos genotóxicos e mutagênicos da mistura dos ácidos ursólico e oleanólico obtidos da fração acetato de etila de *M. hirsuta* sobre células eucarióticas.

Estudos prévios com essa mistura ácida analisaram a toxicidade aguda, mediante ensaio com *Artemia salina* e injeção peritoneal de 60 mg/kg em hamsters, observando-se uma baixa toxicidade (DL<sub>50</sub> 0,95 e 0,10 mg/mL, respectivamente) (Somova et al., 2003). No presente trabalho, não foi demonstrada toxicidade dos ácidos ursólico e oleanólico mediante análise do comprimento médio da raiz para as concentrações testadas em células meristemáticas de *A. cepa*, corroborando os resultados encontrados para os organismos-testes animais acima descritos.

As concentrações testadas da mistura de ácidos ursólico e oleanólico de *M. hirsuta* também apresentaram índice mitótico (IM), alterações cromossômicas e frequências de micronúcleos e de quebras cromossômicas semelhantes estatisticamente ao controle negativo. Uma redução do IM indicaria morte celular ou atraso da cinética de proliferação de células levando a alterações no desenvolvimento do organismo (Rojas et al., 1993). Por outro lado, um valor elevado de IM refletiria o aumento da divisão celular, o que pode levar a desordens na proliferação celular e ao aparecimento de tumores (Leme e Marin-Morales, 2009). Desse modo, a ausência de redução ou aumento do IM no presente estudo indica que esses compostos não são citotóxicos.

Adicionalmente, agentes físicos e químicos podem causar alterações estruturais ou numéricas dos cromossomos sendo clastogênicos, quando induzem a quebras e à formação de micronúcleos, e/ou aneugênicos, levando a perdas cromossômicas, atrasos, aderência, multipolaridade e C-metáfases (Fenech, 2000; Leme e Marin-Morales, 2009). Essas alterações são consideradas genotóxicas, quando são passíveis de reparo e não são necessariamente transmitidas para as células descendentes (Ventura-Camargo et al., 2011). Por outro lado, danos no material genético não reparáveis e conseqüentemente herdados pelas células filhas são considerados mutagênicos.

Em *A. cepa*, a mutagenicidade é analisada pela frequência de micronúcleos (MN) e quebras cromossômicas (QC). Os MN podem surgir em consequência de quebras e perdas cromossômicas, cujo DNA não é incluído ao núcleo principal durante a divisão celular (Fenech et al., 2011). Alternativamente, essas alterações podem surgir como resultado de poliploidização, na tentativa de eliminar quantidades excessivas de DNA do núcleo principal e assim recuperar as condições normais de ploidia (Fernandes et al., 2007). Contudo, no

presente trabalho, as concentrações testadas dos ácidos ursólico e oleanólico não alteraram significativamente a frequência de alterações cromossômicas nem a formação de MN e QC, podendo-se afirmar que a mistura dos ácidos ursólico e oleanólico (triterpenos pentacíclicos) da fração acetato de etila obtida das folhas da *M. hirsuta* não apresentaram efeito genotóxico nem mutagênico.

Este conjunto de dados é particularmente interessante, tendo em vista que, estudos prévios demonstraram citotoxicidade de 18,62% para a concentração de 0,01 mg.mL<sup>-1</sup> para a fração acetato de etila total das folhas da *M. hirsuta* (Silva, 2009). Por outro lado, no presente trabalho, a mistura ácida na mesma concentração não mostrou toxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade, nem mutagenicidade. Através de prospecção fitoquímica qualitativa da *M. hirsuta*, foi demonstrado que essa fração possui, além de triterpenos, outros metabólitos secundários como esteroides, fenóis, taninos, antocianinas, antocianidinas e flavonoides (Silva, 2009). Dessa forma, a atividade citotóxica da fração acetato de etila total previamente sugerida pode ser decorrente da atividade de um desses constituintes ou do efeito sinérgico entre eles (Maciel et al., 2002; Shitan, 2016). Assim, torna-se clara a importância da realização de bioensaios e avaliação da toxicidade de compostos ativos isoladamente, a fim de incrementar seu uso terapêutico e diminuir o risco de efeitos adversos (Rates, 2001).

Considerando que as concentrações avaliadas dos ácidos ursólico e oleanólico não foram tóxicas, citotóxicas, genotóxicas nem mutagênicas para as células meristemáticas de *A. cepa*, foi investigado seu potencial antimutagênico frente a danos no material genético induzidos pelo MMS. Este agente é reconhecido pela capacidade de induzir metilação e alquilação em macromoléculas como o DNA (Malini et al., 2010) e por seus efeitos clastogênicos e mutagênicos, aumentando a frequência de quebras cromossômicas, micronúcleos e outras alterações (Rank e Nielsen, 1997). De acordo com esses indicadores, foi constatado que as concentrações testadas dos ácidos de *M. hirsuta* não apresentaram atividade antimutagênica (quimioprotetora) com redução de danos ao DNA. No entanto, Resende et al. (2006) já relataram que os ácidos ursólico e oleanólico (80 mg/kg) apresentaram atividade protetora dos danos causados pelo agente antineoplásico doxorrubicina, com redução significativa da frequência de micronúcleos em ratos Balb/c, tratados com a mistura dos ácidos. Além disso, Niikawa et al. (1993) também demonstraram a ação antimutagênica desses compostos contra mutações induzidas por benzopireno usando teste de Ames. Embora esse mecanismo de proteção ainda não seja totalmente compreendido, estes ácidos podem ser uma nova



estratégia para o tratamento de diversas doenças, desde que comprovada sua eficácia e segurança.

## 5. Conclusão

A mistura dos ácidos ursólico e oleanólico isolados da fração acetato de etila da *M. hirsuta* não apresentam efeitos antimutagênicos, citotóxicos, genotóxicos ou mutagênicos nas concentrações testadas usando o sistema teste *A. cepa*.

Embora outros testes possam refinar o papel protetor dos ácidos ursólico e oleanólico isolados da *M. hirsuta*, os dados aqui apresentados apontam que essa espécie de planta nativa da caatinga representa uma fonte em potencial para novas drogas e outras formulações com eficácia terapêutica e reduzida toxicidade, sendo importante que medidas de conservação da flora nativa do semiárido nordestino sejam estimuladas para garantir, entre outros aspectos, a manutenção de fontes de medicina alternativa para as populações carentes dessa região do Brasil.

## Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pelo Departamento de Genética, Centro de Ciências Biológicas - UFPE, pelo Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação - UESB, FAPESB e pela CAPES.

## Referências

Albuquerque, U.P.; Araújo, E.L., El-Deir, A.C.A., Lima, A.L.A., Souto, A., Bezerra, B.M., Ferraz, E.M.N., Freire, E.M.X.F., Sampaio, E.V.S.B., Las-Casas, F.M.G., Moura, G.J.B., Pereira, G.A., Melo, J.G., Ramos, A.M., Rodal, M.J.N., Schiel, N., Lyra-Neves, R.M., Alves, R.R.N., Azevedo-Júnior, S.M., Júnior, W.R.T., Severi, W., 2012. Caatinga revisited: ecology and conservation of an important seasonal dry forest. *Scientific World Journal* 2012, 182-205.

Albuquerque, U.P., Medeiros, P.M., Almeida, A.L., Monteiro, J.M., Neto, E.M.F.L., Melo, J.G., Santos, J.P., 2007a. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. *Journal of Ethnopharmacology* 114, 325-354.

Albuquerque, U.P., Oliveira, R.F., 2007b. Is the use-impact on native caatinga species in Brazil reduced by the high species richness of medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 113, 156–170.

Agra, M.F., Silva, K.N., Basílio, J.L.D., França, P.F., Barbosa-Filho, J.M., 2008. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18, 472-508.

Bagatini, M.D., Silva, A.F., Tedesco, S.B., 2007. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 17, 444-447.

Batista-Filho, M., Rissin, A., 2003. Nutritional transition in Brazil: geographic and temporal trends. *Cadernos de Saúde Pública* 19, 181-191.

Canuto, K.M., Silveira, E.R., Bezerra, A.M.E., Leal, L.K.A.M., Viana, G.S.B., 2008. Uso de plantas jovens de *Amburana cearensis* A. C. Smith: alternativa para preservação e exploração econômica da espécie. *Embrapa Semi-Árido*, 1-24.

Çelik, T.A., Aslantürk, Ö.S., 2010. Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of *Inula viscosa* leaf extracts with *Allium* test. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010, 1-8.

Chaves, S.M., Reinhard, K.J., 2003. Paleopharmacology and Pollen: Theory, Method, and Application. *Memórias do Instituto do Oswaldo Cruz*, 98, 207-211.

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

Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A.T., Surralles, J., Crott, J.W., Parry, J., Norppa, Y.H., Eastmond, D.A., Tucker, J.D., Thomas, P., 2011. Molecular mechanisms of

micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis* 26, 125–132.

Fernandes, C.C., Mazzeo, D.E.C., Marin-Morales, M.A., 2007. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide, *Pest. Biochemistry and Physiology* 88, 252–259.

Fiskesjo, G., 1985. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas* 102, 99-112.

Gentry, A.H., 1980. Bignoniaceae. Part I. Tribes Crescentieae and Tourrentieae. *Flora Neotropica* 25, 1-130.

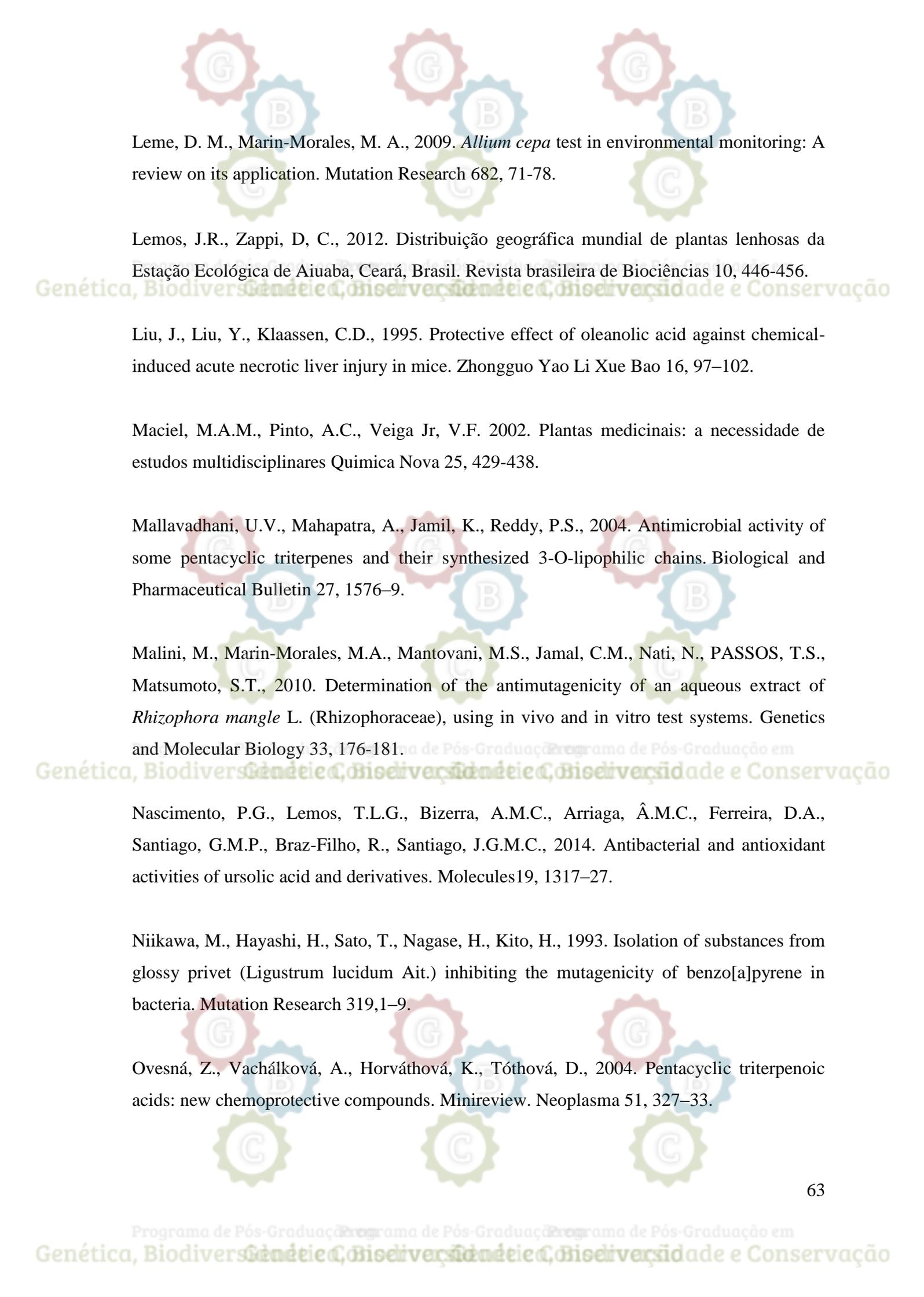
Grant, W.F., 1994. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. *Mutation Research* 310, 175-185.

Karaismailoglu, M.C., 2014. Investigation of the cytotoxic and genotoxic effects of *Artemisia annua* methanol extract with the *Allium* Test. *Ekoloji* 23, 64-74.

Kunkel, S. D., Elmore, C. J., Bongers, K. S., Ebert, S. M., Fox, D. K., Dyle, M. C., Bullard, S. A., Adams, C. M., 2012. Ursolic Acid increases skeletal muscle and brown fat and decreases diet-induced obesity, glucose intolerance and fatty liver disease. *PLoS ONE* 7, 1-8.

Kuras, M., Nowakowska, J., Sliwinska, E., Pilarski, R., Ilasz, R., Tykarska, T., Zobel, A., Gulewicz, K., 2006. Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium* Test induced by bark water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. *Journal of Ethnopharmacology* 107, 211–221.

Jesus, J.A., Lago, J.H.G., Laurenti, M.D., Yamamoto, E.S., Passero, L.F.D., 2015. Antimicrobial Activity of Oleanolic and Ursolic Acids: An Update. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2015, 1-14.



Leme, D. M., Marin-Morales, M. A., 2009. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. Mutation Research 682, 71-78.

Lemos, J.R., Zappi, D, C., 2012. Distribuição geográfica mundial de plantas lenhosas da Estação Ecológica de Aiuaba, Ceará, Brasil. Revista brasileira de Biociências 10, 446-456.

Liu, J., Liu, Y., Klaassen, C.D., 1995. Protective effect of oleanolic acid against chemical-induced acute necrotic liver injury in mice. Zhongguo Yao Li Xue Bao 16, 97-102.

Maciel, M.A.M., Pinto, A.C., Veiga Jr, V.F. 2002. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares Quimica Nova 25, 429-438.

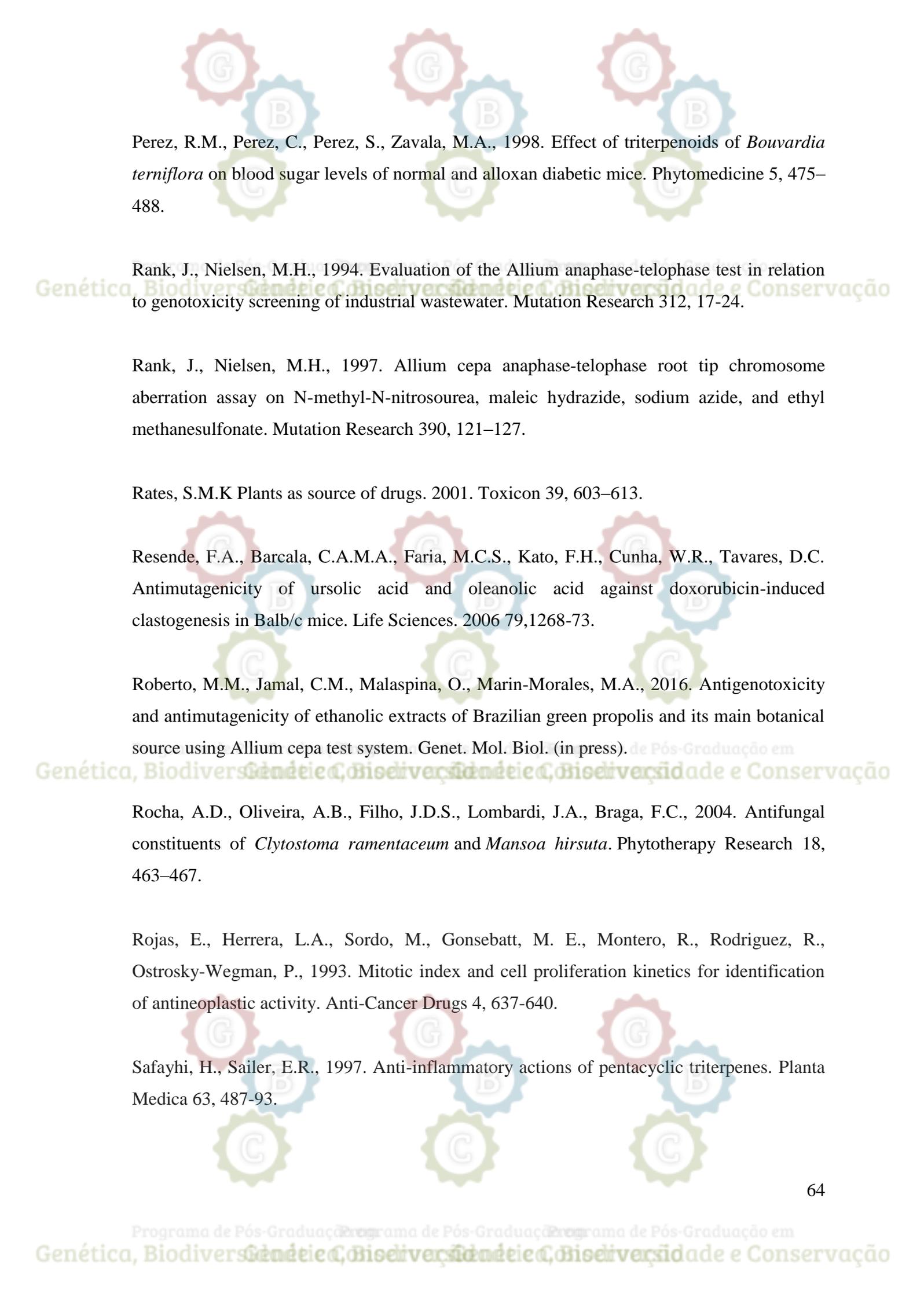
Mallavadhani, U.V., Mahapatra, A., Jamil, K., Reddy, P.S., 2004. Antimicrobial activity of some pentacyclic triterpenes and their synthesized 3-O-lipophilic chains. Biological and Pharmaceutical Bulletin 27, 1576-9.

Malini, M., Marin-Morales, M.A., Mantovani, M.S., Jamal, C.M., Nati, N., PASSOS, T.S., Matsumoto, S.T., 2010. Determination of the antimutagenicity of an aqueous extract of *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae), using in vivo and in vitro test systems. Genetics and Molecular Biology 33, 176-181.

Nascimento, P.G., Lemos, T.L.G., Bizerra, A.M.C., Arriaga, Â.M.C., Ferreira, D.A., Santiago, G.M.P., Braz-Filho, R., Santiago, J.G.M.C., 2014. Antibacterial and antioxidant activities of ursolic acid and derivatives. Molecules 19, 1317-27.

Niikawa, M., Hayashi, H., Sato, T., Nagase, H., Kito, H., 1993. Isolation of substances from glossy privet (*Ligustrum lucidum* Ait.) inhibiting the mutagenicity of benzo[a]pyrene in bacteria. Mutation Research 319,1-9.

Ovesná, Z., Vachálková, A., Horváthová, K., Tóthová, D., 2004. Pentacyclic triterpenoic acids: new chemoprotective compounds. Minireview. Neoplasma 51, 327-33.



Perez, R.M., Perez, C., Perez, S., Zavala, M.A., 1998. Effect of triterpenoids of *Bouvardia terniflora* on blood sugar levels of normal and alloxan diabetic mice. *Phytomedicine* 5, 475–488.

Rank, J., Nielsen, M.H., 1994. Evaluation of the *Allium* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. *Mutation Research* 312, 17-24.

Rank, J., Nielsen, M.H., 1997. *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. *Mutation Research* 390, 121–127.

Rates, S.M.K Plants as source of drugs. 2001. *Toxicon* 39, 603–613.

Resende, F.A., Barcala, C.A.M.A., Faria, M.C.S., Kato, F.H., Cunha, W.R., Tavares, D.C. Antimutagenicity of ursolic acid and oleanolic acid against doxorubicin-induced clastogenesis in Balb/c mice. *Life Sciences*. 2006 79,1268-73.

Roberto, M.M., Jamal, C.M., Malaspina, O., Marin-Morales, M.A., 2016. Antigenotoxicity and antimutagenicity of ethanolic extracts of Brazilian green propolis and its main botanical source using *Allium cepa* test system. *Genet. Mol. Biol.* (in press).

Rocha, A.D., Oliveira, A.B., Filho, J.D.S., Lombardi, J.A., Braga, F.C., 2004. Antifungal constituents of *Clytostoma ramentaceum* and *Mansoa hirsuta*. *Phytotherapy Research* 18, 463–467.

Rojas, E., Herrera, L.A., Sordo, M., Gonsebatt, M. E., Montero, R., Rodriguez, R., Ostrosky-Wegman, P., 1993. Mitotic index and cell proliferation kinetics for identification of antineoplastic activity. *Anti-Cancer Drugs* 4, 637-640.

Safayhi, H., Sailer, E.R., 1997. Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes. *Planta Medica* 63, 487-93.

Shitan, N. 2016. Secondary metabolites in plants: transport and self-tolerance mechanisms. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 4,1-11.

Silva, D. M., 2009. Perfil metabolômico da *Mansoa hirsuta* D.C.(Bignoniaceae). Alagoas: Universidade Federal de Alagoas. Dissertação. Dissertação de mestrado em Química e Biotecnologia. 126 p.

Silva, D.M., Sant'Ana, A.E.G., Castro, M.M.S., Queiroz, L.P., Soares, M.B., Costa, J.F.O. . Isolamento de triterpenos pentacíclicos: ácido ursólico e oleanólico, e fitosteróides: estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol extraídos das folhas da *Mansoa hirsuta* D.C. Bignoniaceae, para aplicação em formulações de suplementos, alimentos funcionais e fitoterápicos. BR. Pat 102015008180, 01 abr. 2015. 19p.

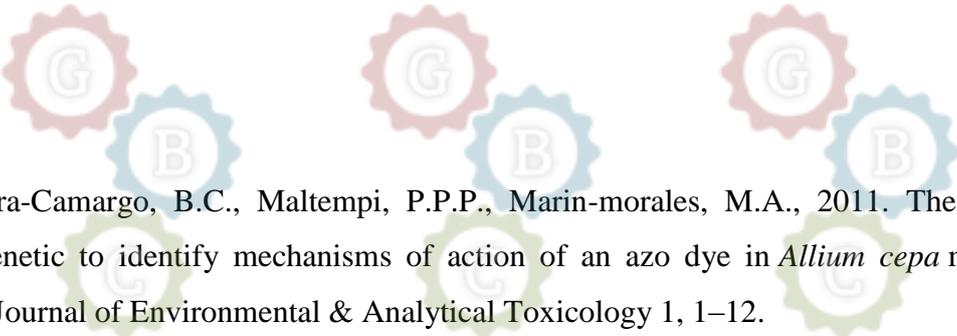
Silva, F. C., Duarte, L. P., Vieira Filho, S. A., 2014. Celastráceas: Fontes de Triterpenos Pentacíclicos com Potencial Atividade Biológica. *Revista Virtual de Química* 6, 1205-1220.

Silva, L.W.S., Hora, F.L., Silva, S.J., Ferraz, T.F., Santos, D.C.L., França, C.S., Santana, S., Ribeiro, L.V.B., Aguiar, D.S, 2012. Fitoterapia: uma tecnologia de cuidado proximal comunitária à pessoa idosa e sua família – práticas populares aliadas aos conhecimentos científicos. *Revista Kairós Gerontologia* 15, 35-53.

Somova, L.O., Nadar, A., Rammanan, P., Shode, F.O. 2003. Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension. *Phytomedicine* 10, 115-21.

Sultana, N., Ata, A. 2007. Oleanolic acid and related derivatives as medicinally important compounds. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 23, 739–756.

Vasconcelos, M.A., Royo, V.A., Ferreira, D.S., Crotti, A.E., Andrade e Silva, M.L., Carvalho, J.C., Bastos, J.K., Cunha, W.R. 2006. *In vivo* analgesic and anti-inflammatory activities of ursolic acid and oleanolic acid from *Miconia albicans* (Melastomataceae). *Zeitschrift fur Naturforschung C* 61, 477-482.



Ventura-Camargo, B.C., Maltempi, P.P.P., Marin-morales, M.A., 2011. The use of the cytogenetic to identify mechanisms of action of an azo dye in *Allium cepa* meristematic cells. *Journal of Environmental & Analytical Toxicology* 1, 1–12.

Yin, M.C., 2015. Inhibitory effects and actions of pentacyclic triterpenes upon glycation. *BioMedicine* 5, 1- 13.

Zoghbi, M.G.B., Ramos, L.S., Maia, J.G.S., Silva, M.L., Luz, A.I.R., 1984. Volatile sulfides of the Amazonian garlic bush. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 32, 1009-1010.



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

## 7 CONCLUSÕES GERAIS

- A *Mansoa hirsuta* D.C. é uma importante planta medicinal típica do semiárido nordestino com compostos bioativos de interesse na medicina popular, com destaque para a presença dos ácidos ursólico e oleanólico.
- Confirmando essa afirmação, os resultados desse estudo verificaram o potencial antioxidante, citoprotetor e hipoglicemiante das folhas de *M. hirsuta*.
- A mistura dos ácidos ursólico e oleanólico isolados dessa espécie de Bignoniaceae também não foi antimutagênica, tóxica, citotóxica, genotóxica nem mutagênica em sistemas teste de *Allium cepa*.
- A importância da *M. hirsuta* na medicina popular, sua aparente eficácia farmacológica e baixa toxicidade dos compostos analisados, reforçam a importância da flora nativa do semiárido brasileiro como fonte de novos fármacos e fitoterápicos.
- Diante do potencial medicinal das espécies nativas do Brasil, medidas de conservação da biodiversidade devem ser incentivadas de forma a proteger o patrimônio farmacológico, ainda pouco conhecido, antes que espécies e bioprodutos possam ser extintos.