



Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul  
Unidade Universitária de Dourados  
Programa de Pós- Graduação em Recursos Naturais

---

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E DA  
CITOTOXICIDADE DO EXTRATO AQUOSO DE  
*Aristolochia triangularis* (CHAM)**

José Darlan Alves da Silva

Dourados – MS  
Outubro/2017



**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E DA  
CITOTOXICIDADE DO EXTRATO AQUOSO DE  
*Aristolochia triangularis* (CHAM)**

José Darlan Alves da Silva (Discente)  
Dr<sup>a</sup>: Claudia Andrea Lima Cardoso (Orientadora)  
Dr: Cláudio Rodrigo Nogueira (Coorientador)

“Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Recursos Naturais, área de concentração em Recursos Naturais, da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais”.

Dourados – MS  
Outubro/2017



S58<sup>a</sup>

Silva, José Darlan Alves

Avaliação do potencial antioxidante e da citotoxicidade do extrato aquoso de *Aristolochia triangularis* (CHAM) / José Darlan Alves da Silva. Dourados, MS: UEMS, 2017. 39p. ; 30cm.

Dissertação (Mestrado) – Recursos Naturais – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Unidade Universitária de Dourados, 2017.

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Andrea Lima Cardoso.

1. Aristolochiaceae. 2. *Artemia salina*. 3. Compostos fenólicos . I. Título.

CDD 23.ed. 583.922

**“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas”. (Claude Lévi-Strauss)**

**Dedico** primeiramente a Jesus,

Aos meus pais José Alves da Silva e Francisca das Chagas Silva dos Santos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado força, saúde e proteção durante essa caminhada.

A toda minha família, meus pais José Alves e Francisca das Chagas, meus irmãos Francisco das chagas, José Carlos, Raquel, Michelle, Keila Cristina e Ana clara, por todo carinho, compreensão, conselhos e apoio em todos os momentos.

Agradeço a minha esposa, Marianny de Oliveira Silva, pelo incentivo, paciência, amizade e amor. Pela busca conjunta na realização dos meus sonhos, pelo apoio nas horas difíceis desta jornada.

A Profª Drª Claudia Andrea Lima Cardoso, minha orientadora, por toda dedicação, ensinamentos e principalmente pela confiança em mim depositada.

Ao coorientador, Prof Dr Cláudio Rodrigo Nogueira, pelo apoio, ensinamentos, confiança, conselhos, pelos incentivos e por acreditar em minha pessoa.

A todos os professores do programa de Pós- Graduação em Recursos Naturais-PGRN da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, que contribuíram para minha formação.

Ao professor Dr. Bruno do Amaral Crispim e Luiza Flávia Veiga Francisco pela oportunidade e a dedicação na realização do teste de *Allium cepa*.

A Profª Drª Silvia Cristina Heredia Vieira, pela amizade, apoio e incentivo nessa jornada.

Ao Me. Joelcio Freitas da Universidade Federal do Espírito Santo, pela ajuda na identificação do material botânico.

Aos meus colegas Maria Mascarenhas, Adriana e William Andrade, pelos momentos de estudos e descontração vividos. Vocês têm uma parte importante no meu coração.

A minha eterna amiga Jaqueline da Silva Santos, por ter me apoiado em todos os momentos dessa jornada, inclusive dando abrigo em seu apartamento. Obrigado por tudo Jaqueline. Você faz parte dessa caminhada.

A minha eterna diretora Ana Lucia e Ivonete Rodrigues, por sempre acreditar e confiar em minha pessoa e obrigado pelo apoio financeiro que vocês me incentivaram nessa jornada.

A Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, por intermédio do Programa de Pós- Graduação em Recursos Naturais, pela oportunidade concedida e por proporcionar meu crescimento pessoal e acadêmico.

Aos órgãos de fomento: CNPq, CAPES, FUNDECT, pelo apoio concedido.

Enfim, a todos aqueles que ajudaram direta ou indiretamente para que este trabalho se concretizasse.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>7</b>
<b>CAPITULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</b>	<b>8</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>8</b>
Gênero <i>Aristolochia</i> L.....	9
<i>Aristolochia triangularis</i> Cham.....	9
<b>Objetivo.....</b>	<b>11</b>
Objetivo Geral.....	11
Objetivos Específicos.....	11
<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>12</b>
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>15</b>
<b>AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DO EXTRATO AQUOSO DE <i>Aristolochia triangularis</i> (CHAM).....</b>	<b>15</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>16</b>
<b>2. Metodologia.....</b>	<b>18</b>
2.1 Coleta, identificação e processamento do material vegetal.....	18
2.2 Preparo dos extratos.....	18
2.3 Reagentes e equipamentos utilizados.....	18
<b>3. Atividade Antioxidante.....</b>	<b>19</b>
3.1 Método de Redução do Ferro FRAP.....	19
<b>4. Teste de toxicidade em <i>Artemia salina</i>.....</b>	<b>20</b>
<b>5. Bioensaio <i>Allium cepa</i>.....</b>	<b>20</b>
<b>6. Quantificação dos metabólitos secundários.....</b>	<b>21</b>
6.1 Compostos fenólicos.....	21
6.2 Taninos.....	22
<b>Resultados e Discussão.....</b>	<b>23</b>
<b>Conclusão.....</b>	<b>29</b>
Referências Bibliográficas.....	30



## RESUMO

A utilização de plantas na medicina tradicional, pela população, é uma prática comum. *Aristolochia triangularis* é uma planta amplamente utilizada na medicina tradicional. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial antioxidante, toxicidade e efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do extrato aquoso de *A. triangularis*. A atividade antioxidante do extrato foi de 391,14  $\mu\text{M/g}$  quando avaliada pelo método de redução de íons de ferro (FRAP). O extrato aquoso de *A. triangularis* apresentou toxicidade empregando como modelo *Artemia salina* com  $\text{DL}_{50}$  de 370,58  $\mu\text{g/ mL}$ . O extrato aquoso de *A. triangularis* causou redução de 63,65 % no índice de germinação, mostrou efeito antimutagênico na concentração de 2000  $\mu\text{g/ mL}$  e não mostrou efeito genotóxico em sementes de *A. cepa*. Os teores de compostos fenólicos e taninos foram de 52,67  $\text{mg/ g}$  e 0,02  $\text{mg/ g}$ , respectivamente.

**Palavras-chave:** Aristolochiaceae, *Artemia salina*, Compostos fenólicos

## ABSTRACT

The use of plants in traditional medicine by the population is a common practice. *Aristolochia triangularis* is a plant widely used in traditional medicine. Thus, the present study aimed to evaluate the antioxidant potential, toxicity and cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of the aqueous extract of *A. triangularis*. The antioxidant activity of the extract was 391.14  $\mu\text{M} / \text{g}$  when evaluated by the iron ion reduction method (FRAP). The aqueous extract of *A. triangularis* showed toxicity using *Artemia salina* with  $\text{LD}_{50}$  of 370.58  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . The aqueous extract of *A. triangularis* caused a reduction of 63, 65% in the germination index, showed antimitotic effect at the concentration of 2000  $\mu\text{g} / \text{mL}$  and showed no genotoxic effect in *A. cepa* seeds. The contents of phenolic compounds and tannins were 52.67  $\text{mg} / \text{g}$  and 0.02  $\text{mg} / \text{g}$ , respectively.

**Key words:** Aristolochiaceae, *Artemia salina*, Phenolic compounds.

## CAPITULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS

### Introdução

Diversos grupos culturais utilizam as plantas como recurso terapêutico, como forma alternativa ou complementar aos tratamentos da medicina tradicional (DORIGONI et al., 2001).

A utilização de plantas na medicina tradicional é uma prática comum entre as populações, sendo considerada uma alternativa importante para muitas populações que não têm acesso a medicamentos sintéticos devido ao alto custo (SILVA & SOUZA, 2007; SILVA et al., 2012).

São inúmeros e diferentes os componentes químicos das plantas, na qual, as propriedades curativas e alimentares estão relacionadas com diferentes componentes (LYON, 1981). As plantas medicinais apresentam constituintes ativos (como carboidratos, lipídeos, proteínas e peptídeos) que são de origem do metabolismo primário e outros ao metabolismo secundário (como compostos fenólicos, lignóides, flavonoides, cumarinas, alcalóides entre outros) (DA CUNHA et al., 2007).

De acordo com estudos científicos realizados com plantas medicinais ao longo dos anos, algumas plantas medicinais já receberam confirmação das ações terapêuticas, entre elas: *Baccharis trimera* (Less.) DC. (carqueja), *Bauhinia forficata* Link. (pata de vaca), *Salvia Officinalis* L. (salvia), *Mormodica charantia* L. (melão de São Caetano), *Phyllanthus niruri* L. (quebra-pedra) e *Myrcia sphaerocarpa* DC. (insulina vegetal), *A. cymbifera* (GROVER et al., 2002; LINO et al., 2004; BARBOSA et al., 2005; SATHISHSEKAR & SORIMUTHUS, 2005; BORGES et al., 2008; CARVALHO et al., 2008; CUNHA et al., 2010).

A família Aristolochiaceae é composta por aproximadamente 600 espécies, distribuídas em quatro gêneros: *Saruma* (monotipo), *Asarum* (86 espécies), *Thottea* Rottboele (30 espécies) e *Aristolochia* (400 espécies) (CAPELLARI JR, 2001). Muitas espécies da família Aristolochiaceae são usadas na medicina popular, demonstrando grande potencial terapêutico como, *A. triangularis* utilizada para tratamentos de diabetes, gripe, infecções e doenças do sistema gastrointestinal (VENDRUSCOLO & MENTZ, 2005; BOLSON et al., 2014).

No entanto, em muitos países é proibida a comercialização de ervas medicinal de espécies do gênero *Aristolochia*, devido as suas propriedades nefrotóxicas, carcinogênicas e mutagênicas, que podem ocasionar á nefropatia progressiva em humanos (MEINL & PABEL, 2006).

### **Gênero *Aristolochia* L.**

O gênero *Aristolochia* L. no Brasil é composto por aproximadamente 100 espécies de ervas trepadeiras, com distribuição predominantemente tropical e subtropical (AHUMADA, 1967; GONZÁLEZ, 1997; KELLY, 1998; WANKE et al., 2007; BARROS et al., 2015). No estado de Mato Grosso do Sul foram descritas 16 espécies do gênero *Aristolochia* L., incluindo a ocorrência da espécie *A. triangularis* (BARROS et al., 2015).

As várias espécies do gênero *Aristolochia* no Brasil são usadas na medicina tradicional e homeopática geralmente na forma de decoto ou extratos etanólicos administrados via oral (LOPES et al., 1991). A decocção de raízes das espécies de *Aristolochia* L. é empregado externamente no tratamento de orquites e doenças de peles, enquanto que o pó dessas é aplicado para auxiliar a cicatrização de ulcerações crônicas e no tratamento de lúpus (MACHADO, 2009).

Muitas espécies de *Aristolochia* L. são usadas para tratamentos antiasmático, anti-inflamatórios, doenças cardiovasculares, analgésico, anticancerígeno e neurotoxicidade, entre outros (YU et al., 2005; MACHADO & LOPES, 2008; HEIRICH et al., 2009; HUANG et al., 2014)

De acordo com a literatura cerca de 60 espécies de *Aristolochia* L. já foram exploradas quimicamente, e as principais classes de metabólitos secundários encontrados foram: ácidos aristoloquicos, aporfina, Amidas, benzilisoquinolinas, isoquinolonas, clorofilas, terpenoides, Lignanais, éteres bifenílicos, flavonóides, tetralones, benzenóides e esteroides (LEITÃO & KAPLAN, 1992; LOPES et al., 2001).

### ***Aristolochia triangularis* Cham.**

A espécie *A. triangularis* (Figura 1) é uma trepadeira perene nativa do Brasil tendo o seu domínio geográfico na região Norte, Centro- Oeste, Sudeste e Sul, sendo conhecida popularmente como cipó- mil- homem, cipó- jarrinha, jarrinha e erva – cobrinha (BARROS et al., 2015)



**Figura 1.** *Aristolochia triangularis* Cham. Fonte: Autor

tor.

É encontrada frequentemente nos biomas da Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica, é conhecida por possuir poderes curativos e pelo seu uso em rituais religiosos. Os indígenas a usava na ponta das flechas, devido á aristoloquina, que possui um alto poder tóxico (HOEHNE, 1978; POTT & POTT, 1994; GUARIM NETO, 1987).

O caule e as raízes de *A. triangularis* são utilizados como antitérmico, antisséptico, depurativo, diurético, digestivo, sedativo, antídoto ofídico e abortivo, indicado também na medicina popular para tratamento contra amenorreia, nevralgia facial, prisão-de-ventre, indigestão e febre intermitentes da malária (CORRÊA et al.,1994 ; CRUZ, 1965). Segundo Scalon et al. (2007) relataram que o caule e as raízes de *A. triangularis* contém diversas propriedades etnofarmacológicas, segundo o conhecimento tradicional, como antisséptica, digestiva, diurética, depurativa e sedativa. Sendo empregada ainda como antídoto ofídico e podendo atuar como abortivo (BEVILAQUA et al., 2007).

De acordo com Bevilaqua et al. (2007) as folhas de *A. triangularis* apresentam atividade bactericida, cicatrizante, anti-úlceras, anti-inflamatória, antirreumática e anti-helmíntica na medicina popular (FENNER et al., 2006).

Estudo realizado com as raízes e a parte aérea de *A. triangularis*, proporcionou o isolamento de nerolidol, lignanas e diterpenos (RUCHER et al., 1981, LOPES et al., 1989).

## **Objetivo**

### **Objetivo Geral**

Avaliar o potencial antioxidante, citotóxico, genotóxico e mutagênico do extrato aquoso de folhas de *A. triangularis*.

### **Objetivos Específicos**

- Determinar a atividade antioxidante utilizando o método de redução do ferro (FRAP) no extrato aquoso de *A. triangularis*;
- Avaliar a toxicidade do extrato aquoso de *A. triangularis* empregando com modelo à *A. salina*;
- Determinar o efeito citotóxico, genotóxico e mutagênico do extrato aquoso de *A. triangularis* em ensaio com *A. cepa*.
- Avaliar os teores de compostos fenólicos e taninos do extrato aquoso de *A. triangularis*.

## Referências Bibliográficas

AHUMADA, L.Z. Aristolochiaceae. In: R. Reitz (ed). **Flora Ilustrada Catarinense**. Parte I, fasc. Aris. Herbário Barbosa Rodrigues. p. 1-27, 1975.

BARBOSA-FILHO, J.M.; VASCONCELOS, T. H. C.; ALENCAR, A. A.; BATISTA, L. M.; OLIVEIRA, R. A. G.; GUEDES, D. N.; FALCÃO, H. S.; MOURA, M. D.; DINIZ, M. F. F. M.; MODESTO-FILHO, J. Plants and their active constituents from South, Central and North America with hypoglycemic activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.4, p.392-395, 2005.

BARROS, F. D. E.; ARAÚJO, A. A. M.; FREITAS, J. Aristolochiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p. 1085-1091. 2015.

BEVILAQUA, G. A. P.; SCHIEDECK, G.; SCHWENGBER, J. E. Identificação e tecnologia de plantas medicinais da flora de clima temperado. **Circular Técnica**, n. 61, p. 1- 18. 2007.

BOLSON, M.; HEFLETER, S. R.; CHAVES, E. I. D.; JUNIOR, A. G.; JUNIOR, E. L. C. Ethno-medicinal study of plants used for treatment of human ailments, with residents of the surrounding region of forest fragments of Paraná. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 23, n. 161, p. 1-3, 2014.

BORGES, K.B.; BAUTISTA, H. B.; GUILERA, S. Diabetes - utilização de plantas medicinais como forma opcional de tratamento. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.5, p.12-20, 2008.

CARVALHO, J.C.T. Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. **Tecmedd**, p. 148- 159, 2008.

CORRÊA, J.C.; MING, L.C.; SCHEFFER, M.C. Cultivo de Plantas Medicinais, Condimentares e aromáticas. **FUNEP**, p. 125- 132, 1994.

CUNHA, A.M.; MENON, S.; COUTO, A. G.; BURGER, C.; BIAVATTI, M. W. Hypoglycemic activity of dried extracts of *Bauhinia forficata* Link. **Journal Phytomedicine**, v.17, n.1, p.37- 41, 2010.

CRUZ, G.L. O livro verde das plantas medicinais e industriais do Brasil. **Velloso**, p. 32-38, 1965.

DA CUNHA, A. P.; TEXEIRA, F.; DA SILVA, A. P.; ROQUE, O. R. Plantas na terapêutica- Farmacologia e ensaios clínicos. **Edição da Fundação Calouste Gulbenkian**. v. 2p. 476- 481, 2007.

DORIGONI, P.A.; GHEDINI, P. C.; FRÓES, L. F.; BAPTISTA, K. C.; ETHUR, A. B. M.; BALDISSEROTTO, B.; BURGE, M. E.; ALMEIDA, C. E.; LOPES, A. M. V.; ZACHIA, R. A. Levantamentos de dados sobre plantas medicinais de uso popular no município de São João do Polêsine. I- Relação entre enfermidades e espécies utilizadas. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, v.4, n.1, p. 69-79, 2001.

FENNER, R.; BETTI, A. H.; MENTZ, L. A.; RATES, S. M. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 3, p. 369-370, 2006.

GONZÁLEZ G., F. A. Hacia una filogenia de *Aristolochia* y sus congeneres neotropicales. **Caldasia**, v. 19, n. 1-2, p. 115-118, 1997.

GROVER, J.K.; YADAV, S.; VATS, V. Medicinal plants of India with antidiabetic potential. **Journal of Ethnopharmacology**, v.80, p.81-83, 2002.

GUARIM NETO, G. Plantas utilizadas na medicina popular do estado de Mato Grosso. **CNPq/ MCT**, p. 45-47, 1987.

HEINRICH, M.; CHAN, J.; WANKE, S.; NEINHUIS, C.; SIMMONDS, M.S.J. Local uses of *Aristolochia* species and content of nephrotoxic aristolochic acid 1 and 2-aglobal assessment based on bibliographic sources. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 125, n. 1, p.108-110, 2009.

HOEHNE, F.C. Plantas e substâncias tóxicas vegetais. São Paulo: **Instituto de Botânica de São Paulo**. P. 91- 95, 1978.

HUANG, T.C.; CHEN, S.M.; LI, Y.C.; LEE, J.A. Increased renalsemicarbazide-sensitive amine oxidase activity and methylglyoxal levels in aristolochic acid-induced nephrotoxicity. **Life Sci.**, v. 114, p.4-8, 2014.

KELLY, L. M. Phylogenetic relationships in *Asarum* (Aristolochiaceae) based on morphology and its sequences. **American Journal of Botany**, v. 85, n. 10, p. 1454-1455, 1998.

LEITÃO, G. G.; KAPLAN, M. A. C. Química do gênero *Aristolochia*. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 73, p. 65-69, 1992.

LINO, C.S.; DIOGENES, J. P.; PEREIRA, B. A.; FARIA, R. A.; ANDRADE, N. M.; ALVES, R. S.; DE QUEIROZ, M. G.; SOUSA, F. C.; VIANA, G. S. Antidiabetic activity of *Bauhinia forficata* extracts in alloxon diabetic rats. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.27, n.1125, p.125-127, 2004.

LOPES, L. M. X.; NASCIMENTO, I. R.; SILVA, T. Phytochemistry of the Aristolochiaceae family. **Research Advances in Phytochemistry**, v. 2, p. 108-109, 2001.

LOPES, A.S.; SILVA, M. de C.; GUILHERME, L.R.G. Acidez do solo e calagem. São Paulo: **Associação Nacional para Difusão de Adubos e Corretivos Agrícolas**, 3.ed, p. 15-17, 1991.

LOPES, M. X. ; VANDERLAN, S.B.; LIGIA, M. V. T.; TANIA, M. G. Terpenes from *Aristolochia triangularis*. **Phytochemistry**. v. 29, n 2, p. 660- 662, 1989.



LYON DE CASTRO. Teoria e pratica conforme a neuropatia publicações Europa-América Portugal. **Jornal Medicina Vegetal** p.121- 129, 1981.

MACHADO, M. B. **Estudo fitoquímico e biológico de *Aristolochia ridicula***. Tese (Doutorado em Química) - Programa de pós-graduação em química, Universidade Estadual Paulista, p. 163, 2009.

MACHADO, M. B.; LOPES, L. M. X. Tetraflavonoid and biflavonoids from *Aristolochia ridicula*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 18, p. 3095-3102, 2008.

MEINL, W.; PABEL, U.; OSTERLOH-QUIROZ, M.; HENGSTLER, J. G.; GLATTI, H.; **International Journal of Cancer**, v. 118, p. 1079- 1083 , 2006.

POTT, A.; POTT, V.J. Plantas do Pantanal. **Embrapa/SPI**, p. 317- 320, 1994.

RUCHER, G.; LANGMANN, B.; SIQUEIRA, N. S. Inhaltsstoffe von *Aristolochia triangularis*. **Journal of Medicinal Plant Research**. V. 41, p. 143- 149, 1981.

SATHISHSEKAR, D.; SORIMUTHUS, S. Beneficial effects of Momordica charantia seeds in the treatment al STZinduced diabetes in experimental rats. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v.28, n.6, p.978-983, 2005.

SCALON, S.P.Q.; SENE, P.A.L.; ZATTI, D.A.; MUSSURY, R.M.; SCALON FILHO, H. Temperatura, luz e substrato na germinação de sementes de cipó-mil-homens (*Aristolochia triangulares* Cham. Et Schl.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 4, p. 32-38, 2007.

SILVA, W. A.; FAGUNDES, N. C. A.; COUTINHO, C. A.; SOARES, A. C. M.; CAMPOS, P. V.; FIGUEIREDO, L. S. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais na cidade de São João da Ponte - MG. **BioFar - Revista de Biologia e Farmácia UFPB**, v. 7, n. 1, p. 122-131, 2012.

SILVA, J. O.; SOUZA, P. S. Levantamento etnobotânico das plantas medicinais utilizadas pela população da Vila Canaã região sudoeste – Goiânia,. 2007. Disponível em: <[http://anhanguera.edu.br/home/index2.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&gid=225&Itemid=1](http://anhanguera.edu.br/home/index2.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=225&Itemid=1)>. Acesso em: 21 set. 2017.

VENDRUSCOLO, G. S.; MANTZ, L.A. Estudo da concordância das citações de uso e importância das espécies e famílias utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, RS, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 2, p. 367-375. 2005.

WANKE, S.; JARAMILLO, M.A.; BORSCH, T.; SAMAIN, M.S.; QUANDT, D.; NEINHUIS, C. Evolution of Piperales - matK gene and trnK intron sequence data reveal lineage specific resolution contrast. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 42, n. 2, p. 477-487, 2007.

YU, L-L.; HUANG, R.; LV, Y. P.; ZHAO, Y.; CHEN, Y. A new flavonoid from *Aristolochia contorta*. **Pharmazie**, v. 60, p. 789-791, 2005.

## **CAPÍTULO II**

### **AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DO EXTRATO AQUOSO DE *Aristolochia triangularis* (CHAM)**

## 1. Introdução

As plantas medicinais são fontes inesgotáveis de compostos naturais bioativos e são em grande parte inexploradas em consideração ao número de espécies de plantas superiores (angiospermas e gimnospermas) (FELIX et al., 2016).

Os medicamentos provenientes de plantas são amplamente utilizados em todo o mundo, seja para tratamento de saúde primária ou como medicamentos complementares ou alternativos, sob a forma de extrato bruto, ou seja, misturas de compostos (XU et al., 2013). O uso de plantas pode ser ocasionado pela questão econômica e o difícil acesso a consultas médicas pelo Sistema Único de Saúde (SUS), como também pela difícil locomoção de pessoas que vivem em áreas rurais (VENDRÚSCOLO & MENTZ 2006).

O uso de plantas medicinais *in natura* na medicina popular é feita na forma de chás, preparadas por decocção ou infusão, macerados ou em forma de uso externo, como cataplasmas (GARLET, 2000). Também são utilizadas plantas secas na forma de chás ou em forma de medicamentos industrializados, como os fitoterápicos (POSSAMAI, 2000).

As espécies da família Aristolochiaceae são amplamente utilizadas na medicina popular na forma de chá para tratamento de micoses, doenças do sistema gastrointestinal, cardiovasculares, trato urinário inclusive como anti-inflamatório, estudos vem sendo desenvolvidos para comprovar a sua eficácia de acordo com o conhecimento popular (BOLSON et al., 2014).

Estudos etnobotânicos mostram que a espécie *A. triangularis* é muito utilizada na medicina popular. Um levantamento de plantas medicinais nativas na Fazenda Azulão em Dourados-MS apresentou segundo as informações tradicionais, que o chá do caule de *A. triangularis* possui potencial antitérmico, anti-inflamatório, sedativo, usado também para problemas digestivos e cólicas menstruais (BRATTI et al., 2013). Outros estudos indicam que o chá infuso ou decocção das folhas e do caule de *A. triangularis* são utilizados para tratamento de doenças nos ossos, machucados, cicatrizante, abortiva, febre, diarreia e convulsões epilépticas (ARAUJO; LEMOS, 2015; BOLSON et al., 2014).

Algumas atividades biológicas também já foram desenvolvidas com a espécie *A. triangularis*. De acordo com Buzatto et al. (2002) que avaliaram a atividade biológica dos constituintes voláteis de *A. triangularis* Cham. tendo como resultado, ausência de atividade antioxidante e antimicrobiana, apresentando efeito tóxico frente ao teste de *A. salina*.

Mongelli et al. (2000) realizaram estudo com extrato diclorometânico de *A. triangularis* que exibiu toxicidade, diante a linhagem de célula tumoral.

Estudo avaliou as atividades antiproliferativa e anti-herpética de extratos, frações e compostos isolados de *A. triangularis*, concluindo que as amostras do cipó são mais tóxicas que as obtidas de folhas, (Kratz et al., 2014).

No Brasil, várias são as pesquisas realizadas com plantas medicinais que vem contribuindo significativamente para o desenvolvimento e uso destas espécies vegetais, pois vem comprovando efeitos terapêuticos, possibilitando a utilização destas para tratamento de patologias (Kalluf, 2008).

Nesse sentido, o presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos, como também o potencial antioxidante do extrato aquoso de *A. triangularis*.

## **2. Metodologia**

### **2.1 Coleta, identificação e processamento do material vegetal**

As folhas de *A. triangularis*, foram coletadas no Horto de Plantas Medicinais - HPM da UFGD.

A identificação da planta foi realizada pelo Me. Joelcio Freitas (Universidade Federal do Espírito Santo) e por Me. Ivan Abreu (Universidade Federal da Bahia). A exsicata foi enviada para ser depositada no herbário da Universidade Federal do Espírito Santo. Em seguida, o material vegetal foi rasurado e armazenado a -20 °C, nos Laboratórios do Centro de Estudos em Recursos Naturais – CERNA, UEMS, Dourados-MS.

### **2.2 Preparo dos extratos**

O extrato aquoso de *A. triangularis*, foi preparado seguindo a mesma proporção utilizada na medicina popular (infuso: 20g de folhas/1L de água) descrita por (RODCRIGUES, 2007). O material vegetal foi imerso em água destilada, previamente aquecida a uma temperatura entre 90 a 100° C, e o resultante foi deixado em repouso por um período de 15 min, a temperatura ambiente (25°C), sendo, em seguida, filtrada. Após esse procedimento, o filtrado obtido foi congelado e, posteriormente, liofilizado.

### **2.3 Reagentes e equipamentos utilizados**

- Foram utilizados os reagentes: Folin-Ciocalteau (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Alemanha), quercetina (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Alemanha), vanilina (4% em metanole 8% de HCl em metanol) (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Alemanha), catequina (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Alemanha), Acetato de sódio trihidratado (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Alemanha), carbonato de sódio 2% (Merck Milipore<sup>®</sup>, EUA), acetona P. A (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Alemanha), ácido acético glacial P.A (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Alemanha), ácido clorídrico P.A (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Alemanha), álcool metílico P.A (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Alemanha), cloreto férrico hexahidratado (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Alemanha), TPTZ (2, 4, 6-Tris (2-piridil) -s-triazina) (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Alemanha), sulfato ferroso heptahidratado (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Alemanha), água destilada.
- Os equipamentos utilizados foram balança analítica (Shimadzu AY 220, Japão), banho- maria (ACB Labor, Alemanha), espectrofotômetro (Digital UV-Visível, Global

Trade Tecchology, Brasil), paquímetro (ZAAS), microscópio óptico (Binocular E100, Nikon) e liofilizador (CHRIST, ALPHA 1-2 LD, *plus*, Espanha).

### 3. Atividade Antioxidante

Foi avaliada a atividade antioxidante do extrato aquoso pelo método de redução dos íons de ferro (FRAP). O experimento foi realizado em uma sala sobre abrigo de luz, com uma temperatura controlada ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ). O teste foi realizado em triplicata.

#### 3.1 Método de Redução do Ferro FRAP

O extrato aquoso foi preparado em cinco diferentes diluições (67, 401, 668, 1336 e 2000  $\mu\text{g/mL}$ ). Para cada 90  $\mu\text{L}$  de cada amostra acrescentaram-se 270  $\mu\text{L}$  de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP. Os tubos foram homogeneizados em agitador magnético e mantidos em banho-maria a  $37^\circ\text{C}$  por 30 min. A leitura das amostras e do branco sendo usado o FRAP, foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm. A partir das absorbâncias obtidas das diferentes diluições do extrato aquoso foi plotada a absorbância no eixo Y e a diluição (mg/L) no eixo X para obtenção da equação da reta. O mesmo procedimento foi empregado para o padrão sulfato ferroso (500  $\mu\text{M}$  a 1500  $\mu\text{M}$ , 1.500  $\mu\text{M}$  e 2.000  $\mu\text{M}$ ) e foi plotado gráfico com as concentrações de sulfato ferroso ( $\mu\text{M}$ ) no eixo X e as respectivas absorbâncias no eixo Y, obtendo um  $R^2 = 0,9915$ ,  $a = 0,0006$  e  $b = 0,058$  e para calcular a equação da reta.

Para calcular a atividade, foi substituída na equação da reta do extrato a absorbância equivalente a 1.000  $\mu\text{M}$  do padrão sulfato ferroso. O valor obtido para o termo x corresponde à diluição da amostra (mg/L) equivalente a 1.000  $\mu\text{M}$  de sulfato ferroso.

$$y = ax + b$$

Onde,

y = Absorbância correspondente a 1.000  $\mu\text{M}$  de sulfato ferroso

x = Diluição da amostra (mg/L) equivalente a 1.000  $\mu\text{M}$  de sulfato ferroso

A partir do resultado encontrado (x), foi dividido por 1.000 para ter o valor em g. O resultado final foi calculado pela divisão de 1.000 ( $\mu\text{M}$ ) pelo valor de X(g) e

multiplicado por 1(g) para encontrar o valor final (Z) que é expresso em  $\mu\text{M}$  sulfato ferroso/g de extrato (RUFINO et al., 2007).

$$X(g) = x / 1.000$$

$$Z = 1.000 / X(g).1$$

#### **4. Teste de toxicidade em *Artemia salina***

O teste de toxicidade em *A. salina* Leach foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Meyer (1982).

Os cistos de *A. salina* foram incubados durante 48 horas em solução de sal marinho sintético (20g/L) e contendo 0,7g/L de bicarbonato de sódio (pH: 8), com iluminação (60W) e aeração constantes. A avaliação foi realizada em 5 concentrações: 67, 401, 668, 1.336 e 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para determinar a DL50. Para cada concentração testada foram realizadas três replicatas com 10 larvas do 2º estágio. O controle negativo (solução salina) e controle positivo (rutina) seguiram o mesmo procedimento. Ao término das 24 horas de incubação, foram analisadas as mortes dos indivíduos e calculada a DL50. Para determinação da dose letal para 50% (DL50) foram empregadas concentrações em função do % de mortalidade.

#### **5. Bioensaio *Allium cepa***

O extrato LAE foi testado nas seguintes concentrações: 67, 401, 668, 1.336 e 2.000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , e água destilada e herbicida trifluralina (84 ppm) foram usados como controle negativo e positivo, respectivamente. Para cada tratamento, utilizou-se uma placa de Petri contendo 60 sementes de *A. cepa* (cultivar Baía Periforme; ISLA®). As sementes foram tratadas em incubadora BOD a  $25 \pm 2^\circ \text{C}$  com controle de fotoperíodo (12 h claro: 12 h escuro) com os tratamentos por 96h. As sementes germinadas foram contadas manualmente e os tamanhos das raízes foram medidos com paquímetro digital (Digmess). Após, as raízes foram colocadas em solução fixadora de Carnoy [etanol e ácido acético (3: 1 v / v)], lavadas com água destilada, hidrolisadas em solução de HCl 1M mol/L a  $60^\circ \text{C}$  por 10 minutos em banho de água, e lavados com água destilada novamente, depois eles foram corados com o reagente de Schiff baseado no método Feulgen por 1h30min.

O potencial citotóxico foi baseado no índice de germinação (IG), bem como os índices de mitose (IM) e de morte celular (IMC). O índice de alteração cromossômica (IAC) foi avaliado por meio da contagem das alterações cromossômicas (brotamento nuclear, metáfase C, perda cromossômica, anafas multipolares, quebras cromossômicas, núcleos lobulados e pontes cromossômicas), enquanto os micronúcleos meristemáticos foram utilizados para calcular o índice de mutagenicidade (IMT). Todas as fórmulas estão descritas em FRANCISCO et al 2018. Para análise das alterações genéticas, foram observadas 5.000 células para cada tratamento em microscópio óptico. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, com posterior de Dunn, para comparações entre controle negativo e tratamentos e análise de variância (ANOVA), com teste de Germinação do Índice de Tukey a posteriori ( $\alpha = 0,05$ ). Todas as análises foram realizadas utilizando o software estatístico R (R Development Core Team 2017).

## **6. Quantificação dos metabólitos secundários**

Os ensaios foram realizados na temperatura controlada de 25 °C e em triplicata.

### **6.1 Compostos fenólicos**

O conteúdo de compostos fenólicos no extrato aquoso foi realizado baseado no método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (ANDRADE et al., 2007). O reagente de Folin-Ciocalteu, de coloração amarelo, forma um complexo de coloração azul na presença de agentes redutores, no caso os compostos fenólicos (SWAIN & HILLIS, 1959). O conteúdo de compostos fenólicos foi realizado baseado no método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (DJERIDANE *et al.*, 2006). Neste método uma alíquota de 100  $\mu$ L do extrato aquoso (2% m:v) foi adicionado 1,5 mL de solução aquosa de carbonato de sódio 20%, 0,5 mL de reagente de Follin-Ciocalteu (1:10 v/v) e 1 mL de água destilada. A solução reagiu por 30 minutos.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 760 nm. A concentração de compostos fenólicos foi calculada preparando uma curva analítica, empregando o ácido gálico como padrão, nas concentrações de 10, 25, 50, 75 e 100  $\mu$ g/mL. Com os dados foi desenvolvida a regressão linear e obtida a equação de reta, apresentando um coeficiente correlação linear ( $R^2 = 0,9992$ ), coeficiente angular ( $a = -0,012$ ) e coeficiente linear ( $b = 0,0014$ ). O resultado foi expresso em mg de ácido gálico por g de extrato liofilizado.



## 6.2 Taninos

Para determinação dos taninos condensados foi utilizado a reação da vanilina, conforme método de Broadhurst & Jones (1978), adaptado por Agostini-Costa et al. (1999). Foram adicionados 4 mL de reagente de vanilina (4% em metanole 8% de HCl em metanol), reagente preparado momentos antes da análise. Os tubos de ensaio foram pré-aquecidos em banho-maria a 30 °C por 30 min. Após essa etapa, foi adicionado 1 mL do aquoso em cada tubo. A reação foi mantida a 30° C por 20 minutos; a leitura da absorbância foi realizada a 500 nm. O mesmo procedimento foi realizado para o branco, sendo substituído 1 mL de infuso por 1 mL de água destilada. A quantificação foi feita por meio de curva de calibração externa, empregando-se a catequina como padrão, nas concentrações de 2,5, 5, 10, 20, 30 e 40 µg/mL e as respectivas absorbâncias foram lidas, obtendo um  $R^2 = 0,998$ ,  $a = 0,006$  e  $b = 0,0018$ . Os resultados foram expressos em mg de catequina por g de extrato liofilizado.

## Resultados e Discussão

A avaliação das propriedades antioxidantes do extrato aquoso de *A. triangularis*, foi realizada pelo o método de redução de íons de ferro (FRAP).

Atividade antioxidante do extrato aquoso de *A. triangularis*, usando o método de redução de íons de ferro (FRAP), apresentou uma elevada capacidade de redução férrica de 391,14  $\mu\text{M/g}$ . De acordo com a classificação de Wojdylo et al. (2007), os valores de FRAP podem ser apresentados como: muito baixo ( $<10 \mu\text{M/g}$ ), baixo (10-50  $\mu\text{M/g}$ ), bom (50-100  $\mu\text{M/g}$ ), elevado (100-500  $\mu\text{M/g}$ ) e muito elevado ( $>500 \mu\text{M/g}$ ).

Corroborando com o resultado, Borneo et al. (2009) avaliou a capacidade antioxidante do extrato aquoso de *A. argentina*, obtendo um elevado poder de redução férrica de  $265,8 \pm 34,9$  ( $\mu\text{M/g}$ ). Muddathir et al. (2017), analisou a capacidade antioxidante pelo método de redução de íons de ferro (FRAP) e constatou que o extrato metanólico de *A. bracteolata* possui alto poder de redução de íons de ferro, com  $400 \pm 0,031$  ( $\mu\text{M/g}$ ). Estudo realizado com extrato metanólico de *A. bracteata*, apresentou poder de redução férrico muito baixo de  $0,89(\mu\text{M/g})$  (SURVESWARAN et al., 2007).

O uso de plantas medicinais para o tratamento de doenças geralmente é relacionado com a crença de que elas apresentam baixa toxicidade devido a sua origem natural. As plantas medicinais, assim como os medicamentos químicos convencionais, possuem em suas substâncias que são responsáveis pelos efeitos biológicos, de acordo com a sua etnoindicação (MEDEIROS, 2014).

Além da substância química de uma planta, a toxicidade pode estar relacionada com as influências biogeográficas, à parte da planta utilizada para o preparo dos extratos, o solvente utilizado, bem como a variedade da planta (BEUTLER et al., 2008).

O bioensaio de letalidade com *A. salina* representa um ensaio biológico barato e simples para testar a bioatividade de extratos de plantas, que na maioria dos casos pode estar correlacionado com propriedades citotóxicas e antitumorais (MEYER et al., 1982).

MEYER et al. (1982) propõem que o grau de toxicidade apresentado por extratos vegetais sobre larvas de *A. salina*, é considerado ativo ou detentores de substâncias bioativas que tiverem um  $DL_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ . Seguindo essa classificação, o extrato aquoso de *A. triangularis* apresenta ativo, com  $DL_{50} = 370,58 \mu\text{g/mL}$ . De acordo com o estudo realizado com extratos metanólico, acetônico, clorofórmico e hexânico de *A. indica*,

o extrato acetônico apresentou mais ativo comparado com os outros, com DL<sub>50</sub> de 200 µg/mL (BHATNAGAR & MAHARANA, 2016).

Os índices de germinação (IG) das sementes de *A. cepa*, submetidas nas diferentes concentrações de 2000, 668, 401 e 67 µg/mL do extrato aquoso de *A. triangularis* são descritos na tabela 01. O controle negativo apresentou um IG de 100 %. No entanto, o teste de germinação pode constatar que houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as concentrações utilizadas. O controle positivo diferiu estatisticamente das concentrações de 401 e 67 (µg/mL) e não apresentou diferença significativa com relação às concentrações de 2000 e 668 (µg/mL).

**Tabela 01.** Potencial mutagênico, genotóxico e citotóxico do extrato aquoso de *A. triangularis* avaliados sobre o desenvolvimento de sementes de *A. cepa*.

TR (µg/mL)	IG %	IM %	IAC %	IMT %	IMC %
CN	100*	77,05*	0,12*	0,04*	0,02*
2000	36,35	59,73	0,24*	0,84	0,02*
668	38,72	63,92*	0,20*	0,00*	0,02*
401	63,42*	69,93*	0,14*	0,08*	0,05*
67	69,23*	70,71*	0,07*	0,02*	0,04*
CP	34,01	4,60	43,48	2,95	1,18

TR - Tratamento; IG- Índice de Germinação; IM - Índice Mitótico; IAC - Índice de Alteração Cromossômica; IMT - Índice de Mutagenicidade; IMC - Índice de Morte Celular; CP - Controle positivo; CN - Controle Negativo; \* Diferença significativa em comparação ao controle positivo (190 µL trifluralina/100 mL de água destilada).

As concentrações de 2000 e 668 µg/mL causaram uma inibição na germinação de cebola, enquanto que as concentrações 401 e 67 µg/mL causaram um aumento no processo quando comparado com o controle negativo (Tabela 1).

Segundo a classificação de Fiskesjo (1985), um agente para ser considerado citotóxico deve possuir a capacidade de redução superior a 50 % no índice de germinação de sementes de *A. cepa*, com relação ao controle negativo. Neste estudo, sementes tratadas com as diferentes concentrações do extrato aquoso de *A. triangularis*, apresentaram uma redução na porcentagem de germinação maior que 50%, nas concentrações de 2000 e 668 µg/mL, o que indica que extrato apresenta citotoxicidade nessas concentrações.

De acordo com Gatti et al. (2004), avaliando o percentual de germinação de alface e de rabanete, verificaram que o extrato aquoso de folhas de *A. esperanzae* reduziu a germinação em 50 e 100%, quando comparado ao tratamento controle negativo.

Os compostos alelopáticos possuem a característica de inibir a germinação e o crescimento, pois os mesmos interferem na divisão celular, permeabilidade de membranas e na ativação de enzimas (RODRIGUES et al., 1992). Sendo assim, a redução na germinação das sementes frente ao aumento das concentrações utilizadas indica que o extrato de *A. triangularis* apresenta ser tóxico, podendo ser devido à presença da ação alelopática em sementes de *A. cepa*.

Estudos com compostos alelopáticos e a identificação das plantas que apresentam princípios ativos capazes de causar algum dano é de extrema importância, tanto na utilização de extratos capazes de evitar plantas daninhas para evitar ou diminuir o uso de herbicidas comerciais, quando nas práticas culturais e de manejos mais corretos que acabe com a interferência destes compostos no crescimento de outras (CARVALHO et al., 1996; GATTI et al., 2004; IGANCI et al., 2006).

Os índices mitóticos (IM) variaram com a alteração da concentração (Tabela 1). Neste estudo a maioria das concentrações apresentou diferença significativa com relação ao controle positivo com exceção da concentração de 2000 µg/mL que apresentou diminuição significativa do IM em relação ao controle negativo, sugerindo que essa concentração interferiu no ciclo normal da célula ocasionando a inibição da divisão celular, demonstrando que a concentração de 2000 µg/mL possui efeito citotóxico. Entre as concentrações ocorreu diferença estatisticamente significativa entre as concentrações de 401 e 67 µg/mL em relação à concentração de 2000 µg/mL.

AMAT et al. (2001), avaliaram os parâmetros citológicos induzidos por extratos aquosos de sete plantas usadas como agentes anti-hipertensivos na medicina popular da Argentina, entre essas plantas foi avaliado o extrato aquoso de *A. triangularis*, que apresentou redução no IM, apresentando diferença significativa com relação ao controle negativo.

Estudo realizado com extrato aquoso de *A. elegans*, foi observado uma redução no índice mitótico e no crescimento radicular de *A. cepa*, com o aumento da concentração do extrato (PAULA et al., 2015). Mendes et al. (2012) não observaram diferença significativa de *A. birostris* em células de *A. cepa*, embora tenha ocorrido um aumento considerável na prófase em todas as concentrações do extrato alcoólico.

Segundo Carvalho et al. (2005), a citotoxicidade de um composto pode ser determinada pelo aumento ou diminuição do IM das células submetidas a sua exposição. De acordo com Christopher & Kapoor (1988), a redução do IM pode ser ocasionada

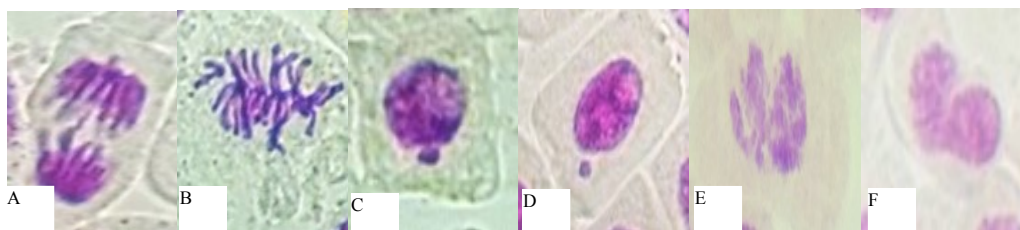
devido à obstrução do início da prófase, impedindo uma ou mais fases mitóticas, ou o abrandamento da taxa de progressão celular através da mitose.

O extrato aquoso de *A. triangularis* não apresentou efeitos genotóxico com análise de Índice de Alteração Cromossômica (IAC), como também o índice de morte celular (IMC) do extrato não apresentaram valores estatisticamente significativos em relação ao controle negativo (Tabela1).

De acordo com Fão (2012), os efeitos genotóxicos podem ser observados por meio de algumas aberrações cromossômicas da formação de micronúcleos que são danos irreversíveis onde os micronúcleos são pequenos corpos contendo ácidos desoxirribonucleicos (DNA).

Pode-se notar que as concentrações de 2000; 668; 401 e 67 µg/mL do extrato não foram capazes de ocasionar grandes números de aberrações cromossômicas em células de *A. cepa*, diante disso as concentrações não diferiram estatisticamente do controle negativo, caracterizando que as concentrações testadas não apresentam efeito genotóxico.

Apesar de não apontar relação estatisticamente significativa entre as concentrações, as alterações mais encontradas foram: pontes cromossômicas, perda cromossômica, brotamento nuclear, Micronúcleo, Morte celular e núcleos lobulados (Figura1).



**Figura 1.** A: Pontes cromossômicas; B: Perda cromossômica; C: Brotamento nuclear; D: Micronúcleo; E: Morte celular; F: Núcleos lobulados.

Segundo Liman et al. (2010), as pontes cromossômicas ocorrem durante os estágios da anáfase e telófase (Figura 2), provavelmente são formadas pela quebra e fusão de cromossomos e cromátides, ou durante a translocação das cromátides desiguais. As pontes cromossômicas são capazes de provocar mutações cromossômicas estruturais (EL-GHAMERY et al., 2000; LUO et al., 2004). Outro tipo de alteração celular é a perda cromossômica que de acordo com Saxena et al. (2005), indica o potencial clatogênico de um composto em teste. O brotamento nuclear (Figura 2) é caracterizado pela presença de uma pequena saliência de cromatina do núcleo principal (TONELINE et al., 2014). Segundo Leme & Marin-Morales (2009) afirma que núcleos lobulados podem ser

originados a partir de anáfases multipolares, a presença de multipolaridade parece não impedir que o envoltório nuclear se reestruture.

O efeito mutagênico com base as células analisadas no sistema de teste com *A. cepa*, foi possível observar diferença significativa das concentrações quando comparado ao controle positivo, com exceção da concentração de 2000 µg/mL que apresentou efeito mutagênico quando comparado com o controle negativo. Este resultado demonstra a presença do efeito mutagênico do aquoso de *A. triangularis* na concentração de 2000 µg/mL utilizado neste estudo.

Segundo Machado (2013), a mutagênicidade é o efeito tóxico que prejudica, especificamente, o material genético presente na célula, acarretando uma mudança no DNA ou no próprio cromossomo, tais como reação direta com o DNA nuclear; incorporação do DNA durante a respiração celular; interferência da divisão celular mitótica ou meiótica, decorrendo em divisão incorreta, presença de anormalidades e micronúcleos nas células. Diante disso a concentração de 2000 µg/mL levou ao ponto de danificar significativamente o material genético das células de *A. cepa*, assim resulta na presença do efeito mutagênico do extrato nessa concentração testada.

Os testes com *A. cepa* são considerados bem satisfatórios como indicadores de potencial genotóxico e de alterações cromossômicas, fornecendo informações importantes sobre produtos que são consumidos por pessoas (VICENTINI et al., 2001). Diante a sua confiabilidade, vários pesquisadores realizam testes *in vitro* de animais junto com o sistema de teste de *A. cepa*, obtendo resultados semelhantes, fornecendo informações preciosas para a saúde humana (CHAUHAN et al., 1999; VICENTINI et al., 2001; TEIXEIRA et al., 2003).

O sistema de teste com *A. cepa* mostra-se como um bioindicador para um *screening* do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico de plantas medicinais, diante ao seu baixo custo, confiança e concordância com outros experimentos, colaborando com estudos de prevenção de danos à saúde (KUJAWSKA & HILGERT, 2014; BOLSON et al., 2014).

O extrato aquoso de *A. triangularis* apresentou maior teor de compostos fenólicos com 52,67mg/g e baixo teor de taninos condensados com 0,02mg/g. Corroborando com resultados, Felix et al. (2016), estudou o extrato aquoso (decoção) de *A. albida* Duch. que apresentou maior teor de compostos fenólicos 0,94 mg/g em relação a taninos 0,43mg/g.

O estudo realizado com extrato etanólico de rizomas de *A. clematitidis* apresentou maior teor de compostos fenólicos (23,55%) e taninos condensados (0,15%) (ABBOUYI et

al., 2016). Papuc et al. (2010), obteve também em seus resultados, maior presença de compostos fenólicos (11,04 mg/g) em extrato etanólico da parte aérea de *A. climatitis*. De acordo com, Dalmeida & Mohon (2014), que relatou a prevalência de compostos fenólicos no extrato metanólico de *A. bracteata*.

*A. triangularis* apresentou nesse estudo pouca quantidade de taninos condensados, em comparação com os resultados encontrados em outros estudos com espécies de *Aristolochia* (FELIX et al., 2016; ABBOUYI et al., 2016; PAPUC et al., 2010).

## Conclusão

O extrato aquoso de *A. triangularis*, apresentou uma elevada atividade antioxidante 391,14  $\mu\text{M/g}$  quando avaliado pelo método de redução de íons de ferro (FRAP).

No bioensaio de letalidade com *A. salina*, o extrato aquoso de *A. triangularis* apresentou grau de toxicidade com  $\text{DL}_{50} = 370,58 \mu\text{g/ mL}$ .

O extrato aquoso de *A. triangularis* apresentou potencial citotóxico nas concentrações de 2000 e 668  $\mu\text{g/mL}$  causando inibição na germinação das sementes de *A. cepa* relação ao índice germinativo. Com relação ao índice mitótico a única concentração que apresentou diminuição significativa do IM em relação ao controle negativo foi de 2000  $\mu\text{g/mL}$ .

Em relação ao potencial mutagênico foi possível observar na concentração de 2000  $\mu\text{g/mL}$  que apresentou diferença quando comparado com o controle negativo. Porém não foi observado efeito genotóxico em nenhuma das concentrações testadas.

O extrato aquoso de *A. triangularis* apresentou teores de compostos fenólicos 52,67mg/g superior valor obtido para taninos de 0,02mg/g.



## Referências Bibliográficas

ABBOUYI, A. E.; MALIKI, S. E.; FILALI-ANSARI, N.; KHYARI, S. E. Antioxidant Effect of Extract of Rhizomes from *Aristolochia Clematidis*. **Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences**, v. 6, n. 2, p. 427-437, 2016.

AGOSTINI-COSTA, T. S.; GARRUTI, D. S.; LIMA, L.; FREIRE, S.; ABREU, F. A. P.; FEITOSA, T. Avaliação de metodologias para determinação de taninos no suco de caju. **Boletim CEPPA**, v. 17, n. 2, p. 167-176, 1999.

AMAT, A. G.; YAJIA, M. E.; GONZALEZ, C. F.; LORCA, G. L.; GONZALEZ, F. S.; RIGLOS, A. G.; VERON, J. R. Evaluation of Cytological Parameters Induced by Aqueous Extracts of Seven Plants Used as Antihypertensive Agents in Argentine Folk Medicine. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 21, p. 37-42, 2001.

ANDRADE, C. A.; SILVA, V. C.; PEITZ, C.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G.; KERBER, V. A. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae mimosoideae do gênero *Acacia* - **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, p. 231- 235, 2007.

ARAUJO, J. L.; LEMOS, J. R. Estudo etnobotânico sobre plantas medicinais na comunidade de Curral Velho. **Biotemas**, v. 2, p.125- 127, 2015.

BEUTLER, H. P.; MAIER, E. M.; PETERS, G. B.; ROSSATO, C. K. Intoxicação experimental com frutos de *Melia azedarach* em coelhos. In: **Anais do 35o Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária. 35o COMBRAVET**, Rio Grande do Sul, 2008. Disponível em: <<http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R0209-1.pdf>>. Acesso em: 21 set. 2017.

BHATNAGAR, S.; MAHARANA, S.; phytochemical, cytotoxic and antioxidant Activities of leaf extracts of *aristolochia indica* (linn.). **Advances in Biology & BioMedicine**, v. 3, n. 1, p.1-5, 2016.

BOLSON, M.; HEFLER, S. R.; CHAVES, E. I. D.; JUNIOR, A. G.; JUNIOR, E. L. C. Ethno-medicinal study of plants used for treatment of human ailments, with residents of the surrounding region of forest fragments. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 23, n. 161, p. 1-7, 2014.

BORNEO, R.; EON, A. E.; AGUIRRE, A.; RIBOTTA, P.; CANTERO, J.J. Antioxidant capacity of medicinal plants from the Province of Córdoba (Argentina) and their *in vitro* testing in a model food system. **Food Chemistry**, v. 112, n. 3, p. 664-670, 2009.

BROADHURST, R.B.; JONES, W. T. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 29, n. 9, p. 788-789, 1978.

BRATTI, C.; VIEIRA, M. C.; ZÁRATE, N. A. H.; OLIVEIRA, A. P. A.; MARAFIGA, B. G.; FERNANDES, S.S. L. Levantamento de Plantas Medicinais Nativas da Fazenda Azulão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.15, n.4, p.675-683, 2013.

BUZATTO, C. ZIMMER, G.; LINARES, C. E. B.; MOREL, A. F.; SIMIONATTO, E.; SANDRO, R. G. Atividade biológica dos constituintes voláteis de *Aristolochia triangularis* Cham. In: 25ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – SBQ, Porço de Caldas: **Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**, 2002.

CARVALHO, G.J; ANDRADE, L.A.B.; GOMIDE, M.; FIGUEIREDO, P.A.M. Potencialidades alelopáticas de folhas verdes + ponteiro de cana-de açúcar em diferentes concentrações de matéria seca, na germinação de sementes de alface. **UNIMAR Ciências**, v.5, n.2, p.19-22, 1996.

CARVALHO, L. C.; RODRIGUES, V. E. G. Levantamento florístico de plantas medicinais nativas no domínio do campo rupestre na Reserva Florestal do Boqueirão, **Pro Homine**, v. 4, p. 15-25, 2005.

CHAUHAN L. K. S.; SAXENA, P. N.; GUPTA, S. K. Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 42, n. 3, p. 181-189, 1999.

CHRISTOPHER, H.B.; KAPOOR, M.B. The cytogenetic effects of sodium salicylate on the root meristem cells of *Allium sativa* L. **Cytologia**, v. 54, n. 2, p. 203-209, 1988.

DALMEIDA, D.; MOHAN, V. R. Quantification of total phenolics, flavonoid and *in vitro* antioxidant activity of *Aristolochia bracteata* Retz. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical**, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2014.

DJERIDANE, A.; YOUSFI, M; NADJEMI, B.; BOUTASSOUNA, D.; STOCKER, P.; VIDAL, N. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 97, n. 4, p. 654-660, 2006.

EL-GHAMERY, A. A.; EL-NAHAS, A.I.; MANSOUR, M.M. The action of atrazine herbicide as an inhibitor of cell division on chromosomes and nucleic acids content in root meristems of *Allium cepa* and *Vicia faba*. **Cytologia**, v. 55, p. 209-215, 2000.

FÃO, F.; ZAN, R. A.; BRONDANI, F. M. M.; RAMOS, L. J.; MENEGUETTI, D. U. O. Análise do potencial mutagênico da seiva da casca de *Croton lechleri* (Müll. Arg). **SaBios: Revista Saúde e Biologia**, v. 7, n. 1, p.91-98, 2012.

FELIX, G. F.D.; ISABELLE, S. T.; JEAN-MARC, A.; PASCAL, A. C. D. Physico-chemical composition and radical- scavenging activity evaluation of the extracts of *Aristolochia albida* Duch. (Aristolochiaceae). **Journal of Applied Biosciences**, v. 107, p. 460-471, 2016.

FISKESJÖ, G. The Allium test: a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, p.99-112, 1985.

FRANCISCO, L. F. V.; CRISPIM, B. A.; VIANA, L. F.; NASCIMENTO, H. S. N.; JUNIOR, J. L. R.; GRISOLIA, A. B. Cytotoxicity, Genotoxicity and Mutagenicity of Aluminum, Manganese and Lead in Meristematic Cells of Root *Allium cepa*. **Orbital: The Electronic Journal of Chemistry**, v. 10, p. 60-61, 2018.

GARLET, T. M. B. **Levantamento das plantas medicinais utilizadas no município de Cruz Alta, RS, Brasil**. PPG Botânica/ UFRGS, Dissertação mestrado, 2000.

GATTI, A. B.; PEREZ, S. C. J. G. A.; LIMA, M. I. S. Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 3, p. 459- 461, 2004.

IGANCI, J. R. V.; BOBROWSKI, V. L.; HEIDEN, G.; STEIN, V. C.; ROCHA, B. H. G. Efeito do extrato aquoso de diferentes espécies de boldo Sobre a germinação e índice mitótico de *allium cepa* L. **Arquivos Do Instituto Biológico**, v. 73, n. 1, p. 79-82, 2006.

KALLUF, L.J.H. Fitoterapia funcional: dos princípios ativos à prescrição de fitoterápicos. **VP Editora**, 1.ed, p.304- 312, 2008.

KUJAWSKA, M.; HILGERT, N. I. Phytotherapy of Polish migrants in Misiones, Argentina: Legacy and acquired plant species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 153, n. 3, p. 1-16, 2014.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009.

Liman, R.; Akyıl, D.; Eren, Y.; Konuk, M.; Testing of themutagenicity and genotoxicity of metolcarb by using both Ames/Salmonella and *Allium* test. **Chemosphere**, v. 80, p.147-149, 2010.

LUO, L.Z.; WERNER, K.M.; GOLLIN, S.M.; SAUNDERS, W.S. Cigarette smoke induces anaphase bridges and genomic imbalances in normal cells. **Mutation Research**, v. 554, p. 375-385, 2004.

MACHADO, A. T. **Avaliação do potencial mutagênico do efluente do terminal petroquímico Almirante Soares Dutra (OSÓRIO-RS-BRASIL) através do sistema teste de *Allium cepa***. Monografia (Graduação em Bacharel em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Rio Grande do Sul. 32p. 2013.

MEDEIROS, B. J. L. **Estudo Pré-clínico do extrato hidroetanólico de *Calophyllum brasiliense* Cambess.: Atividades Hipoglicemiante e Toxicidade**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde) Universidade Federal do Amapá. 18p. 2014.

MENDES, S. S.; ANDRADE, J. A.; XAVIER, M. A.; SECUNDO JUNIOR, J. A.; PANTALEÃO, S. M.; ESTEVAM, C. S.; FERRARI, S. F. Genotoxicity test of *Maytenus rigida* and *Aristolochia birostris* in the radicular meristem of the onion, *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 1, p. 76-81, 2012.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 5, p. 31-34, 1982.

MONGELLI, E.; PAMPUTO, S.; COUSSIO, J.; SALOMON, H.; CICCIA, G. Cytotoxic and DNA interaction activities of extracts from medicinal plants used in Argentina. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 1-2, p. 145-151, 2000.

MUDDATHIR, A. M.; YAMAUCHI, K.; BATUBARA, I.; MOHIELDIN, E. A. M.; MITSUNAGA, T. Anti-tyrosinase, total phenolic content and antioxidant activity of selected Sudanese medicinal plants. **South African Journal of Botany**, v. 109, p. 9-15, 2017.

PAPUC, C.; CRIVINEANU, M.; GORAN, G.; NICORESCU, V.; DURDUN, NICOLETA. Free Radicals Scavenging and Antioxidant Activity of European Mistletoe (*Viscum album*) and European Birthwort (*Aristolochia clematidis*). **Revista de chimie**, v. 61, n. 7, p. 619-622, 2010.

PAULA, R. P.; BUENO, S. S. S.; SCHMITT, K. F. M.; TIAGO, A. V.; ROSSI, A. A. B. Sistema Teste de *Allium cepa* como Bioindicador de Citotoxicidade e Genotoxicidade em *aristolochia elegans* mast. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, n. 21, p. 1749- 1750, 2015.

POSSAMAI, R. M. **Levantamento etnobotânico das plantas de uso medicinal em Mariana Pimenta**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 108. 2000.

RODRIGUES, L.R.A.; RODRIGUES, T.J.D.; REIS, R.A. Alelopatia em plantas forrageiras. **FCAVJ-NESP/FUNEP**, p.113- 114, 1992.

RODRIGUES, V. E. G. **Etnobotânica e florística de plantas medicinais nativas de remanescentes de floresta estacional semidecidual na região do Alto Rio Grande, MG**. 2007. 84p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Programa de pós-graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal de Lavras. 2007.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, RICARDO E.; BRITO, EDY S.; MORAIS, SELENE M.; SAMPAIO, CAROLINE G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, FULGENCIO D. Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Embrapa**: Comunicado Técnico. v. 1, p. 1-4, 2007.

SAXENA, P. N.; CHAUHAN, L.K.S.; GUPTA, S.K. Cytogenetic effects of commercial formulation of cypermethrin in root meristem cells of *Allium sativum*: spectroscopic basis of chromosome damage. **Toxicology**, v. 216, n. 2-3, p. 244-255. 2005.

SURVESWARAN, S.; CAI, Y.; CORKE, H.; SUN, M. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. **Food Chemistry**, v. 102, n. 3, p. 938-940, 2007.

SWAIN, T.; HILLS, W.E. The phenolic constituents of *Punhus domestica*. The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 19, n. 1, p. 63-65, 1959.

TONELINE, M. T.; FILO, J. B.; RODRIGUEIRO, D. A.; NOVO, N. F. Frequência de micronúcleos e outras alterações nucleares em pacientes portadores de diabetes mellitus. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas**, v. 16, n. 2, p. 80-85, 2014.

VENDRUSCOLO, G. S.; MANTZ, L.A. Estudo da concordância das citações de uso e importância das espécies e famílias utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 2, p. 367-382. 2006.

VICENTINI, V. E. P.; CAMPAROTO, M. L.; TEIXEIRA, R. O.; MANTOVANI, M. *S.Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissus sicyoides* L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and test systems. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 23, n. 3, p.593-595, 2001.

WOJDYŁO, A.; OSZMIAN, J.; AND CZEMERYŚ, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. **Food Chemistry**, v. 105, n. 3, p. 940-947, 2007.

XU, Q.; BAUER, R.; HENDRY, B. M.; FAN, T. PI.; ZHAO, Z.; DUEZ, P.; SIMMONDS, M. S. J.; WITT, C. M.; LU, A.; ROBINSON, N.; GUO, D. A.; PETER, J. H. "The quest for modernisation of traditional Chinese medicine. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 1, p.1-4, 2013.