



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA

ELIZABETE REGINA SILVA LUCENA DOS SANTOS

**PERFIL FITOQUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Acanthospermum*
hispidum L. , *Boerhavia diffusa* L. E *Eleutherine bulbosa*(Mill) Urb.**

RECIFE

2019

ELIZABETE REGINA SILVA LUCENA DOS SANTOS

PERFIL FITOQUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE*Acanthospermum hispidum* L. , *Boerhavia diffusa* L. **E** *Eleutherine bulbosa*(Mill) Urb.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Morfotecnologia.

Área de concentração: Morfotecnologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Cláudia Sampaio de Andrade Lima.

Co-orientador: Prof.^o Dr.^o Ricardo Yara.

RECIFE

2019

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso (CRB4/1728)

Santos, Elizabete Regina Silva de Lucena

Perfil fitoquímico e atividade biológica de *Acanthospermum hispidum* L., *Boerhavia diffusa* L.e *Eleutherine bulbosa* (Mill) Urb./ Elizabete Regina Silva de Lucena Santos -2019.

98 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Claudia Sampaio de Andrade Lima Coorientador:
Ricardo Yara

Dissertação (Mestrado)—Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em
Morfotecnologia. Recife, 2019.

Inclui referências, apêndice e anexo

1. Fitoquímicos 2. Atividade antioxidante 3. Caatinga I. Lima, Claudia
Sampaio de Andrade (orient.) II. Yara, Ricardo (coorient.) III. Título

572.2

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-511

ELIZABETE REGINA SILVA LUCENA DOS SANTOS

PERFIL FITOQUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Acanthospermum hispidum* L.,
Boerhavia diffusa L. E *Eleutherine bulbosa* (Mill) Urb

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) como requisito parcial para obtenção do grau de Mestra em Morfotecnologia.

Aprovada em: 23/ 09/ 2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto (Examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Juliana Pinto de Medeiros (Examinadora interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Thiago Mendonça de Aquino (Examinador externo)
Universidade Federal de Alagoas

AGRADECIMENTOS

Ter gratidão às pessoas te cerca, é como diariamente se alimentar de amor. Em um coração onde mora a gratidão, sempre habitará a felicidade. Obviamente nenhuma trajetória difícil pode ser traçada sozinha, assim como esse mestrado, onde as pessoas que me cercaram foram anjos de Deus que me cobriram felicidade e motivação todos os dias. Eu não teria o que relatar nesta dissertação sem a ajuda delas, por isso me cubro de gratidão a todos esses anjos que me acolheram até aqui.

Sou grata a ti Deus, por desde o fim da graduação, mesmo com toda a dificuldade pela qual eu passava, ter me dado forças para estudar e correr atrás dos meus objetivos. Hoje, colho alguns dos frutos que plantei. Os desafios são inúmeros, haverá outros plantios na qual farei sempre sob a Tua luz da verdade para que a praga o ímpio jamais possa prejudicar os frutos.

Agradeço a prof.^a Claudia Sampaio e ao prof. Ricardo Yara por terem me aceito como orientanda de mestrado, aberto as portas do laboratório e de todo conhecimento proporcionado nesses dois anos. O presente trabalho foi realizado com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Código de financiamento 001, como também com o suporte da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e o Instituto Tecnológico das Cadeias Biossustentáveis (ITCBio).

Serei eternamente grata aos meus pais, Claudia e André, que sempre acreditaram em mim e sem pestanejar eles sempre priorizaram minha educação, se tornando meu porto seguro em todos os momentos da minha vida. Meu agradecimento carinhoso ao meu noivo, Silas Vasconcelos, por todo amor e apoio que tem me proporcionado ao longo desses anos e também a minha família no geral que mesmo sem saber como ajudar, as orações, abraços e as mais diversas formas de carinho sempre eram um grande conforto para mim.

Por último e não menos importantes, também transbordam agradecimentos aos meus mais que amigos, Anjos! Que me fizeram rir, me aconselharam, deram apoio, enxugaram minhas lágrimas, ajudaram de diversas formas e vou leva-los para minha vida: Rafael Japa, Yhasminie, Marília Grazi, Paola, Bia, Giu, Analú, Rafael Quadros, Leyliane, Renan, Pérsio, Marília Lima, Yago, Luiz, Bela, Wesley, Nati, Alice e a todos que participaram e de alguma forma, meu muito obrigada, jamais esquecerei os momentos felizes e dramático lado de vocês!

*“Por isso sinto prazer nas fraquezas, nas injúrias, nas necessidades,
nas perseguições e nas angústias **por amor de Cristo**.
Porque quando estou fraco então sou f*

2 Coríntios 12:10

RESUMO

Muitas plantas do Bioma Caatinga são utilizadas como recursos terapêuticos desta região. Este estudo verificou os potenciais bioativos e os perfis fitoquímicos de *Acanthospermum hispidum* L., *Boerhavia diffusa* L. e *Eleutherine bulbosa* (Mill) Urb. coletadas no semiárido pernambucano. Foram verificados os potenciais antioxidantes através dos métodos de inibição do radical livre 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH) e poder antioxidante redutor do ferro. Foram realizadas as prospecções químicas, os doseamentos de fenóis e flavonoides, análises cromatográficas, Espectrometria de Massas e ensaios para detecção da ação citotóxica e microbiológica. *A. hispidum* ($99.9 \pm 3,4 \mu\text{g EQ.g}^{-1}$) e *E. bulbosa* ($113,3 \pm 3,1 \mu\text{g EQ.g}^{-1}$) apresentaram as maiores quantidades de flavonoides. *E. bulbosa* ($105,1 \pm 1,5 \mu\text{g EAG.g}^{-1}$) e *B. diffusa* ($161,0 \pm 11,7 \mu\text{g EAG.g}^{-1}$) apresentaram os maiores teores de fenóis. As espécies botânicas que apresentaram maiores teores de fenóis e flavonóides, também apresentaram alto potencial antioxidante, como oIC_{50} de *E. bulbosa* de $123.8 \pm 0,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e *B. diffusa* de $159.9 \pm 15.1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, não apresentando diferenças estatísticas para o ácido cítrico utilizado. A análise do poder antioxidante redutor do ferro demonstrou que *B. diffusa* apresentou $198,08 \pm 4,64 \mu\text{g ET.g}^{-1}$ e *E. bulbosa* $136,1 \pm 2,18 \mu\text{g ET.g}^{-1}$. As espécies testadas apresentaram baixos percentuais de hemólise (abaixo de 14%). Devido aos resultados significativos da espécie *E. bulbosa*, tal foi submetida ao fracionamento e testes complementares de atividade citotóxica, frente a linhagem tumoral HeLa, e atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e álcool ácido resistentes, além de leveduras. Os resultados observados demonstram um alto potencial antioxidante e uma vasta riqueza de compostos químicos através das análises cromatográficas como também a baixa toxicidade de espécies oriundas do bioma Caatinga, o que justifica o uso popular terapêutico destas espécies.

Palavras-chave: Atividade antioxidante. Caatinga. Cromatografia. Fitoterapia. Hemólise.

ABSTRACT

Many plants of the Caatinga biome are used as a therapeutic resource in this region. This work verified the bioactive potential and phytochemical profile of *Acanthospermum hispidum* L., *Boerhavia diffusa* L. and *Eleutherine bulbosa* (Mill) Urb. Collected in Pernambuco semiarid. The antioxidant potential was verified by DPPH (Diphenylpicrilhydrazine) assays and reducing antioxidant power. Chemical prospection, phenol and flavonoid assay, chromatographic analysis, mass spectrometry and cytotoxic and microbiological detection were performed. *A. hispidum* ($99.9 \pm 3.4 \mu\text{g EQ.g}^{-1}$) and *E. bulbosa* ($113.3 \pm 3.1 \mu\text{g EQ.g}^{-1}$) presented the highest amounts of flavonoids *E. bulbosa* ($105.1 \pm 1.5 \mu\text{g EAG.g}^{-1}$) and *B. diffusa* ($161.0 \pm 11.7 \mu\text{g EAG.g}^{-1}$) had the highest phenol contents. The botanical species presented higher phenol and flavonoid contents, and also presented high antioxidant potential with *E. bulbosa* IC_{50} of $123.8 \pm 0.2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ and *B. diffusa* of $159.9 \pm 15.1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, not showing statistical differences for the citric acid used. Reduction power analysis showed that *B. diffusa* presented $198.08 \pm 4.64 \mu\text{g ET.g}^{-1}$ and *E. bulbosa* $136.1 \pm 2.18 \mu\text{g ET.g}^{-1}$. The tested species presented low percentages of hemolysis (below 14%). Due to the significant results of the *E. bulbosa* species, this was submitted to fractionation and complementary tests of cytotoxic activity against HeLa tumor lineage and antimicrobial activity against Gram-positive, Gram-negative bacteria, acid-resistant bacteria and yeast fungi. The observed results demonstrate a high antioxidant potential and a vast richness of chemical compounds through chromatographic analyzes as well as the low toxicity of species from the Caatinga biome, which justifies the popular therapeutic use of these species.

Key words: Antioxidant activity. Caatinga. Chromatography. Herbal medicine. Hemolysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa de localização do município do Brejo da madre de Deus.	17
Figura 2 - Espécie <i>Acanthospermum hispidum</i> L.....	23
Figura 3 - Espécie <i>Boerhavia diffusa</i> L.....	25
Figura 4 - Espécie <i>Eleutherine bulbosa</i> (Mill.) Urb.....	27
Figura 5 - Processo de elaboração e fracionamento dos extratos analisados no estudo.....	32
Figura 6 - Placa cromatográfica para compostos triterpenos e esteróides. Placa cromatográfica pré-revelada (6A) e placa cromatográfica pós-revelada (6B).....	46
Figura 7 - Placa cromatográfica para compostos derivados monoterpenos. Placa cromatográfica pré-revelada (7A) e placa cromatográfica pós-revelada (7B).....	47
Figura 8 - Placa cromatográfica para compostos fenólicos. Placa cromatográfica pré-revelada (8A) e placa cromatográfica pós-revelada (8B).....	48
Figura 9 - Placa cromatográfica para compostos derivados naftoquinonas. Placa cromatográfica pré-revelada (9A) e placa cromatográfica pós-revelada (9B).....	49
Figura 10 - Placa cromatográfica para compostos derivados antracênicos. Placa cromatográfica pré-revelada (10A) e placa cromatográfica pós-revelada (10B).....	49
Figura 11 - Placa cromatográfica para cumarinas. Placa cromatográfica pré-revelada (11A) e placa cromatográfica pós-revelada (11B).....	50
Figura 12 - Resultado em porcentagem da ação antioxidante dos extratos etanólicos da <i>A. hispidum</i> L., <i>B. diffusa</i> L. e <i>E. bulbosa</i> (Mill) Urb. e seu respectivo IC50 ($\mu\text{g mL}^{-1}$).....	51
Figura 13 - Resultado em porcentagem da ação antioxidante das frações da <i>E. bulbosa</i> (Mill) Urb. e seu respectivo IC50 ($\mu\text{g mL}^{-1}$).....	52
Figura 14 - Resultados da fragilidade osmótica expressos em porcentagem.	55
Figura 15 - (A) Fotomicrografia dos eritrócitos de carneiro para o ensaio da folha de <i>B. diffusa</i> L., na concentração de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ com aumento de 500x. (B) Fotomicrografia dos eritrócitos de carneiro para o ensaio da raiz da <i>B. diffusa</i> L., na concentração de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ com aumento de 500x. * Eritrócitos íntegros.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Compostos descritos na literatura da Eleutherine.....	29
Tabela 2 - Extratos realizados a partir das partes das plantas.....	31
Tabela 3 - Condições cromatográficas usadas na análise dos extratos.....	34
Tabela 4 - Fase Móvel e reveladores usados na análise de HPTLC.....	35
Tabela 5 - Prospecção fitoquímica qualitativa dos extratos etanólicos da <i>A. hispidum</i> L., <i>B. diffusa</i> L. e <i>E. bulbosa</i> (Mill) Urb.....	41
Tabela 6 - Média da quantificação de fenóis totais dos extratos etanólicos da <i>A. hispidum</i> L., <i>B. diffusa</i> L. e <i>E. bulbosa</i> (Mill) Urb. expressos em equivalente à ácido gálico expressos em $\mu\text{g EAG.g}^{-1}$	42
Tabela 7 - Média da quantificação de fenóis totais das frações da espécie <i>E. bulbosa</i> (Mill) Urb. Expressos em equivalente à ácido gálico expressos em $\mu\text{g EAG.g}^{-1}$	43
Tabela 8 - Média da quantificação de flavonoides totais dos extratos etanólicos da <i>A. hispidum</i> L., <i>B. diffusa</i> L. e <i>E. bulbosa</i> (Mill) Urb. Expressos em equivalente à ácido gálico expressos em $\mu\text{g EQ.g}^{-1}$	44
Tabela 9 - Média da quantificação de flavonóides totais dos extratos fracionados da <i>E. bulbosa</i> (Mill) Urb. expressos em equivalente à ácido gálico expressos em $\mu\text{g EQ.g}^{-1}$	45
Tabela 10 - Resultado da ação antioxidante dos extratos etanólicos das espécies <i>A. hispidum</i> L., <i>B. diffusa</i> L. e <i>E. bulbosa</i> (Mill) Urb. expressos em equivalente de TROLOX por grama de extrato ($\mu\text{g ET.g}^{-1}$).....	53
Tabela 11 - Resultado da ação antioxidante dos extratos fracionados da espécie <i>E. bulbosa</i> (Mill) Urb. expressos em equivalente de TROLOX por grama de extrato ($\mu\text{g ET.g}^{-1}$).....	54
Tabela 12 - Resultado do ensaio de citotoxicidade, com resultados expressos em termos percentuais.	57
Tabela 13 - Resultado da análise antimicrobiana, com halos de inibição expressos em mm.	58
Tabela 14 - Resultados da análise de GC-MS para os extratos de Folha da espécie <i>A. hispidum</i> L.....	95
Tabela 15 - Resultados da análise de GC-MS para os extratos de raiz da espécie <i>A. hispidum</i> L.....	95
Tabela 16 - Resultados da análise de GC-MS para os extratos de folha da espécie <i>B. diffusa</i> L.	96
Tabela 17 - Resultados da análise de GC-MS para os extratos do caule da espécie <i>B. diffusa</i> L.....	96
Tabela 18 - Resultados da análise de GC-MS para os extratos da raiz da espécie <i>B. diffusa</i> L.....	96
Tabela 19 - Resultados da análise de GC-MS para os extratos da folha da espécie <i>E. bulbosa</i> (Mill) Urb.....	97
Tabela 20 - Resultados da análise de GC-MS para os extratos do bulbo da espécie <i>E. bulbosa</i> (Mill) Urb.....	97
Tabela 21 - Resultados da análise de GC-MS para os extratos da raiz da espécie <i>E. bulbosa</i> (Mill) Urb.....	98

SIGLAS E ABREVIATURAS

CCDAE	Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência
DPPH	Difenil-picril-hidrazina
EAG	Equivalente a Ácido gálico
EQ	Equivalente a Quercetina
ET	Equivalente a Trolox
HPTLC	<i>High Performance Thin Layer Chromatography</i>
IPA	Instituto Agrônômico de Pernambuco
OMS	Organização Mundial de Saúde
SUS	Sistema Único de Saúde
TLC	<i>Thin-layer chromatography</i>
UV-Vis	Ultravioleta - visível
GC-MS	<i>Gas Chromatography Mass Spectrometry</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	OBJETIVOS	14
1.1.1	Geral	14
1.1.2	Específicos	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1	O BIOMA CAATINGA	15
2.2	REGIÃO DO BREJO DA MADRE DE DEUS	15
2.3	FITOTERÁPICOS: O CONHECIMENTO EMPÍRICO NA UTILIZAÇÃO DA FLORA DA CAATINGA	17
2.4	COMPONENTES FITOQUÍMICOS	18
2.5	FENÓIS E FLAVONOIDES	19
2.6	ANTIMICROBIANOS NATURAIS	19
2.7	ANTIOXIDANTES NATURAIS	20
2.8	PRODUTOS NATURAIS CITOTÓXICOS	21
2.9	FRAGILIDADE OSMÓTICA	22
2.10	<i>Acanthospermum hispidum</i> L.	22
2.10.1	Atividades biológicas de <i>A. hispidum</i> L.	23
2.10.2	Características químicas de <i>A. hispidum</i> L.	24
2.11	<i>Boerhavia diffusa</i> L.	25
2.11.1	Atividades biológicas de <i>Boerhavia diffusa</i> L.	25
2.11.2	Características químicas de <i>Boerhavia diffusa</i> L.	26
2.12	<i>Eleutherine bulbosa</i> (Mill.) Urb.	26
2.12.1	Atividades biológicas <i>Eleutherine bulbosa</i> (Mill.) Urb.	28
2.12.2	Características químicas <i>Eleutherine bulbosa</i> (Mill.) Urb.	28
3	MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1	COLETA DAS AMOSTRAS E PROCEDIMENTOS PARA OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	31
3.2	PROCESSO DE FRACIONAMENTO DAS AMOSTRAS	32
3.3	ENSAIOS QUÍMICOS	33
3.3.1	Prospecção fitoquímica	33
3.3.2	Doseamento de fenóis	33
3.3.3	Doseamento de flavonoides	33
3.3.4	Gas chromatography mass spectrometry (GC-MS)	34
3.3.5	Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE)	35
3.4	ENSAIOS BIOLÓGICOS	36
3.4.1	Difenil-picril-hidrazina (DPPH)	36

3.4.2	Teste do poder antioxidante redutor do ferro.	36
3.4.3	Fragilidade osmótica	37
3.4.4	Análise citotóxica	37
3.4.5	Análise antimicrobiana	38
3.5	ANALISE ESTATÍSTICA	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1	ENSAIOS QUÍMICOS	40
4.1.1	Testes de prospecção fitoquímica	40
4.1.2	Doseamento de fenóis	41
4.1.3	Doseamento de flavonoides	43
4.1.4	CG-MS	45
4.1.5	High-performance thin-layer chromatography (HPTLC)	46
4.2	ENSAIOS BIOLÓGICOS	50
4.2.1	Atividade Antioxidante: Difenil-picril-hidrazina (DPPH)	50
4.2.2	Atividade do poder antioxidante redutor do ferro.	52
4.2.3	Fragilidade osmótica	54
4.2.4	Análise citotóxica	56
4.2.5	Análise antimicrobiana	58
5	CONCLUSÕES	60
	REFERÊNCIAS	61
	APÊNDICE A – ARTIGO SUBMETIDO A REVISTA ANAIS DA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS	74
	ANEXO A - FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA DAS ESPÉCIES	94
	ANEXO B - TABELAS COM COMPOSTOS DETECTADOS NAS ANÁLISES DE GC-MS	95

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui a maior biodiversidade mundial, muitas de suas espécies vegetais são utilizadas para tratamento e cura de enfermidades onde estão distribuídas em diferentes regiões do país. Dentre essas regiões, destaca-se o bioma caatinga por ser unicamente brasileiro e por conter o clima semiárido (MACIEL et al., 2002; ROQUE e LOIOLA, 2013).

Tal região possui condições específicas de áreas de caatinga diferenciando-se de outras áreas do mundo e isso faz com que uma grande quantidade de espécies botânicas da região apresente características funcionais e morfológicas especializadas. Isso se deve às condições de estresse as quais elas são submetidas, tais como a alta variação de temperatura e índice pluviométrico, que o clima e o solo do semiárido apresentam (DRUMOND, 2000).

Inserido na região de caatinga, o município do Brejo da Madre de Deus, situado na mesorregião Agreste e na microrregião Vale do Ipojuca do Estado de Pernambuco, Brasil. O clima é do tipo Tropical semiárido, com alta variação de temperaturas, sendo entre 15°C a 34°C, compreendendo a região mais seca do agreste pernambucano, onde as precipitações se concentram no verão entre novembro e abril, incluindo média anual de 431,8 mm (BRASIL, 2005; ROCHA, 2016).

Desta forma, o estudo selecionou três espécies de vasta ocorrência em diversos biomas, inclusive no semiárido, e que são utilizadas pela população local como fitoterápicos, a *Acanthospermum hispidum* L., *Boerhavia diffusa* L e a *Eleutherine bulbosa* (Mill) Urb., que são conhecidas popularmente na região como Espinho de cigano, Pega-pinto e Alho do mato, respectivamente.

O presente estudo teve como objetivo, realizar testes iniciais para avaliar o perfil fitoquímico através de prospecção, doseamentos, análises cromatográficas de GCMS e HPTLC, avaliar a ação antioxidante e fragilidade osmótica dos extratos etanólicos de *A. hispidum* L., *B. diffusa* L e a *E. bulbosa* (Mill) Urb. e por sequencia selecionar a espécie que apresentar melhores resultados para o fracionamento e realização de testes complementares de ação microbiológica, antioxidante, citotóxica frente a linhagem de células tumorais, fitoquímica e cromatográfica por HPTLC.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Geral

Analisar o perfil fitoquímico dos extratos etanólicos de *A. hispidum* L., *B. diffusa* L. e *E. bulbosa* (Mill) Urb., como também fracionar e caracterizar quimicamente a espécie que apresentar melhores resultados em ensaios biológicos.

1.1.2 Específicos

- 1.1.2.1. Realizar a caracterização das espécies através de testes fitoquímicos e de doseamento de fenóis e flavonoides;
- 1.1.2.2. Realizar a caracterização química através de métodos cromatográficos utilizando HPTLC e GC-MS;
- 1.1.2.3. Avaliar a ação antioxidante das espécies através dos ensaios de DPPH e poder antioxidante redutor;
- 1.1.2.4. Realizar a análise de fragilidade osmótica das espécies frente a células eritrocitárias de carneiro;
- 1.1.2.5. Selecionar, realizar o fracionamento e aprofundar as pesquisas através de ensaios complementares para a espécie que apresentar melhores resultados nos pontos 3.2.1 a 3.3.4;
- 1.1.2.6. Realizar a análise citotóxica da espécie frente à linhagem neoplásica HeLa da espécie selecionada;
- 1.1.2.7. Avaliar a ação antimicrobiana frente a micro-organismos representantes de bactérias Gram positivas, Gram negativas, álcool-ácido resistentes, leveduras e fungos filamentosos da espécie selecionada.
- 1.1.2.8. Avaliar a ação antioxidante das frações da espécie selecionada;
- 1.1.2.9. Realizar testes fitoquímicos de doseamento de fenóis e flavonoides das frações da espécie selecionada
- 1.1.2.10. Realizar a análise cromatográfica por HPTLC das frações da espécie.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O BIOMA CAATINGA

O território brasileiro engloba ao todo seis biomas, no qual se faz parte a caatinga, ocupando 11% de todo o território nacional, sendo o único bioma exclusivamente brasileiro. Abriga fauna e flora únicas, com muitas espécies endêmicas e clima seco e quente. (SCHOBER, 2002).

A Caatinga abrange parte dos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e a parte nordeste de Minas Gerais, no vale do Jequitinhonha. O termo “caatinga” é originário do tupi e significa “mata branca”, referindo-se a forma e coloração da vegetação durante a seca, onde grandes partes da flora perdem as suas folhas e seus troncos esbranquiçados e brilhantes ficam evidentes no ambiente (PRADO, 2003).

Quanto ao clima, é semiárido com alta variação de temperatura e a distribuição de chuvas é irregular tendo a precipitação média anual variando entre 240 e 1.500mm, mas metade da região recebe menos de 750mm e algumas áreas centrais menos de 500mm. Cerca de 50 às 70% das chuvas na Caatinga são concentradas em média em três meses consecutivos, apesar variação anual e dos longos períodos de seca serem frequentes com o número de meses secos que aumenta da periferia para o centro da região, podendo chegar de 7 a 11 meses de baixa disponibilidade de água para as plantas (NIMER, 1972; SAMPAIO, 1995; PRADO, 2003).

Apesar de ser a única grande região natural brasileira cujos limites estão totalmente restritos ao território nacional com grande número de espécies vegetais e animais que se adaptaram ao clima semiárido, temperaturas amplas e um regime pluviométrico variável e estressante, as políticas de conservação da caatinga ainda são escassas. Pouquíssima atenção tem sido dada à conservação da área, e a contribuição da sua biota à biodiversidade é extremamente significativa para o Brasil. (SILVA et al., 2004).

Na caatinga, suas espécies vegetais contêm propriedades químicas únicas, devido a adaptação ao clima de semiárido, com ampla variação de temperatura. Muitas dessas plantas são protagonistas de um conhecimento empírico e são utilizadas como curativas e outros diversos fins (LEAL et al., 2005)

2.2 REGIÃO DO BREJO DA MADRE DE DEUS

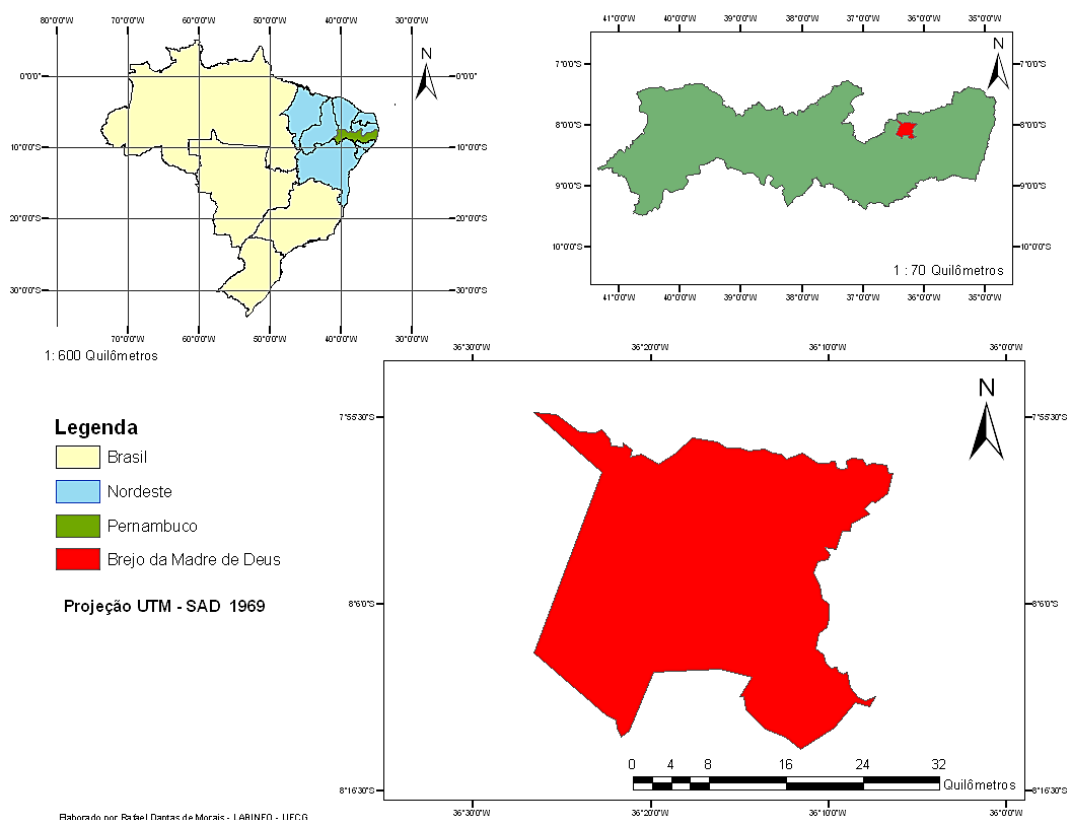
Inserido na região de caatinga, o município do Brejo da madre de Deus (Figura 1), situado na mesorregião Agreste e na microrregião Vale do Ipojuca do Estado de Pernambuco,

limitando-se a norte com Sta.Cruz Capibaribe e Taquaritinga do Norte, a sul com Belo Jardim, Tacaimbó e São Caitano, a leste com Caruaru e Toritama, e a oeste com Jataúba (BRASIL, 2005; ROCHA, 2016).

O clima local é semiárido tropical (Bsh), com alta variação de temperatura, estando entre 15 °C e 34 °C, o período de chuva varia de fevereiro a maio e depende principalmente de sistemas climáticos do tipo Zona de Convergência Intertropical (ZCIT), com uma precipitação média anual de 431,8 mm (Brasil, 2005; Rocha, 2016; Salgueiro et al., 2014). Planossolo ocorre neste município e é caracterizado por imperfeitamente drenado, alta fertilidade natural e inundações na estação chuvosa e seca no verão, a vegetação é caracterizada por Caatinga hiperxerófila com trechos de floresta decídua (PROJETEC, 2010; SALGUEIRO ET AL., 2014).

A área do Brejo da Madre de Deus ocupa 779,3 km² e representa 0.79 % do Estado de Pernambuco. A sede do município tem uma altitude aproximada de 627 metros e coordenadas geográficas de 08° 08' 45'' . de latitude sul e 36° 22' 16'' . de longitude oeste, distando 202,2 km da capital, Recife, cujo acesso é feito pela BR-232/104, e PE-145. Com respeito aos solos, nos Patamares Compridos e Baixas Vertentes do relevo suave ondulado ocorrem os Planossolos onde são mal drenados com fertilidade natural média e problemas de sais. Nos topos e Altas Vertentes, os solos Brunos não Cálcicos apresentam-se rasos e com fertilidade natural alta. Nos Topos e Altas Vertentes do relevo ondulado ocorrem os Podzólicos, drenados e fertilidade natural média e as Elevações Residuais com os solos Litólicos, rasos, pedregosos e fertilidade natural média (BRASIL, 2005).

Figura 1: Mapa de localização do município do Brejo da madre de Deus.



Fonte: Rafael Dantas (2012) acesso em 17 de agosto de 2019. link encurtador.com.br/bemIV.

2.3 FITOTERÁPICOS: O CONHECIMENTO EMPÍRICO NA UTILIZAÇÃO DA FLORA DA CAATINGA

O conhecimento empírico sempre se fez presente na história do uso de plantas medicinais. As antigas civilizações já utilizavam plantas para alimento, remédio, veneno ou outros fins, dependendo dos seus efeitos colaterais observados. No histórico da fitoterapia (estudo das plantas medicinais e suas aplicações na cura das doenças), podemos verificar que existem registros da utilização de plantas como remédio em antigas civilizações, como na obra chinesa Pen Ts'ao, de Shen Nung, que remonta 2800 a.c. e em antigos papiros do antigo Egito (GOFF, 2001).

No Brasil há uma grande riqueza terapêutica no potencial vegetal, devido à presença de ecossistemas de climas ímpares onde tal vegetação vem sendo utilizada desde os primeiros indígenas até os dias atuais pela medicina popular (GLAUCO, 2016). Atualmente a ciência se faz de extrema importância para verificação e consolidação do conhecimento empírico, como através de estudos etnobotânicos, biológicos e químicos em que, a partir da determinação dos

ativos das espécies botânicas com potencial terapêutico, o conhecimento tradicional se faz um aliado importante para a ciência. (FRANCISCO et al., 2015).

Com o reconhecimento científico tais avanços chegam à população através dos recursos na área de saúde. A Organização Mundial da Saúde (OMS), em 1978, na conferência de Alma-Ata, trouxe o reconhecimento de recursos locais apropriados com o objetivo de manter e restaurar o estado da saúde reconhecendo os medicamentos de origem vegetal como recurso terapêutico (OMS, 1979). Porém, apenas através da Portaria nº. 971, Decreto nº 5813, em 03 de maio de 2006 que no Brasil se estabeleceu a política para o uso de plantas medicinais no serviço público no Sistema Único de Saúde (SUS) (REZENDE; COCCO, 2002).

As vantagens da utilização de fitoterápicos podem estar como forma opcional de terapia levando em consideração o baixo custo, em relação a outros tipos de medicamentos convencionais. Porém, ainda são necessários maiores investimentos em trabalhos científicos nessa área, onde muitas espécies são utilizadas pela população pelo potencial fitoterápico e necessitam de comprovação científica para seu uso seguro. (BORGES et al., 2008).

A utilização desses fitoterápicos na região de caatinga é bem marcante, não apenas devido o conhecimento empírico e tradicional que vem de populações indígenas, mas também com efeito da população ser grande parte de baixa renda e nem sempre ter recursos de saúde disponíveis, se recorre ao uso dos fitoterápicos. Dentre as espécies da flora da caatinga utilizadas pela população de forma empírica como fitoterápicos para a cura de enfermidades estão a *A. hispidum*, *B. diffusa* L. e a *E. bulbosa*.

2.4 COMPONENTES FITOQUÍMICOS

As plantas produzem diversos componentes orgânicos, os quais são metabólitos primários e secundários. Onde os metabólitos primários têm função estrutural e energética e os metabólitos secundários são produtos naturais relacionados a adaptação, proteção e sobrevivência; protegendo as plantas contra patógenos e herbívoros, servindo também como atrativos para polinizadores, devido a sua diversidade de coloração, aroma e sabores, além de servir como agentes de competição entre plantas (TAIZ; ZEIGER, 2006; VIZZOTO; KROLOW; WEBER, 2010).

Adicionalmente, tais compostos secundários, tem grande importância ecológica devido ao seu efeito medicinal para os seres humanos. Em sua classificação podemos dividi-los em três grupos distintos quimicamente: terpenos, compostos fenólicos e componentes contendo nitrogênio. Onde dentro do grupo de compostos fenólicos podemos encontrar em maior

abundância os Fenóis e Flavonoides, como também os Etilbenos, Lignanas e Taninos que garantem diversas atividades e ações as plantas (VIZZOTO; KROLOW; WEBER, 2010)

2.5 FENÓIS E FLAVONOIDES

Os fenóis são substâncias que possuem em sua constituição um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. São encontrados distribuídos em organismos do reino vegetal, incluindo de moléculas simples até com alto grau de polimerização (SOARES et al., 2008).

Podendo estar presentes em moléculas mais simples como os ácidos fenólicos e os flavonoides, os taninos podem ser encontrados em diversos vegetais, sendo caracterizados como compostos fenólicos de alto peso molecular. Tendo em vista a diversidade química de compostos fenólicos distribuídos pela natureza, para o seu processo de extração são utilizados diferentes solventes e na literatura é possível encontrar diversas metodologias analíticas que são empregadas no processo de quantificação destes compostos (EFRAIM et al., 2006).

Os compostos fenólicos exercem função de proteção, conferindo as plantas alta resistência a microrganismos e pragas. Esses compostos podem influenciar o valor nutricional e características físicas dos alimentos, como também constituem os antioxidantes mais abundantes (EVERETTE et al., 2010).

Os flavonoides constituem um dos maiores grupos de metabólitos secundários encontrados em plantas, tais compostos naturais tem a função principal proteger estes organismos contra agentes oxidantes, com ampla gama de cores são também atrativos para polinizadores. São constituídos por três anéis, onde os seus carbonos podem sofrer variações químicas, como hidrogenação, metilação, hidroxilação e sulfonação, resultando na formação de mais de quatro mil compostos flavonoides, que são agrupados em classes que são as antocianinas, flavanas, flavonas, os flavonóis e isoflavonóides que se destacam por suas propriedades farmacológicas (LAZARY, 2010; GEORGIEV et al. 2014; LOPES et al. 2010).

Os fenóis e flavonoides estão presentes na dieta humana como em leguminosas, vinhos, e são considerados importantes protetores naturais do organismo. Em estudos, estes demonstram ter ação terapêutica envolvendo os diversos sistemas (imunológico, circulatório, cardiovascular e nervoso) (GEORGIEV et al. 2014; RIBEIRO et al., 2006).

2.6 ANTIMICROBIANOS NATURAIS

Desde as primeiras civilizações há relatos das atividades antimicrobianas de plantas, na qual foram utilizadas empiricamente por séculos, mas apenas foram confirmadas

cientificamente apenas nas últimas décadas, onde atualmente muitos pesquisadores estudam a atividade antimicrobiana de diversas plantas, comprovando ou não o conhecimento popular de uso das espécies nativas (DUARTE, 2006).

Com aumento populacional e a exposição a diversas patologias, os micro-organismos como fungos e bactérias que causam prejuízos à saúde humana estão cada vez mais resistentes a medicamentos conhecidos, e isso motiva a procura de alternativas como antibióticos de ocorrência natural, a solução pode estar em fitoterápicos devido a metabólitos secundários envolvidos na defesa das plantas contra patógenos microbianos e que podem ser utilizados como fármacos antimicrobianos em humanos. (VIZZOTO; KROLOW; WEBER, 2010; MAHASNEH, 1999; DUARTE et al., 2005).

Em pesquisas sobre as atividades antimicrobianas com extratos naturais de plantas em diversas regiões do mundo têm se obtido resultados positivos. Porém ainda devem-se intensificar os estudos antimicrobianos, principalmente em países da América latina, onde se possuem uma vasta flora e um rico conhecimento empírico na utilização de plantas nativas para fins medicinais, como no uso antibacteriano ou antifúngico (MAHASNEH, 1999; DUARTE et al., 2005).

2.7 ANTIOXIDANTES NATURAIS

Os radicais livres se definem por moléculas independentes com elétrons não pareados, sendo altamente instáveis, com meias vidas curta e quimicamente reativas. Em excesso, essas moléculas geram danos nas funções fisiológicas normais do organismo. Algumas espécies de radicais livres são: Radical superóxido, óxido nítrico, peroxinitrito e radical semiquinona que atuam como agentes oxidantes nos seres (ALMEIDA et al., 2018; BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Tais radicais livres são gerados em diversas partes da célula como mitocôndrias e citoplasma, onde sua ação no organismo está ligada ao seu sítio de formação. Com a ação desses radicais, pode ser desencadeado um estresse oxidativo, que acompanha o aumento das defesas antioxidantes enzimáticas, porém a produção de uma vasta quantidade de radicais livres podem causar danos e morte celular. Em contrapartida, mesmo que em excesso gere danos para o organismo, os radicais livres são de fundamental importância para as reações ocorridas no corpo (YU; ANDERSON, 1997).

Como antagonista aos radicais livres, os antioxidantes são os compostos responsáveis pelo retardo e inibição das lesões causadas pelos compostos instáveis, evitando o início ou propagação das reações em cadeia de oxidação (BIANCHI; ANTUNES, 1999)

Os compostos antioxidantes podem ser encontrados diariamente na dieta, de forma natural ou sintética. As indústrias de alimentos, cosméticos e médica são grandes consumidoras desses tipos de compostos, que são tão fundamentais no organismo. Atualmente há diversos protocolos de avaliação da capacidade antioxidante dos compostos, onde muito já utilizam células e organismos vivos, contudo a grande parte dos modelos utilizados são os embasados na química de radicais livres, dos métodos mais utilizado destaca-se o baseado em 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), um método colorimétrico para avaliar a atividade antioxidante baseando-se na capacidade das substâncias antioxidantes em capturar o radical livre (JIA et al., 2012).

Também, uma outra forma de avaliar a capacidade antioxidante é através do ensaio do poder antioxidante redutor do ferro., que é baseada na capacidade de redução dos íons de ferro, reduzirem o reagente Fe^{+3} , com consequente formação de um complexo colorido com Fe^{+2} indicando a capacidade de doação de elétrons, sendo este o mecanismo de ação de muitos antioxidantes fenólicos (DORMAN et al., 2003).

2.8 PRODUTOS NATURAIS CITOTÓXICOS

As plantas podem apresentar substâncias bioativas de interesse farmacológico. Muitas espécies são estudadas com o intuito de estabelecer atividades, esclarecer mecanismos de ação, identificar componentes ativos e investigar os possíveis efeitos tóxicos de diferentes espécies vegetais (BATITUCCI, 2003).

Tais atividades podem ser antitumorais e tais espécies são utilizadas empiricamente para o tratamento de doenças de origem citotóxica, porém partes dessas espécies não foram devidamente estudadas quanto aos seus potenciais citotóxicos (BAGATINI et al., 2007).

Segundo estudos de Silva et al., (2004) as plantas medicinais podem conter compostos tóxicos com efeitos maléficos. Entretanto, o consumo de espécies medicinais também podem suprimir os efeitos de agentes tóxicos que atuam sobre o organismo humano. Por isso, devem-se intensificar estudos que avaliem a capacidade tóxica e citotóxica das plantas frente a diversos tipos celulares e de metodologias.

Caracterizar a citotoxicidade de uma espécie *in vitro* é uma alternativa para a avaliação biológica de produtos para a área saúde e fundamental para a análise inicial dos compostos.

Pela exposição de uma cultura celular a um extrato dos componentes de uma espécie, é possível caracterizar reações adversas de citotoxicidade resultantes (MASSON E LOMBELLO, 2016).

2.9 FRAGILIDADE OSMÓTICA

Os eritrócitos, também conhecidos como hemácias, estão presentes no sangue dos mamíferos em grandes quantidades e dão coloração vermelha ao sangue, por conter o pigmento vermelho chamado hemoglobina, que é de fundamental importância para a homeostase corporal. São sensíveis a diversos tipos de substâncias sejam elas naturais ou sintéticas, e o seu contato no organismo pode causar perturbações na membrana dos eritrócitos, acarretando alterações estruturais e consequentemente em sua permeabilidade (PEREIRA, et al. 2017).

A membrana dos eritrócitos é composta de ácidos graxos polinsaturados, tornando-as resistentes ao ataque de diversos compostos, podendo ocasionar alguma alteração em sua estrutura como: fragilidade de proteínas de membrana, mudanças na morfologia, alterações de metabolismo intracelular e de permeabilidade ou hemólise (BEGUM; TERAQ, 2002).

Por meio de ensaios laboratoriais é possível avaliar a resistência anti-hemolítica e o comportamento da membrana eritrocitária frente a diferentes substâncias, que pode ser um extrato de planta, por exemplo. O ensaio capaz de testar a capacidade das hemácias de manterem sua integridade estrutural e resistirem à lise quando expostas ao estresse osmótico é chamado de Curva de Fragilidade Osmótica (CFO) também conhecida como Curva de resistência globular, Prova de resistência osmótica; Prova de fragilidade osmótica; Curva de hemólise ou Resistência osmótica das hemácias (PEREIRA et al., 2017; CAIRES, 2012; MOUSINHO et al., 2008).

2.10 *Acanthospermum hispidum* L.

A espécie *A. hispidum* L. pertencente a ordem Asterales e a família Asteraceae, é uma planta comumente conhecida no Nordeste do Brasil como Espinho de cigano ou Carrapicho-de-carneiro (Figura 2). O seu nome científico do *Acanthospermum* é proveniente do grego *acantha* (espinho) e *esperma* (semente) e refere-se à fruta espinhosa, o *Hispidum* provém do Latin, e significa áspero, espinhosa, Seus caules são densamente cobertos por pequenos de pelos, suas folhas podem ter até 11,5 cm de comprimento, suas flores possuem pétalas (corolas) de cor amarelada com cerca de 1,5 mm de comprimento e suas frutas tem forma achatada e triangular (HAREKRISHNA et al., 2010).

Figura 2 :Espécie *Acanthospermum hispidum* L.



Fonte: Google imagens. Acesso em 17 de agosto de 2019.

2.10.1 Atividades biológicas de *A. hispidum* L.

Dentre as diversas atividades biológicas a quais são atribuídas a espécie, está a atividade antimicrobiana, onde o trabalho de Fleischer et al. (2003) revela que os extratos etanólico das partes aéreas de *A. hispidum* L. demonstra atividade contra uma ampla gama de bactérias patogênicas, como também extratos de frações polares da amostra também demonstrou boa atividade antimicrobiana para os mesmos micro-organismos.

Também é atribuída atividade antiplasmodial a espécie em questão também havendo um uso frequente da população asiática para cura da malária. Em estudos in vitro, foram determinadas as eficiências dos extratos aquoso-metanólico e aquoso e hexânico, das folhas de *A. hispidum* L. contra o patógeno *Plasmodium malareae*, obtendo resultados positivos para tratamento da malária. (OLADIMEJI, 2018; GANFON et al., 2012).

Também foram testados extratos alcaloides de *A. hispidum* L. in vitro contra linhagens selvagens de *P. falciparum*, onde, além de apresentar boa atividade antimalárica também foi notável baixa citotoxicidade contra três linhagens de células humanas: THP1, melanócitos normais e HTB-66 (SANON et al., 2003).

Quanto a atividade hipoglicêmica, na literatura é possível verificar alguns estudos que relatam essa atividade, como o de Vasundharamma e Mahmood (2018) que testou extratos de acetato de etila e extrato e aquoso de *A. hispidum* em ratos diabéticos e foi constatado a baixa nos níveis de glicose no sangue dos animais testados.

É registrado que a população do noroeste da Nigéria utiliza a espécie tradicionalmente para combater a diabetes como descreve o trabalho como de Chika (2018) que verificou a

atividade antidiabética das folhas de *A. hispidum*, através do extrato aquoso, ratos diabéticos por 28 dias e ao final da experiência foi constada a eficácia e a baixa toxicidade do extrato, dando respaldo assim, a utilização tradicional pela população.

Há relatos da utilização da *A. hispidum* pela população tradicional brasileira para objetivos abortivos. Porém, o estudo de Lemonica e Alvarenga (1994) avaliou esse possível efeito abortivo ou teratogênico testando o extrato aquoso com ratos Wistar fêmeas em diversas dosagens onde não foi detectado nenhuma atividade abortiva, mudança significativa no peso médio dos fetos ou malformações internas nos fetos, mas houve um aumento no número de malformações externas, e isso foi relacionado à dosagem.

As atividades larvicidas e pupicidas também foram investigadas devido a relatos de uso pela população da Índia para esta finalidade. Diferentes extrações de *A. hispidum* (hexano, benzeno de petróleo, clorofórmio, acetato de etila e acetona) foram testadas contra três espécies de mosquitos *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, nas fases de larva e de pupas. Os extratos de petróleo e benzeno apresentaram maiores atividades larvicidas contra as três espécies de dípteros testadas, comprovando a atividade inseticida e criando uma alternativa de produto natural comparado aos sintéticos químicos comercializados (VIVEKANANDHAN et al., 2018).

2.10.2 Características químicas de *A. hispidum* L.

Nos perfis químicos dos extratos de folhas e raízes de *A. Hispidum* são observados em literatura relatos das presenças de compostos como terpenóides, carboidratos, alcalóides, glicosídeos, flavonóides, taninos e saponinas (HAREKRISHNA et al., 2010). Também foram detectados compostos polifenólicos (NAIR et al., 1985). Em análises cromatográficas, já foram descritas lactonas sesquiterpênicas isoladas da espécie, que fazem parte de uma família de compostos com amplo espectro de atividade biológica, incluindo atividades antimicrobianas e antitumorais (EVANI et al., 2008).

Também utilizando métodos cromatográficos, foram detectados açúcares, polióis, flavonas (5,7,2', 5'-tetrahidroxi-3,4'- dimetoxiflavona e 5'-acetoxi-5,7,2'-tri-hidroxi-3, 4'- dimetoxiflavona), Alildimetil-Formamida, Eritritol, Glicerina, Benzoilmetil-3-hidroxi-5-nitro-2-indolinona, silanol e ácido hexadecanóico, 1- (hidroximetil) -1,2-etanodiil éster, em extratos de folhas da *A. hispidum* (RAOUF et al., 1990; THERESA; ABASS, 2011; AZEEZ 2018).

2.11 *Boerhavia diffusa* L.

A *Boerhavia diffusa* L. é uma espécie botânica herbácea (Figura 3), pertencente a Família Nyctaginaceae, um tipo de erva daninha facilmente encontrada em áreas de cultivo de diversos países como Índia, Nigéria e partes da América latina. Possuindo hábito perene com 30 a 40 cm de altura, apresenta flores reduzidas de coloração amarelada, com forma de funil com amplo acesso ao néctar pelos animais (SATHEESH, PARI, 2004).

Na Nigéria, a espécie é encontrada especialmente em áreas pantanosas e é comumente usada como comida de coelho pela população local. A *B. diffusa* é utilizada na medicina tradicional por suas propriedades anti-inflamatórias, antibacterianas e cardiotônicas, também no tratamento da elefantíase, cegueira noturna e úlceras e diabetes. Há relatos da periodicidade da planta, onde se observa pela população sua atividade máxima no mês de maio (CHUDE et al., 2001).

Figura 3: Espécie *Boerhavia diffusa* L.



Fonte: O autor (2017).

2.11.1 Atividades biológicas de *Boerhavia diffusa* L.

Extratos e compostos derivados *B. diffusa* tem ocorrência na literatura científica com atividades anti-inflamatórias, antioxidante, antienvelhecimento, anticancerígeno, antiapoptótico e antidiabético (GHOSH, 2018)

A atividade hipoglicêmica é atribuída ao extrato aquoso da *B. diffusa* na literatura, produzindo reduções de glicose no sangue em ratos diabéticos induzidos por aloxana. No teste do extrato metanólico de folhas da espécie, também houve redução da glicemia, proteína total,

insulina sérica, níveis de glicogênio no fígado e perda de peso em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (CHUDE et al., 2001; PERWEZ et al., 2018).

Atividades antioxidantes também são atribuídas a *B. diffusa*, exibindo no trabalho de Perwez et al. (2018) atividade de eliminação de radical DPPH (IC₅₀ 163,1 ± 6,7 µg / mL), demonstrando atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres. Assim também como o estudo de Kaushik et al. (2017) que atribui atividade antioxidante a extratos da espécie em diversos procedimentos de extração. Em estudos para verificação da toxicidade, foi comprovada que o extrato aquoso de folhas de *B. diffusa* é não tóxico quando testadas em ratos albinos (ORISAKWE et al, 2003). Também, em complemento, o estudo de Kaushik et al. (2017) atribuiu atividade hepatoprotetora a espécie.

2.11.2 Características químicas de *Boerhavia diffusa* L.

Em análises dos extratos aquosos, metanólicos, etanólicos, éter de petróleo e clorofórmio foram verificadas a presença de diversos compostos como: Fenóis, flavonóides, glicosídeos, taninos, saponinas, alcalóides, terpenóides, esteróides, flobatanina e proteínas. Estes resultados demonstram que a planta tem um grande número de constituintes químicos, que podem ser responsáveis por muitas ações farmacológicas e biológicas (CHUDE et al, 2001; PERWEZ et al., 2018; BEEGUM et al., 2014).

Na *B. diffusa* também foram verificadas composições de vitaminas (82,22%), carboidrato (10,56%), vitamina C (44,80/ 100g peso), vitamina B3 (97,00/ 100g) e vitamina B2 (22,00/ 100g) (UJOWUNDU et al. 2008). Em análises cromatográficas, estudos demonstram diversos compostos como: terpenóides, saponinas, flavonóides, glicosídeos cardíacos, flobataninos e taninos. Também constituintes como: N'-Etilenobis (2- [2-hidroxifenil]) glicina, Tert-butil-4-hidroxi anisol, GR Ácido propiônico, silanamina, Phytol, hexadecano, ácido hexadecanóico, éster 2-hidroxi-1- (hidroximetil) etílico, estigmast-5-en-3-ol (3.BETA.) e estigmasterol. A presença diversos compostos ativos na espécie podem justificar o uso da planta para várias doenças pelas populações, necessitando de mais análises para interligação dos seus compostos com suas atividades (BEEGUM et al., 2014; AMIT PATNAIK; SHARMA, 2018).

2.12 *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb.

Eleutherine bulbosa (Mill) Urb. (Figura 4) é uma espécie botânica pertencente a família Iridaceae, que apresenta 1.630 espécies e 77 gêneros distribuídas mundialmente, com maior

ocorrência nos continentes do sul devido a alta incidência solar. No Brasil, as Iridaceae são encontradas em 110 espécies e 14 gêneros (REEVES et al., 2001)

A espécie é nativa da América Latina, com ocorrência em campos da Amazônia e nordeste do Brasil. Se trata de uma planta herbácea bulbosa e rizomatosa, de 20 a 30 cm de altura, com bulbos semelhantes à cebola de coloração vermelha, as folhas são simples plissadas longitudinalmente, inteiras, com cerca de 25 cm de comprimento e suas flores são brancas ou rosadas, dispostas numa panícula ampla no ápice de um longo escapo rígido da folhagem, que se abrem ao por do sol. Ela é conhecida popularmente por alho do mato na região do nordeste brasileiro, e também como jabutitana, marupazinho ou lágrimas de la virgem em outras regiões da América Latina (EGGERS et al. 2016; LORENZI; MATOS, 2002).

Os bulbos da espécie são utilizados pelas populações tradicionais do Brasil, principalmente regiões na Amazônia, com o conhecimento empírico provindo de populações indígenas, porém, não há comprovação científicas suficientes que embasem sua eficácia nem da segurança de sua utilização (LORENZI; MATOS, 2002).

Em contrapartida, estudos realizados com a espécie do mesmo gênero, a *Eleutherine Americana*, trás relatos do grande potencial do extrato do bulbo, como agente antimicrobiano, anti-inflamatório, como inibidor da α -glicosidase, replicação do HIV e topoisomerase II, devido a compostos presentes em seu bulbo como naftaleno, naftoquinona e antraquinona (INSANU et al. 2014).

Figura 4: Espécie *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb.



Fonte: o autor (2017).

2.12.1 Atividades biológicas *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb.

A atividade antimicrobiana da espécie *E. bulbosa* foi relatada pela comunidade em estudos etnobotânicos, também é possível encontrar alguns trabalhos na literatura científica que relatam a ação positiva da espécie frente a diversos micro-organismos como *Streptococcus pyogenes* retirados de isolados clínicos das amígdalas de pacientes com amigdalite, *Staphylococcus aureus* retirados de alimentos contaminados, *Aspergillus niger*, *Rhizopus spp.*, *Penicillium spp.*, *Erwinia spp.*, *Bacillus cereus*, *Shigella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, e outros organismos Gram-positivos, Gram-negativos e fungos (IFESAN, et al. 2009; IFESAN, et al. 2010; HARLITA; ASNANI, 2018).

Nasution et al. (2018) traz um levantamento etnobotânico de plantas utilizadas para cura de diabetes em karo étnica, norte de Sumatra, na Indonésia. Segundo o estudo, o bulbo da *Eleutherine* é utilizado pela curandeira local para a atividade hipoglicemiante, o estudo também trouxe uma triagem fitoquímica mostrou que os extratos brutos citados no trabalho continham compostos fenólicos, terpenóides, esteróides e saponinas.

O estudo de extratos de bulbos da *E. palmifolia*, espécie que alguns autores consideram sinonímia de *E. bulbosa*, observaram bons resultados de atividade antidiabética e antioxidante, através da pesquisa *in vivo*, com 24 camundongos machos da linhagem Wistar, induzidos a hiperglicemia por aloxana. (ARWATI et al, 2018; LORENZI; MATOS, 2002). Para o papel regulador da pressão arterial, o extrato etanólico do bulbo de *E. bulbosa* obteve resultados positivos na diminuição da pressão de ratas ovariectomizadas reduzir o nível de pressão arterial sistólica em 28,06% e a diastólica em 30,47% (BAHTIAR; CHUMALA, 2018).

2.12.2 Características químicas *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb.

Dentre os compostos químicos característicos da *E. bulbosa*, estão relatadas a presença de fenóis, favonóides, alcaloides, antraquinonas, saponinas, glicosídeos, taninos, triterpenos e esteroides fazem parte da composição da espécie (SHI et al, 2018; ICHWAN; MUSTOFA, 2017). Estudos utilizando métodos cromatográficos, isolaram substâncias ativas do bulbo do *Eleutherine*, como o trabalho de Hara, et al. (1997) que isolou a Naftoquinona elecanacin e um naftaleno chamado isoeleuterol a partir da *Eleutherine americana* que demonstraram atividade contra a topoisomerase II humana, sugerindo uma atividade inibidora contra o HIV. Também foram isolados compostos de *E. americana* por HPTLC E LC-MS como eleutherol, isoeleutherina e eleutherina, 2,5-dimetil-10-hidroxi-naftropona e 8- O - β - d-glucopiranosídeo. (SOMPOL et al. 2008). Na Tabela 1 seguem listados os compostos isolados do gênero *Eleutherine*.

Tabela1: Compostos descritos na literatura da Eleutherine.

Compostos isolados do Eleutherine					
Composto	Grupo de Compostos	Espécie	Local	Atividade – Função	Referência
Eleutherol – Derivados de Eleutherol A e C	Naftaleno – Derivados de Naftaleno	<i>E. americana</i>	Heichi (China)	Aumento do fluxo coronariano em cobaias;	Chen et al., 1986.
				Atividades inibitórias contra o HIV.	Chen et al., 2018
					Hara et al., 1997
Eleutherin	Naftoquinona	<i>E. americana</i>	*	Aumento do fluxo coronariano em cobaias; Atividade Inibitória contra Topoisomerase II humana.	Chen et al., 1986. Hara et al., 1997.
Isoeleutherina	Naftoquinona	<i>E. americana</i> – <i>E. plicata</i>	*	Aumento do fluxo coronariano em cobaias; Atividade contra <i>Entamoeba histolytica</i> .	Chen et al., 1986 Nascimento et al., 2012
Hongconin	Naftaleno	<i>E. americana</i>	Hong Cong (China)	*	Chen et al., 1986
Eleuthinone A e C	Derivados de Naftaleno	<i>E. americana</i>	Heichi (China)	Efeito potente contra a lesão de humanos célula endotelial da veia umbilical	Chen et al., 2018
9,9'-di-hidroxi-8,8'-dimetoxi-1'-dimetil-1H,	*	<i>E. americana</i>	Guangxi (China)	Atividade contra o crescimento de	Jinzhong et al., 2006

1H '- [4,4'] bis [nafta [2,3- c] funanil] -3,3'- diona; 6,8-di-hidroxi-3,4- dimetoxi -1- metil- antraquinona-2-éster metílico do ácido carboxílico	antraquinona	<i>E. americana</i>	Guangxi, (China)	Atividade contra o crescimento de <i>Pyricularia oryzae</i>	Jinzhong et al., 2006
2-acetil-3,6,8-tri-hidroxi- 1-metil-antraquinona	antraquinona	<i>E. americana</i>	Guangxi, (China)	Atividade contra o crescimento de <i>Pyricularia oryzae</i>	Jinzhong et al., 2006
Elecanacina	Naftoquinona	<i>E. americana</i>	Ilha de Java (indonésia)	*	Hara et al., 1997
Eleutherinona	Naftoquinona	<i>E. bulbosa</i>	Nova União Estados de Minas Gerais	Atividade fitopatogênica contra o fungo fitopatogênico <i>Cladosporium sphaerospermum</i>	Alves et al., 2003.
8-hidroxi-3,4-dimetoxi- 1-metil-antra-9	*	<i>E. americana</i>	*	*	Liu et al 2009
éster metílico do ácido 10-quinona-2-carboxílico Éster metílico do ácido	*	<i>E. americana</i>	*	*	Liu et al 2009
4,8-di-hidroxi-3-metoxi- 1-metil-antra-9,10- quinona-2-carboxílico	*	<i>E. americana</i>	*	*	Liu et al 2009
[bis (2-6, 7-diamino-5, 8- dioxo-naftaleno1-il) propanal]	Naftoquinona	<i>E. bulbosa</i>	Kerala, India	Atividade fungicida	Rani, 2018

Fonte: O autor (2019).

Legenda: * Não Identificado.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COLETA DAS AMOSTRAS E PROCEDIMENTOS PARA OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

As amostras de *A. hispidum* L., *B. diffusa* L. e *E. bulbosa* (Mill.) Urb. foram coletadas no dia 17 de maio de 2017, na cidade de Brejo da Madre de Deus, região do semiárido pernambucano, Caatinga, de clima tropical semiárido (Bsh), com variação de temperatura de 15C° a 34C°, onde a coordenadas de coleta foram: 8°08'29.6"S 36°20'35.9"W.

Para realização do estudo os exemplares das espécies vegetais foram separados em laboratório, sendo realizada a identificação botânica com depósito no herbário Dárdano de Andrade Lima do Instituto agronômico de Pernambuco (IPA), protocolo nº FIB Nº 04/2018, disponibilizada no Anexo 9.1.

Para a preparação dos extratos (Tabela 2), as espécimes foram separadas e secadas em estufa de circulação forçada de ar a 42°C, sendo posteriormente trituradas e os extratos brutos obtidos utilizando álcool etílico 70% (v/v) durante 4 ciclos de 48 horas, em cada ciclo os sobrenadantes foram retirados e mais álcool foi adicionado. Após este processo, os extratos foram submetidos à destilação sob vácuo em evaporador rotativo IKA (RV10 CONTROL V) e em seguida levados ao dessecador, para retirada total do solvente.

Tabela2: Extratos realizados a partir das partes das plantas.

Extratos realizados no estudo	
Espécie	Parte da espécie
<i>Acanthospermum hispidum</i> L.	Folha
	Raiz
<i>Boerhavia diffusa</i> L.	Folha
	Caule
	Raiz
<i>Eleutherine bulbosa</i> (Mill.) Urb.	Folha
	Bulbo
	Raiz

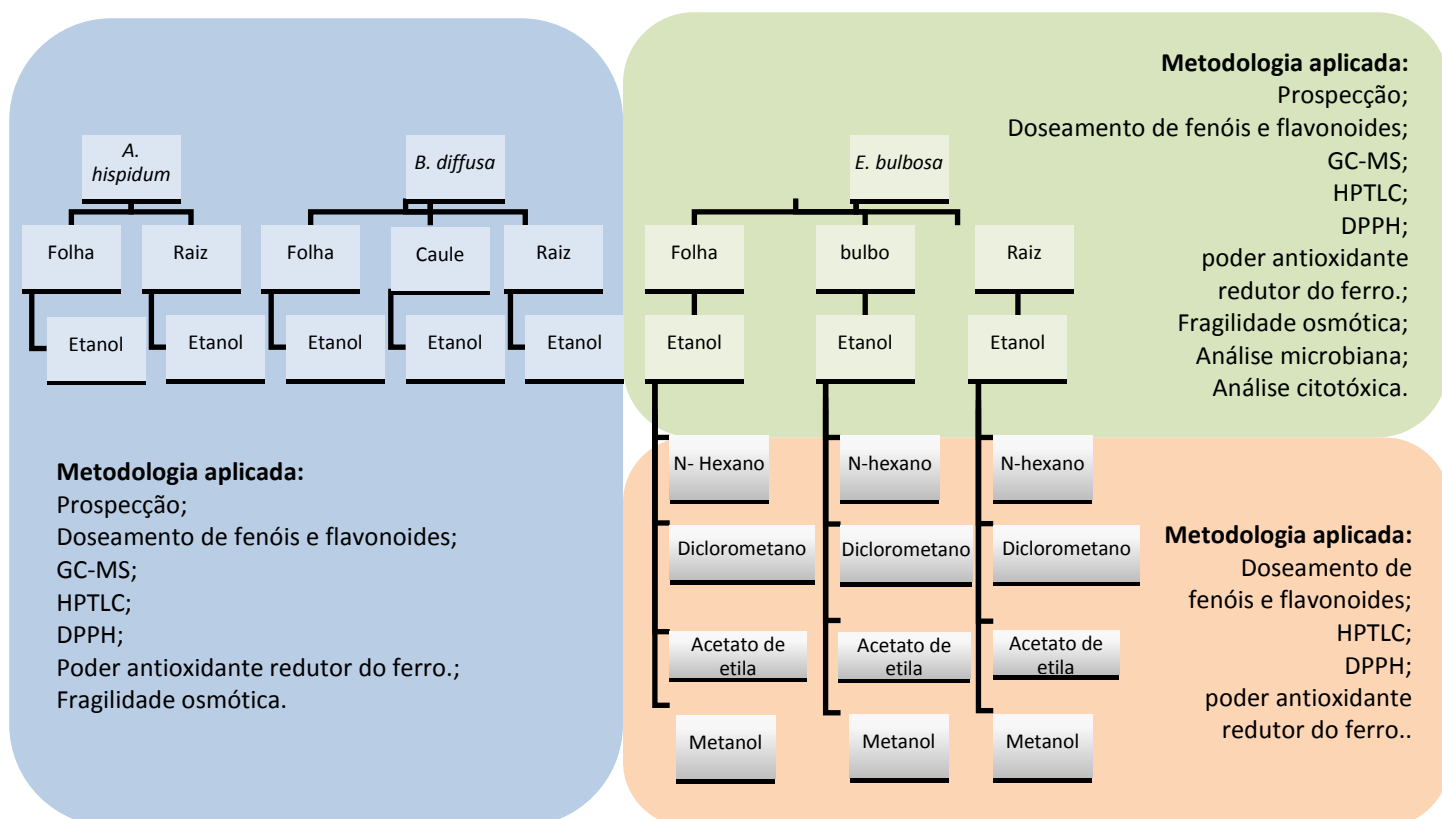
Fonte: O autor (2019).

3.2 PROCESSO DE FRACIONAMENTO DAS AMOSTRAS

A espécie que apresentou resultados expressivos nos testes antioxidantes, de fragilidade osmótica, cromatografia e caracterização fitoquímica foi selecionada para o fracionamento e submetida a testes complementares, antimicrobiano e citotóxico, além de submeter às frações a análise antioxidante, de doseamento fitoquímico e análise cromatográfica por HPTLC.

A espécie que apresentou potencial para o fracionamento foi a *E. bulbosa* (Mill) Urb. da qual, a partir do extrato etanólico foram utilizadas 6,0; 6,0 e 6,9g do extrato etanólico da folha, bulbo e raiz para fracionamento em coluna filtrante, em sílica (gel 60 para cromatografia em coluna 0,04-0,063mm) , utilizando solventes em polaridades crescentes: N-hexano, Diclorometano, Acetato de etila e Metanol, como mostrado na Figura5. As frações foram obtidas utilizando 5 alíquotas de 100ml de cada um dos solventes e em seguidas foram submetidas a evaporador rotativo para retirada total do solvente. Com os extratos com peso estável, foi possível executar a metodologia para cada espécie.

Figura 5: Processo de elaboração e fracionamento dos extratos analisados no estudo.



Fonte: O autor (2019).

3.3 ENSAIOS QUÍMICOS

3.3.1 Prospecção fitoquímica

As prospecções fitoquímicas dos extratos etanólicos de *A. hispidum* L., *B. diffusa* L. e *E. bulbosa* (Mill.) Urb. Foram realizadas para detecção da presença dos seguintes compostos: taninos; saponinas, antocianinas, antocianidinas e flavonoides. As análises de prospecção a serem descritas foram baseadas na metodologia descrita por Matos (2009).

3.3.2 Doseamento de fenóis

Os doseamentos de compostos fenólicos totais foram realizados com os extratos etanólicos de *A. hispidum* L., *B. diffusa* L. e com frações e extrato etanólico de *E. bulbosa* (Mill.) Urb. A concentração de compostos fenólicos (totais) foi determinada utilizando-se o método espectrofotométrico (Singleton et al., 1999). A mistura de reação foi preparada a partir de 0,5 mL de solução metanólica de extrato com 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (10%) e 2,5 mL de NaHCO_3 a 7,5%. O branco foi preparado concomitantemente, à partir de 0,5 mL de metanol, 2,5 mL de reagente de 10% de Folin-Ciocalteu e 2,5 mL de 7,5% de NaHCO_3 , ambos dissolvidos em água destilada. As amostras foram em seguida incubadas num banho termostaticado a 45°C durante 45 min. A absorbância foi determinada usando o espectrofotômetro de UV-Vis com a leitura do comprimento de onda a 765 nm (λ). As amostras foram preparadas em triplicata para cada análise e o valor médio de absorbância foi obtido. Foi utilizado como padrão o ácido gálico para a construção da curva de calibração. Em seguida, o conteúdo de equivalente de compostos fenólicos presentes em extratos foi expresso em termos de μg equivalentes de ácido gálico por grama de extrato ($\mu\text{g EAG.g}^{-1}$).

3.3.3 Doseamento de flavonoides

Os doseamentos de compostos de flavonoides totais foram realizados com os extratos etanólicos de *A. hispidum* L., *B. diffusa* L. e com frações e extrato etanólico de *E. bulbosa* (Mill.) Urb. A determinação de flavonoides de seguiu a metodologia proposta por Woisky e Salatino (1998) adaptada. O experimento consiste em pipetar 1 mL do extrato em tubo de ensaios e, após essa adição, adiciona-se aos tubos 1 mL de cloreto de alumínio (AlCl_3 , 5%) (hexahidratado) em metanol e 2 mL de metanol. Para o experimento, foi preparado o branco utilizando-se 3 mL de metanol e 1 mL de cloreto de alumínio. Aguarda-se 30 minutos no escuro e procede-se a leitura em espectrofotômetro a 425nm. As amostras foram preparadas em

triplicata para cada análise e o valor médio de absorbância foi obtido. Foi utilizada como padrão a quercetina para a construção da curva de calibração. A partir da equação da reta obtida, realiza-se o cálculo do teor de flavonóides, expresso em μg equivalente quercetina de amostra por grama de extrato ($\mu\text{g EQ.g}^{-1}$).

3.3.4 Gas chromatography mass spectrometry (GC-MS)

Através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas foram analisadas as amostras etanólicas de *A. hispidum* L., *B. diffusa* L. e *E. bulbosa* (Mill.) Urb. em um GC/MS, Agilent modelo 7890A, de coluna capilar DB-5ms (5% fenil-95% metilpolisiloxano). Os fragmentos de massa obtidos foram comparados com os da biblioteca de referência NIST versão 8. As condições cromatográficas usadas na análise dos extratos encontram-se na Tabela 3.

Tabela3: Condições cromatográficas usadas na análise dos extratos.

Parâmetros e condições gerais	
Equipamento	GC/MS 7890 A, Agilent
Coluna capilar	DB-5ms (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) 5% fenil-95% metilpolisiloxano
Gás de arraste	Hélio (1,4 ml/min)
Modo de injeção	Split 1:10
Ionização	Impacto eletrônico com 70 Ev
Volume injetado	1 μL
Aquisição	Scan – 30 a 450 m/z
Temperatura do detector	280°
Temperatura do injetor	280°
Temperatura inicial	70°
Tempo inicial	3 min
Taxa de aquecimento	4°
Temperatura final	280° por 15 min
Tempo final	Min

Fonte: O autor (2019).

3.3.5 Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE)

A análise qualitativa para determinação de classes de compostos foi realizada a partir do HPTLC/CCDAE (High-Performance Thin Layer Chromatography/Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE). Os módulos de HPTLC da CAMAG (Muttenez, Suíça) composto por um Automatic TLC Sampler 4, Automatic development chamber ADC2 e um TLC Visualizer manipulados pelo software WINCATS (versão 1.4.4.6337) foram usados para a análise dos extratos etanólicos de *A. hispidum* L., *B. difusa* L. e extrato etanólico e frações da *E. bulbosa* (Mill) Urb. A fase estacionária foi uma placa 60F254 (20 cm × 10 cm) Merck (Darmstadt, Alemanha) composta por sílica gel pré-ativada com suporte de alumínio. As amostras foram aplicadas na placa em bandas de 9,5 mm de comprimento com distância de 8 mm do fundo da placa e a primeira aplicação a 20 mm do lado esquerdo, mantendo uma distância de 12 mm entre cada amostra. Foram realizadas pesquisas para a detecção de compostos fenólicos, de cumarina, naftoquinonas, derivados antracênicos, triterpenos e esteroides. Na Tabela 4 encontra-se as fases móveis e os reveladores para cada um dos compostos pesquisados.

Tabela4: Fase Móvel e reveladores usados na análise de HPTLC.

Compostos Pesquisados	Fase móvel	Revelador utilizado
Compostos fenólicos	Acetato de etila – ácido acético-ácido fórmico-água (110:11:11:26).	Neu
Cumarina	Tolueno-éter (1:1). Saturado com ácido acético a 10%.	KOH
Naftoquinonas	Tolueno-ácido fórmico (99:1).	KOH
Derivados antracênicos	Acetato de etila-metanol-água (110:13,5:10).	KOH
Triterpenos e Esteroides	Tolueno-cloroformio- etanol (40:40:10)	Liebermann-Burchard com aquecimento a 100°C por 10min.
Monoterpenos	Tolueno-acetado 93-7	Vanilina sulfúrica com aquecimento a 110 °

Fonte: O autor (2019).

3.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS

3.4.1 Difenil-picril-hidrazina (DPPH)

O teste de DPPH foi realizado com os extratos etanólicos de *A. hispidum* L., *B. diffusa* L. e com frações e extrato etanólico de *E. bulbosa* (Mill.) Urb. O método baseia-se na transferência de elétrons onde, por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar, o DPPH que possui cor púrpura é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com consequente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos determinou-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres. A partir do extrato etanólico foram preparadas soluções em triplicata das amostras nas seguintes concentrações: 1000, 500, 250, 125 e 62,5 µg.mL⁻¹. Um controle negativo foi feito pela adição de etanol e DPPH. Adicionou-se a cada concentração de extrato etanólico uma solução de DPPH, exceto nos brancos, onde foi adicionado o solvente. Após a adição do DPPH, esperou-se 30 minutos e procedeu-se a leitura no espectrofotômetro a 515nm (Nascimento et al., 2011). A capacidade de eliminar o radical DPPH (% de atividade antioxidante) foi calculada utilizando-se a seguinte equação:

$$\text{Eliminação [DPPH] (\%)} = \frac{(\text{Abs controle} - \text{Abs amostra})}{\text{Abs controle}} \times 100$$

Adicionalmente foi realizado o cálculo da IC₅₀, capacidade do extrato de induzir metade do efeito máximo antioxidante, sendo utilizado o software GraphPad Prims 7.0 para sua determinação.

3.4.2 Teste do poder antioxidante redutor do ferro.

O teste do poder antioxidante redutor do ferro. foi realizado com os extratos etanólicos de *A. hispidum* L., *B. diffusa* L. e com frações e extrato etanólico de *E. bulbosa* (Mill.) Urb. No teste da atividade poder antioxidante redutor do ferro., foi utilizada uma alíquota de 2,5mL da amostra, misturadas com 0,2M de tampão fosfato, adicionando-se 1,5mL de ferricianeto de potássio 1% (K₃Fe(CN)₆). A mistura foi incubada a 50°C em 30 min. Depois foi adicionado 2,5mL de ácido tricloroacético (10%) com 5mL da mistura. A mesma foi centrifugada em 3000g. Após esse processo, foram retirados 2,5mL do sobrenadante, aos quais foram

adicionados 2,5mL de água e 0,5 de cloreto férrico. As amostras são analisadas pela absorbância no comprimento de onda de 700nm. A curva de calibração foi realizada utilizando o TROLOX como padrão, sendo os resultados expressos em μg equivalente de TROLOX por grama de extrato ($\mu\text{g ET.g}^{-1}$) (JAYANTHI E LALITHA, 2011; FERREIRA et al., 2007).

3.4.3 Fragilidade osmótica

A técnica de fragilidade osmótica realizada foi baseada na metodologia descrita por Darcie e Lewis (1975) modificada. O ensaio foi realizado em duplicata, as amostras foram testadas em concentrações de 1000, 500, 250, 125, 62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ diluídas em solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9%. As amostras receberam 75 μL de sangue de ovelha (Multi Diagnostics) em cada concentração testada para verificar a hemólise. O sangue das ovelhas foi exposto ao extrato por 30 minutos.

Em seguida, as soluções da amostra foram centrifugadas a 2500 rpm por 3 minutos a 25 °C. O controle negativo foi realizado com solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9% e o controle positivo com água destilada, que recebeu os mesmos procedimentos utilizados nas amostras de teste. A medida de absorbância do sobrenadante foi realizada a 540nm em espectrofotômetro (UV 1800 Shimadzu). Para determinação da taxa de hemólise, foi realizada uma medição a 540 nm sem adição de sangue de ovelha.

Também foram realizados esfregaços panóticos com o precipitado resultante do procedimento para a observação da morfologia integral ou hemolítica dos eritrócitos, observado através de um microscópio óptico conectado à câmera Leica DFC-280 em aumento de 1000x. A porcentagem de hemólise foi calculada pela fórmula:

$$\text{Hemólise (\%)} = \frac{\text{abs da amostra} - \text{Abs da coloração} \times 100}{\text{Abs controle positivo}}$$

3.4.4 Análise citotóxica

O ensaio citotóxico foi realizado como teste complementar apenas com os extratos etanólicos de *E. bulbosa* (Mill.) Urb. O ensaio citotóxico realizado admitiu a metodologia que se baseia na análise colorimétrica da conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol) -2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas, onde se é possível definir a citotoxicidade celular. Os extratos etanólicos da *E. bulbosa* (Mill) Urb. Foram avaliados frente à linhagem neoplásica HeLa (carcinoma uterino humano) mantidas em estufa a 37 °C contendo

5% de CO₂, em meios específicos RPMI 1640 (Gibco) e DMEN (Gibco), com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 10 mM de HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid) (Gibco) e 1% de Penicilina/Estreptomicina (Gibco). Para o repique, utilizou-se tripsina/EDTA (0,25%).

As células da linhagem foram plaqueadas numa densidade 1×10^5 (linhagem aderida), por poço em placas de 96 poços. As linhagens neoplásicas foram tratadas com os compostos na concentração final de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e em seguida incubadas por 72 horas. Após este período 25 μL de MTT foi adicionado e as células foram reincubadas por 3 h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 100 μL de DMSO em espectrofotômetro de placa a 595 nm. Os experimentos foram realizados em quadruplicatas. A citotoxicidade foi calculada utilizando-se a seguinte equação:

$$\text{Citotoxicidade (\%)} = 1 - \frac{(\text{Abs controle} - \text{Abs amostra})}{\text{Abs controle}} \times 100$$

Para a avaliação do potencial citotóxico das amostras testadas, foram consideradas as amostras com alta atividade (95 a 100 % de inibição), com atividade moderada (inibição de crescimento celular variando de 70 a 90%) e sem atividade (inibição de crescimento menor que 50 %) (RODRIGUES et al., 2014).

3.4.5 Análise antimicrobiana

A avaliação antimicrobiana foi realizada como teste complementar apenas com os extratos etanólicos de *E. bulbosa* (Mill.) Urb. Os testes para a determinação das atividades antimicrobianas foram realizados de acordo com o método de difusão em disco, com modificações, no laboratório do Departamento de Antibióticos da UFPE (UFPEDA), com os seguintes micro-organismos: *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 01), *Mycrococcus luteus* (UFPEDA 06), *Bacillus subtilis* (UFPEDA 16), *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 39), *Mycobacterium smegmatis* (UFPEDA 71), *Enterococcus faecalis* (UFPEDA 138), *Escherichia coli* (UFPEDA 224), *Serratia marcescens* (UFPEDA 398) e a levedura *Candida albicans* (UFPEDA 1007).

Foram utilizados 200 mg das amostras, para a diluição em 2 mg.mL^{-1} de DMSO, e posteriormente foram distribuídos em discos de papel de filtro esterilizados de 6 mm de diâmetro. Os discos foram postos sobre o meio de cultura correspondente para cada micro-organismo, a suspensão do inóculo dos micro-organismos em solução salina correspondeu a 0,5

na escala de McFarland, sendo os micro-organismos semeados em meio ágar Muller-Hinton e GL com um swab estéril.

As placas foram colocadas em estufa a 35°C por 24 até 48 horas (dependendo da espera e condição de crescimento dos micro-organismos), em triplicata, onde a observação e medição dos halos de inibição foram realizadas, e processadas com as médias aritméticas dos halos. Os controles positivos utilizados foram: Ciclofosfamida (CTX) e Clorafenicol (CLO) e o controle negativo foram as placas apenas com os micro-organismos.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas e gráficos foram realizados através do Software GraphPad Prism 7.03. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. A diferença estatística foi calculada utilizando ANOVA com teste de comparações múltiplas Turkey para as análises de doseamentos de fenóis, flavonoides e poder antioxidante redutor do ferro. Para os tratamentos de DPPH foi realizada ANOVA com teste de comparações múltiplas de Dunnett. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sabe-se que algumas plantas da região da Caatinga são utilizadas como fitoterápicos, devido aos compostos que lhes conferem um perfil terapêutico, onde metabólitos secundários presentes nessas plantas estão envolvidos em seus efeitos benéficos e medicinais (CHATTERJEE, 2015; MORAIS, 2005). A caatinga apresenta clima, temperatura, precipitação, solo e outros componentes abióticos diferentes quando comparados a outras regiões, o que pode influenciar a quantidade de metabólitos produzidos durante o desenvolvimento da planta, devido ao estresse da alta variação das condições ambientais (CALIXTO, 2001; GOINGUENÉ e TURLINGS 2002).

A capacidade de resposta ao estresse de um determinado sistema é realizada por métodos de resistência que podem ser escapes ou tolerância. Nos mecanismos de escape há uma redução na atividade metabólica, ao contrário dos mecanismos de tolerância, onde há uma maior atividade na produção de compostos (WILLADINO e CAMARA, 2010). Estudos como Pimpão (2009) confirmam a capacidade de alteração metabólica das plantas, na qual o estresse hídrico e a salinidade aumentam a quantidade de fenóis e a atividade antioxidante.

Para avaliar o potencial das espécies *A. hispidum* L., *B. diffusa* L. e *E. bulbosa* (Mill) Urb. foram realizados testes químicos e biológicos. Para a avaliação dos compostos encontrados nessas espécies de caatinga, a partir de prospecções fitoquímicas, doseamentos de equivalentes de flavonoides e fenóis e análise cromatográfica por GCMS e HPTLC.

4.1 ENSAIOS QUÍMICOS

4.1.1 Testes de prospecção fitoquímica

A prospecção fitoquímica foi avaliada de forma qualitativa de compostos de Antocianinas e antocianidinas, Flavonas, Flavonóis, Xantonas, Chalconas e Auronas, Saponinas e Taninos nas três espécies estudadas. Entre os testes de prospecção fitoquímica foi possível detectar qualitativamente a presença de compostos derivados do metabolismo secundário das espécies estudadas. Os resultados foram elucidados na Tabela 5.

Tabela5: Prospecção fitoquímica qualitativa dos extratos etanólicos da *A. hispidum* L., *B. diffusa* L. e *E. bulbosa* (Mill) Urb..

TESTE DE PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA						
Espécie	Amostra	Antocianinas e antocianidinas	Flavonas, Flavonóis e Xantonas	Chalconas e Auronas	Saponina	Tanino
<i>A. hispidum</i> L.	Folha - Etanol	+	+	+	-	++
	Raiz - Etanol	-	+	+	-	+
<i>B. diffusa</i> L.	Folha - Etanol	+	+	++	+	++
	Caule - Etanol	+	+	+	-	++
	Raiz - Etanol	-	-	+	-	+
<i>E. bulbosa</i> (Mill) Urb.	Folha - Etanol	+	+++	+	+	++
	Bulbo - Etanol	+++	+++	+	++	++
	Raiz - Etanol	+	+	+	+	+

Fonte: O autor (2019).

Legenda: + Presença fraca, ++ Presença moderada, +++ Presença forte.

Para a espécie *E. bulbosa* (Mill) Urb., foram detectadas antocianinas e antocianidinas, corroborando com o trabalho de Thanh et al. (2012) onde o autor encontrou cerca de 2,04% desses componentes nos bulbos da espécie. A forte presença de flavonas, flavonóis e xantonas nos extratos da folha e do bulbo da *E. bulbosa* (Mill) Urb., no teste de prospecção, corroboram com artigos da literatura para a espécie (SINACAY, 2016; MARTÃO, 2013). Foi detectável presença de taninos e outros compostos na *A. hispidum* L. O trabalho de Maurya et al. (2007) encontrou a presença de flavonas, flavonóis e xantonas no extrato de folhas *B. diffusa* L., o que vai a concordância com os resultados do atual trabalho. Também foi possível verificar a presença de Chalconas, auronas e taninos na folha e caule da espécie.

4.1.2 Doseamento de fenóis

O ácido gálico foi utilizado como padrão para a determinação de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu, a correlação linear estabelecida foi $R^2 = 0,99321$, a equação de regressão linear obtida foi $y = 0,00989x + 0,00995$. A partir da equação de regressão linear

obtida, os teores de compostos fenólicos das amostras foram determinados em termos de equivalente μg de ácido gálico por grama de extrato ($\mu\text{g EAG.g}^{-1}$) (Tabela 6 e 7).

Tabela 6: Média da quantificação de fenóis totais dos extratos etanólicos da *A. hispidum* L., *B. diffusa* L. e *E. bulbosa* (Mill) Urb. expressos em equivalente à ácido gálico expressos em $\mu\text{g EAG.g}^{-1}$.

DOSEAMENTO DE FENÓIS		
Espécie	Amostra	Concentração 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
<i>B. diffusa</i> L.	Folha - Etanol	$161,0 \pm 11,7^a$
<i>B. diffusa</i> L.	Caule - Etanol	$111,5 \pm 1,4^b$
<i>E. bulbosa</i> (Mill) Urb.	Folha - Etanol	$105,1 \pm 1,5^b$
<i>B. diffusa</i> L.	Raiz - Etanol	$86,1 \pm 0,9^b$
<i>E. bulbosa</i> (Mill) Urb.	Bulbo - Etanol	$74,8 \pm 5,9^{b,c}$
<i>A. hispidum</i> L.	Folha - Etanol	$71,43 \pm 0,81^{b,c}$
<i>E. bulbosa</i> (Mill) Urb.	Raiz - Etanol	$65,2 \pm 8,5^{b,c}$
<i>A. hispidum</i> L.	Raiz - Etanol	$21,0 \pm 1,9^d$

Fonte: O autor (2019).

No doseamento dos compostos fenólicos, as amostras analisadas apresentaram consideráveis teores dos equivalentes a ácido gálico (EAG) nas amostras etanólicas, onde a amostra *B. diffusa* L. Folha e Caule apresentaram os maiores teores de EAG.

Sem diferença estatística para a amostra do Caule e raiz da *B. diffusa* L., a amostra de *E. bulbosa* (Mill) Urb. folha apresentou consideráveis teores de EAG. O trabalho de Fawole et al., (2009) atribui para a espécie *E. bulbosa* quantidade de compostos fenólicos e os correlacionam a atividades antiinflamatórias da família Iridaceae.

As amostras de *E. bulbosa* (Mill) Urb. bulbo e raiz com $74,8 \pm 5,9$ e $65,2 \pm 8,5 \mu\text{g EAG.g}^{-1}$ respectivamente, e *A. hispidum* L. Folha com $77,1 \pm 9,1 \mu\text{g EAG.g}^{-1}$ apresentaram consideráveis teores de equivalentes a compostos fenólicos sem se distinguirem estatisticamente (Tabela 6).

Tabela7: Média da quantificação de fenóis totais das frações da espécie *E. bulbosa* (Mill) Urb. Expressos em equivalente à ácido gálico expressos em $\mu\text{g EAG.g}^{-1}$.

DOSEAMENTO DE FENÓIS		
Espécie	Amostra	Concentração 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
<i>E. bulbosa</i> (Mill) Urb.	Folha - Acetato de etila	$152,8 \pm 1,3^a$
	Folha - Metanol	$126,7 \pm 4,0^b$
	Folha - Diclorometano	$94,28 \pm 1,9^c$
	Folha - N-hexano	$85,94 \pm 8,2^c$
	Raiz - Diclorometano	$54,93 \pm 2,1^d$
	Bulbo - Acetato de etila	$51,76 \pm 1,4^d$
	Raiz - Acetato de etila	$51,64 \pm 4,8^d$
	Bulbo - Diclorometano	$44,37 \pm 7,1^d$
	Raiz - Metanol	$43,51 \pm 1,8^d$
	Bulbo - Metanol	$42,73 \pm 0,3^d$
	Raiz - N-hexano	$33,94 \pm 6,8^d$
	Bulbo - N-hexano	$31,42 \pm 2,1^d$

Fonte: O autor (2019).

Quanto às análises das frações da espécie *E. bulbosa* (Mill) Urb. nos doseamentos de compostos fenólicos os maiores teores de EAG se concentraram nas amostras de derivadas das folhas e bulbos (Tabela 7). As quatro frações da folha, acetato de etila, diclorometano, metanol e N-hexano concentraram os melhores resultados do doseamento seguidos dos extratos de bulbo e raiz.

Segundo Degáspari (2004) a presença dos compostos fenólicos podem conter ações antioxidantes, inibindo a oxidação de lipídios ou outras moléculas, evitando o início ou propagação das reações em cadeia de oxidação, prevenindo o desenvolvimento diversas doenças.

4.1.3 Doseamento de flavonoides

A quercetina foi utilizada como padrão para a determinação dos flavonóides totais pela revelação do cloreto de alumínio (AlCl_3), a correlação linear estabelecida foi de $R^2 = 0,99576$, a equação de regressão linear obtida foi de $y = 0,02709x - 0,04905$. A partir da equação de

regressão linear obtida, os teores totais de flavonóides das amostras foram determinados em termos de μg equivalente de quercetina por grama de extrato ($\mu\text{g EQ.g}^{-1}$) (Tabela 8 e 9).

Tabela8: Média da quantificação de flavonoides totais dos extratos etanólicos da *A. hispidum* L., *B. diffusa* L. e *E. bulbosa* (Mill) Urb. Expressos em equivalente à ácido gálico expressos em $\mu\text{g EQ.g}^{-1}$.

DOSEAMENTO DE FLAVONÓIDES		
Espécie	Amostra	Concentração 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
<i>E. bulbosa</i> (Mill) Urb.	Folha- Etanol	$113,3 \pm 3,1^a$
<i>A. hispidum</i> L.	Folha- Etanol	$99,9 \pm 3,4^b$
<i>B. diffus</i> L.	Folha- Etanol	$46,0 \pm 1,8^c$
<i>B. diffusa</i> L.	Caule- Etanol	$25,1 \pm 1,6^d$
<i>E. bulbosa</i> (Mill) Urb.	Bulbo- Etanol	$17,8 \pm 0,8^d$
<i>E. bulbosa</i> (Mill) Urb.	Raiz- Etanol	$15,1 \pm 0,8^{d,e}$
<i>B. diffusa</i> L.	Raiz- Etanol	$12,0 \pm 0,2^{d,e}$
<i>A. hispidum</i> L.	Raiz- Etanol	$8,3 \pm 0,2^f$

Fonte: O autor (2019).

As amostras etanólicas com os maiores teores de compostos fenólicos também apresentaram os maiores resultados para os compostos flavonóicos com as amostras de *E. bulbosa* (Mill) Urb. folha que apresentou o maior teor de equivalentes a quercetina seguido das amostras de *A. hispidum* L. folha e *B. diffusa* L. folha, existindo diferença estatística entre elas.

Os teores de equivalentes de quercetina obtidos das amostras fracionadas da *E. bulbosa*(Mill) Urb.demonstraram que os maiores valores se concentraram nas amostras da folha: Diclorometano, Acetato de etila e metanol, assim como os resultados obtidos no doseamento de fenóis no atual trabalho, demonstrando assim uma relação entre a quantidade de metabólitos das amostras.

Tabela9: Média da quantificação de flavonóides totais dos extratos fracionados da *E. bulbosa* (Mill) Urb. expressos em equivalente à ácido gálico expressos em $\mu\text{g EQ.g}^{-1}$.

DOSEAMENTO DE FLAVONÓIDES		
Espécie	Amostra	Concentração 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
<i>E. bulbosa</i> (Mill) Urb.	Folha – Diclorometano	$140,7 \pm 0,21^a$
	Folha - Acetato de etila	$112,8 \pm 4,79^b$
	Folha – Metanol	$85,63 \pm 2,1^c$
	Bulbo – Diclorometano	$51,63 \pm 6,36^d$
	Folha - N-hexano	$43,14 \pm 2,1^d$
	Bulbo - N-hexano	$19,04 \pm 4,6^e$
	Bulbo - Acetato de etila	$16,39 \pm 0,9^e$
	Raiz – Diclorometano	$13,17 \pm 0,66^e$
	Raiz - N-hexano	$10,1 \pm 0,94^e$
	Bulbo – Metanol	$6,73 \pm 0,17^{e,f}$
	Raiz - Acetato de etila	$4,82 \pm 0,77^{e,f}$
	Raiz – Metanol	$2,9 \pm 0,17^{e,f}$

Fonte: O autor (2019).

Demonstrando os teores de equivalentes a fenóis e flavonoides similares aos encontrados no presente trabalho, o de Bhardwaj et. al (2014), que encontrou quantidades similares de equivalentes de quercetina para a espécie *B. diffusa* L. nas amostras da folha e raiz.

4.1.4 CG-MS

Na análise cromatográfica a gás, vários compostos foram detectados nas amostras, as características destes compostos como peso molecular, fórmula molecular, tempo de retenção e área de pico (%) estão resumidas nas Tabelas do Anexo 9.2. Para análise consideramos somente aqueles com índice de similaridade acima de 80%.

Neste sentido, os compostos detectados em folhas de *A. hispidum*, Lavandulol (98,1%); Raiz *B. diffusa*, Diidroxiaçetona (81,7%); Folhas de *E. bulbosa*, 2-Thiouracil (85,6%); Bulbo de *E. bulbosa*; Etanolamina (83,8%) e Benzofenona (92.4 %).

Nos resultados cromatográficos foidemonstrada uma vasta riqueza de compostos nas três espécies em foco no trabalho. Na espécie *A. hispidum* L., foi possível detectar com o índice de similaridade de 98.1% o Lavandulol que segundo a literatura apresenta moderada atividade antioxidante, compõe fragâncias variadas (Ruberto & Baratta, 2000).

Utilizado como marcador para avaliar o transporte de glicose e sua absorção em várias células e sistemas de órgãos a Diidroxiacetona, conhecida como DHA, é utilizada comercialmente para fins de bronzeamento da pele, também utilizado para amenizar os efeitos do vitiligo, sendo um bioproduto valorizado no mercado (CIRIMINNA, et al. 2018), e tal foi detectada nas amostras da raiz *B. Diffusa* L. onde apresentou índice de similaridade de 81.7%.

Apresentando índice de similaridade de 83.8% o composto Etanolamina foi detectado na *E. bulbosa* (Mill) Urb. Bulbo onde na levedura, está envolvido na via metabólica chamada via de biossíntese da fosfatidilcolina. Também encontrada nas análises de GCMS a Benzofenona teve índice de similaridade de 92.4 % que se trata de um aromatizante encontrado em frutas vermelhas (POJAROVÁ et al. 2007; RANI; NAIR, 2016; RODRÍGUEZ; WILLIAN, 2014).

4.1.5 High-performance thin-layer chromatography (HPTLC)

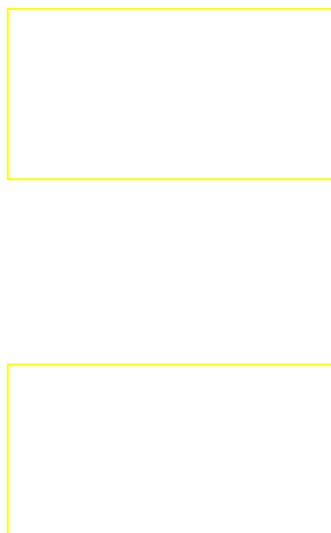
As amostras etanólicas de *A. hispidum*, *B. diffusa* e amostras etanólicas e frações da *E. bulbosa* foram avaliadas para detecção de compostos na análise de HPTLC, onde as características das bandas foram analisadas e comparadas com seus respectivos padrões de análise (Figuras 6 a 11). Amostras de folhas e raízes de *B. diffusa* e de *A. hispidum* mostraram bandas para triterpenos (Figura 6) e seus padrões (Sitosterol e Stigmasterol), bem como observados para monoterpenos e seus padrões (Carvacrol e Timol) (Figura 7).

Figura 6: Placa cromatográfica para compostos triterpenos e esteróides. Placa cromatográfica pré-revelada (6A) e placa cromatográfica pós-revelada (6B).



Nas amostras de *A. hispidum* L, foram detectados monoterpenos e triterpenos nas amostras da folha e raiz e tais resultados vai de acordo com o trabalho de Araujo et al. (2013) que detectou fitoesteróis em extrato hidroetanólico de raízes de *A. hispidum* L. (Figura 7).

Figura 7: Placa cromatográfica para compostos derivados monoterpenos. Placa cromatográfica pré-revelada (7A) e placa cromatográfica pós-revelada (7B).



Fonte: O autor (2019).

Na avaliação de compostos fenólicos, as amostras de folhas, bulbos e raízes de *E. bulbosa* apresentaram alteração de cor e coincidiram com o padrão de rutina (Figura 8). Para a detecção de naftoquinonas (Figura 9) o padrão utilizado foi o Lapachol e a amostra de bulbos de *E. bulbosa* apresentou características para este tipo de composto. Na placa cromatográfica de derivados antracênicos, as amostras de bulbos e raízes apresentaram revelação compatível com seu padrão aloina (Figura 10) e na avaliação da cumarina (Figura 11).

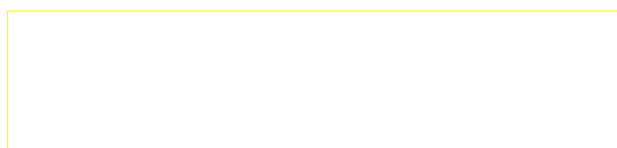
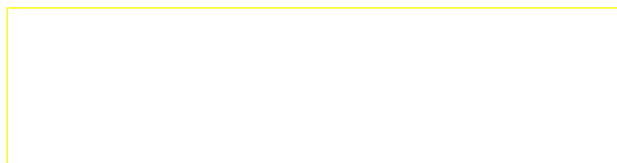
Figura 8: Placa cromatográfica para compostos fenólicos. Placa cromatográfica pré-revelada (8A) e placa cromatográfica pós-revelada (8B).



Fonte: O autor (2019).

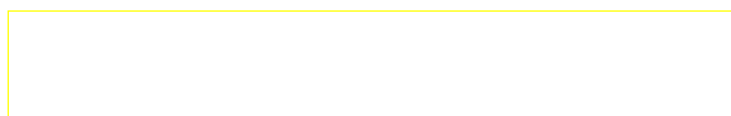
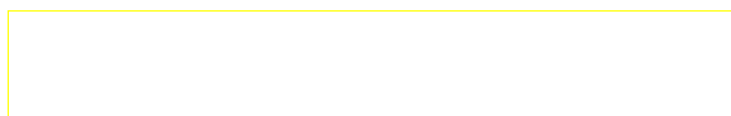
Os testes cromatográficos com o extrato etanólico e frações da *E. bulbosa* (Mill) Urb. detectaram Naftoquinonas (Figura 9) utilizando o padrão Lapachol, tal resultado vai de acordo com a literatura onde trabalhos encontraram derivados ou isolaram compostos de naftoquinonas ou antraquinonas de bulbos do gênero Eleutherine (MAHABUSARAKAM et al., 2010; PARAMAPOJN, et al. 2008; ALVES et al. 2003; RANI, 2018), nas amostras da espécie também foram detectados compostos fenólicos e também cumarinas (Figura 10), sendo equivalentes para seus respectivos padrões rutina, quercetina e cumarina, onde tais compostos estão relacionados a diversas atividades, dentre elas antioxidantes, antinflamantória, antitumorais, etc. (BEEGUM et al. 2014; OLIVEIRA, 2016).

Figura 9: Placa cromatográfica para compostos derivados naftoquinonas. Placa cromatográfica pré-revelada (9A) e placa cromatográfica pós-revelada (9B).



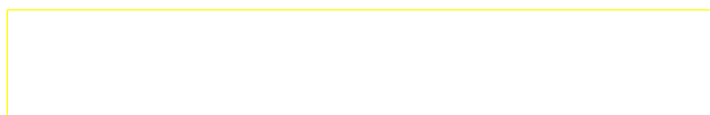
Fonte: O autor (2019).

Figura 10: Placa cromatográfica para compostos derivados antracênicos. Placa cromatográfica pré-revelada (10A) e placa cromatográfica pós-revelada (10B).



Fonte: O autor (2019).

Figura 11: Placa cromatográfica para cumarinas. Placa cromatográfica pré-revelada (11A) e placa cromatográfica pós-revelada (11B).



Fonte: O autor (2019).

4.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.2.1 Atividade Antioxidante: Difenil-picril-hidrazina (DPPH)

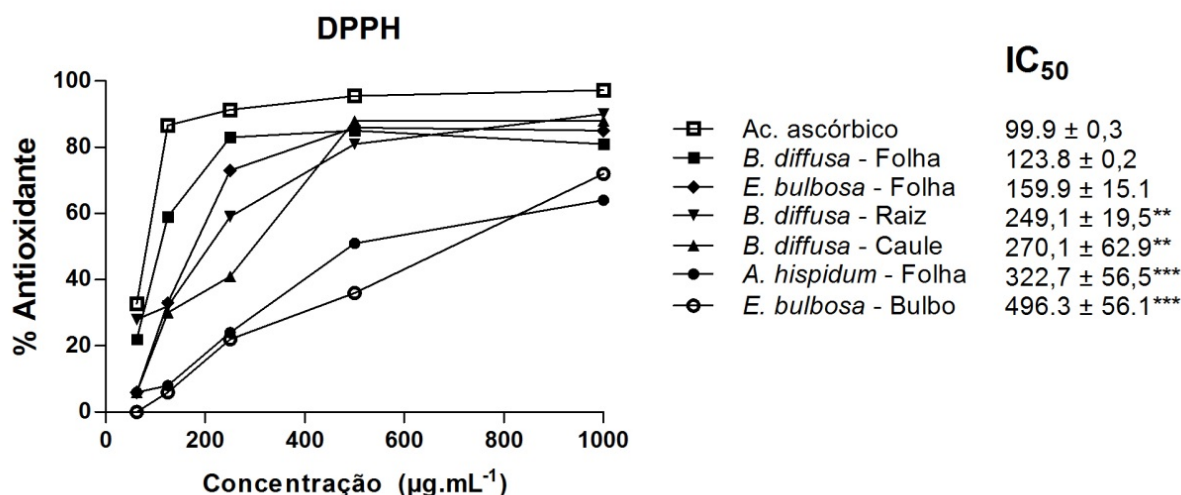
No trabalho, foram realizados ensaios biológicos para comprovação das atividades dos compostos que as amostras da caatinga possuem.

Os testes antioxidantes realizados no trabalho foram de DPPH e poder antioxidante redutor do ferro, que possuem mecanismo de ação e avaliativos distintos. Enquanto primeiro método baseia-se na transferência de elétrons, onde pela ação de um antioxidante o DPPH é reduzido da sua cor púrpura para amarela tendo um decréscimo na absorbância. O ensaio de poder antioxidante redutor do ferro se baseia na capacidade de compostos fenólicos reduzirem o reagente Fe^{+3} , com consequente formação de um complexo colorido com Fe^{+2} . Logo, com ensaios antioxidantes com diferentes mecanismos de ações, uma mesma amostra avaliada pode apresentar desempenhos diferentes em ambos os ensaios (NASCIMENTO, et al. 2011; SANTOS, et al. 2007).

Os resultados referentes à atividade antioxidante através da redução do radical DPPH em *A. hispidum*, *B. diffusa* e *E. bulbosa* são mostrados nas Figuras 12 e 13. As amostras etanólicas de raiz de *A. hispidum* L. e raiz de *E. bulbosa* (Mill) apresentaram percentual de antioxidante menor que 50%, sendo possível calcular o IC₅₀.

A análise de DPPH revela que os extratos de folhas de *B. diffusa* e *E. bulbosa* têm alta capacidade antioxidante, não se diferenciando estatisticamente do padrão, Ac. Ascórbico (Figura 12). Comparando com os resultados obtidos nos doseamentos de fenóis e flavonoides foi perceptível que as amostras que apresentaram alto teor de equivalentes também demonstraram boas atividades antioxidantes.

Figura 12: Resultado em porcentagem da ação antioxidante dos extratos etanólicos da *A. hispidum* L., *B. diffusa* L. e *E. bulbosa* (Mill) Urb. e seu respectivo IC₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

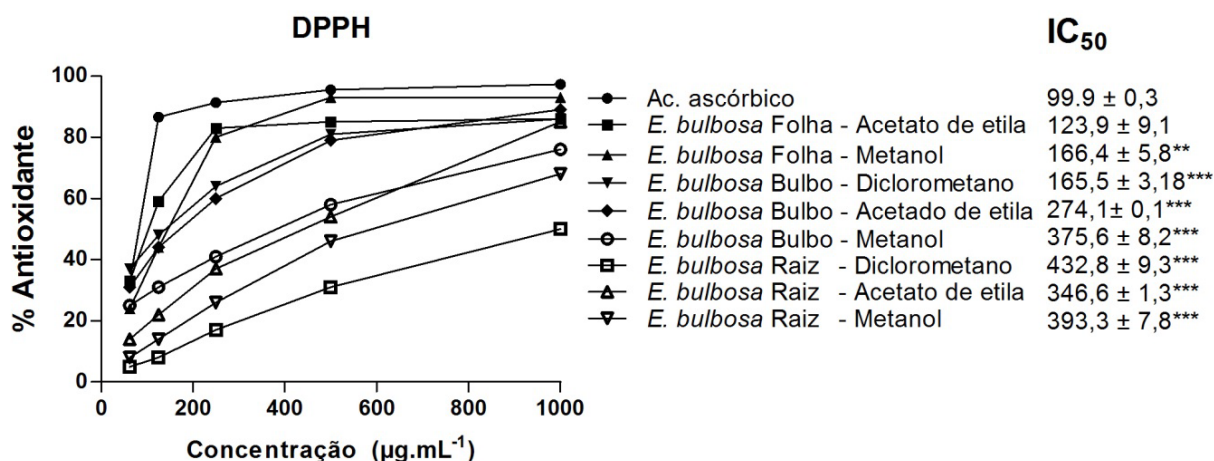


Fonte: O autor (2019).

Legenda: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$ diferença em relação ao padrão ascórbico

As frações analisadas também apresentaram bom desempenho no teste de antioxidante de DDPH, como a fração Acetato de etila da folha que não apresentou diferença estatística do padrão ácido ascórbico (Figura 13).

Figura 13: Resultado em porcentagem da ação antioxidante das frações da *E. bulbosa* (Mill) Urb. e seu respectivo IC₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$).



Fonte: O autor (2019).

Legenda: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$ diferença em relação ao padrão ascórbico.

4.2.2 Atividade do poder antioxidante redutor do ferro.

Os resultados referentes à atividade de redução do poder antioxidante redutor do ferro para o extrato etanólico das espécies *A. hispidum*, *B. diffusa* e *E. bulbosa* são mostrados nas Tabela 10 e 11. Onde o extrato de folhas da *B. diffusa* e a fração diclorometano do bulbo da *E. bulbosa* apresentaram os melhores desempenhos em comparação com outros extratos (Tabela 10). Os resultados expressos em μg equivalentes de Trolox por grama de extrato ($\mu\text{g ET.g}^{-1}$).

Na avaliação do poder antioxidante redutor do ferro, o desempenho da *A. hispidum* L. também similar com $73,12 \pm 1,32 \mu\text{g ET.g}^{-1}$, apresentando significância $P < 0,05$ quando comparado com as amostras da folha da *B. diffusa* L. que apresentou as maiores quantidades de equivalentes a trolox. A atividade antioxidante da *Acanthospermum* pode estar atribuída as quantidades de flavonoides e a moderadas quantidade de fenóis entradas nos testes de prospecção e doseamento descritos no trabalho.

Tabela 10: Resultado da ação antioxidante dos extratos etanólicos das espécies *A. hispidum* L., *B. diffusa* L. e *E. bulbosa* (Mill) Urb. expressos em equivalente de TROLOX por grama de extrato ($\mu\text{g ET.g}^{-1}$).

ATIVIDADE DO PODER ANTIOXIDANTE REDUTOR DO FERRO.		
Espécie	Amostra	1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
<i>B. diffusa</i> L.	Folha- Etanol	198,08 $\pm$ 4,64 ^a
<i>E. bulbosa</i> (Mill) Urb.	Bulbo- Etanol	129,7 $\pm$ 9,77 ^b
<i>E. bulbosa</i> (Mill) Urb.	Folha- Etanol	136,1 $\pm$ 2,18 ^b
<i>B. diffusa</i> L.	Raiz- Etanol	117,1 $\pm$ 6,5 ^b
<i>A. hispidum</i> L.	Folha- Etanol	73,12 $\pm$ 1,32 ^c
<i>B. diffusa</i> L.	Caule- Etanol	57,04 $\pm$ 5,7 ^{c,d}
<i>E. bulbosa</i> (Mill) Urb.	Raiz- Etanol	47,27 $\pm$ 1,56 ^{c,d}
<i>A. hispidum</i> L.	Raiz- Etanol	46,12 $\pm$ 1,70 ^d

Fonte: O autor (2019).

Entre as frações da *E. bulbosa* (Mill) Urb., a fração acetato de etila da folha, que obteve o melhor resultado no teste de DDPH, essa mesma amostra demonstrou alto desempenho no teste de poder antioxidante redutor do ferro com $178,6 \pm 9,9 \mu\text{g ET.g}^{-1}$, ressaltando que tal amostra obteve o maior teor, entre as amostras fracionadas, no doseamento de fenóis, confirmando que compostos fenólicos apresentam boas atividades antioxidantes.

Outras amostras fracionadas que tiveram bom desempenho no doseamento químico também apresentaram boas atividades antioxidantes como a fração metanol da folha com DDPH e poder antioxidante redutor do ferro de $164,4 \pm 5,8$ de EC50 e $195,6 \pm 2,0 \mu\text{g ET.g}^{-1}$. As frações diclorometano e acetato de etila do bulbo que corresponderam as maiores atividades no poder antioxidante redutor do ferro com $344,5 \pm 13,4$ e $263,8 \pm 11,6 \mu\text{g ET.g}^{-1}$, respectivamente, também apresentaram boas atividades no DPPH com EC50 de $165,5 \pm 3,18$ e $274,1 \pm 0,1$, diferenciando-se estatisticamente do padrão, ac. Ascórbico.

Tabela 11: Resultado da ação antioxidante dos extratos fracionados da espécie *E. bulbosa* (Mill) Urb. expressos em equivalente de TROLOX por grama de extrato ($\mu\text{g ET.g}^{-1}$).

ATIVIDADE DO PODER ANTIOXIDANTE REDUTOR DO FERRO.		
Espécie	Amostra	Concentração 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
<i>E. bulbosa</i> (Mill) Urb.	Bulbo – Diclorometano	344,5 $\pm$ 13,4 ^a
	Bulbo - Acetato de etila	263,8 $\pm$ 11,6 ^b
	Bulbo – Metanol	239,9 $\pm$ 10,9 ^b
	Folha – Metanol	195,6 $\pm$ 2,0 ^{b,c}
	Raiz - Acetato de etila	179,4 $\pm$ 13,4 ^{b,c}
	Folha - Acetato de etila	178,6 $\pm$ 9,9 ^{b,c}
	Raiz – Metanol	144,5 $\pm$ 1,1 ^{b,c,d}
	Raiz – Diclorometano	126,5 $\pm$ 4,0 ^{b,c,d}
	Raiz - N-hexano	126,0 $\pm$ 11,4 ^{b,c,d}
	Folha – Diclorometano	117,5 $\pm$ 0,5 ^{b,c,d}
	Bulbo - N-hexano	93,11 $\pm$ 1,2 ^{b,c,d,e}
	Folha – N- hexano	52,09 $\pm$ 1,7 ^{b,c,d,e}

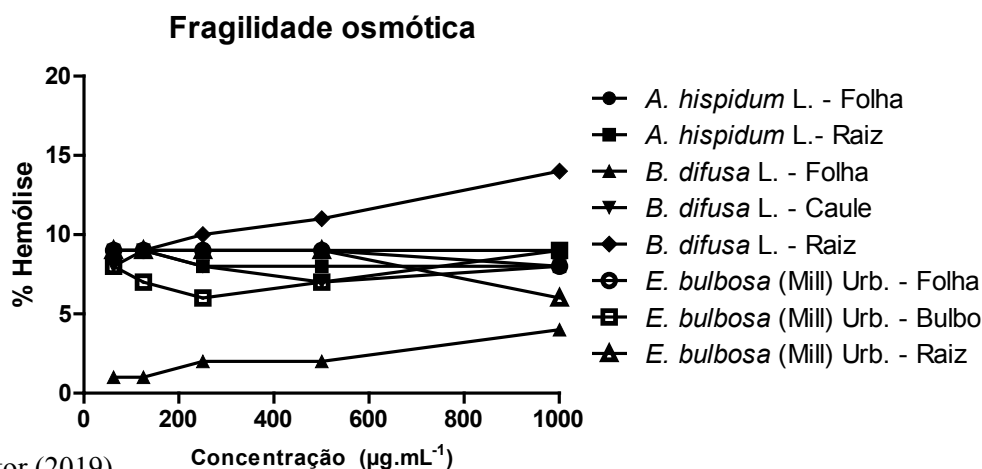
Fonte: O autor (2019).

4.2.3 Fragilidade osmótica

Os resultados obtidos no trabalho para avaliação de citotoxicidade frente a células eritrocitárias de carneiro se encontram na Figura 14, sendo a fragilidade osmótica frente aos extratos expressas em porcentagem.

Os resultados dos ensaios antioxidantes e químicos se entrelaçam com resultados hemolíticos que comprovam que as amostras brutas (etanólicas), possuem baixa toxicidade quando submetidos a contato com eritrócitos. A avaliação da fragilidade osmótica mede capacidade das hemácias de manterem sua integridade estrutural e resistirem á lise quando expostas ao estresse osmótico.

Figura 14: Resultados da fragilidade osmótica expressos em porcentagem.

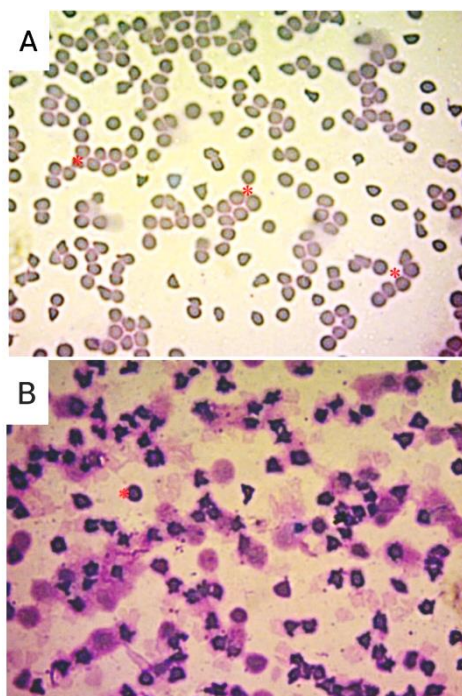


Fonte: O autor (2019).

Na análise do precipitado eritrocitário, nas lâminas tratadas com extratos, foram observadas taxas baixas de hemólise e alterações morfológicas de membrana puderam ser detectadas. Essas alterações ocorreram predominantemente nos extratos da raiz de *B. diffusa* (14% de hemólise na concentração de 1000 µg.mL⁻¹) (Figura 15B). Por outro lado, extratos de folhas da mesma espécie apresentaram as menores taxas de hemólise (4% de hemólise na concentração de 1000 µg.mL⁻¹) (Figura 15A).

Segundo o autor Sperandio et al. (2010) a ação hemolítica deve ser considerada alta apenas quando as percentagens atingem valores superiores a 40% e baixa quando esses valores são inferiores a 10%. Logo, nenhuns dos extratos que tiveram a hemólise analisadas demonstraram-se com alta hemólise frente aos eritrócitos de carneiro, com exceção do extrato da amostra da raiz da *B. diffusa* L. obteve hemólise moderada, com 14% de hemólise na concentração mais alta, de 1000 µg.mL⁻¹, os demais extratos analisados apresentaram percentuais inferiores a 10% se enquadrando em um baixo percentual citotóxico, Onde a amostra que apresentou menor porcentagem de hemólise foi também a que obteve os melhores resultados nos antioxidantes, a folha da *B. diffusa* L., com 4% apresentando diferença estatística para a raiz da *B. diffusa* L, que apresentou maior porcentagem. Estes resultados podem ser atribuídos aos componentes químicos encontrados nestas amostras provenientes do sertão pernambucano, onde nenhuns dos resultados das cromatografias gasosas ou HPTLC encontraram algum componente capaz de causar lise celular descritos em literatura.

Figura 15: (A) Fotomicrografia dos eritrócitos de carneiro para o ensaio da folha de *B. diffusa* L., na concentração de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ com aumento de 500x. (B) Fotomicrografia dos eritrócitos de carneiro para o ensaio da raiz da *B. diffusa* L., na concentração de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ com aumento de 500x. * Eritrócitos íntegros.



Fonte: O autor (2019).

4.2.4 Análise citotóxica

O ensaio citotóxico frente a linhagem neoplásica HeLa (carcinoma uterino humano) foi realizado com os extratos etanólicos da *E. bulbosa*, onde os resultados se encontram na Tabela 12.

Tabela12: Resultado do ensaio de citotoxicidade, com resultados expressos em termos percentuais.

CITOTOXICIDADE		
Espécie	Amostra	Percentual citotóxico (%)
<i>E. bulbosa</i> - Folha	Etanol	50
<i>E. bulbosa</i> - Bulbo	Etanol	50
<i>E. bulbosa</i> - Raiz	Etanol	98
Controle positivo	-	99

Fonte: O autor (2019).

Considerando a espécie que apresentou bons desempenhos com suas amostras etanólicas nos ensaios e bom potencial descrito em literatura, foi realizado testes complementares com a *E. bulbosa* (Mill) Urb. que engloba teste citotóxico e antimicrobiano. A análise citotóxica foi realizada com as amostras etanólicas frente a linhagem neoplásica HeLa (carcinoma uterino humano), apresentou resultados positivos com, 98%, 50% e 38% de percentual citotóxico para os extratos da raiz, folha e bulbo respectivamente.

A atividade citotóxica que se destaca é a da raiz da espécie com 98% de potencial citotóxico, resultados similares ao controle positivo com 99%. Trabalhos em literatura, em sua maioria, testam os potenciais sobre o bulbo e dentre esses estudos com outras espécies de *Eleutherine*, atribuem atividade citotóxica do bulbo contra células tumorais (JINZHONG et al., 2006; AMELIA et al., 2014).

Segundo RODRIGUES et al., (2014) o extrato da raiz se enquadrrou em alta atividade citotóxica e moderada atividade para a amostra do bulbo, porém com apenas 38% de percentual citotóxico as folhas se apresentaram um potencial citotóxico relevante.

Ichwan e Mustofa (2017) avaliaram o extrato acetato, hexano e etanólico do bulbo da *E. bulbosa* e descobriram um potencial citotóxico na espécie, assim como o presente trabalho. Eles atribuem essa atividade a isolado do bulbo da espécie já descrito na literatura, o *Eleutherin*, é conhecido por ser citotóxico para células de câncer de colo de útero.

O trabalho de Wastuti et al. (2015) relaciona os flavonóides presentes nesta planta à sua atividade apoptótica, podendo ser usadas no tratamento do câncer, devido a presença de quercetina e miricetina. No atual trabalho foi possível teores de flavonoides, tanto no

doseamento, quanto na avaliação cromatográfica de HPTLC, onde foi possível detectar na amostra da raiz da *E. bulbosa*, o padrão rutina.

4.2.5 Análise antimicrobiana

Os resultados da análise antimicrobiana dos extratos etanólicos da espécie *Eleutherine bulbosa* frente a nove microorganismos entre fungos e bactérias gram positivas, negativas e álcool-ácido resistentes, seguem listados na Tabela 13. Onde, os controles positivos foram Canamicina para bactérias e Cetoconazol para fungos.

Tabela13: Resultado da análise antimicrobiana, com halos de inibição expressos em mm.

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA					
Espécie/ Microorganismos	<i>Eleutherine bulbosa</i> Folha	<i>Eleutherine bulbosa</i> Bulbo	<i>Eleutherine bulbosa</i> Raiz	Canamicina	Cetoconazol
<i>S. Aureus</i>	0±0,0	26±2,6	20,3±0,3	22,33±0,58	-
<i>M. luteus</i>	0±0,0	12±1,7	18,3±2,0	27±1,0	-
<i>B. subtilis</i>	9,3±0,5	23,3±0,5	17,3±1,5	13,33±0,58	-
<i>P. aeruginosa</i>	0±0,0	10±0	9±0,0	19,66±0,58	-
<i>M. smegmatis</i>	0±0,0	13±1,7	17,3±0,5	40±1,0	-
<i>E. faecalis</i>	0±0,0	11±1,7	15,6±0,5	13±0,0	-
<i>E. coli</i>	0±0,0	0±0,0	12,3±0,5	14,66±0,58	-
<i>S. marcescens</i>	0±0,0	0±0,0	11,3±1,1	14,66±0,58	-
<i>C. albicans</i>	0±0,0	13,6±0,5	14,6±0,5	-	24 ±1,0

Fonte: O autor (2019).

Para a atividade antimicrobiana, os extratos etanólicos da *E. bulbosa* analisados, apresentaram atividade antimicrobiana para diversos microrganismos, pelo método de difusão em disco. A análise do extrato da raiz demonstrou atividade para todos os microrganismos testados, com os maiores halos de inibição para: *S. Aureus* (20,3±0,3), *M. luteus* (18,3±2,0), *B. subtilis* (17,3±1,5), *M. smegmatis* (17,3±0,5), *E. faecalis* (15,6±0,5), *E. coli* (12,3±0,5) e *C. albicans* (14,6±0,5). Em contrapartida, a amostra do extrato da folha apresentou halos de inibição de 9,3±0,5 para *B. subtilis*, espécie gram-positiva, porém não apresentou atividade antimicrobiana frente aos demais microrganismos. O Estudo de Rani (2018) atribuiu atividade

antimicrobiana para a *Eleutherine bulbosa*, onde isolou um composto fungicida a partir do bulbo da espécie em questão. O extrato do bulbo apresentou atividade para gram-positivos, negativos, álcool-ácido resistentes e fungos, com maiores halos, em expressos em mm, para *S. Aureus* ($26 \pm 2,6$), *B. subtilis* ($23,3 \pm 0,5$), *M. smegmatis* ($13 \pm 1,7$) e para *C. albicans* com ($13,6 \pm 0,5$). Trabalhos na literatura científica comprovam a atividade antimicrobiana para a *E. bulbosa* e também para plantas do mesmo gênero, testadas em microrganismos gram-positivos, gram-negativos e fungos, confirmando os resultados obtidos no atual trabalho (IFESAN, et al. 2010; HARLITA et al, 2018).

5 CONCLUSÕES

O atual trabalho analisou o potencial bioativo dos extratos etanólicos de *A. hispidum*, *B. diffusa* e *E. bulbosa*, onde foi Realizada a caracterização das três espécies através de testes fitoquímicos e de doseamentos de fenóis e flavonoides, como também a caracterização química através de métodos cromatográficos utilizando HPTLC e GC-MS, observando vasta quantidade de metabólitos nas amostras etanólicas e fracionadas. Foi realizado o fracionamento da espécie que apresentou o maior potencial nas análises de ensaio biológico e químico, sendo esta a *E. bulbosa*, que obteve significativos resultados nos testes químicos e biológicos realizados.

Com os ensaios biológicos foram avaliadas e comprovadas às baixas taxas de hemólise e os altos potenciais das espécies como antioxidantes através das análises de DPPH e poder antioxidante redutor do ferro, observando resultados mais expressivos com as espécies *B. diffusa* e *E. bulbosa*; com esta ultima espécie foi desenvolvido testes complementares com seus extratos etanólicos, de citotoxicidade e antimicrobiano, onde para tal, foi demonstrado resultados positivos frente a linhagem Hela e aos microrganismos testados, as frações dessa espécie também apresentou bons resultados antioxidantes, com os extratos da folha não apresentando diferença estatística para o padrão utilizado (Ac. Ascórbico).

Tais resultados comprovaram o potencial bioativo das espécies e proporcionam um estudo seguro sobre os seus componentes e atividades, confirmando suas utilizações de forma empírica como fitoterápicos pelas populações. Porém, é necessário compreender a necessidade de estudos complementares com essas espécies para utilização e consumo seguros destas plantas como forma de terapia.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, I.; BEG, A.Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45. Indian plants against multi-drug resistant human pathogens, *J. of Ethnopharmacol.* 74:113-123. 2001.
- ALMEIDA A.B.; TORTATO, K.; CARVALHO, N.A. ;CIRINO, M.M.; GODINHO, G.A.; SOARES, A.R.C.; CANDIDO, R.C.S.R; LOPES, N.C.S.; SILVA L.H.P. Radicais Livres e os Principais Antioxidantes nos Alimentos: uma Revisão. *International Journal of Nutrology* 2018.
- ALVES, T. M. A.; KLOOS, H.; ZANI, C. L. Eleutherinone, a Novel Fungitoxic Naphthoquinone from *Eleutherine bulbosa* (Iridaceae). *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 98(5): 709-712, July, 2003.
- AMELIA, T.; DINA P.; ROMSIAH, D.; TJAHJONO, H. In Silico Study of The Component of *Eleutherine americana* MERR. on Human Estrogen Reseptor Alpha as Potential Anti-Breast Cancer. 3rd International Conference on Computation for Science and Technology (ICCST-3). November, 2014.
- ARAÚJO, L. B. D. C.; SILVA, S. L.; GALVÃO, M. A. M.; FERREIRA, M. R. A., ARAÚJO, E. L., RANDAU, K; P.; SOARES, L. A. L.Total phytosterol content in drug materials and extracts from roots of *Acanthospermum hispidum* by UV-VIS spectrophotometry. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23(5), 736-742 . 2013.
- ARUP, U.; EKMAN, S.; LINDBLOM, L.; MATTSSON, j. High performance thin layer chromatography (HPTLC), an improved technique for screening lichen substances. *Lichenologist*. Cambridge University Press. 2007.
- ARWATI, NILUH et al. O Efeito do Extrato da Haste da Cebola Dayak (*Eleutherine Palmifolia* (L.) Merr.) Extrato nos Níveis de Glicose no Sangue do Diabetes Mellitus Sofrido por Rato. *Noções de Saúde* , [SI], v. 2, n. 3, p. 368-372, mar. 2018.
- AZEEZ, T.O. Federal University of Technology, Owerri. *Acanthospermum hispidum* Therapeutic Effect of Aqueous – Methanolic Extract of *Acanthospermum hispidum* on *Plasmodium falciparum* infected albino rats. *Biomedical Technology*. Vol 21 No 2. May. 2018.

BAGATINI M. D.; SILVA, A.C.F.; TEDESCO, S.B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 17(3): 444-447, Jul./Set. 2007.

BAHTIAR, A.; DAYAK, D.Y.D. Onions (*Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb.) Bulbs Extracts Reduce the Blood Pressure of Ovariectomized Rats. *Journal Of Natural Remedies*. Volume 18, Edição 2, abril de 2018.

BATITUCCI, M.C.P. (2003) Estudo dos efeitos cardiovasculares do extrato hidroalcoólico de plantas do gênero *Solanum*: aspectos fisiofarmacológicos e citogenéticos. Tese de Doutorado. Vitória, Universidade Federal do Espírito Santo.

BEEGUM, G.R.J.; BEEVY, S.S.; SUGUNAN, V.S. Qualitative Phytochemical Screening and GC-MS Analysis of *Boerhavia diffusa* L. *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering*. ISSN 2250-2459, ISO 9001:2008 Certified Journal, Volume 4, Issue 7. 2014.

BEGUM, A. N., TERAQ, J. Protective effect of quercetin against cigarette tar extract-induced impairment of erythrocyte deformability. *The Journal of nutritional biochemistry*, 13(5), 265-272, 2002.

BHARDWAJ, R.; ANKITA, Y.; SHARMA RA. Phytochemicals And Antioxidant Activity In *Boerhavia Diffusa*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. Vol 6. 2014.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais Livres E Os Principais Antioxidantes Da Dieta Free Radicals And The Main Dietary Antioxidants .*Rev. Nutr.*, Campinas, 12(2): 123-130, maio/ago. 1999.

BORGES, K.B.; BAUTISTA, H.B.; GUILERA, S. Diabetes - utilização de plantas medicinais como forma opcional de tratamento. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v.5, n.2, p.12-20, 2008.

BRASIL. Ministério De Minas E Energia/Cprm - Serviço Geológico Do Brasil. Diagnóstico Do Município De Brejo Da Madre De Deus, Estado De Pernambuco. Editores: Beltrão, B.A.; Mascarenhas, J.C.; Miranda, J.L.F.; Souza Junior, L.C.; Galvão, M.J.T.G. & Pereira, S.N. Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água subterrânea. Recife: CPRM/PRODEEM,. 21p. 2005.

CAIRES, A. C.; DA COSTA GILENO, M. Padronização e Aplicação da Curva de Fragilidade Osmótica no Auxílio Diagnóstico de Anemias. *Revista ReBraM*, 15(2), 49- 58, 2012.

CALIXTO, J.B. Medicamentos Fitoterápicos. In: YUNES, R.A. & CALIXTO, J.B. (eds.): plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Argos- Ed. Universitária UNOESC, Santa Catarina: Campus Chapecó, p. 297-315. 2001.

CAROL, H. C., GILBERTO L. BRAGA E PIERINA S. BONATO. Fundamentos de cromatografia. Editora da Unicamp, 2006.

CHATTERJEE, S. S.. From covalent bonds to eco-physiological pharmacology of secondary plant metabolites. Karlsruhe, Germany: Biochemical Pharmacology, 2015.

CHEN, D.; HU, M.; LIU, Y.; YU, M; XU, X.; MA, G. New Naphtalene Derivatives from the Bulbus of *Eleutherine americana* with their protective effect on the Injury of HUEVECs. *Molecules*, v. 23. 2018.

CHEN, Z; HUANG, H.; WANG, C. Hongconin, a new naphthalene derivative from Hong-Cong, the rhizome of *Eleutherine americana* Merr. et Heyne (Iridaceae). *Chem Pharm Bull*; 34, 2743-6. 1986.

CHIKA, D.C. ONYEBUEKE, S.O. Bello. Phytochemical analysis and evaluation of antidiabetic effects in alloxan-induced diabetic rats treated with aqueous leaf extract of *Acanthospermum hispidum*. *African journals online*. Vol 21, No 1. 2018.

CHUDE M.A.; ORISAKWE, O.E.; AFONNE, O.J.; GAMANIEL, K.S.; VONGTAU, O.H. Hypoglycaemic effect of the aqueous extract of *Boerhavia diffusa* leaves. *Indian Journal Pharmacology*. Volume : 33. Issue : 3. Page : 215-216, 2001.

CIRIMINNA, R.; FIDALGO, A.; ILHARCO, L.M.; PAGLIARO, M. Dihydroxyacetone: Um Insight Atualizado em um Bioproducto Importante. *QuímicaOpen*. 2018; 7 (3): 233-236. . Doi: 10.1002 / open.2017 00201 de março 2018.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S.; Fundamentos de cromatografia. Editora da UNICAMP, Campinas, SP. 2006.

CONFERÊNCIA NACIONAL DE SAÚDE. CONFERÊNCIA NACIONAL DE SAÚDE. 5., 1975. Brasília. Resumos... Brasília: Ministério da Saúde, 1975.

COSTA, R.M.A.; MENK, C.F.M. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. *Biotecnologia: ciência e desenvolvimento* 3: 24-26. 2000.

DACIE J.V.; LEWIS S.M. *Practical haematology*. Elsevier Limited – 5th ed.1975.

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N. Antioxidants Properties Of Phenolic Compound. *Visão Acadêmica*, Curitiba, Vol. 5, p. 33-40. 2004.

DORMAN, H. J.; KOSAR, M.; KAHLOS, K.; HOLM, Y.; HILTUNEN, R. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars. *J. Agric. Food Chem.*, v.51, p. 4563- 4569, 2003.

DRUMOND, M.A.; KILL, L.H.P; LIMA, P.C.F.; OLIVEIRA, M.C.; OLIVEIRA, V.R.; ALBUQUERQUE, S.G.; NASCIMENTO, C.E.S.; CAVALCANTE, J. Estratégias para o uso sustentável da biodiversidade da caatinga. In workshop de avaliação e identificação de 29 ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade do bioma caatinga. Petrolina - Brasil,. Embrapa/Cpatsa, UFPE e Conservation International do Brasil. pp. 47. 2000.

DUARTE M.C.T.; FIGUEIRA G.M.; SARTORATTO A.; REHDER V.L.G.; MACHADO A.L.M.; DELARMELINA C. Anti-Candida activity of essential oils and extracts from native and exotic medicinal plants used in Brazil. *J. of Etnopharmacol.* 97: 305-311. 2005.

DUARTE, M, C T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. *multiciência*. 2006.

EFRAIM, P.; TUCCI, M. L.; PEZOA-GÁRCIA, N. H.; HADDAD, R.; EBERLIN, M. N. Teores de compostos fenólicos de sementes de cacauero de diferentes genótipos. *Brazilian Journal of Food Technology*, Campinas, v. 9, n. 4, p. 229-236, 2006.

EGGERS, L.; CHUKR, N.; LOVO, J.; GIL, A. Iridaceae. In: *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000136>. 2016.

EVANI, L.; ARAÚJO, I.; KARINA, P; RANDAU, I.; JOSÉ, G.; SENA, F; REJANE, M.; MENDONÇA, P.; HAROUDO, S. : *Acanthospermum hispidum* DC (Asteraceae): perspectives for a phytotherapeutic product. *Rev. bras. farmacogn.* 2008.

EVERETTE, J. D.; BRYANT, Q. M.; GREEN, A. M.; ABBEY, Y. A.; WANGILA, G. W.; WALKER, R. B. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 58, p. 8.139-8.144, 2010.

FELLOWS, L. K.; BOUTELLE, M. G.; FILLENZ, M. Physiological stimulation increases nonoxidative glucose metabolism in the brain of the freely moving rat. . *J Neurochem*; 60(4): 1258–1263. Apr .1993

FERREIRA, I.C.F.R.; BAPTISTA, P.; VILLAS-BOAS, M.; BARROS, L. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chemistry* Vol. 100. p. 1511–1516. 2007.

FRANCISCO, E.B.J.; DAYANNE, R.O.; ELIZÂNGELA, B.B.; IZABEL, C.S.L.; FRANCISCO, R.S.D.N.F.; IRWIN, R.A.M.; GEORGE, P.F.; MARTA, R.K.. *Investigação Etnofarmacológica dos Diferentes usos da Espécie Croton Campestris A.: Estudo Comparativo na Biorregião do Araripe - Ensaios Cienc. Biol. Agrar. Saúde*, vol. 19, num. 4 . 2015.

FRANK, G.A.; MÜLLER, C.J.. *Análise Estratégica Para A Implementação De Um Projeto De Produção E Comercialização De Produtos Químicos Derivados Da Mentha Arvensis Na Província De Misiones-Argentina. Xxvi Encontro Nacional De Engenharia De Produção. BRASIL. 2007.*

GANFON, H.; BERO, J. ; ALEMBERT T.; TCHINDA, F.; GBAGUIDI, J.; GBENOU, M.; MOUDACHIROU, M.; FRÉDÉRICH,J.; QUETIN-LECLERCQ. Antiparasitic activities of two sesquiterpenic lactones isolated from *Acanthospermum hispidum* D.C.*Journal of Ethnopharmacology* Volume 141, Issue 1, 7 May 2012.

GEORGIEV, V.; ANANGA, A.; TSOLOVA, V. Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. *Nutrients*. 6(1):391-415. 2014.

GHOSH, S. BOERHAVIA DIFFUSA: ONE PLANT WITH MANY FUNCTIONS *International Journal of Green Pharmacy*Vol 12, No 03. 2018.

GLAUCO JLS, DIANA CSNP: Aspectos da terapia etnofarmacológica associados à atividade antitumoral - *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, vol.10, num.3 2016.

GOFF, J. As doenças têm história. 2a ed. Lisboa: Terramar;1997.5 Eldin S, Dunford A. Fitoterapia na atenção primária de saúde. São Paulo: Manole; 2001

GOUGHENÉ, S.P.; TURLINGS, T.C.J. The effects of abiotic factors on induced volatile emissions in corn plants. *Plant Physiology*, V.129, p. 1296-1307, 2002.

HARA H; MARUYAMA, N.; YAMASHITA, S; HAYASHI, Y; LEE, K.H.; BASTO, K.F.; CHAIRUL, R.M.; IMAKURA, Y. Elecanacin, a novel new naphthoquinone from the bulb of *Eleutherine americana*. *Chem Pharm Bull* 45: 1714-1716. 1997.

HAREKRISHNA R.; ANUP C.; SATYABRATA B.; BHABANI S.N., SRUTI RANJAN M.; ELLAIAH, P. Preliminary phytochemical investigation and anthelmintic activity of *Acanthospermum hispidum* DC. *Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. 2 (5): 217-221. 2010.

HARLITA, T.; OEDJIJONO, A.A. The Antibacterial Activity of Dayak Onion (*Eleutherine palmifolia* (L.) Merr) towards Pathogenic Bacteria. *Tropical Life Sciences Research*. 2018;29(2):39-52. doi:10.21315/tlsr2018.29.2.4.

ICHWAN A. L.; M. MUSTOFA. I. Anticancer Activity of *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. Extract on WiDr Cell Line In Vitro. *Advances in Health Sciences Research*, volume 9. 2017.

IFESAN O.B.; IBRAHIM, D.; VORAVUTHIKUNCHAI, S. Antimicrobial activity of crude ethanolic extract from *Eleutherine americana*. *Journal of Food, Agriculture and Environment*. 8. 1233-1236. 2010.

IFESAN, O.B.; HAMTASIN, C.; MAHABUSARAKAM, W. VORAVUTHIKUNCHAI, S.P. Assessment of Antistaphylococcal Activity of Partially Purified Fractions and Pure Compounds from *Eleutherine americana*. *Journal of Food Protection*: February, Vol. 72, No. 2, pp. 354-359. 2009.

JAYANTHI, P.; LALITHA, P. Reducing power of the solvent extracts of *Eichhornia crassipes*. (Mart.) Solms. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. Vol, 3, p. 126-128. 2011.

JIA, SHU-MIN; LIU, XIAO-FEI; KONG, DE-MING; SHEN, HAN-XI. A simple, postaddition antioxidant capacity assay using adenosine triphosphate-stabilized 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS) radical cation in a Quadruplex

DNAzyme catalyzed ABTS-H₂O₂ system. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 35, n. 1, p. 407-412, 2012.

JINZHONG, X.; FENG, Q.; WENJUAN D.; GEXIA. Q. New Bioactive from *Eleutherine americana*. *Chem. China*. 3: 320-323. 2006.

KAUSHIK, A; HUSAIN, A; AWASTHI, H.; SINGH, D.P.; KHAN, R; MANI, D. Antioxidant and Hepatoprotective Potential of Swaras and Hima Extracts of *Tinospora cordifolia* and *Boerhavia diffusa* in Swiss albino Mice. *Pharmacogn Mag.*;13(Suppl 3):S658-S662. 2017.

LANÇAS, F. M. Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE. Editora Atomo. P 382.2009.

LAZARY V.M.D. Efeitos do consumo do isoflavona na prevenção do câncer de mama. [Monografia]. Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde, Núcleo de Estudos em Educação e Promoção da Saúde, NESPROM, Brasília, 2010.

LEAL, I.R.; JOSÉ M.C.S.; MARCELO T.; THOMAS E. L. JR.. Mudando o curso da conservação da biodiversidade na Caatinga do Nordeste do Brasil. *MEGADIVERSIDADE*. Nº 1, Vol 1 . Julho 2005.

LEMONICA, L.P.; ALVARENGA, C.M.D. Abortive and teratogenic effect of *Acanthospermum hispidum* DC. and *Cajanus cajan* (L.) Millps. in pregnant rats . *Journal of Ethnopharmacology*. Volume 43, Issue 1, June 1994.

LI, J. H.; AWAD, A. B.; FINK, C. S.; WU, M.; TREVISAN, P. Measurement variability of plasma beta-sitosterol and campesterol, two new biomarkers for cancer prevention. *Muti Eur J Cancer Prev*. 10(3): 245–249. Jun 2001

LIU, X.J.; YAN, X.Q.; WANG, N L. Studies on chemical constituents of *Eleutherine Americana*. *Journal of Chinese medicinal materials* 32(1):55-8. 2009.

LOPES R.M.; OLIVEIRA T.D.; NAGEM T.J.; PINTO A.D.S. Flavonóides. *Biotecnologia Ciência& Desenvolvimento*. 3(14). 2010.

LORENZI, H; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais do Brasil – Nativas e Exóticas. São Paulo: Instituto Plantarium de Estudo da Flora LTDA.. p. 233-234. 2002.

MASSON, A.O.; LOMBELLO, C.B. METODOLOGIAS DE AVALIAÇÃO CITOTÓXICA: ESTUDO COMPARATIVO SEGUNDO TEMPO DE EXPOSIÇÃO. Colaob, 2016.

MASSON, A.O.; LOMBELLO, C.B. METODOLOGIAS DE AVALIAÇÃO CITOTÓXICA: ESTUDO COMPARATIVO SEGUNDO TEMPO DE EXPOSIÇÃO. Colaob, 2016.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C. ;VALDIR, F.V.JR; NOEMA, F; GRYNBERG; ECHEVARRIA, A. PLANTAS MEDICINAIS: A NECESSIDADE DE ESTUDOS MULTIDISCIPLINARES. Quim. Nova, Vol. 25, No. 3, 429-438, 2002.

MAGUIRE, L.; KONOPLYANNIKOV, M.; FORD,A.; ANITA, R.; MAGUIRE, N.; M. O'BRIEN. Comparison of the cytotoxic effects of beta-sitosterol oxides and a cholesterol oxide, 7beta-hydroxycholesterol, in cultured mammalian cells. J Nutr. Oct; 90(4): 767–775. 2003.

MAHABUSARAKAM, W; HEMTASIN, C; CHAKTHONG, S; PIYAWAN, S. ; IFESAN, V; OLAWUMI, B. Naphthoquinones, Anthraquinones and Naphthalene Derivatives from the Bulbs of *Eleutherine americana* .Planta Medica. Jan 1, 2010

MAHASNEH A.M.A.; ADEL, M.A.; EL-OQLAH A.A.B. Antimicrobial activity of extracts of herbal plants used in the traditional medicine of Jordan, J. of Ethnopharmacol. 64(3): 271-276. 1999.

MARTÃO, VM. Atividade antioxidante in vitro de plantas medicinais da Amazônia Ocidental. Universidade Federal de Rondônia. Porto Velho. 2013.

MATOS, F. J. A. Fitoquímica experimental. 3ª. Edição. Editora da UFC. 2009.

MAURYA, R.; SATHIAMOORTHY, B.K.; MUNDKINAJEDDU, K. Flavonoids and phenol glycosides from *Boerhavia diffusa*.. Natural Product Research 21(2):126-34. March 2007.

MOUSINHO, K. C.; CORREIA, M. B. L.; SILVA, J. O. D.; MAGNATA, S. D. S. L. P.; SOUZA, I. A. D.; CATANHO, M. T. J. D. A. Effect of the extract of *Ricinus communis* L. on the osmotic fragility, labeling of red blood cells with Technetium-99m and morphology of the cells. Brazilian Archives of Biology and Technology, 51(6), 1139-1146, 2008.

NAIR, A.G.R.; RAO, S.A.; VOIRIN, B.Polyphenolic compounds from leaves of *Acanthospermum hispidum*. Fitoterapia. 1985.

NASCIMENTO, J.C.; LAGE, L.F.O.; CAMARGOS, C.R.D.; AMARAL, J.C., COSTA, L.M., SOUSA, A.M.; OLIVEIRA, F.Q. Antioxidant determination activity by DPPH method and assay for total flavonoids in leaves extracts of *Bauhinia variegata* L. Rev. Bras. Farm. Vol. 4: p. 327-332. 2011.

Nascimento, M. S.; Vieira, J. M. S.; L. C. S.; Malheiros J. O. C.; Silva J.; Rodrigues, L. C. S; Barbosa, W. L. R. Characterisation Of Isoeleutherine In Aqueous Extract Of Eleutherine Plicata Herb, Iridaceae, Active Against *Entamoeba Hystolitica*/ *Entamoeba Dispar* In-Vitro. IJPSR . 2012.

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

OLIVEIRA, P.N.; GIULIETTI, A.M.; OLIVEIRA R.P. Flora da Bahia: Iridaceae. Sitientibus série Ciências Biológicas. 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Cuidados Primários em Saúde . Relatório da Conferência Internacional sobre Cuidados Primários da Saúde, Alma Ata, URSS, 6 a 12 de setembro de 1978. Brasília: Ministério da Saúde, 1979. 64p.

ORISAKWE ,O.E; AFONNE, J.O.; CHUDE, M.A.; OBI, E. DIOKA, C.E. Sub-chronic Toxicity Studies of the Aqueous Extract of *Boerhavia diffusa* Leaves. Journal of Health Science. p. 444-447. 2003.

PARAMAPOJN, S.; GANZERA, M.; GRITSANAPANA, W., STUPPNER, H. Analysis of naphthoquinone derivatives in the Asian medicinal plant *Eleutherine americana* by RP-HPLC and LC–MS. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 47. 990–993. 2008.

PATNAIK, A., SHARMA, H.P. GC-MS Analysis of *Boerhavia diffusa* Linn. Whole Plant Extracts: An Ethno-medicinal Plant. Research & Reviews: A Journal of Pharmacognosy. 5(1): 7–12p. 2018.

PEREIRA, D. R.; CINTRA, A. J. L.; FARIAS, A. G. M.; LIMA, V. L. DE M. Fragilidadeosmótica do extrato aquoso de folhas de *Indigofera suffruticosa* sobre eritrócitos de ratos. Resumo expandido. 2017.

PERWEZ, A.; NAIYER, S.; ARVIND,, K.; GUPTAAMAL, M.; MAHFOZ, G.A.; BAMAGOUS, S. AL-GHAMDI; NASIR, A.; SIDDIQUI. Anti-diabetic Effect of *Boerhavia*

diffusa L. Root Extract via Free Radical Scavenging and Antioxidant Mechanism Toxicology and Environmental Health Sciences. September Volume 10, Issue 3, pp 220–227. 2018.

PIMPÃO, RCS. 2009. Compostos fenólicos e sua actividade antioxidante em espécies de *Juniperus*: análise da produção sazonal e sob condições de stresse. Tese de mestrado, Biologia (Biologia Celular e Biotecnologia), Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências.

POJAROVÁ, M.; KAUFMANN, D.; GASTPAR, R.; NISHINO, T.; RESZKA, P.; BEDNARSKI, P.J.; ANGERER, EV. [(2-Phenylindol-3-yl) methylene] propanedinitriles inhibit the growth of breast cancer cells by cell cycle arrest in G2/M phase and apoptosis. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*; 15(23): 7368-7379. 2013.

PRADO, D. As caatingas da América do Sul. In: I.R. Leal, M. Tabarelli & J.M.C. Silva (eds.). *Ecologia e conservação da Caatinga*. pp. 3-73. Editora Universitária, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil. 2003.

RANI, V.S. Isolation Of A Compound From The Bulbs Of *Eleutherine bulbosa* (Miller) Urban (Iridaceae). *Asian J Pharm Clin Res*, Vol 11, Issue 6, , 406-410. 2018.

RANI, V.S.; NAIR, BR. GC-MS Analysis Of Ethyl Acetate Extract Of *Eleutherine Bulbosa* (Urban) Miller (Iridaceae) *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 22. 2016.

RANI. V.S. Isolation of a compound from the bulbs of *eleutherine bulbosa* (Miller) urban (iridaceae). *Asian J Pharm Clin Res*, Vol 11, Issue 6. 406-410. 2018.

RAOUF, A.H.; YUH-MEEI L.; LUIS, J.P.; EUGENIA, B; BO S.C.; JOHN, M.P.; DJAJA, D.S.; .Douglas K ;Plant-derived sweetening agents: Saccharide and polyol constituents of some sweet-tasting plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 1990; 28(1):103-115.

REEVES, G.; CHASE, M.W.; GOLDBLATT, P.; RUDALL, P.; FAY, M.F.; COX, A.V.; LEJEUNE, B.; CHIES, T.S. Molecular systemics of Iridaceae: Evidence from four plastid DNA regions. *American Journal of Botany*, v.88(11), nov., p. 2074-2087. 2001.

REZENDE, H.A.; COCCO, M.I.M. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. *Revista da Escola de Enfermagem*, v.36, n.3, p.282-8, 2002.

- RIBEIRO J.N., OLIVEIRA T.T.D., NAGEM T.J., FERREIRA JÚNIOR D.B., PINTO A.D.S. Avaliação dos parâmetros sanguíneos de hepatotoxicidade em coelhos normais submetidos a tratamentos com antocianina e antocianina + naringenina. RBAC.;38(1): 23-27. 2006.
- ROCHA, P.G.O.; XIMENES, T.C.F.; GUERRA, S.M.S. Geoprocessamento aplicado a seleção de áreas para implantação de aterro sanitário: estudo de caso, consórcio Brejo Madre de Deus e Juatuba- PE | GIS applied to selecting areas for the implementation of the landfill: case study, Fen consortium Mother of Go. Revista Geama, [S.l.], p. 176-186. 2016.
- RODRIGUES, F. A. R. et al. Mefloquine-oxazolidine derivatives: a new class of anticancer agents. Chem Biol Drug Des , v. 83, p. 126-131, 2014.
- ROQUE, AA.; LOIOLA, MIB. Potencial de uso dos recursos vegetais em uma comunidade rural no semiárido potiguar. Revista Caatinga, v. 26, n. 4, p. 88-98. 2013.
- RUBERTO, G.;BARATTA, M.T. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems, Food Chemistry 69(2):167-174. April, 2000.
- SAMPAIO, E.V.S.B. Overview of the Brazilian Caatinga. In: S.H. Bullock, H.A. Mooney & E. Medina (eds.). Seasonally dry forests. pp. 35-58. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido. 1995.
- SANON, N.; AZAS, M.; GASQUET, E.; OLLIVIER, E.; MAHIOU, N.; BARRO, N. Timon-DavidAntiplasmodial activity of alkaloid extracts from Pavetta crassipes (K. Schum) and Acanthospermum hispidum(DC), two plants used in traditional medicine in Burkina Faso Parasitol Res 90: 314. 2003.
- SANTOS, M.H.B; BRUNO L.; DUARTE, S.M.S.; ABREU, C.M.P.; GOUVÊA, C.M.C.P. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café (Coffea arabica). Química Nova, 30(3), 604-610. 2007.
- SATHEESH; AMARNATH, M.; PARI, L. Antioxidant effect of Boerhavia diffusa L. in tissues of alloxan induced diabetic rats. 2004.
- SCHOBER, J. Preservação e uso racional do único bioma exclusivamente nacional. Cienc. Cult., São Paulo , v. 54, n. 2, p. 06-07, Oct. 2002 .

SHI, P.; DU, W.; WANG, Y.; TENG, X.; CHEN, X.; YE, L. Total phenolic, flavonoid content, and antioxidant activity of bulbs, leaves, and flowers made from *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. Food Science & Nutrition. 2018.

SILVA, C.R.; MONTEIRO, M.R.; BEZERRA, R.J.A.C. Absence of mutagenic and citotoxic potentiality of senna (*Cassia angustifolia* Vahl.) evaluated by microbiological tests. Rev Bras Farmacogn 14(Supl. 1): 1-3. 2004.

SINACAY, I.C.; DELGADO, E.M.M.; SÁNCHEZ, O.M.A. Antibacterial effect in the *Eleutherine vitrio bulbous* (Yahuar piri piri) front *Streptococcus mutans* ATCC 35668. Pueblo Cont. Vol. 27[2]. 2016.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods Enzymol. 299, 152-178. 1999.

SOARES, M.; WELTER, L.; KUSKOSKI, E. M.; GONZAGA, L.; FETT, R. Compostos Fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas Niágara e Isabel. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v, 30, n. 1, p. 59-64, 2008.

SOMPOL, P. Analysis of naphthoquinone derivatives in the Asian medicinal plant *Eleutherine americana* by RP-HPLC and LC-MS. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis 47 4-5 : 990-3. 2008.

SPERANDIO D.; ROSSIGNOL G.; GUERILLON J.; CONNIL NATHALIE, ORANGE N.; FEUILLOLEY M.G.J.; MERIEAU A. Cell-associated hemolysis activity in the clinical strain of *Pseudomonas fluorescens* MFN1032. BMC Microbiology 10: 1-11. 2010.

T. C. FLEISCHER; E. P.K. AMEADE; I. K. SAWER. Antimicrobial activity of the leaves and flowering tops of *Acanthospermum hispidum* . Pharmacology, Toxicology and Pharmaceutics. ISSN: 0367-326X, Vol: 74, Issue: 1, Page: 130-132. 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Plant physiology. 4. ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc., 2006.

THERESA, I.E.; ABASS, A.O. Two Flavones from *Acanthospermum hispidum* DC and their Antibacterial Activity. International Journal of Organic Chemistry. 2011; 1(3):226-233

UJOWUNDU, C.O.; IGWE, C.U.; ENEMOR, V.H.A.; NWAOGU, L.A.; OKAFOR, O.E. Nutritive and Anti-Nutritive Properties of *Boerhavia diffusa* and *Commelina nudiflora* Leaves Pakistan Journal of Nutrition. Vol. 7 , p. 90-92. 2008.

VASUNDHARAMMA, J.; MAHMOOD, S.K. Validation Of Antioxidant Property Of *Acanthospermum Hispidum* Dc In Control And Streptozotocin Induced Diabetic Rats. Global Journal For Research Analysis. Vol 7, No 1 (2018).

VIVEKANANDHAN P.; SENTHIL-NATHAN, S; SHIVAKUMAR, M.S. Larvicidal, pupicidal and adult smoke toxic effects of *Acanthospermum hispidum* (DC) leaf crude extracts against mosquito vectors Physiological and Molecular Plant Pathology, ISSN: 0885-5765, Vol: 101, Page: 156-162. 2018.

VIZZOTO, M. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância / Marcia Vizzoto, Ana Cristina Krolow e Gisele Eva Bruch Weber – Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 16 p. 2010.

WILLADINO L, CAMARA TR. 2010. Tolerância Das Plantas À Salinidade: Aspectos Fisiológicos E Bioquímicos. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer – Goiânia, 6: 23p.

WASTUTI, S.; SUWARSO, E.; PANDAPOTAN N. The cytotoxic test and apoptotic of *Solanum sanitwongsei* Craib against HeLa cells. International Journal of PharmTech Research. Research 7 (1), 16-21. 2015.

WEIJL, N.I.; CLETON, F.J.; SANTO, S. Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. Cancer Treatment Reviews, London, v.23, n.4, p.209- 240, 1997.

WOISKY, R. G; SALATINO, A. Analysis os propolis: some parameters ond prodecure for chemical fuality control. Journal Apicultural Research, 1998.

YU, T-W., ANDERSON, D. Reactive oxygen species-- induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. Mutation Research, Amsterdam, v.379, n.2, p.201-210, 1997.

APÊNDICE A – ARTIGO SUBMETIDO A REVISTA ANAIS DA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS

Anais da Academia Brasileira de Ciências



**Antioxidant, Hemolytic, Chromatographic and Phytochemical
analysis of *Acanthospermum hispidum* L., *Boerhavia diffusa* L.
and *Eleutherine bulbosa* (Mill) Urb.**

Collected from a Caatinga region

Journal:	<i>Anais da Academia Brasileira de Ciências</i>
Manuscript ID	AABC-2019-0924
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	12-Aug-2019
Complete List of Authors:	dos Santos, Elizabete; Universidade Federal de Pernambuco, Biophysics and radiobiology Department; UFPE, Biophysics and radiobiology Department Santana, Edson; Universidade Federal de Pernambuco, Biophysics Silva, Marília; Federal University of Pernambuco, Department of Histology and Embryology da Silva, Pêrsio; UFPE, Biophysics and radiobiology Department Padilha, Rafael; Universidade Federal de Pernambuco Yara, Ricardo; UFPE, Biomedical Engineering Department Lima, Cláudia; Federal University of Pernambuco, Department of Biophysics
Keyword:	Antioxidant activity, Caatinga, Chromatography, Herbal medicines, Hemolysis
Classifications:	Ciências Biológicas (Biological Sciences)

1. FRONT PAGE

Antioxidant, Hemolytic, Chromatographic and Phytochemical analysis of *Acanthospermum hispidum* L., *Boerhavia diffusa* L. and *Eleutherine bulbosa* (Mill) Urb. Collected from a Caatinga region.

Authors:

Elizabete Regina Silva Lucena dos Santos¹

Edson Renan Barros Santana¹

Marília Grasielly de Farias Silva¹

Pérsio Alexandre da Silva¹

Rafael Jorge Santos Aracati Padilha¹

Ricardo Yara²

Cláudia Sampaio de Andrade Lima¹

Professional address:

¹Biophysics and radiobiology Department, Health Sciences Center, Federal University of Pernambuco (UFPE) Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, 50670-90, Recife - PE, Brazil, Recife – PE.

²Biomedical Engineering Department, Health Sciences Center, Federal University of Pernambuco (UFPE) Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, 50670-90, Recife - PE, Brazil, Recife – PE.

Key words:

Antioxidant activity, Caatinga, Cromatography, Herbal medicines, Hemolysis.

Running title: Antioxidant, Hemolytic, Chromatographic and Phytochemical analysis of *Acanthospermum hispidum* L., *Boerhavia diffusa* L. and *Eleutherine bulbosa* (Mill) Urb. Collected from a Caatinga region.

Academy Section:

Biological Sciences

Correspondence:

Name: Cláudia Sampaio de Andrade Lima

E-mail: claudia.salima@gmail.com

2. ABSTRACT

Usually medicinal plants are used as the sole therapeutic resource in the Caatinga biome region. The present paper realized prospecting tests and analyzes of GCMS and HPTLC, besides evaluating the antioxidant and hemolytic action of the ethanolic extracts of *Acanthospermum hispidum* L., *Boerhavia diffusa* L. and *Eleutherine bulbosa* (Mill)Urb. In the HPTLC and CGMS analyzes, it was possible to detect compounds in the three species evaluated as phytosterols, naphthoquinones, phenols, coumarins and anthracenic derivatives. The leaves of *E. bulbosa* and *A. hispidum* presented the highest amounts of flavonoids (113.3 ± 3.1 and $99.9 \pm 3.4 \mu\text{g EQ.g}^{-1}$). *E. bulbosa* and *B. diffusa* leaves had considerable phenol content (105.1 ± 1.5 and $161.0 \pm 11.7 \mu\text{g EGA.g}^{-1}$). These botanical species that had higher content of compounds had high antioxidant potential of DDPH with leaves of *B. diffusa* and *E. bulbosa* (IC_{50} of $123.8 \pm 0.2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ and $159.9 \pm 15.1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), with no difference to the standard used and the reduction power analysis showed better results in the same samples (*B. diffusa* and *E. bulbosa* leaves with $198.08 \pm 4.64 \mu\text{g ET.g}^{-1}$ and $136.1 \pm 2.18 \mu\text{g ET.g}^{-1}$). Species tested showed low percentages of hemolysis. The observed results demonstrate the antioxidant potential and low toxicity of the Caatinga biome species.

3. INTRODUCTION

Brazil has the largest biodiversity in the world, its plant species are distributed in different regions of the country and many of them are used to prevent, treat, and cure diseases. Among these regions, the Caatinga biome stands out. Besides being exclusively Brazilian biome, it contains a semi-arid climate that provides specific characteristics for the Caatinga areas, distinguishing them from other areas of the world, with high temperature variation, irregular rainfall distribution and climate and climate. characteristic soils of the semiarid (Maciel et al., 2002; Roque and Loiola, 2013).

Plant species found in these locations are subjected to the great conditions of climatic stress in development, which may culminate in a differentiated metabolism and consequently present specialized functional and morphological characteristics differing from species in other regions of the world (Drumond, 2000).

Brejo da Madre de Deus municipality has a long tradition in phytoterapic production and its produce attend health policy in specially to primary attention to health. Due to Caatinga semiarid characteristics and phytoterapic production in this municipality, we selected three medicinal species used in phytoterapic production: *Acanthospermumhispidum* L., *Boerhaviadiffusa* L. and *Eleutherinebulbosa* (Mill) Urb., popularly known in Brazil as "espinho de cigano", "pega-pinto" and "alho do mato", respectively for raw material characterization.

The present work that aims to perform the phytochemical profile through prospecting tests and GCMS and HPTLC analyzes, besides we evaluate the antioxidant and hemolytic action of the ethanolic extracts of the three collected species.

4. MATERIALS AND METHODS

The samples of *Acanthospermumhispidum* L., *Boerhavia diffusa* L. and *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. were collected on May 17th, 2017, in Brejo da Madre de Deus, Caatinga region (8° 08' 06.2 " S and 36° 19' 29.4" W).

The local climate is tropical semi-arid (Bsh), with high temperature variation, being between 15 °C and 34 °C, the rain period varies from February to May and are mostly dependent on weather systems of the type Intertropical Convergence Zone (ZCIT), with an average annual rainfall of 431.8 mm (Brazil, 2005; Rocha, 2016; Salgueiro et al., 2014). Planosol occurs in this municipality and it is characterized by imperfectly drained, high natural fertility and flooding in the rainy season and dryness in summer, the vegetation is characterized by hyperxerophilous Caatinga with stretches of deciduous forest (Projete, 2010; Salgueiro et al., 2014).

Botanical identification was carried out in Dárdano de Andrade Lima herbarium of the Pernambuco Agronomic Institute (IPA), protocol No. FIB No. 04/2018. Ethanolic extracts of the leaf and root parts of *Acanthospermum hispidum* L .; leaf, stem and root of *Boerhavia diffusa* L. and leaf, bulb and root of *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb.

4.1. Chemical testing

4.1.1 Phytochemical Prospecting Tests

The prospecting analyzes to be described were based on the methodology described by Matos (2009). Phytochemical tests were performed for the qualitative identification of the following compounds: Tannins; saponins, anthocyanins, anthocyanidins and flavonoids.

4.1.2. Total Phenolic Content

The total phenolic compounds concentration was determined using the spectrophotometric method (Singleton et al., 1999). The reaction mixture was prepared by mixing 0.5 mL methanolic extract solution with 2.5 mL Folin-Ciocalteu reagent (10%) and 2.5 mL 7.5% NaHCO_3 . The blank was prepared concurrently from 0.5 mL of methanol, 2.5 mL of 10% Folin-Ciocalteu reagent and 2.5 mL of 7.5% NaHCO_3 , both dissolved in distilled water. The samples were then incubated in a thermostated bath at 45 °C for 45 min. Absorbance was determined using the UV-Vis spectrophotometer (UV 1800 Shimadzu) measure at 765 nm. Samples were prepared in triplicate for each analysis and the. Gallic Acid was used as a standard then, the equivalent content of phenolic compounds present in extracts was expressed in terms of μg gallic acid equivalents per gram of extract ($\text{EGA } \mu\text{g.g}^{-1}$).

4.1.3. Flavonoid Dosing

The flavonoid determination followed the methodology proposed by Woisky and Salatino (1998) adapted. The determination consists on pipetting 1 mL of the extract, 1 mL of 5% $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ solubilized in methanol and 2 mL methanol into a test tube. For the experiment, the blank was prepared using 3 mL methanol and 1 mL aluminum chloride. After 30 minutes in the dark and the samples were measure in a spectrophotometer (UV 1800 Shimadzu) at 425 nm. Samples were prepared in triplicate for each analysis. Quercetin was used as a standard and the results obtained and the flavonoid content were expressed in μg quercetin equivalent of sample per gram of extract ($\mu\text{g EQ.g}^{-1}$).

Gas chromatography mass spectrometry (GC-MS)

Gas chromatography coupled with mass spectrometry analyzed the samples of *A. hispidum* L., *B. diffusa* L. and *E. bulbosa* (Mill.) Urb. On a GC/MS (Agilent model 7890A), the obtained mass fragments were compared to those of the NIST version 8 reference library. The chromatographic conditions used in the extracts analysis were: DB-5ms capillary column (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m) 5% phenyl-95% methylpolysiloxane, with helium carrier gas (1.4 mL.min⁻¹); Split injection mode 1:10; Ionization Electronic impact with 70 Ev; Injected sample volume 1 mL; Scan Acquisition - 30 to 450 m.z⁻¹; Detector temperature at 280 °C; Injector temperature 280 °C; Initial temperature 70 °C; Initial time 3 min; Heating rate 4 °C; Final temperature 280 °C for 15 minutes and Final time 70 minutes.

4.1.4. High-performance thin-layer chromatography (HPTLC)

Qualitative analysis for compound class determination was performed using HPTLC (High-Performance Thin Layer Chromatography). CAMAG HPTLC module consisting on an Automatic TLC Sampler 4, Automatic development chamber ADC2 and a TLC Visualizer handled by WINCATS software (version 1.4.4.6337) were used for the analysis of the ethanolic extracts of *A. hispidum* L., *B. diffusa* L. and *E. bulbosa* (Mill) Urb. The stationary phase was a plate (20 cm × 10 cm) composed of pre-activated silica gel with aluminum support (60F254 Merck). The samples were applied on the plate in 9.5 mm long bands distanced 8 mm from the bottom of the plate and the first application at 20 mm from the left side, maintaining a distance of 12 mm between each sample. Research was carried out to detect phenolic compounds, coumarin, naphthoquinones, anthracenic derivatives, triterpenes and steroids. Table 1 shows the mobile phases and developers for each of the compounds searched.

Table 1: Mobile Phase and revealer used in HPTLC analysis.

Researched Compounds	Mobile phase	Revealer
Phenolic compounds	Ethyl acetate - acetic acid-formic acid-water (110: 11: 11: 26).	Neu
Coumarin	Toluene ether (1: 1). Saturated with 10% acetic acid.	KOH
Naphthoquinones	Toluene formic acid (99: 1).	KOH
Anthracenic	Ethyl methanol-water acetate (110: 13.5:	KOH

derivatives	10).	
Triterpenes and Steroids	Toluene-chloroform-ethanol (40:40:10).	Liebermann-Burchard with heating at 100°C for 10min.

4.2. Biological Assays

4.2.2. Antioxidant Activity: Diphenyl-picrilhydrazine (DPPH)

Ethanollic extract solutions were prepared in triplicate at the following concentrations: 1000, 500, 250, 125 and 62.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, a control was made by the addition of ethanol and DPPH. At each concentration of ethanollic extract was added a DPPH solution, for this procedure another control was made by adding solvent insted of extract. 30 minutes were waited after DPPH addition. Measure were perfomed in a spectrophotometer (UV 1800 Shimadzu) at 515 nm (Nascimento et al., 2011). The ability to eliminate the DPPH radical (% antioxidant activity) was calculated using the following equation:

$$\text{Elimination [DPPH] (\%)} = \frac{(\text{Abs Sample} - \text{Abs Control})}{\text{Abs Control}} \times 100$$

Additionally, the IC_{50} was calculated, the extract's ability to induce half of the maximum antioxidant effect, using GraphPad Prims 7.03 software.

4.2.3. Reducing Power Antioxidant Activity

For the reducing power determination, a 2.5 mL aliquot was used, mixed with 0.2 M phosphate buffer, and 1.5 mL of 1% potassium ferricyanide was added. The mixture was incubated at 50 °C within 30 min. Then 2.5 mL of trichloroacetic acid (10%) was added with 5 mL of the mixture. It was centrifuged at 3000g. After this process, 2.5 mL of the supernatant was removed, later 2.5mL of water and 0.5 of ferric chloride were added. The samples are analyzed in a spectrophotometer (UV 1800 Shimadzu) and measure at 700 nm. Samples were prepared in triplicate for each analysis. The calibration curve was performed using TROLOX as standard, the results being expressed in $\mu\text{g TROLOX equivalent per gram of extract } (\mu\text{g ET.g}^{-1})$ (Jayanthi and Lalitha, 2011; Ferreira et al., 2007).

4.2.4. Osmotic fragility

The technique of osmotic fragility performed was based on the methodology described by modified Darcie and Lewis (1975). The assay was performed in duplicate, the samples were tested at concentrations of 1000, 500, 250, 125, 62.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ diluted in 0.9% isotonic sodium chloride solution. The samples received 75 μL of sheep blood (Multi Diagnostics) at each concentration tested to verify hemolysis. The sheep blood were exposed to the extract for 30 minutes.

Then the sample solutions were centrifuged at 2500 rpm for 3 minutes at 25 °C. The negative control was performed with 0.9% isotonic sodium chloride solution and the positive control with distilled water, which received the same procedures used in the test samples. The supernatant absorbance measurement were performed at 540 nm in a spectrophotometer (UV 1800 Shimadzu). For determination of hemolysis rate, a measurement were performed at 540 nm without adding sheep's blood.

Smears were also performed on panotic stained glass slides, with the precipitate resulting from the procedure for observing the integral or hemolytic morphology of the erythrocytes, which were observed through an optical microscope connected to the Leica DFC-280 Camera in 1000x magnification. Hemolysis percentage was calculated by the formula:

$$\text{Hemolysis (\%)} = \frac{\text{Sample abs} - \text{Staining Abs}}{\text{Abs Positive Control}} \times 100$$

4.3. Statistical analysis

Statistical analyzes and graphs were performed using GraphPad Prism 7.03 software. Data were expressed as mean $\pm$ standard deviation. Statistical difference was calculated using Turkey's ANOVA with multiple comparisons test for total phenolic content and flavonoid assays and reducing power analyzes. For DPPH treatments, ANOVA was performed with Dunnett's multiple comparison test. P values <0.05 were considered significant.

5. RESULTS

5.1. Chemical testing

5.1.2. Phytochemical Prospecting Tests

Among phytochemical prospecting tests it was possible to detect the presence of secondary metabolism compounds qualitatively (Table 2).

Table 2: Results of phytochemical prospecting.

PHYTOCHEMICAL PROSPECTION ANALYSIS					
Sample	Anthocyanins and anthocyanidins	Flavones, Flavonols and Xanthones	Chalcones and Aurones	Saponins	Tannins
<i>A. hispidum</i> L.- Leaf	+	+	+	-	++
<i>A. hispidum</i> L. – Root	-	+	+	-	+
<i>B. diffusa</i> L. - Leaf	+	+	++	+	++
<i>B. diffusa</i> L. – Stalk	+	+	+	-	++
<i>B. diffusa</i> L. – Root	-	-	+	-	+
<i>E. bulbosa</i> (Mill) Urb. – Leaf	+	+++	+	+	++
<i>E. bulbosa</i> (Mill) Urb. – Bulb	+++	+++	+	++	++
<i>E. bulbosa</i> (Mill) Urb.- Root	+	+	+	+	+

Caption: + Poor Presence, ++ Moderate Presence, +++ Strong Presence.

5.1.3. Total Phenolic Content

Gallic acid was used as standard for the determination of total phenolic compounds by the Folin-Ciocalteu method, the linear correlation established was $R^2 = 0.99321$, the linear regression equation obtained was $y = 0.00989x + 0.00995$. From linear regression equation obtained the phenolic compounds contents of the samples were determined in terms of equivalent μg of gallic acid per gram of extract ($\mu\text{g EGA.g}^{-1}$) (Table 3).

Table 3: Average quantification of total phenolic compounds expressed as gallic acid equivalent ($\mu\text{g EGA.g}^{-1}$).

Samples	Total phenolic compounds Concentration $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$
---------	--

<i>B. diffusa</i> L. - Leaf	161,0 ± 11,7 ^a
<i>B. diffusa</i> L. – Stalk	111,5 ± 1,4 ^b
<i>E. bulbosa</i> (Mill) Urb. – Leaf	105,1 ± 1,5 ^b
<i>B. diffusa</i> L. – Root	86,1 ± 0,9 ^b
<i>E. bulbosa</i> (Mill) Urb. – Bulb	74,8 ± 5,9 ^{b,d}
<i>A. hispidum</i> L. - Leaf	71,43 ± 0,81 ^{b,d}
<i>E. bulbosa</i> (Mill) Urb. – Root	65,2 ± 8,5 ^{b,d}
<i>A. hispidum</i> L. - Root	21,0 ± 1,9 ^c

5.1.4. Flavonoid Dosing

Quercetin was used as standard for the determination of total flavonoids by aluminum chloride (AlCl₃) revelation, the linear correlation established was R²= 0.99576, the linear regression equation obtained was y=0.02709x - 0.04905. From linear regression equation obtained the total flavonoids contents of the samples were determined in terms of equivalent µg of quercetin per gram of extract (µg EQ.g⁻¹) (Table 4).

Table 4: Average quantitation of total expressed flavonoids equivalent to quercetin (µg EQ.g⁻¹).

FLAVONOIDS DOSING	
Samples	Concentration 1000 µg.mL ⁻¹
<i>E. bulbosa</i> (Mill) Urb. – Leaf	113,3 ± 3,1 ^a
<i>A. hispidum</i> L. - Leaf	99.9 ± 3,4 ^b
<i>B. diffusa</i> L. - Leaf	46,0 ± 1,8 ^c
<i>B. diffusa</i> L. – Stalk	25,1 ± 1,6 ^d
<i>E. bulbosa</i> (Mill) Urb. – Bulb	17,8 ± 0,8 ^d
<i>E. bulbosa</i> (Mill) Urb. – Root	15,1 ± 0,8 ^{d,e}
<i>B. diffusa</i> L. – Root	12,0 ± 0,2 ^{d,e}
<i>A. hispidum</i> L. - Root	8,3 ± 0,2 ^{d,e,f}

5.1.5. GCMS

In gas chromatographic analysis, several compounds were detected in the samples (Tables 6 to 13), the characteristics of these compounds such as molecular weight, molecular formula, retention time and peak area (%) are summarized in Appendix A. For analysis we considered only those with similarity index above 80%.

In this sense the compounds detected in *A. hispidum* leaves, Lavandulol (98.1%); *E. bulbosa* leaves, 2-Thiouracil (85.6%); *E. bulbosa* bulb; Ethanolamine (83.8%); *E. bulbosa* root, 1H-1,2,4-Triazole-3-carboxylic acid (75.9%).

5.1.6. High-performance thin-layer chromatography (HPTLC)

A. hispidum, *B. diffusa* and *E. bulbosa* samples were evaluated for detection of various compounds in HPTLC analysis, where the characteristics of the bands were analyzed and compared with their respective analysis standards (Figures 1 to 6).

B. diffusa stem and leaf samples and *A. hispidum* leaf and root samples showed bands for triterpenes (Figure 1) and their standards (Sitosterol and Stigmasterol) as well observed for monoterpenes and their standards (Carvacrol and Thymol) (Figure 2).

In the evaluation of phenolic compounds, the samples of *E. bulbosa* leaf, bulbs and root showed a color change and match the rutin pattern (Figure 3). For detection of naphthoquinones (Figure 4) the standard used was Lapachol and the bulb sample of *E. bulbosa* showed characteristics for this type of compound. In the chromatographic plate of anthracenic derivatives, the bulb and root samples presented revelation matching their Aloin standard (Figure 5) and in the coumarin evaluation (Figure 6).

5.2. Biological Assays

5.2.2. Antioxidant Activity: Diphenyl-picrilhydrazine (DPPH)

The results regarding antioxidant activity by reducing the DPPH radical in *A. hispidum*, *B. diffusa* and *E. bulbosa* are shown in Figure 7.

DPPH analysis reveals that *B. diffusa* and *E. bulbosa* leaf extracts have similar antioxidant capacity as ascorbic acid (Figure 7). The samples *A. hispidum* L. root and *E. bulbosa* (Mill) root presented antioxidant percentage lower than 50%, so it was possible to calculate the IC₅₀.

5.2.3. Reducing Power Antioxidant Activity

The results regarding the activity of reducing antioxidant power for the ethanolic extract of *A. hispidum*, *B. diffusa* and *E. bulbosa* species are shown in Table 5. Besides leaves extract *B. diffusa* had the best performance compared with others extracts (Table 5).

Table 5: Result of the antioxidant action of extracts of the species expressed as TROLOX equivalent per gram of extract ($\mu\text{g ET.g}^{-1}$).

ANTIOXIDATING ACTIVITY OF REDUCING POWER	
Sample	Concentration 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
<i>B. diffusa</i> L. - Leaf	198,08 $\pm$ 4,64 ^a
<i>E. bulbosa</i> (Mill) Urb. – Leaf	136,1 $\pm$ 2,18 ^b
<i>E. bulbosa</i> (Mill) Urb. – Bulb	129,7 $\pm$ 9,77 ^b
<i>B. diffusa</i> L. – Root	117,1 $\pm$ 6,5 ^b
<i>A. hispidum</i> L.- Leaf	73,12 $\pm$ 1,32 ^c
<i>B. diffusa</i> L. – Stalk	57,04 $\pm$ 5,7 ^{c,d}
<i>E. bulbosa</i> (Mill) Urb.- Root	47,27 $\pm$ 1,56 ^{c,d}
<i>A. hispidum</i> L. – Root	46,12 $\pm$ 1,70 ^d

5.2.4. Osmotic fragility

The evaluation assay for cytotoxicity against sheep erythrocyte cells are shown in Figure 8, with osmotic fragility compared to extracts expressed as a percentage.

In the analysis of the erythrocyte precipitate slides treated with extracts, low hemolysis rates were observed, and few morphological changes could be detected. These changes occurred predominantly in *B. diffusa* root extracts (14% hemolysis at a concentration of 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (Figure 9B). On the other hand, leaf extracts of the same species had the lowest hemolysis rates (4% hemolysis at a concentration of 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (Figure 9A).

6. DISCUSSION

Some plants in the Caatinga region are known to be used as herbal medicines, due to the compounds that provide them with a therapeutic profile, where secondary metabolites present in these plants are involved in their beneficial and medicinal effects (Chatterjee, 2015; Morais, 2005). Caatinga presents climate, temperature, precipitation, soil and other different abiotic

components when compared to other regions, which may influence the amount of metabolites produced during plant development, due to the stress of the high variation of environmental conditions (Calixto, 2001; Gouinguéné and Turlings 2002).

The stress response capacity of a given system is determined by resistance methods that can be escape or tolerance. In escape mechanisms there is a reduction in metabolic activity, as opposed to tolerance mechanisms, where there is a greater activity in the production of compounds (Willadino and Camara, 2010). Studies such as Pimpão (2009) confirm the capacity of metabolic alteration of plants, in which water stress and salinity increased the amount of phenols and antioxidant activity.

This paper carried out chemical and biological tests to evaluate the potential of *A. hispidum* L., *B. diffusa* L. and *E. bulbosa* (Mill) Urb. from caatinga stress climate. For the evaluation of the compounds found in these caatinga species, phytochemical prospections, flavonoid and phenol equivalents assays and chromatographic analysis by GCMS and HPTLC were performed. The phytochemical prospecting was qualitatively evaluated of compounds of Anthocyanins and anthocyanidins, Flavones, Flavonols, Xanthonas, Chalcones and Aurones, Saponins and Tannins in the three studied species.

Anthocyanins and anthocyanins were detected in *E. bulbosa* (Mill) Urb. species, corroborating the work of Thanh et al. (2012) where the author found about 2.04% of these components in the species bulbs. The presence of flavones, flavonols and xanthonas in *E. bulbosa* (Mill) Urb. leaf and bulb extracts in the prospecting test corroborate literature articles for the species (Sinacay, 2016; Martão, 2013). The work of Maurya (2007) found the presence of flavones, flavonols and xanthonas in *B. diffusa* L. leaf extract according to the results of the present work. It was also possible to verify the presence of chalcones, aurones and tannins in the leaf and stem of the species.

In sync with the assay of phenolic compounds, the three species analyzed presented considerable contents of the equivalents of the substances, where the sample *B. diffusa* L. leaf presented $161.0 \pm 11.7 \mu\text{g EGA.g}^{-1}$ and the sample of Stem with $111.5 \pm 1.4 \mu\text{g EAG.g}^{-1}$, these being the highest levels of phenolic equivalents. With no statistical difference for the *B. diffusa* L. stem sample, the *E. bulbosa* (Mill) Urb. leaf sample presented $105.1 \pm 1.5 \mu\text{g EAG.g}^{-1}$. The samples of *E. bulbosa* (Mill) Urb. Bulb and root with 74.8 ± 5.9 and $65.2 \pm 8.5 \mu\text{g EAG.g}^{-1}$ respectively, and *A. hispidum* L. Leaf with $77.1 \pm 9.1 \mu\text{g EAG.g}^{-1}$ showed considerable levels of equivalent to phenolic compounds without statistical difference. Was found $21.0 \pm 1.9 \mu\text{g EGA.g}^{-1}$ in the *A. hispidum* L. Root sample, differing statistically from the other species evaluated.

The samples with the highest content of phenolic compounds also showed the highest results for the flavonoid compounds. The samples of *E. bulbosa* (Mill) Urb. leaf which presented the highest quercetin equivalent content with $113.3 \pm 3.1 \mu\text{g EQ.g}^{-1}$ followed by samples of *A. hispidum* L. leaf with $99.9 \pm 3.4 \mu\text{g EQ.g}^{-1}$ and *B. diffusa* L. leaf with $46.0 \pm 1.8 \mu\text{g EQ.g}^{-1}$, where there is a statistical difference between them.

The articles in the scientific literature agree with the results of the phenol and flavonoid assays, demonstrating that the equivalent levels are similar to those found in the present paper. Bhardwaj et al. (2014), similar amounts of quercetin equivalents were found for *B. diffusa* L. leaf and root samples. In the species *E. bulbosa* (Mill) Urb. Fawole et al., (2009) attributed amount of phenolic compounds to anti-inflammation activities of the Iridaceae family. According to Degáspari (2004) the presence of phenolic compounds may contain antioxidant actions, inhibiting the oxidation of lipids or other molecules, preventing the onset or spread of oxidation chain reactions, preventing the development of various diseases.

In the species *A. hispidum* L., it was possible to detect with the similarity index of 98.1% the compound Lavandulol that according to a literature presents moderate antioxidant activity, composed of varied fragrances (Ruberto & Baratta, 1999). For this same species, HPTLC analyzes detected monoterpenes and triterpenes in the leaf and root samples and the source results are in agreement with the work of Araujo et al. (2013) who detected the phytosterol in hydroethanolic extract of roots of *A. hispidum* L.

Phytosterols were also detected in *B. diffusa* L. leaf and stem in HPTLC analysis. Studies point to its likely prevention and potential therapy for human cancer, already found in foods with vegetable oils. Its activity in literature is described for having anti-carcinogenic and anti-atherogenic properties, for inducing apoptosis of breast cancer cells (Maguire et al. 2003; Li, 2001).

In chromatographic tests with *E. bulbosa* (Mill) Urb. naphthoquinones were detected using the Lapachol standard. This result is consistent with the literature where studies have found derivatives or isolates of naphthoquinones or anthraquinones from bulbs of the species or its genus *Eleutherine* (Mahabusarakam et al., 2010; Paramapojn, et al. 2008; Alves et al. 2003; Rani, 2018); In the specimens of the same genre were also detected phenolic and coumarin compounds, being equivalent to their respective patterns rutin, quercetin and coumarin, where such compounds are related to several activities, including antioxidants, anti-inflammatory and anti-tumor (Beegum et al. 2014; Oliveira, 2016).

With a similarity index of 83.8%, Ethanolamine was detected in *E. bulbosa* (Mill) bulb and is involved in the metabolic pathway through phosphatidylcholine biosynthesis. In GCMS

analyzes a benzophenone with a similarity index of 92.4% was found which is a flavoring found in red fruits, and a DL-Arabinose which is a pectin in the cell wall of higher plants. (Bano, 2012; Pojarová et al. 2007; Rani and Nair, 2016; Rodríguez and Willian, 2014).

In chromatographic tests with *E. bulbosa* (Mill) Urb. was detected Naphthoquinones using the standard Lapachol. This result is consistent with the literature where studies have found derivatives or isolates of naphthoquinones or anthraquinones from bulbs of their species or their genus Eleutherine (Mahabusarakam et al., 2010; Paramapojn, et al. 2008; Alves et al. 2003; Rani, 2018). In the genus Eleutherine were also detected phenolic compounds and also coumarins, being equivalent to their respective patterns rutin, quercetin and coumarin, where such compounds are related to several activities, including antioxidants, anti-inflammatory and anti-tumor (Beegum et al., 2014, Oliveira, 2016).

In the paper, biological assays were released to prove the activities of caatinga species. The antioxidant tests performed were DPPH and reducer power, which have different mechanism of action. DPPH is based on electron transfer, where the action of an antioxidant is used to reduce the color purple to yellow with a decrease in absorbance. The reducing power test is based on the ability of phenolic compounds to reduce Fe^{+3} reagent, with the consequent formation of a Fe^{+2} colored complex. With the use of antioxidants with different mechanisms of action, samples may present different performances in both trials (Nascimento, et al. 2011; Santos, et al. 2007).

The species with the best results for DPPH were *B. diffusa* L. and *E. bulbosa* (Mill) Urb. leaves, with IC_{50} results of $123.8 \pm 0.2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ and $159.9 \pm 15.1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ with no statistical difference for the standard used, ascorbic acid with $99.9 \pm 0.3 \mu\text{g.mL}^{-1}$. The same samples in reducing power presented the largest equivalents of a trolox with $198.08 \pm 4.64 \mu\text{g ET.g}^{-1}$ for *B. diffusa* L. leaf and $136.1 \pm 2.18 \text{ ETg}^{-1}$ for *E. bulbosa* (Mill) Urb. leaf presenting significance, with $P < 0.05$ when compared with each other. The results can be interrelated with the expressive phenolic and flavonoid compounds reported in this article.

Other samples of *B. diffusa* L. showed antioxidant activity in both tests, in DPPH with an IC_{50} of $270.1 \pm 62.9 \mu\text{g ET.g}^{-1}$ for the stem and $249.1 \pm 19.5 \mu\text{g ET.g}^{-1}$ for the root, not statistically differing between them. Reduction power analysis showed $57.04 \pm 5.7 \mu\text{g ET.g}^{-1}$ for the stem and $117.1 \pm 6.5 \mu\text{g ET.g}^{-1}$ for the root, where the root sample showed no statistical difference in comparison sample of bulb of *E. bulbosa* (Mill) Urb. with $129.7 \pm 9.77 \mu\text{g ET.g}^{-1}$.

Other samples also showed antioxidant activities such as the species *A. hispidum* L., which presented, in the DPPH assay in its leaf sample the IC_{50} of $322.7 \pm 56.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, differing statistically from the standard. In the evaluation of the reducing power, the performance of *A.*

hispidum L. was also similar with $73.12 \pm 1.32 \mu\text{g ET.g}^{-1}$, presenting significance $P < 0.05$ when compared to *B. diffusa* L. leaf samples which presented the highest amounts of trolox equivalents. *Acanthospermum*'s antioxidant activity may be attributed to the amount of flavonoids and the moderate amount of phenols entered in the prospecting and dosing tests described in the paper.

The results of the chemical and antioxidant tests are compatible with the hemolytic tests that prove that these samples have low toxicity when in contact with erythrocytes. Osmotic fragility assessment measures the ability of red blood cells to maintain their structural integrity and resist lysis when exposed to osmotic stress.

According to the author Sperandio et al. (2010) hemolytic action should be considered high only when the percentages reach values above 40% and low when these values are below 10%. None of the extracts showed high hemolysis of sheep erythrocytes, except for the extract of the *B. diffusa* L. root sample, moderate hemolysis, with 14% hemolysis at the highest concentration of $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, and the other extracts analyzed showed presented percentages below 10% adjusting a low cytotoxic percentage. The sample with the lowest percentage of hemolysis was also the one that obtained the best results of its antioxidant results, the *B. diffusa* L. leaf, with 4% hemolysis. These results can be attributed to the chemical components found in these samples from the Pernambuco backlands, where none of the gas chromatography or HPTLC results found any component capable of causing cell lysis described in the literature.

7. CONCLUSIONS

The present work demonstrated the richness of metabolic compounds through several chemical analyzes of *Acanthospermum hispidum* L., *Boerhavia diffusa* L and *Eleutherinebulbosa* (Mill) when collected in Caatinga region. The low percentage of hemolysis was observed suggesting extracts low toxicity, besides these sample presented antioxidant activities.

8. ACKNOWLEDGMENTS

The authors of this paper are grateful for the financial and scientific support from the Higher Education Personnel Improvement Coordination (CAPES) and the Biosustainable Chains Technology Institute (ITCBio), as well as the Alipio Magalhães Porto Pharmacy (FAVIAMP) for collecting the samples.

9. REFERENCES

- ALVES TMA, HELMUT K, ZANI CL. 2003. Eleutherinone, a novel fungitoxic naphthoquinone from *Eleutherine bulbosa* (Iridaceae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 5: 709-712.
- BEEGUM GRJ; BEEVY SS, SUGUNAN VS. 2014. Qualitative Phytochemical Screening and GC-MS Analysis of *Boerhavia diffusa* L. International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering 4: 318- 324.
- BHARDWAJ R, ANKITA Y, SHARMA RA. 2014. Phytochemicals And Antioxidant Activity In *Boerhavia Diffusa*. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 6: 344-348.
- BRAZIL. 2005. Ministério De Minas E Energia/Cprm - Serviço Geológico Do Brasil. Diagnóstico Do Município De Brejo Da Madre De Deus, Estado De Pernambuco. Editores: BELTRÃO BA., MASCARENHAS JC, MIRANDA JLF, SOUZA JUNIOR LC, GALVÃO MJTG, PEREIRA SN. Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água subterrânea. 21.
- CALIXTO JB. 2001. Medicamentos Fitoterápicos. In: YUNES RA & CALIXTO JB. (eds.): plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Argos- Ed. Universitária UNOESC , Santa Catarina: Campus Chapecó 1: 297-315.
- CHATTERJEE SS. 2015. From covalent bonds to eco-physiological pharmacology of secondary plant metabolites. Karlsruhe, Germany: Biochemical Pharmacology 1: 9.
- DARCIE JV, LEWIS SM. Practical Hematology. 1975. 5th Edition. Churchill Livingstone. London. 629 p.
- DEGÁSPARI CH, WASZCZYNSKYJ N. 2004. Antioxidants Properties Of Phenolic Compound. Visão Acadêmica 5: 33-40.
- DRUMOND MA, KILL LHP, LIMA PCF, OLIVEIRA MC, OLIVEIRA V.R, ALBUQUERQUE SG, NASCIMENTO CES, CAVALCANTE J. 2000. Estratégias para o uso sustentável da biodiversidade da caatinga. In workshop de avaliação e identificação de 29 ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade do bioma caatinga. Petrolina - Brasil,. Embrapa/Cpatsa, UFPE e Conservation International do Brasil. 47 p.
- FAWOLE OA, NDHLALA AR, AMOO SO, FINNIE JF, STADEN JV. 2009. Anti-inflammatory and phytochemical properties of twelve medicinal plants used for treating gastrointestinal ailments in South Africa. Journal of Ethnopharmacology 123: 237-243.
- FERREIRA ICFR, BAPTISTA P, VILLAS-BOAS M, BARROS L. 2007. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. Food Chemistry 100: 1511–1516.

- GOUINGUENÉ SP, TURLINGS TCJ. 2002. The effects of abiotic factors on induced volatile emissions in corn plants. *Plant Physiology* 129: 1296-1307.
- JAYANTHI P, LALITHA P. 2011. Reducing power of the solvent extracts of *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 3: 126-128.
- LI JH, AWAD AB, FINK CS, WU YW, TREVISAN MP. 2001. Measurement variability of plasma beta-sitosterol and campesterol, two new biomarkers for cancer prevention. *Eur J Cancer Prev* 10: 245–249.
- MACIEL MAM, PINTO AC, VALDIR FVJ, NOEMA F, GRYNBERG, ECHEVARRIA A. 2002. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quim. Nova* 25: 429-438.
- MAHABUSARAKAM W, HEMTASIN C, CHAKTHONG S, PIYAWAN S, IFESAN V, OLAWUMI B. 2010. Naphthoquinones, Anthraquinones and Naphthalene Derivatives from the Bulbs of *Eleutherine americana*. *Planta Medica* 76:345-349.
- MAGUIRE L, KONOPLYANNIKOV , FORD, ANITA RM, NORA MO. 2003. Comparison of the cytotoxic effects of beta-sitosterol oxides and a cholesterol oxide, 7beta-hydroxycholesterol, in cultured mammalian cells. *J Nutr* 90: 767–775.
- MARTÃO, VM. 2013. Atividade antioxidante in vitro de plantas medicinais da Amazônia Ocidental. Programa de Pós- Graduação- Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente (PGDRA) da Fundação Universidade Federal de Rondônia (UNIR) 99p.
- MATOS FJA. 2009. Fitoquímica experimental. 3ª. Edição. Editora da UFC, 36p.
- MAURYA R, SATHIAMOORTHY BK, MUNDKINAJEDDU D. 2007. Flavonoids and phenol glycosides from *Boerhavia diffusa*. *Natural Product Research* 21:126-34.
- MORAIS SM, DANTAS JDP, SILVA ARA, MAGALHÃES EF. 2005. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 15: 169-177.
- NASCIMENTO JC, LAGE LFO, CAMARGOS CRD, AMARAL JC, COSTA LM, SOUSA AM, OLIVEIRA FQ. 2011. Antioxidant determination activity by DPPH method and assay for total flavonoids in leaves extracts of *Bauhinia variegata* L. *Rev. Bras. Farm* 4: 327-332.
- OLIVEIRA PN, GIULIETTI AM, OLIVEIRA RP. 2016. Flora da Bahia: Iridaceae. *Sitientibus série Ciências Biológicas*.
- PARAMAPOJN S, GANZERA M, GRITSANAPANA W, STUPPNER H. 2008. Analysis of naphthoquinone derivatives in the Asian medicinal plant *Eleutherine americana* by RP-HPLC and LC–MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 47: 990–993.

- PIMPÃO, RCS. 2009. Compostos fenólicos e sua actividade antioxidante em espécies de *Juniperus*: análise da produção sazonal e sob condições de stresse. Tese de mestrado, Biologia (Biologia Celular e Biotecnologia), Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências.
- POJAROVÁ M, KAUFMANN D, GASTPAR R, NISHINO T, RESZKA P, BEDNARSKI PJ, ANGERER EV. 2007. [(2-Phenylindol-3-yl) methylene] propanedinitriles inhibit the growth of breast cancer cells by cell cycle arrest in G2/M phase and apoptosis. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 15: 7368-7379.
- PROJETEC. SECRETARIA DE RECURSOS HÍDRICOS (SRH). 2010. Plano hidroambiental da bacia hidrográfica do rio Capibaribe: Tomo I - diagnóstico hidroambiental volume 02/03 /Projetos Técnicos. Recife, 197p.
- RANI VS. 2018. Isolation Of A Compound From The Bulbs Of *Eleutherine Bulbosa* (Miller) Urban (Iridaceae). *Asian J Pharm Clin Res* 11: 406-410.
- RANI VS, NAIR BR. 2016. GC-MS Analysis Of Ethyl Acetate Extract Of *Eleutherine Bulbosa* (Urban) Miller (Iridaceae) *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 22p.
- ROCHA PGO, XIMENES TCF, GUERRA SMS. 2016. Geoprocessamento aplicado a seleção de áreas para implantação de aterro sanitário: estudo de caso, consórcio Brejo Madre de Deus e Juatuba- PE | GIS applied to selecting areas for the implementation of the landfill: case study, Fen consortium Mother of Go. *Revista Geama* 1: 176-186.
- RODRÍGUEZ F, WILLIAN J. 2014. Viabilidad del uso de cristales de mentol como anestésico en juveniles de gamitana, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Piscis, Characiformes). Universidad Nacional de la Amazonía Peruana.
- ROQUE AA, LOIOLA MIB. 2013. Potencial de uso dos recursos vegetais em uma comunidade rural no semiárido potiguar. *Revista Caatinga* 26: 88-98.
- RUBERTO G, BARATTA MT. 2000. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems, *Food Chemistry* 69:167-174.
- SALGUEIRO JHPB, PINTO EJA, MONTENEGRO SMGL, SILVA BBS. 2014. Tendência De Índices Pluviométricos Na Bacia Do Rio Capibaribe-Pe E Sua Influência Na Gestão Dos Recursos Hídricos. *Revista Brasileira de Geografia Física*, 07: 1002-1014.
- SANTOS MHB, BRUNO L, DUARTE SMS, ABREU CMP, GOUVÊA CMCP. 2007. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café (*Coffea arabica*). *Química Nova* 30: 604-610.

SINACAY IC, DELGADO EMM, SÁNCHEZ OMA. 2016. Antibacterial effect in the *Eleutherine vitrio bulbous* (Yahuar piri piri) front *Streptococcus mutans* ATCC 35668. *Pueblo Cont.* Vol. 27:343-350.

SINGLETON VL, ORTHOFER R, LAMUELA-RAVENTOS RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* 299: 152-178.

SPERANDIO D, ROSSIGNOL G, GUERILLON J, CONNIL N, ORANGE N, FEUILLOLEY MGJ, MERIEAU A. 2010. Cell-associated hemolysis activity in the clinical strain of *Pseudomonas fluorescens* MFN1032. *BMC Microbiology* 10: 1-11.

THANH N, PHAM T, CUONG, NGUYEN H, BINH LT. 2012. Extracting and analysing anthocyanin content from different plants. *Tap Chi Sinh Hoc* 33: 79-85.

WILLADINO L, CAMARA TR. 2010. Tolerância Das Plantas À Salinidade: Aspectos Fisiológicos E Bioquímicos. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer – Goiânia*, 6: 23p.

WOISKY RG, SALATINO A. 1998. Analysis os propolis: some parameters ond prodecure for chemical fuality control. *Journal Apicultural Research* 37: 99-105

ANEXO A - FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA DAS ESPÉCIES



Secretaria de
Agricultura e
Reforma Agrária

PERNAMBUCO
GOVERNO DO ESTADO

HERBÁRIO IPA – DÁRDANO DE ANDRADE LIMA
FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

FIB Nº 04/2018

	Nº de Tombo	Nome popular	Família	Nome Científico	Identificada por
1	80344	Espinho de cigano	Asteraceae	<i>Acanthospermum hispidum</i> L.	R. Pereira
2	80345	Pega pinto	Nictaginaceae	<i>Boerhavia diffusa</i> L.	O. Cano
3	80346	Alho do mato	Iridaceae	<i>Eleutherine bulbosa</i> (Mill.) Urb.	O. Cano

Dr^a Rita de Cássia Pereira
Curadora do Herbário IPA

Consulta: Elizabete Regina Silva Lucena dos Santos tel.: (81) 995163555

Procedência: PE - Brejo da Madre de Deus

Coletor: a mesma em 19/03/2017 e 23/01/2018

Determinada em: 08.05.2018

Obs.: Amostra botânica em estudo na UFPE/PPGM para fim de dissertação de Mestrado em Morfotecnologia.

Resultado encaminhado por e mail: elizabetelucena@live.com

Instituto Agronômico de Pernambuco - IPA

Vinculado à Secretaria de Agricultura e Reforma Agrária

Av. Gal. San Martin, 1371 - Bongi - 50761-000 - Recife - PE - C.P. 1022

CNPJ 10.912.293/0001-37 - PABX: (81) 3184-7200 - Fax: (81) 3184-7211

Home Page: www.ipa.br / E-mail: ipa@ipa.br

ANEXO B - TABELAS COM COMPOSTOS DETECTADOS NAS ANÁLISES DE GC-MS

Tabela14: Resultados da análise de GC-MS para os extratos de Folha da espécie *A. hispidum* L.

<i>Acanthospermum hispidum</i> L.			
Folha			
RT	AP (%)	Formula molecular	Peso molecular
3.27	34.22	$C_7H_{14}O_2$	130.09938
4.52	8.48	$C_9H_{20}O_2$	160.14633
5.64	6.78	$C_{22}H_{45}Cl_3Si$	442.235611
11.53	5.17	$C_{10}H_{23}NO$	173.177964
17.99	2.35	$C_{10}H_{22}O$	158.167066
30.41	0.56	$C_8H_{12}O_3S$	188.050715
32.66	3.90	$C_{11}H_{22}O_2$	186.16198
33.45	7.40	$C_7H_{14}O_2$	130.09938
34.32	2.45	$C_8H_{16}O_2$	144.115029
36.59	7.29	C_9H_{16}	124.1252007
36.71	4.95	$C_{11}H_{18}$	150.140851
36.94	5.72	$C_{10}H_{20}O$	156.151415
37.40	5.28	C_9H_{16}	124.1252007
42.96	3.38	$C_4H_4N_2OS$	128.004434
44.50	2.00	$C_{10}H_{18}O$	154.135765

Fonte: O autor (2019).

Tabela15: Resultados da análise de GC-MS para os extratos de raiz da espécie *A. hispidum* L.

<i>Acanthospermum hispidum</i> L.			
Raiz			
AP (%)	RT	Formula molecular	Peso molecular
71.16	3.272	$C_7H_{14}O_2$	130.09938
28.840	33.453	$C_7H_{14}O_2$	130.09938

Fonte: O autor (2019).

Tabela16: Resultados da análise de GC-MS para os extratos de folha da espécie *B. diffusa* L.

<i>Boerhavia diffusa</i> L.			
Folha			
RT	AP (%)	Formula molecular	Peso molecular
3.28	32.76	C ₇ H ₁₄ O ₂	130.09938
4.53	8.51	C ₉ H ₂₀ O ₂	160.14633
5.65	7.03	C ₁₅ H ₃₀	210.234751
11.53	5.50	C ₁₀ H ₂₃ NO	173.177964
17.99	2.71	C ₂₂ H ₄₅ Cl ₃ Si	442.235611
24.02	1.04	C ₁₀ H ₂₂ O	158.167066
25.57	31.83	C ₇ H ₁₄ O ₆	194.079039
30.54	1.42	C ₂₅ H ₂₅ NO ₃	387.183443
33.45	2.05	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	172.14633
36.95	4.09	C ₁₀ H ₂₀ O	156.151415
42.96	3.01	C ₄ H ₄ N ₂ OS	128.004434

Fonte: O autor (2019).

Tabela17: Resultados da análise de GC-MS para os extratos do caule da espécie *B. diffusa* L.

<i>Boerhavia diffusa</i> L.			
Caule			
RT	AP (%)	Formula molecular	Peso molecular
3.27	9.15	C ₇ H ₁₄ O ₂	130.09938
25.51	27.84	C ₇ H ₁₄ O ₆	194.079039
33.48	19.78	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256.24023
36.95	1.33	C ₈ H ₁₀ O ₂	138.06808
37.41	4.80	C ₁₀ H ₁₈	138.140851
37.56	10.34	C ₁₄ H ₂₆ O	210.198365
59.73	26.73	C ₂₉ H ₅₀ O	414.386166

Fonte: O autor (2019).

Tabela18: Resultados da análise de GC-MS para os extratos da raiz da espécie *B. diffusa* L.

<i>Boerhavia diffusa</i> L.			
Raiz			
RT	AP (%)	Formula molecular	Peso molecular
3.27	9.07	C ₇ H ₁₄ O ₂	130.09938
3.50	2.70	C ₃ H ₆ O ₃	90.031694
3.54	0.63	C ₅ H ₁₁ NO	101.084064
18.87	17.23	C ₃ H ₆ N ₂ O	86.0480127
25.69	62.05	C ₇ H ₁₄ O ₆	194.079039
33.46	8.29	C ₁₁ H ₂₂ O ₂	186.16198

Fonte: O autor (2019).

Tabela19: Resultados da análise de GC-MS para os extratos da folha da espécie *E. bulbosa* (Mill) Urb.

<i>Eleutherine bulbosa</i> (Mill) Urb.			
Folha			
RT	AP (%)	Formula molecular	Peso molecular
3.27	23.08	C ₇ H ₁₄ O ₂	130.09938
3.55	4.13	C ₁₀ H ₁₈	138.140851
30.42	7.96	C ₁₀ H ₁₈	138.140851
33.47	16.92	C ₁₁ H ₂₂ O ₂	186.16198
36.95	3.88	C ₁₇ H ₃₄ O ₄	302.24571
37.41	10.51	C ₁₀ H ₁₈	138.140851
37.53	28.36	C ₁₈ H ₃₀ O	262.229666
38.13	2.28	C ₅ H ₁₀ O ₅	150.052823
42.97	2.83	C ₄ H ₄ N ₂ OS	128.004434

Fonte: O autor (2019).

Tabela20: Resultados da análise de GC-MS para os extratos do bulbo da espécie *E. bulbosa* (Mill) Urb.

<i>Eleutherine bulbosa</i> (Mill) Urb.			
Bulbo			
RT	AP (%)	Formula molecular	Peso molecular
3.27	11.11	C ₇ H ₁₄ O ₂	130.09938
3.54	1.10	C ₂ H ₇ NO	61.052764
33.46	4.45	C ₉ H ₁₆ O ₃	172.109944
37.40	6.82	C ₁₀ H ₁₈	138.140851
37.55	2.10	C ₁₂ H ₂₂ O ₄	230.151809
39.14	32.32	C ₁₆ H ₁₆ O ₄	272.104858
40.19	12.52	C ₂₀ H ₁₆ O	272.120115
42.94	29.55	C ₁₃ H ₁₂ N ₂ O ₃	244.084792

Fonte: O autor (2019).

Tabela 21: Resultados da análise de GC-MS para os extratos da raiz da espécie *E. bulbosa* (Mill) Urb.

<i>Eleutherine bulbosa</i> (Mill) Urb.			
Raiz			
RT	AP (%)	Formula molecular	Peso molecular
3.27	15.89	C ₇ H ₁₄ O ₂	130.09938
3.50	6.93	C ₃ H ₆ O ₃	90.031694
3.87	32.58	C ₂ H ₆ O ₂ S	94.0088506
24.03	22.49	C ₁₀ H ₂₃ NO	173.177964
24.72	1.59	C ₁₃ H ₁₀ O	182.073165
29.51	9.81	C ₁₅ H ₂₆ O ₄	270.18311
33.46	5.62	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	172.14633
34.49	2.43	C ₁₀ H ₂₂ O	158.167066
37.55	0.77	C ₃ H ₃ N ₃ O ₂	113.0225263
38.27	1.83	C ₁₂ H ₂₃ NO ₂	213.172879

Fonte: O autor (2019).