



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO
TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS

ALESON PEREIRA DE SOUSA

**Avaliação da toxicidade e determinação das atividades biológicas dos
flavonóides vitexina, tilirosídeo e 5,7-dihidroxi-3,8,4'-trimetoxi: estudos
in silico, *in vitro* e *ex-vivo***

JOÃO PESSOA – PB

2022

ALESON PEREIRA DE SOUSA

Avaliação da toxicidade e determinação das atividades biológicas dos flavonóides vitexina, tilirosídeo e 5,7-dihidroxi-3,8,4'-trimetoxi: estudos *in silico*, *in vitro* e *ex-vivo*

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos. Área de concentração: Ensaios Pré-Clínicos e Clínicos.

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia da Silveira e Sá
COORIENTADOR: Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho

JOÃO PESSOA – PB

2022

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S725a Sousa, Aleson Pereira de.

Avaliação da toxicidade e determinação das atividades biológicas dos flavonóides vitexina, tilirosídeo e 5,7-dihidroxi-3,8,4'-trimetoxi : estudos in silico, in vitro e ex-vivo / Aleson Pereira de Sousa. - João Pessoa, 2022.

115 f. : il.

Orientação: Rita de Cássia da Silveira e Sá.
Coorientação: Abrahão Alves de Oliveira Filho.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Malvaceae. 2. Flavonóides. 3. Biodisponibilidade.
4. Toxicidade. 5. Atividade antibacteriana. 6.
Fotoproteção. I. Sá, Rita de Cássia da Silveira e. II.
Oliveira Filho, Abrahão Alves de. III. Título.

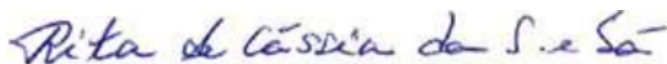
UFPB/BC

CDU 561.5/.9(043)

PARECER DA BANCA DE EXAMINADORA DE DEFESA DA TESE

Tese de Doutorado avaliada em 17 / 08 / 2022

A Banca Examinadora considera o candidato **APROVADO**.



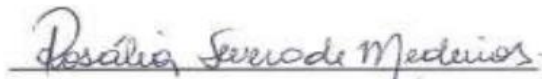
Profª. Drª. Rita de Cássia da Silveira e Sá
Universidade Federal da Paraíba
Orientadora



Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho
Universidade Federal de Campina Grande
Coorientador



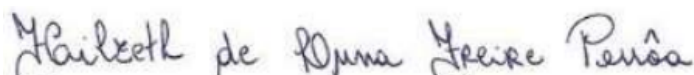
Profª. Drª. Raline Mendonça dos Anjos
Universidade Federal de Campina Grande
Examinadora Externa à Instituição



Profª. Drª. Rosália Severo de Medeiros
Universidade Federal de Campina Grande
Examinadora Externa à Instituição



Profª. Drª. Liana Clebia de Moraes Pordeus
Universidade Federal da Paraíba
Examinadora Interna à Instituição



Profª. Drª. Hilzeth de Luna Freire Pessoa
Universidade Federal da Paraíba
Examinadora Interna à Instituição

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Luzia Meiridark Pereira Torres de Sousa e José Gomes de Sousa, por todo apoio e por sempre estamparem sorrisos de satisfação nas minhas constantes buscas de aperfeiçoamento profissional. Ao meu irmão Anderson Israel Pereira de Sousa e minha prima Sayonara Torres de Lucena pelo suporte e torcida nessa etapa profissional tão importante. A minha perseverança e paciência de plantar e colher os frutos do trabalho veio sempre dos ensinamentos de vocês.

A Guilherme Coutinho Guimarães, pelo encorajamento a enfrentar os desafios no período de construção desse trabalho, pelo acolhimento, suporte e companherismo em mais uma etapa profissional, obrigado por passar sempre toda essa segurança e tranquilidade que eu necessitei para concluir essa etapa.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Os grandes desafios de saúde que estamos vencendo atualmente são frutos da luta constante e diária de profissionais na saúde e cientistas íntegros, éticos e dedicados a cumprir seu papel com a sociedade. A ciência permite a humanidade compreender um pouco mais sobre a natureza, tão importante à vida, pois através dela buscamos viver com qualidade e harmonia no meio ambiente.

Agradeço primeiramente a Deus por apontar o caminho e pela oportunidade dada para realização deste trabalho, tenho o prazer de colher os frutos desta conquista.

Agradeço aos cientistas por não perder a fé numa solução, mesmo em meio a recursos escassos, buscar fazer o melhor para modificar os problemas que nos rodeiam. Presto minhas homenagens aos amigos e familiares vítimas da pandemia de covid-19.

Gostaria de agradecer a minha família por tudo que sempre me proporcionaram, assim tive condições para conquistar esse título. Minha mainha Luzia Meiridark e o meu painho José Gomes de Sousa sempre trabalharam muito duro na vida com ética, responsabilidade e perseverança para garantir nosso conforto e esperança em dias melhores, vocês são a base e exemplo que sigo, muito obrigado. Também agradeço ao meu irmão Anderson Israel e a minha prima Sayonara Torres de Lucena por toda torcida que sempre teve para que eu alcance os meus objetivos profissionais, obrigado.

Agradeço a Guilherme Coutinho que em mais uma etapa profissional esteve do meu lado, me dando todo apoio e suporte necessário para enfrentar a seleção de doutorado e seguir com a jornada de viagens para disciplinas e experimentos, obrigado por estar desde o início ao fim desta etapa ajudando nas horas difíceis, pelo acolhimento de sempre na minha segunda morada, a cidade de João Pessoa, que se tornou a morada do meu coração. Saiba que serei eternamente grato por tudo.

Também sou grato a minha antiga equipe de trabalho no laboratório Para Exame, coordenado pela Dra. Maria José de Medeiros e minhas amigas de desafios diário na bancada: Elitânia, Osivânia, Patrícia, Daniely, Jacilene, Lila e todos os demais integrantes. Agradeço toda calma, apoio e torcida para realização da minha transição do mercado de trabalho para o doutorado.

Quero agradecer a todos os meus amigos, em especial aos amigos do mestrado de Biologia Celular e Molecular da UFPB, pois nunca soltamos as mãos uns dos outros,

mesmo acabando a etapa de mestrado. À Mayara Karla que me apresentou minha orientadora Prof^ª Rita e me incentivou a fazer o projeto para tentar a seleção de doutorado, serei sempre grato por todo o apoio. Aos queridos e hospitaleiros doutores de bioquímica pela UFRN: Diana Pontes, Giulian César e Sarah, vocês abriram a porta da casa e do coração em tantas disciplinas que paguei na UFRN, e sempre torceram e me acolheram; sou muito grato pela amizade de vocês. À Franciele e Vanessa, pois fomos os três últimos da nossa turma de mestrado que conseguiram ingressar em programas de doutorado, nossas conversas sobre os desafios do mercado de trabalho e as particularidades nas nossas vidas pessoais sempre me deixavam amparado. À Larissa Rodrigues, que junto a Mayara Karla, sempre estivemos viajando para as disciplinas do doutorado, estudando e fazendo ciência, obrigado por me ensinar tantas coisas, te admiro muito. À Laísa Vilar que foi uma inspiração para nossa turma de mestrado, sendo a primeira a ingressar no doutorado, se transformando em uma pesquisadora formidável na área de microbiologia, por todo o suporte no período da pandemia em colaborar com meus trabalhos fazendo com que estes fossem publicados em boas revistas científicas; nas infinitas orientações e correções de textos; no apoio e conversas que me ajudaram a levar com mais leveza o doutorado, muito obrigado.

Faço de forma especial um agradecimento à minha amiga Marília Marinho de Lucena que sempre esteve junto de mim, dividindo a carga dos desafios pessoais e profissionais na nossa amizade tão bonita, obrigado por todos os conselhos e conversas tão edificantes em nosso dia a dia.

Agradeço a Vanessa Moraes, minha amiga de doutorado. Ela foi um presente que recebi no momento da seleção, obrigado por dividir o curso dessa etapa comigo. Aos demais amigos que sempre estiveram comigo na expectativa e torcida para realização desta etapa (Nair Andrade, Júnior Antero, Niedja Alves e André Gomes). Sei que vocês sempre torcem por mim e apoiam minhas conquistas, agradeço o carinho e amizade.

Ainda sobre a construção do trabalho, agradeço aos nossos colaboradores a Prof^ª Dr^ª. Maria de Fátima Vanderlei e suas doutorandas: (Maria Denise, Diégina Araújo e Micaely Oliveira) por me ajudarem a seguir com a pesquisa em produtos naturais que enriquece nosso patrimônio genético e valoriza nossos recursos naturais, obrigado pela parceria. Também agradeço ao colaborador Dr. Helivaldo Diógenes da Silva Souza, toda sua contribuição nas discussões sobre as particularidades das características químicas que as moléculas desempenhavam na pesquisa.

O doutorado me permitiu ter a oportunidade de estágio docente com os melhores professores em Citopatologia da UFPB, agradeço os professores Dra. Luciene Simões e Dr. Adriano Alves por toda troca de conhecimento nesse período de aulas que estivemos juntos.

Agradecimento em especial ao Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho que aceitou meu pedido de colaboração, tornando-se meu coorientador, que abriu as portas do seu laboratório (Lafbim - UFCG) e cedeu seu tempo e estrutura, contribuindo significativamente para reestruturação do trabalho quando tive que passar por obstáculos. Carregarei o exemplo de pessoa e profissional que você me passou neste tempo enquanto seu orientando no doutorado, muito obrigado!

Também serei eternamente grato à Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia da Silveira e Sá pela oportunidade de ter sua orientação, por confiar e me proporcionar a liberdade necessária para conduzir o trabalho e buscar as parcerias que enriqueceram o desenvolvimento da pesquisa. Agradeço os conselhos e por conduzir os rumos necessários para nosso êxito na conclusão do projeto. Muito obrigado!

Devo lembrar-me de todos os bons amigos e servidores que fazem parte das instituições federais onde desenvolvi meu doutorado: no laboratório (Lafbim-UFCG), aos técnicos Aline e Eduardo; na coordenação do (DITM - UFPB), aos secretários Yago e Adriana; na coordenação (DITM – UFRN), ao secretário Guilherme; na coordenação do (DITM – UFRPE), ao secretário Fernando Campos; aos membros da coordenação do (DITM – UFC), obrigado.

“O Ser Humano é parte de um todo chamado por nós de 'universo', uma parte limitada no tempo e no espaço.

Ele experiencia a si mesmo, seus pensamentos e sentimentos, como alguma coisa separada do resto... uma espécie de ilusão de sua consciência.

Essa ilusão é uma prisão para nós, restringindo-nos a nossos desejos pessoais e à afeição por algumas pessoas próximas.

Nossa tarefa deve ser a de nos libertar desse cárcere, ampliando o nosso círculo de compaixão para envolver todos os seres vivos e toda natureza.”

(Albert Einstein)

RESUMO

As terapias complementares, que utilizam plantas medicinais e fitoterápicos, são bastante comuns no Brasil. Dentre as várias espécies vegetais brasileiras utilizadas em tais terapias destacam-se as espécies da família Malvaceae. O presente estudo teve como objetivo investigar a biodisponibilidade, toxicidade, fator de proteção solar e determinação do potencial antibacteriano e genotóxico dos flavonoides vitexina, tilirosídeo e 5,7-dihidroxi-3,8,4'-trimetoxi (Pg-1), isolados de espécies da família Malvaceae, a partir de estudos *in silico*, *in vitro* e *ex vivo*. As estruturas químicas e as propriedades bioativas previstas foram analisadas *in silico* através de softwares. Os ensaios *in vitro* e *ex-vivo* que utilizaram amostras humanas foram realizados de acordo com o Código de Ética da Associação Médica Mundial e foram aprovados por Comitê de Ética competente (protocolo número: 3.621.284). A análise *in silico* das estruturas químicas das moléculas e das propriedades bioativas previstas demonstra que a vitexina e o Pg-1 apresentam estabilidade entre suas propriedades hidrossolúveis e lipossolúveis, caracterizando-as como fármacos que possuem biodisponibilidade oral e boa absorção. O tilirosídeo possui um perfil mais lipossolúvel, o que permite maior permeabilidade nas membranas biológicas. Os testes de toxicidade *in silico* revelaram a potencial eficácia destas moléculas na proteção celular contra os radicais livres, além de possíveis atividades biológicas: antimutagênica, anticarcinogênica, antioxidante, antineoplásica, anti-inflamatória, anti-hemorragica e agonista da apoptose. As avaliações citotóxicas *in vitro* e genotóxicas *ex-vivo* detectaram baixas taxas de hemólise nas hemácias humanas e reduzida toxicidade celular contra as células da mucosa oral. A atividade citotóxica sugere o uso seguro das concentrações das substâncias avaliadas (500-1000 µg/mL) e demonstra diferentes formas de interação das moléculas com os tipos celulares analisados. A CIM evidenciou forte efeito dos flavonoides vitexina, tilirosídeo e Pg-1 frente à *K. pneumoniae*, *E. coli* e *E. fecalis*. A CBM revelou que a vitexina possui efeito bacteriostático para cepas de *K. pneumoniae* e *E. fecalis*; o tilirosídeo apresentou efeito bactericida contra cepa de *K. pneumoniae*; o Pg-1 foi considerado bactericida para as cepas de *E. fecalis* e *E. coli*, e bacterioestático na cepa de *K. pneumoniae*. Os dados demonstram que a vitexina, o tilirosídeo e o Pg-1 são moléculas seguras para possíveis aplicações terapêuticas e seu perfil de toxicidade indica viabilidade para estudos futuros.

Palavras-chave: Malvaceae, flavonóides, biodisponibilidade, toxicidade, atividade antibacteriana, fotoproteção.

ABSTRACT

Complementary therapies using medicinal plants and herbal medicines are quite common in Brazil. Among several Brazilian plant species used in such therapies, the species of the Malvaceae family stand out. The present study aimed to investigate the bioavailability, toxicity, solar protection factor and determination of the antimicrobial and genotoxic potential of the flavonoids vitexin, tiliroside and 5,7-dihydroxy-3,8,4'-trimethoxy (Pg-1), isolated from species of the Malvaceae family, using *in silico*, *in vitro* and *ex vivo* studies. The chemical structure and predicted bioactive properties were analyzed *in silico* using software. The *in vitro* and *ex-vivo* assays using human samples were performed in accordance to the Ethics Code of the World Medical Association and were approved by the Ethics Committee (protocol number: 3.621.284). The *in silico* analysis of the chemical structure of the molecules and the expected bioactive properties shows that vitexin and Pg-1 have oral bioavailability and good absorption owing to their balanced lipophilicity/hydrosolubility, while tiliroside has increased lipophilicity resulting in increased permeability of biological membranes. The *in silico* toxicity tests revealed the potential efficacy of these molecules in cellular protection against free radicals, in addition to possible antimutagenic, anticarcinogenic, antioxidant, antineoplastic, anti-inflammatory, anti-hemorrhagic and apoptosis agonist activity. The *in vitro* cytotoxic and *ex-vivo* genotoxic evaluation detected low rates of hemolysis in human red blood cells and no cellular toxicity against oral mucosa cells. The reduction in cytotoxic activity is indicative of the safety of the concentrations used (500-1000 µg/mL) and demonstrates different forms of interaction of the molecules with the types of cells analyzed. The MIC showed a strong effect of the flavonoids vitexin, tiliroside and Pg-1 against *K. pneumoniae*, *E. coli* and *E. fecalis*. The MBC revealed that vitexin has a bacteriostatic effect for strains of *K. pneumoniae* and *E. fecalis*, tiliroside had a bactericidal effect against a strain of *K. pneumoniae*, Pg-1 was considered bactericidal for strains of *E. fecalis* and *E. coli*, and bacteriostatic in the *K. pneumoniae* strain. The data suggest that vitexin, tiliroside and Pg-1 are safe molecules for possible therapeutic applications and their toxicity profile indicates that they are promising targets for future studies.

Keywords: Malvaceae, flavonoids, bioavailability, toxicity, antibacterial activity, photoprotection.

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

Abs: Absorbâncias

ADME: Absorção, Distribuição, Metabolização e Excreção

ADMET: Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção e Toxicidade

ATCC: Coleção de Microrganismos Norte Americana

BHI: *Brain Heart Infusion*

CBM: Concentração Bactericida Mínima

CIM: Concentração Inibitória Mínima

DMSO: Dimetilsulfóxido

EEB: Extrato Etanólico Bruto

EtOH: Etanol

FC: Fase Clorofórmica

FD: Fase Diclorometano

FPS: Fator de Proteção Solar

H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio

µg: Micrograma

µL: Microlitros

MH: Müller Hinton

mL: Mililitro

nm: Nanômetro

Pa: Probabilidade de ser ativo

Pi: Probabilidade de ser inativo

Ro5: Regras dos cinco Lipsinki

ROS: Espécies Reativas de Oxigênio

TMF1: 5,7,4'-trimetoxiflavona

TMF2: 5-hidroxi-3',4',7-trimetoxiflavona

TMF3: 5,4-dihidroxi-6,7,8'trimetoxi

TMF4: 5,4'-dihidroxi-3,6,7,3-tetrametoxiflavona

UFC: Unidade Formadora de Colônias

UV: Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química básica dos flavonóides	22
Figura 2. Estrutura química dos diferentes tipos de flavonóides	23
Figura 3. Distribuição das espécies <i>Helicteres velutina</i> , <i>Pavonia glazioviana</i> e <i>Waltheria viscosissima</i> na América do Sul	27
Figura 4. Malvaceae: <i>Helicteres velutina</i>	29
Figura 5. Canferol-3-O- β -D-(6''-Ep-coumaril)glucopiranosídeo – tilirosídeo	30
Figura 6. Malvaceae: <i>Pavonia glazioviana</i>	31
Figura 7. 5,7-dihidroxi-3,8,4'-trimetoxi	32
Figura 8. Malvaceae: <i>Waltheria viscosissima</i>	33
Figura 9. 5,7,4'-trihidroxiflavona-8-C- β -glucopiranosídeo – vitexina	34
Figura 10. Obtenção de extratos (EEBs), frações diclorometano/clorofórmio (FD/FC) e substâncias isoladas de espécies da família Malvaceae <i>sensu lato</i>	42
Figura 11. Estruturas dos flavonoides vitexina, tilirosídeo e Pg-1 obtidos de espécies da família Malvaceae	43
Figura 12. Avaliação da citotoxicidade em eritrócitos humanos	45
Figura 13. Determinação do fator de proteção solar (FPS)	46
Figura 14. Preparação de inóculo das cepas bacterianas	48
Figura 15. Determinação da Concentração Inibitória Mínima	49
Figura 16. Avaliação da Concentração Bactericida Mínima	50
Figura 17. Avaliação da genotoxicidade em células de mucosa oral	51
Figura 18. Efeito citotóxico da vitexina (<i>W. viscosissima</i>) contra hemácias	64
Figura 19. Efeito citotóxico do tilirosídeo (<i>H. velutina</i>) contra hemácias	65
Figura 20. Efeito citotóxico do Pg-1 (<i>P. glazioviana</i>) contra hemácias	66
Figura 21. Fotomiografia de células esfoliadas da mucosa oral de humanos com: (a) cariorrexe, (b) cariólise, (c) bi-nucleação, (d)	77

macronúcleo e (e) micronúcleo.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades bioativas <i>in silico</i> da vitexina, do tilirosídeo e do Pg-1	55
Tabela 2. Probabilidade de efeito antineoplásico da vitexina, do tilirosídeo e do Pg-1	56
Tabela 3. Biodisponibilidade físico-química – vitexina	59
Tabela 4. Biodisponibilidade físico-química - tilirosídeo	60
Tabela 5. Biodisponibilidade físico-química – Pg-1	61
Tabela 6. Análise de toxicidade <i>in silico</i> da vitexina, do tilirosídeo e do Pg-1	63
Tabela 7. Fator de Proteção Solar (FPS) de <i>H. velutina</i> , <i>W. viscosíssima</i> e <i>P. glavioziana</i>	68
Tabela 8. Fator de Proteção Solar (FPS) dos flavonoides vitexina, tilirosídeo e Pg-1	69
Tabela 9. CIM da vitexina, tilirosídeo e Pg-1 contra cepas de <i>E. fecalis</i> e <i>S. aureus</i>	71
Tabela 10. CIM da vitexina, tilirosídeo e Pg-1 contra cepas de <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>E. coli</i>	73
Tabela 11. CBM da vitexina, tilirosídeo e Pg-1 contra cepas de <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. fecalis</i> e <i>E. coli</i>	75
Tabela 12. Perfil de genotoxicidade – vitexina	78
Tabela 13. Perfil de genotoxicidade – tilirosídeo	79
Tabela 14. Perfil de genotoxicidade – Pg-1	80

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
2.1 Flavonoides – estrutura e característica	21
2.1.1 Potencial farmacológico dos flavonóides	24
2.2 Espécies vegetais como fonte de flavonóides	26
2.2.1 Família Malvaceae	26
2.2.2 <i>Helicteres velutina</i> e o tilirosídeo	28
2.2.3 <i>Pavonia glazioviana</i> e 5,7-dihidroxi-3,8,4'-trimetoxi	30
2.2.4 <i>Waltheria viscosissima</i> e a vitexina	32
2.3 Toxicidade de substâncias candidatas a fármacos	34
2.3.1 Estudo <i>in silico</i>	35
2.3.2 Estudo <i>in vitro</i> e <i>ex-vivo</i>	36
3. OBJETIVOS	39
3.1 Objetivo geral	39
3.2 Objetivos específicos	39
4. METODOLOGIA	41
4.1 Local da Pesquisa	41
4.2 Materiais	41
4.2.1 Material vegetal	41
4.3 Ensaio <i>in silico</i>	42
4.3.1 Propriedades farmacológicas <i>PASS online</i> [®]	43
4.3.2 Biodisponibilidade oral teórica <i>Molinspiration</i> <i>Cheminformatics</i> [®]	43
4.3.3 Toxicidade teórica <i>admetSAR</i> [®]	44
4.4 Obtenção de hemácias e células de mucosa oral humana	44
4.5 Ensaio <i>in vitro</i>	45
4.5.1 Potencial citotóxico em eritrócitos humanos (sistema ABO)	45
4.5.2 Determinação do fator de proteção solar (FPS)	46
4.5.3 Avaliação do potencial antimicrobiano	47
4.5.3.1 Cepas bacterianas e meios de cultura	47
4.5.3.2 Isolamento e preparação do inóculo	47

4.5.3.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	48
4.5.3.4 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)	49
4.6 Ensaios <i>ex-vivo</i>	50
4.6.1 Investigação do potencial genotóxico em células de mucosa oral de humanos	50
4.7 Análise estatística	52
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1 Análises <i>in silico</i> dos flavonóides vitexina, tilirosídeo e Pg-1	54
5.1.1 Propriedades farmacológicas	54
5.1.2 Perfil de biodisponibilidade	58
5.1.3 Perfil de toxicidade	62
5.2 Análises <i>in vitro</i> dos flavonóides vitexina, tilirosídeo e Pg-1	63
5.2.1 Efeito de citotoxicidade em hemácias de humanos (sistema ABO)	64
5.2.2 Determinação do Fator de Proteção Solar (FPS)	67
5.2.3 Avaliação do potencial antibacteriano	70
5.2.3.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	70
5.2.3.2 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)	74
5.3 Análises <i>ex-vivo</i> dos flavonóides vitexina, tilirosídeo e Pg-1	76
5.3.1 Avaliação de genotoxicidade em células da mucosa oral de humanos	76
6. CONCLUSÕES	82
7. REFERÊNCIAS	85
8. ANEXOS	104

1. Introdução

1 INTRODUÇÃO

Os fármacos disponíveis no mercado, em sua maioria, são derivados direta ou indiretamente de produtos naturais. As plantas medicinais são fontes de substâncias bioativas, que possuem grande variedade estrutural de metabólitos, tais como os terpenos, os alcaloides, as saponinas, os esteroides, os taninos e os flavonóides (KHAN et al., 2016). No mundo, o consumo de frutas, vegetais e o uso das plantas medicinais pela população são atividades amplamente difundidas, que, muitas vezes, envolve costumes e conhecimentos herdados sobre o efeito nutritivo e curativo destes produtos naturais (LUCENA; MELO GUEDES, 2020).

Os flavonóides são compostos polifenólicos presentes na dieta regular do ser humano em alimentos de origem vegetal. Essas moléculas possuem uma conformação química com grupos hidroxila que facilitam a captação de radicais livres do meio. Tal característica permite que os flavonóides desempenhem atividades antioxidante, anti-inflamatória e anticâncer, e contribuam para a redução do estresse oxidativo e para manutenção da saúde (TELES et al., 2015).

Devido à sua grande diversidade de atividade biológica, os flavonóides são de interesse econômico e científico quanto à sua aplicabilidade farmacológica e potencial terapêutico. Na literatura científica, estão disponíveis diversos estudos que abrangem a identificação e propriedades dessas substâncias em diferentes espécies vegetais. As espécies *Helicteres velutina*, *Pavonia glazioviana* e *Waltheria viscosíssima*, pertencentes à família Malvaceae, vem ganhando destaque, em estudos fitoquímicos, pela presença, em especial, de flavonóides (CHAVES et al., 2013), entre eles, a vitexina, o tilirosídeo e o 5,7-dihidroxi-3,8,4'-trimetoxi, moléculas com ação antioxidante (FERREIRA et al., 2019), larvicida (FERNANDES et al., 2019) e antibacteriana (OLIVEIRA et al., 2019).

Especificamente, o tilirosídeo, um flavonóide glicosídico presente nos frutos, folhas e raízes, é um dos principais compostos bioativos de *H. velutina* (GROCHOWSKI et al., 2018; FERNANDES et al., 2019), conhecido por exercer vários efeitos, como antibacteriano e larvicida (PANIZZI et al., 2002), antitrombótico (HAN et al., 2012), anticoagulante (GEVRENOVA et al., 2013), hepatoprotetor (GOTO et al., 2012), anti-inflamatório (JIN et al., 2016), antiobesidade e antidiabético (NINOMIYA et al., 2007) e anticâncer (LU et al., 2009). Já o 5,7-dihidroxi-3,8,4'-trimetoxi, flavonóide trimetoxilato encontrado em *P. glazioviana*, foi observada atividade larvicida (GUALBERTO, 2013;

CASIMIRO-JÚNIOR, et al., 2013), enquanto a vitexina, um dos constituintes de *W. viscosissima*, foi relacionada às propriedades antiviral, antioxidante e antineoplásica dessa espécie (ZHANG et al., 2015; AN et al., 2015).

Apesar dos flavonóides vitexina, tilirosídeo e 5,7-dihidroxi-3,8,4'-trimetoxi (Pg-1) despertarem grande interesse devido ao seu potencial farmacológico e medicinal, o seu perfil toxicológico ainda é pouco investigado. Dessa forma, determinar o nível de toxicidade e avaliar o potencial bioativo é importante para o campo de inovação tecnológica de fármacos naturais, contribuindo para o enriquecimento do patrimônio genético e científico do país.

Neste estudo, foi realizada a avaliação da toxicidade e a determinação das atividades biológicas dos flavonóides vitexina, tilirosídeo e Pg-1, a partir de uma abordagem *in silico*, utilizando ensaios de análise da estrutura química para a determinação das propriedades bioativas preditivas; ensaios de biodisponibilidade oral e de toxicidade teórica; estudos *in vitro* com métodos toxicológicos em células humanas anucleadas (citotoxicidade- sistema ABO); a determinação do potencial antibacteriano e fator de proteção solar; e a análise *ex-vivo* com células nucleadas (genotoxicidade da mucosa oral).

2. Fundamentação Teórica

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Flavonóides – estrutura e característica

Os compostos produzidos pelas plantas são divididos em metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários fazem parte do metabolismo energético básico e incluem as proteínas, os carboidratos e os ácidos nucleicos, que são indispensáveis à sua existência. Já os metabólitos secundários possuem sua biossíntese restrita a algumas espécies vegetais. Sua produção está relacionada a estratégias de defesa, perpetuação e sobrevivência da planta e não ao metabolismo básico, e incluem compostos como polifenóis, cumarinas, alcaloides, saponinas, quinonas, esteroides, terpenoides, entre outros (SILVA et al., 2016).

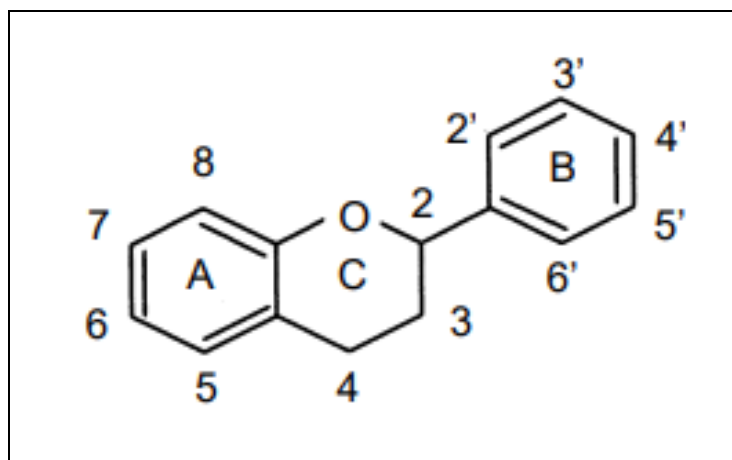
Dentre os compostos polifenólicos, ou seja, flavonóides, ácidos fenólicos, lignanas e estilbenos, destacam-se os flavonóides devido aos seus diversos efeitos biológicos. São substâncias que se apresentam na forma de pigmentos naturais e protegem as plantas contra danos causados por agentes oxidantes, como raios ultravioletas (UV). Essas substâncias são muito importantes para o desenvolvimento e bom funcionamento dos vegetais, visto que permitem uma maior resistência e melhor adaptação às mudanças climáticas e à presença de predadores naturais (AHERNE; O'BRIEN, 2002; MARTÍNEZ-FLÓREZ et al., 2002).

Os flavonóides são amplamente distribuídos no reino *Plantae*, como nas plantas medicinais e frutas. São encontrados, por exemplo, em amoras, morangos (*Vaccinium ssp.*), frutas cítricas (*Citrus ssp.*) e nas nozes; no chocolate (*Theobroma cacao*), e em bebidas derivadas da uva (*Vitis vinifera*), como vinho tinto, além do chá verde e do chá preto (*Camelia sinensis*) (AHERNE; O'BRIEN, 2002; GORNIK; BARTOSZEWSKI; KRÓLICZEWSKI, 2019).

Os flavonóides são compostos formados por uma mistura biogenética proveniente de rotas metabólicas do ácido chiquímico e acetil-CoA (SIMÕES et al., 2017). Os estudos de caracterização química os classificam como compostos de baixo peso molecular que compartilham um esqueleto difenilpirano comum (C6-C3-C6) com dois anéis fenil (A e B) ligados por um anel C pirano (heterocíclico). Átomos de carbono nos anéis A e C são numerados de 2 a 8, e os do anel B, de 2 a 6 (CARTAYA; REYNALDO, 2001) (Figura 1). Os flavonóides são responsáveis pela coloração das flores, polinização e filtração de raios

solares, que está relacionada à presença de hidroxilas na sua estrutura. As hidroxilas atuam no sequestro de íons ferro e de outros metais, conferindo potencial antioxidante, com capacidade de captar radicais livres e proteger o vegetal de efeitos deletérios causados por agentes físicos, químicos e biológicos no ambiente. (OLIVEIRA et al., 2012; LOPES et al., 2016).

FIGURA 1 - ESTRUTURA QUÍMICA BÁSICA DOS FLAVONOIDES



FONTE: O autor (2022)

Portanto, devido a estas características, os flavonóides são capazes de reparar danos celulares, melhorar a atividade de enzimas nas células endoteliais e reduzir a geração de radicais livres (ZHANG et al., 2009), o que justifica a função essencial destas moléculas na proteção contra efeitos oxidativos, contribuindo na sua ação terapêutica contra diversas patologias (MARTÍNEZ-FLÓREZ et al., 2002). Além dos conhecidos efeitos antioxidantes, também possuem outras propriedades bioativas como: interação no mecanismo de comunicação das proteínas de membranas (junções comunicantes), regulação do crescimento celular e indução de enzimas de desintoxicação (monooxigenases dependentes do citocromo P-450) (ESTRADA-REYES et al., 2012).

As atividades bioativas dos flavonóides dependem das propriedades de redução nos grupamentos presentes em seus anéis aromáticos. A principal classificação que distingue sua estrutura e potencial bioativo foi adotada em categorias diferentes, a saber:

A. Flavanóis com um anel pirano heterocíclico e um grupo-OH na posição 3 do anel C

(por exemplo, a catequina);

B. Flavonóis com um grupo carbonil na posição 4 e um grupo -OH na posição 3 do anel C (por exemplo, a quercetina);

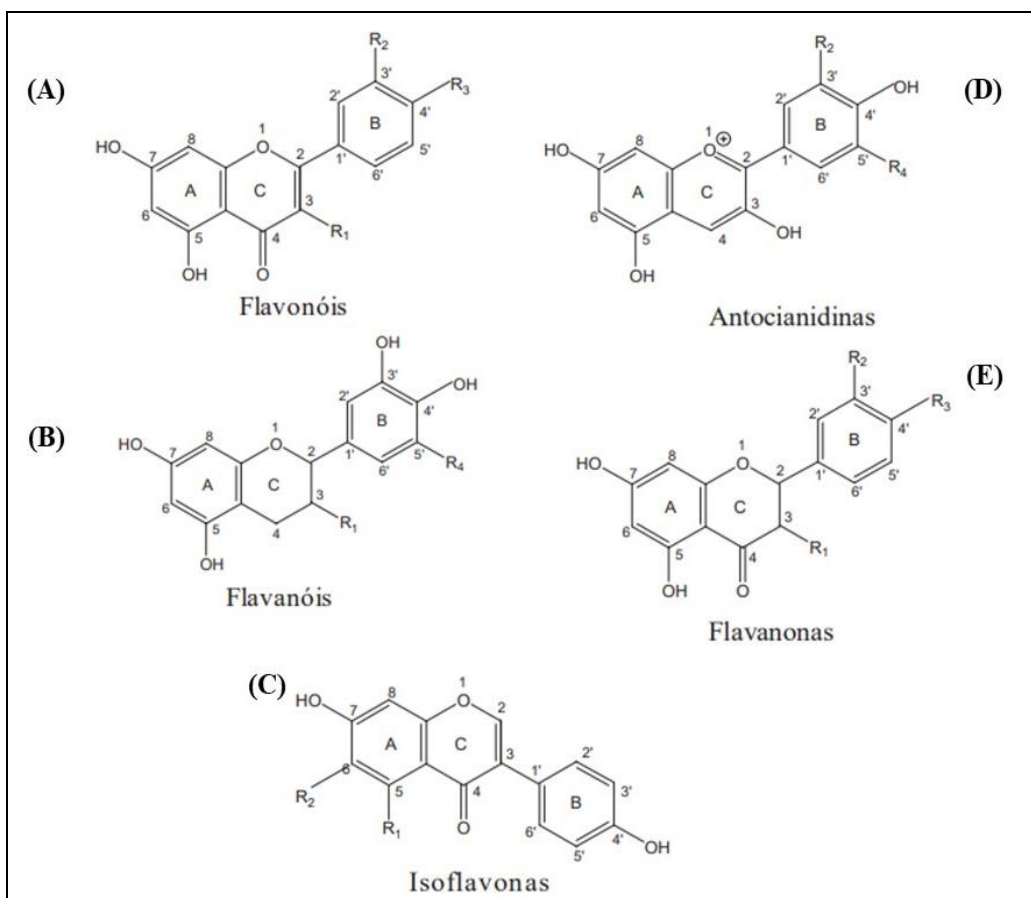
C. Isoflavonas com um grupo carbonila na posição C-4 do anel C (por exemplo, a genisteína);

D. Antocianidinas com um grupo anexado-OH na posição 3, mas também tem uma ligação dupla entre os carbonos 3 e 4 do anel C (por exemplo, o cloreto de cianidina);

E. Flavanonas com um grupo carbonil na posição 4 do anel C e ausência do grupo hidroxila na posição C3 (por exemplo, a diosmetina);

A estrutura básica dos tipos diferentes de flavonóides (HUBER; RODRIGUEZ-AMAYA, 2008) estão representados na figura 2.

FIGURA 2 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS DIFERENTES TIPOS DE FLAVONÓIDES, (A) FLAVONÓIS, (B) FLAVANÓIS, (C) ISOFLAVONAS, (D) ANTOCIANIDINAS, (E) FLAVANONAS



FONTE: Huber; Rodriguez-Amaya (2008)

Estes compostos podem sofrer variadas modificações estruturais ao entrar em contato com o organismo, tais como: glicosilação, esterificação, amidação, hidroxilação, que irão modular a polaridade e, conseqüentemente, sua farmacocinética. O seu acúmulo pode inativar o papel funcional e aumentar o potencial de toxicidade para o indivíduo (FERREIRA et al., 2015). Dessa forma, etapas de estudos que investigam o papel bioativo e o menor potencial de toxicidade sobre o organismo são fundamentais para ensaios com substâncias candidatas a novos fármacos.

2.1.1 Potencial farmacológico dos flavonóides

Os compostos polifenólicos eram considerados antinutrientes - substâncias presentes nas plantas capazes de inibir enzimas digestivas, bloqueando a absorção de nutrientes pelo organismo. Assim, devido a alguns efeitos adversos no metabolismo humano, essas substâncias não possuíam grande apelo para pesquisa no desenvolvimento de medicamentos (SOUSA et al., 2011).

Entretanto, o conhecimento das propriedades antioxidantes dos fenólicos trouxe um novo interesse em relação aos possíveis efeitos terapêuticos. Os flavonóides são atualmente as principais substâncias que se destacam através do seu potencial antioxidante, sendo descrito em estudos epidemiológicos a eficácia de dietas ricas nestes compostos associadas ao baixo risco de doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (FERREIRA et al., 2015).

Os principais flavonóis avaliados nas fontes alimentares são a miricetina, a quercetina e o kaempferol, e as flavonas apigenina e luteolina. Essas moléculas são as mais amplamente distribuídas nos alimentos, sendo as mais investigadas em estudos sobre compostos antioxidantes e anticarcinogênicos. Outros efeitos farmacológicos também têm sido atribuídos aos flavonóides como inibição da proliferação celular, anti-inflamatório, anti-fibrótico, anticoagulante, antibacteriano, antiaterogênico e antihipertensivo (HUBER; RODRIGUEZ-AMAYA, 2008).

Os flavonóides presentes nas variadas espécies vegetais são determinados por fatores intrínsecos de enzimas controladas geneticamente que regulam a síntese e distribuição nas plantas. Além disso, o seu conteúdo é influenciado por fatores extrínsecos, como estação do ano, incidência de radiação UV, clima, composição do solo, preparo e processamento do alimento (PABÓN-BAQUERO et al., 2018).

A radiação solar é absorvida pelos flavonóides na faixa dos comprimentos de onda de 280 a 315 nanômetros, agindo como filtro de radiação UV e proteção contra danos nas células vegetais. O efeito fotoprotetor foi evidenciado, inicialmente, em estudos utilizando extratos de plantas ricos em flavonóides que possuíam alta taxa de proteção UV. Recentemente, outros estudos com compostos vegetais, formulações fitoquímicas e moléculas isoladas forneceram evidências mais robustas e convincentes de que plantas expostas à radiação UV respondem por mudanças na síntese de flavonóides, utilizando o efeito fotoprotetor das moléculas (FERREIRA et al., 2015).

Em estudo realizado por Gliszczynska-Swiglo et al. (2007), por exemplo, foi descrito o efeito da radiação solar nos teores de flavonóide em inflorescências do brócolis. Após a exposição, foram observados elevados níveis de compostos polifenólicos na composição desse vegetal, mostrando uma correlação positiva com a radiação solar e o desempenho nutricional dos alimentos (FALLER; FIALHO, 2010).

Outro efeito farmacológico de grande destaque para os flavonóides compreende o seu potencial antimicrobiano: bioatividade que defende a planta/consumidores de infecções provocadas por microrganismos externos como parasitas, fungos, bactérias e vírus.

Para deter a disseminação de patógenos, as plantas possuem imunidade inata que envolve diferentes etapas de respostas de defesa e algumas dessas incluem a biossíntese de flavonóides (PIASECKA et al., 2015). A grande parte dos estudos que relatam as suas propriedades antibacterianas ressalta o efeito contra patógenos de plantas, o que poderia ser efetivamente aplicado no combate a patógenos humanos. As atividades antibacterianas dos flavonóides usam mecanismos diferentes das drogas comerciais e, portanto, podem ser importantes na descoberta de novas terapias contra a ação das bactérias (PANDEY; KUMAR, 2013).

As catequinas têm sido extensamente estudadas por suas propriedades antibacterianas em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo frequentemente associadas aos efeitos antibacterianos e às interações com a membrana celular. (REYGAERT, 2014). Em contraste com os efeitos protetores dos flavonóides nas membranas em diversos tipos celulares, as catequinas rompem a membrana bacteriana ao se ligarem à bicamada lipídica e ao inativarem ou inibirem a síntese de enzimas intracelulares e extracelulares. Fathima e Rao (2016) relataram que o modo de ação bactericida demonstrado pelas catequinas é uma explosão oxidativa ocasionada pela geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) que causam danos e alterações na

permeabilidade da membrana. Assim, os flavonóides tendem a ter como alvo a bicamada lipídica, modificando as propriedades físico-químicas para exercer suas bioatividades.

Como discutido no estudo de Ingólfsson et al. (2014), fitoquímicos de diferentes estruturas, como os polifenóis, podem alterar as propriedades da membrana e regular biofunções de diversas proteínas presentes na sua constituição. A ação dos flavonóides na bicamada lipídica envolve dois mecanismos: o primeiro está associado à ligação das moléculas mais apolares no interior hidrofóbico, enquanto o segundo promove a ligação através de pontes de hidrogênio entre os grupos de cabeça polares de lipídios e os flavonóides mais hidrofílicos localizados na interface da membrana (TSUCHIYA, 2015). Além disso, as interações inespecíficas de flavonóides com fosfolipídeos podem induzir mudanças estruturais nas propriedades da membrana (espessura e acoplamento de moléculas) e modular indiretamente a distribuição/função das proteínas, bem como influenciar as propriedades farmacológicas dos próprios flavonóides (ARORA et al., 2012; GÓRNIAK; BARTOSZEWSKI; KRÓLICZEWSKI, 2019).

2.2 Espécies vegetais como fonte de flavonóides

Os flavonóides são compostos encontrados em abundância nas angiospermas, dentre as quais se inclui a família Malvaceae (MACHADO et al., 2008). A presença de compostos fenólicos em espécies que integram essa família é favorecida pela sua localização geográfica, que é mais característica de zonas tropicais, com o ambiente climático possuindo temperatura média do ar, em todos os meses do ano, superior a 18 °C. Isto gera fatores propícios para o desenvolvimento de uma grande diversidade de plantas, embora haja maior desafio para sua adaptação e sobrevivência (FINCH et al., 2017). Entre os compostos fenólicos encontrados na natureza, os flavonóides se destacam como as principais substâncias ativas presentes nas espécies da família Malvaceae (FERREIRA et al., 2019).

2.2.1 Família Malvaceae

As plantas da família Malvaceae fazem parte de um grupo de famílias que compõem a ordem Malvales: *Bombacaceae*, *Sterculiaceae*, *Tiliaceae* e *Malvaceae*, representadas mundialmente por 250 gêneros e 4.300 espécies, distribuídas,

principalmente, nas regiões tropicais e subtropicais, que são mais propícias ao seu desenvolvimento (FERNANDES-JÚNIOR; KONNO, 2017; CARVALHO et al., 2011).

O Brasil é considerado um país tropical com geolocalização que atribui maior incidência de radiação solar sobre o seu território, criando um clima propício para o desenvolvimento de diversos tipos de plantas (COFFEY; JANSEN, 2019). Na biodiversidade brasileira, a família Malvaceae apresenta cerca de 70 gêneros e 783 espécies. Algumas destas espécies são endêmicas, com distribuição pantropical presente em todos os estados brasileiros (MARQUES et al., 2017).

Dentre os gêneros com maior representação nesta família, estão os gêneros *Hibiscus*, *Sida*, *Pavonia*, *Abutilon*, *Nototriche*, *Cristaria* e *Gossypium* (GOMES et al., 2011). Em especial, no presente estudo, foram investigadas as espécies *Helicteres velutina*, *Pavonia glazioviana* e *Waltheria viscosíssima*, cuja localização concentra-se nas regiões norte e nordeste do Brasil, apesar da *W. viscosíssima* ocorrer com frequência também nas regiões sudeste e centro-oeste (Figura 3).

FIGURA 3 - DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES *Helicteres velutina*, *Pavonia glazioviana* E *Waltheria viscosíssima* NA AMÉRICA DO SUL



FONTE: Disponível em: www.tropico.org. Data da consulta: 14 de janeiro de 2021.

As plantas pertencentes à família Malvaceae apresentam-se como subarbustos, arbustos e árvores, de tamanho pequeno ou médio. Suas folhas são alternas, simples ou compostas palmadas, com margens inteiras ou serradas. As flores são hemafroditas ou assexuadas, e chamam atenção devido à sua coloração (AGUIAR et al., 2012; ALMEIDA, 2016). Muitas espécies são largamente usadas na terapêutica como anti-inflamatórios, antimicrobianos, antipiréticos e diuréticos, por possuírem classes de substâncias bioativas, incluindo esteroides, terpenos, flavonóides e cumarinas (AHMED et al., 2017). O alto teor de compostos fenólicos, como os flavonóides, indica um potencial antioxidante natural destas plantas. Os antioxidantes estão relacionados à diminuição do estresse oxidativo, sendo capazes de retardar ou inibir a oxidação celular. Além disso, reduzem o processo inflamatório, preservando as células e evitando efeitos citotóxicos degenerativos (LOPES et al., 2016).

Estudos fitoquímicos realizados em diferentes espécies desta família indicaram a presença de vários compostos ativos, com destaque para os flavonóides. Dentre os representantes deste grande grupo de compostos secundários e de relevância neste estudo, estão os flavonóides 5,7,4'-trihidroxi-flavona-8-C- β -glucopiranosídeo (vitexina), obtido da espécie *W. viscosíssima* (FERREIRA et al., 2019); Canferol-3-O- β -D-(6''-Ep-coumaril) glucopiranosídeo (tilirosídeo), proveniente de *H. velutina* (FERNANDES et al., 2019), e 5,7-dihidroxi-3,8,4'-trimetoxi, extraído de *P. glazioviana* (OLIVEIRA, 2019).

2.2.2 *Helicteres velutina* e o tilirosídeo

Dentre os gêneros de plantas que integram a família Malvaceae, destacamos o gênero *Helicteres* L., cujos efeitos biológicos e farmacológicos de algumas espécies têm grande utilização na medicina popular. Em regiões tropicais, como América e Ásia, encontramos diversas espécies, incluindo *H. isora*, *H. angustifolia* e *H. hirsute*, que são as mais frequentes em estudos de fitoquímica e farmacologia (BALOGUN et al., 2015).

As espécies de *Helicteres* L. são caracterizadas morfológicamente como arbustos ou subarbustos, com flores vistosas, zigomorfas, pediceladas, geralmente pendentes e inodoras, e frutos dispostos em cápsulas espirais distintas. Na América, há 38 espécies distribuídas pelo continente, entre as quais as mais estudadas cientificamente são: *H. sacarolha*, *H. eichleri* e *H. velutina*, as duas últimas endêmicas no Brasil, que é considerado o

centro de diversidade deste gênero nas Américas, tendo a ocorrência registrada de 31 espécies (FERNANDES et al., 2020).

A espécie *H. velutina* K. Schum, conhecida como "Pitó", é comumente encontrada nas regiões Nordeste e Sudeste do Brasil, sendo utilizada como repelente de insetos pela tribo indígena Pankararé (Bahia, Brasil) (Figura 4). Estudos recentes comprovam que a *H. velutina* possui atividade larvicida contra *Aedes aegypti* (FERNANDES et al., 2018; SANTOS et al., 2012).

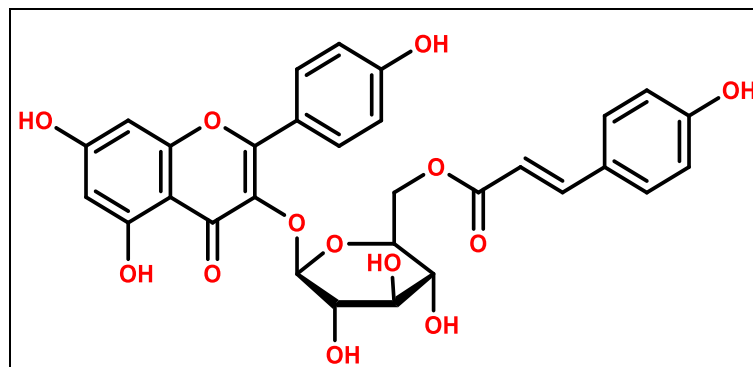
FIGURA 4 - MALVACEAE: *Helicteres velutina*



FONTE: Disponível em
<http://www.plantsoftheworldonline.org>.
Consulta: 20 de janeiro de 2021

Os extratos de partes aéreas da *H. velutina* têm como composição majoritária os flavonóides, cujas atividades biológicas incluem: antioxidante, antibacteriana, anti-inflamatória e larvicida (FERNANDES et al., 2020). Estudos fitoquímicos realizados por Fernandes et al. (2018) evidenciaram a presença do flavonóide Canferol-3-O- β -D-(6''-Ep-coumaril) glucopiranosideo, também conhecido como tilirosídeo, entre seus constituintes (Figura 5).

**FIGURA 5 - CANFEROL-3-O-B-D-(6''-EP-COUMARIL)
GLUCOPIRANOSÍDEO – TILIROSÍDEO**



FONTE: O autor (2022)

O tilirosídeo está presente em diversos produtos naturais que possuem um amplo espectro de atividades biológicas, a saber: antibacteriana e larvicida (FERNANDES et al., 2018), antitrombótica (HAN et al., 2012), anticoagulante (GEVRENOVA et al., 2013), hepatoprotetora (GOTO et al., 2012), anti-inflamatória (JIN et al., 2016), controle de obesidade e diabetes (NINOMIYA et al., 2007), anticâncer e proteção ultravioleta (UV) (LU et al., 2009; CHICARO et al., 2004).

Entretanto, estudos relacionados à toxicidade e ao efeito farmacológico do tilirosídeo, de forma isolada, são escassos. Assim, considerando a ampla variedade de compostos que as plantas metabolizam e a variação quantitativa e qualitativa destes, decorrentes de alterações no ambiente, clima, estresses físicos e químicos, torna-se pertinente estudar espécies de uso popular em diversas regiões brasileiras, visando atribuir níveis seguros de utilização e determinar seus efeitos farmacológicos.

2.2.3 *Pavonia glazioviana* e 5,7-dihidroxi-3,8,4'-trimetoxi

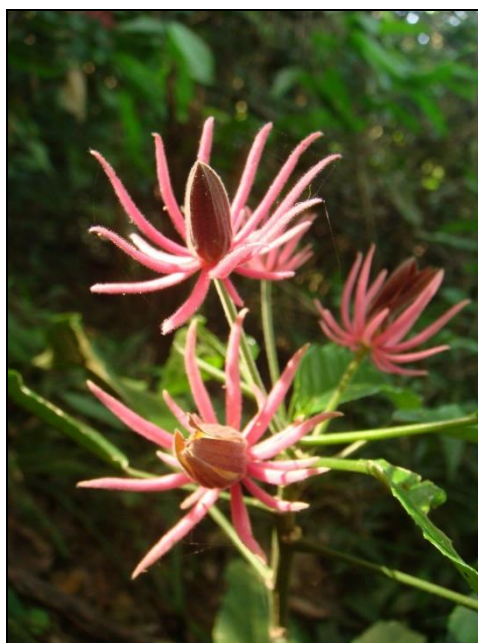
O gênero *Pavonia* possui 250 espécies apenas no continente americano, sendo considerado um dos maiores gêneros da família Malvaceae, com distribuição em regiões de clima temperado e tropical (GUALBERTO, 2013; GARCIA, 2007). No Brasil, foram descritos cerca de 120 espécies, distribuídas nas regiões Nordeste e Sudeste, apresentando-se como ervas, arbustos e árvores de pequeno porte (LOPES, 2014; FERNANDES, 2013).

Através de estudos fitoquímicos, em diferentes espécies do gênero *Pavonia*, foram isolados compostos biotativos, como alcaloides, flavonóides, saponinas, taninos e

terpenoides (CHAVES, 2016; ANDRADE et al., 2012). Além disso, estudos farmacológicos revelaram diversas propriedades bioativas, a saber: *P. zeylanica* L., utilizada como vermífuga e purgativa (TIWARI; MINOCHA, 1980); *P. distinguenda*, potencial antibacteriano e antineoplásico em tumores de próstata (MARASCIULO et al., 2006); *P. varians*, tratamento de infecções do aparelho digestivo (LEAL, 2018); *P. zeylanica* e *P. glazioviana*, atividade larvicida (VAHITHA et al., 2002; OLIVEIRA, 2019); e *P. odorata*, ação antioxidante (RAJALAKSHMI; VADIVEL; PUGALENTHI, 2016).

A espécie *P. glazioviana* é caracterizada como um arbusto com folhas ovais e margem serradas (Figura 6). É uma planta endêmica da região Nordeste do Brasil, com domínio fitogeográfico na caatinga, encontrada nos estados do Piauí, Ceará e de Pernambuco a Bahia (ESTEVES, 2001). É também conhecida como “malva-da-chapada” e “tampa-cabaça”, e utilizada como forrageira de animais domésticos e como recurso floral para abelhas (MAZZOTTI et al., 2010). Contudo, seu potencial terapêutico é desconhecido, com escassez de dados na literatura sobre estudos fitoquímicos e farmacológicos.

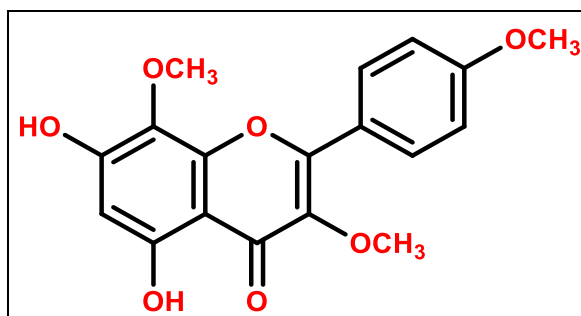
FIGURA 6 - MALVACEAE: *Pavonia glazioviana*



FONTE: Disponível em
<http://www.plantsoftheworldonline.org>.
Consulta: 20 de janeiro de 2021

Em estudos fitoquímicos recentes, desenvolvidos por Oliveira (2019) com a espécie *P. glazioviana*, foi realizado o isolamento de compostos flavonóides, incluindo a quercetina, o canferol, a acacetinae, e, de forma pioneira, o 5,7-dihidroxi-3,8,4'-trimetoxi (Pg-1) (Figura 7).

FIGURA 7 - 5,7-DIHDROXI-3,8,4'-TRIMETOXI – PG-1



FONTE: O autor (2022)

Em pesquisas utilizando outras espécies vegetais, foi evidenciada a extração de flavonóides molecularmente análogos ao 5,7-dihidroxi-3,8,4'-trimetoxi (*i.e.* 5-hidroxi 3',4',7-trimetoxi – TMF-1 e 5,7,4'-trimetoxi – TMF-2), que possuem propriedades biológicas atribuídas ao seu potencial bioativo como atividades antimutagênica, anticarcinogênica, antioxidante e anti-inflamatória (OLIVEIRA FILHO et al., 2015; SUDHA et al., 2018).

2.2.4 *Waltheria viscosissima* e a vitexina

O gênero *Waltheria* pertence à família Sterculiaceae, que é um membro da Malvaceae *sensu lato*. Há cerca de 50 a 60 espécies identificadas que se apresentam na forma de subarbustos perenes com 20 a 50 cm, com raiz profunda, rugosa e bem desenvolvida, e ramos eretos com folhas simples (CORRÊA, 1984). As espécies desse gênero são nativas, ocorrendo com frequência na Ásia e América, incluindo o Brasil (KUBITZKI; BAYER, 2013), com 22 espécies, entre elas, *Waltheria indica* L., *Waltheria brachypetala* Turks, *Waltheria communis* A. St. Hil., *Waltheria viscosissima* A. St. Hil. (LORENZI; MATOS, 2002).

A espécie *W. viscosíssima* A. St. Hil, popularmente conhecida como "malva branca" e "malva viscosa", é uma planta rica em óleos essenciais e mucilagem. É nativa da região Nordeste do Brasil, sendo utilizada como antitussígena e expectorante (VASQUES et al., 1999). Apresenta-se como um arbusto perene que alcança 50 cm de altura, com pilosidade cinzenta, aveludada e ramos providos de pêlos glandulosos, folhas simples, com floração e frutificação por meio de sementes (Figura 8) (MOREIRA et al., 2011).

FIGURA 8 - MALVACEAE: *Waltheria viscosíssima*



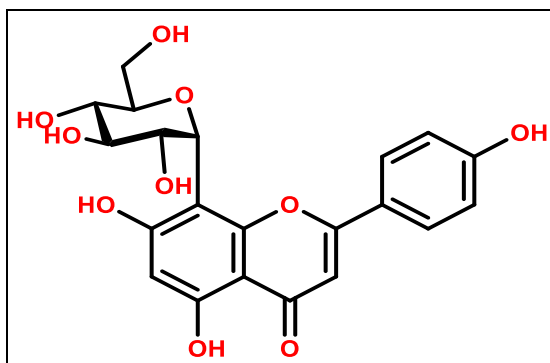
FONTE: Disponível em
<http://www.plantsoftheworldonline.org>.
Consulta: 20 de janeiro de 2021

A *W. viscosíssima* se destaca na medicina popular brasileira por suas atividades expectorante, antitussígena, emoliente e maturativa de tumores, além de limpar velhas úlceras (CORRÊA, 1984). Entre os compostos responsáveis por seu potencial biológico, estudos destacam a presença de alcaloides da quinolona (HOELZEL et al., 2005; LIMA et al., 2009; CRETTON et al., 2016), triterpenos, fenólicos e flavonóides (MONTEILLIER et al., 2017; CARIDADE et al., 2018).

Em estudos fitoquímicos recentes, foi isolado o flavonóide 5,7,4'-trihidroxiavona-8-C- β -glucopiranosídeo – vitexina (Figura 9) de partes aéreas e raízes de *W.*

viscosíssima. Foram também identificadas várias atividades biológicas, como antioxidante, antibacteriana, antiviral, antineoplásica e anti-inflamatória, além de ação contra larvas de *Aedes aegypti* (PETRUSSA et al., 2013; ZHANG et al., 2015; FERREIRA et al., 2019). Ademais, a vitexina possui hidroxilas que promovem maior captação de radicais livres, conferindo a esta molécula uma forte ação antioxidante (AN et al., 2015).

FIGURA 9 - 5,7,4'-TRIHIDROXIFLAVONA-8-C-B- GLUCOPIRANOSIDEO – VITEXINA



FONTE: O autor (2022)

2.3 Toxicidade de substâncias candidatas a fármacos

Os mecanismos precisos pelos quais os flavonóides exercem seus efeitos benéficos à saúde necessitam de estudos específicos para a determinação do curso e da ação de cada substância no organismo até desempenhar seu potencial biológico. Vale destacar que os parâmetros farmacocinéticos de absorção, distribuição, metabolização e excreção (ADME) são importantes para elucidar a forma mais segura de usufruir do potencial bioativo destas moléculas. Neste sentido, a pesquisa de potencial bioativo deve estar ligada aos ensaios de toxicidade, utilizando métodos diversos e diferentes etapas de experimentação como *docking/in silico*, *in vitro*, *in vivo*, entre outros.

As atividades de pesquisa na área de medicamentos têm passado por constante evolução. A descoberta e isolamento de substâncias e o potencial bioativo molecular contam com um arsenal de testes pré-clínicos e clínicos, envolvendo experimentos que buscam alcançar os padrões de segurança e eficácia exigidos para os fins comerciais farmacêuticos (SANTOS; VALE; COSTA, 2017).

O estudo dos candidatos a fármacos pode ser realizado por meio de análises computacionais conhecidas como docking ou estudos *in silico*. Através de softwares e modelos matemáticos e estatísticos, realizam-se predições de potencial biológico e farmacológico de moléculas em curto espaço de tempo, contribuindo, de forma ágil e com menor custo, para a identificação de possíveis alvos farmacêuticos (TOROPOVA, 2017).

As metodologias denominadas *in vitro*, traduzido do latim que significa “*em vidro*”, se aliam à estratégia dos estudos farmacológicos, sendo utilizadas de forma sequencial ao *in silico*. A seleção das moléculas mais promissoras é avaliada em metodologias de bancada utilizando tubos e placas com população de microrganismos e células limitadas. Esses testes avaliam o potencial biológico de forma rápida, com custo relativamente baixo (VELASCO et al., 2011).

No método *ex-vivo*, que significa “*fora de um corpo vivo*”, os tecidos vivos não são criados artificialmente, mas retirados diretamente de um organismo vivo. O *ex-vivo* compreende uma análise mais refinada quanto à resposta dada ao objeto de estudo. Utiliza-se de análises mais complexas com diversidade celular maior e mais próxima das condições *in vivo*, sendo, no entanto, menos reativo à resposta biológica em tratamentos de estresse. Apesar da forma célere nos resultados apresentados por esse método, o custo geralmente torna-se oneroso dado à maior complexidade de suas metodologias e necessidade de reagentes (EVANS et al., 2013).

2.3.1 Estudo *in silico*

As moléculas candidatas a fármacos devem possuir promissora atividade biológica e um bom perfil de biodisponibilidade. Dentre 10.000 moléculas utilizadas nos estágios iniciais de pesquisa, apenas uma consegue chegar à fase de comercialização (BUNNAGE, 2011). Desta forma, os ensaios que promovem processos de triagem com agilidade, eficácia e baixo custo são alternativas viáveis na pesquisa de novas substâncias com potencial farmacológico.

Os modelos *in silico* são empregados nos estágios iniciais de pesquisas que visam o desenvolvimento de moléculas naturais e sintéticas com potencial terapêutico. Esses ensaios são usados de forma crescente como triagem preliminar e devem ser associados a outros estudos, como *in vitro*, *ex-vivo*, e *in vivo*. Este procedimento visa diminuir a quantidade de moléculas avaliadas, otimizando tempo e recursos na identificação de novas

substâncias, além de possuir reprodutibilidade, rapidez e exatidão (SRINIVAS et al., 2014).

A determinação das propriedades farmacocinéticas de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET), essenciais no estudo dos candidatos a novos fármacos, têm sido amplamente estudados por metodologias *in silico* (TONIN, 2009). Para tal fim, os medicamentos devem possuir um bom perfil de biodisponibilidade, incluindo solubilidade, permeabilidade, lipofilicidade, pKa e estabilidade, que são características químicas e estruturais que potencializam a bioatividade (DUCHOWICZ et al., 2007).

Os parâmetros revelados pelo ADMET têm um papel importante na definição da disponibilidade *in vivo* e os efeitos tóxicos das moléculas em estudo (HANSCH et al., 2004). Aliado à identificação das propriedades farmacocinéticas, outros softwares buscam elucidar, através das informações em bancos de dados científicos, os mecanismos de ação de forma teórica e preditiva, com a utilização de ferramentas específicas, como os programas *Molinspiration*, *PassOnline*, *ToxPredict* e *OSIRIS Property Explorer*, que acessam ou geram informações a partir de bancos de dados científicos seguros sobre moléculas químicas e suas possíveis atividades (KUMAR; RAJAGOPAL, 2015).

2.3.2 Estudo *in vitro* e *ex-vivo*

Os estudos *in vitro* consistem em métodos rápidos e eficientes para avaliar uma série de potenciais bioativos e toxicológicos, fornecendo informações sobre as diversas formas de interação entre as substâncias ativas e células humanas ou animais (ARORA et al., 2012). As vantagens na utilização dos estudos *in vitro* incluem a evidência dos efeitos primários na interação dos organismos e substâncias ativas com baixo custo, rapidez e alta eficiência (HUANG et al., 2010).

Existem ensaios *in vitro* considerados clássicos na determinação da citotoxicidade. Os métodos empregados são relativamente simples e consistem em análises espectrofotométricas que utilizam marcadores para determinar a viabilidade celular por meio da avaliação de integridade das membranas. Vários trabalhos já evidenciaram que substâncias bioativas apresentam baixa toxicidade celular e/ou conferem proteção contra radicais livres, utilizando métodos convencionais e acessíveis, como o hemolítico e o anti-hemolítico (WANG et al., 2011).

Atualmente, grande parte dos resultados obtidos *in vitro* precisam ser validados e confirmados *in vivo* (PAUL et al., 2013). Entretanto, os estudos com animais são caros, dispendem muito tempo e levam a muitos impasses éticos (REUS et al., 2012). Assim, os ensaios *ex-vivo* se tornam uma ferramenta alternativa para avaliação de vários parâmetros biológicos, incluindo a toxicidade. Por exemplo, em estudos realizados para análise da genotoxicidade em células de mucosa oral, foi revelada a interação das substâncias com os núcleos celulares causando mutações e degeneração (XU et al., 2013).

Em ambas as abordagens *in vitro* e *ex-vivo*, é possível utilizar tecidos ou células específicas como células escamosas de humanos que são comumente usadas em modelos experimentais para identificar o potencial tóxico de produtos farmacêuticos. Os procedimentos *ex-vivo* geralmente envolvem células e tecidos retirados de organismos em condições estéreis, sem alterações, para experimentação, por até 24 horas (LELIEVRE et al., 2007).

3. Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar a biodisponibilidade, toxicidade e determinação do fator de proteção solar e potencial antimicrobiano e genotóxico dos flavonóides vitexina, tilirosideo e 5,7-dihidroxi-3,8,4'-trimetoxi (Pg-1), isolados de espécies da família Malvaceae

3.2 Objetivos Específicos

Ensaio *in silico*

1. Descrever as propriedades farmacológicas, através do software *PASS online*[®], relacionadas à atividade anticancerígena, às doenças do sistema reprodutor feminino, doenças crônicas e neoplasias do sistema gastrointestinal;
2. Avaliar a biodisponibilidade oral teórica através do software *Molinspiration Cheminformatics*[®];
3. Determinar a toxicidade teórica, utilizando o software *admetSAR*[®];

Ensaio *in vitro*

4. Demonstrar o potencial citotóxico através da atividade hemolítica em eritrócitos humanos dos tipos sanguíneos A, B e O;
5. Aferir a coleção de espectros produzidos no ensaio de atividade foto-protetora pela ação produzida das substâncias em estudo;
6. Avaliar o efeito antibacteriano, quantificando sua Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) *in vitro* contra cepas: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* e *Klebsiella pneumoniae*.

Ensaio *ex-vivo*

7. Investigar o potencial genotóxico das substâncias, utilizando o teste de genotoxicidade em células de mucosa oral de humanos.

4. Metodologia

4 METODOLOGIA

4.1 Local da Pesquisa

As atividades de pesquisa experimental foram realizadas no Laboratório de Ensaios Toxicológicos (LABETOX) na Universidade Federal da Paraíba (UFPB). As metodologias de análise de citotoxicidade *in vitro* e genotoxicidade *ex-vivo* foram realizadas em parceria com o Laboratório de Fitoterapia, Bioquímica e Microbiologia (LAFBIM), coordenado pelo Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho, na Universidade Federal de Campina Grande (campus Patos - PB).

4.2 Materiais

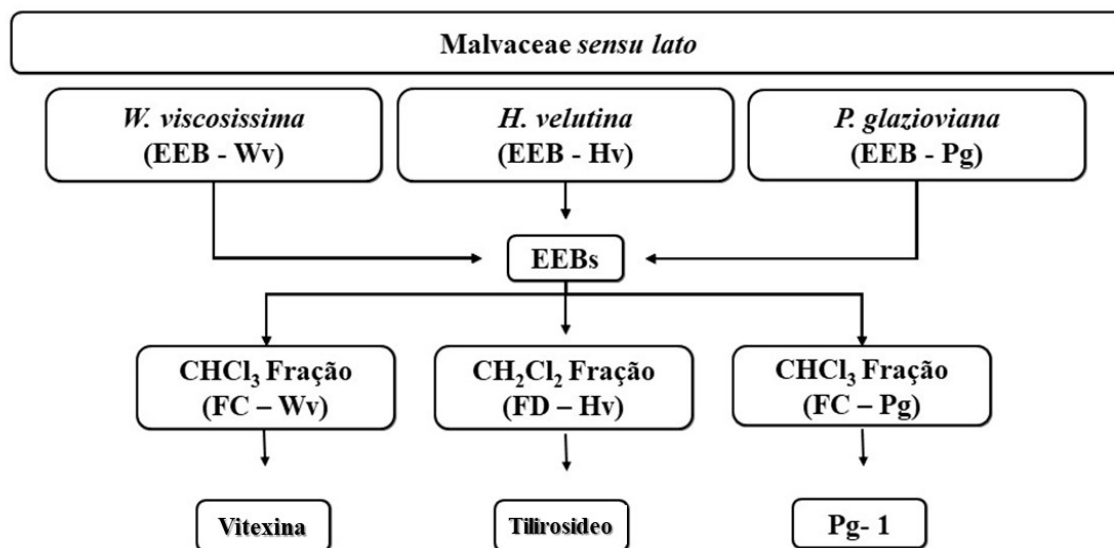
4.2.1 Material vegetal

As partes aéreas de *P. glazioviana* e *H. velutina* foram coletadas em fevereiro de 2015, em Jeremoabo (Bahia, Brasil), e identificadas pela Prof^ª Dr^ª Adilva de Souza Conceição da Universidade do Estado da Bahia (UNEB). As espécies vegetais foram registradas (números de registro: 28709 e 28709-1, respectivamente) e depositadas no Herbário da UNEB (HUNEB, Coleção Paulo Afonso). As partes aéreas de *W. viscosíssima* foram coletadas em agosto de 2013, em Santa Rita (Paraíba, Brasil). A planta foi identificada pela Prof^ª Dr^ª Maria de Fátima Agra da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e, posteriormente, registrada e depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (número MF Agra 21709) da UFPB (João Pessoa, Brasil).

O material vegetal foi secado a 40 °C, pulverizado e macerado com etanol 95% (5 L) por 72 horas. A solução de extrato foi evaporada sob pressão reduzida a 40 °C para a produção dos extratos etanólicos brutos (EEBs). Em seguida, foi realizada a separação por cromatografia líquido-líquido, usando hexano, diclorometano (CH₂Cl₂)/clorofórmio (CHCl₃), acetato de etila e n-butanol, o que resultou na obtenção das respectivas frações, além da fração hidroalcoólica. As frações diclorometano/clorofórmio foram submetidas a procedimentos cromatográficos e espectroscópicos, resultando no isolamento e caracterização estrutural dos três flavonóides: vitexina - 5,7,4'-trihidroxi-flavona-8-C-β-glucopiranosídeo, tilirosídeo - canferol-3-O-β-D-(6''-Ep-coumaril) glucopiranosídeo e 5,7-

dihidroxi-3,8,4'-trimetoxi (Pg-1), conforme descrito na Figura 10.

FIGURA 10 - OBTENÇÃO DE EXTRATOS (EEBs), FRAÇÕES DICLOROMETANO/CLOROFÓRMIO (FD/FC) E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA MALVACEAE *sensu lato*



Legenda: (EEB-Wv) Extrato Etanólico Bruto de *Waltheria viscosissima*; (EEB-Hv) Extrato Etanólico Bruto de *Helicteres velutina*; (EEB-Pg) Extrato Etanólico Bruto de *Pavonia glazioviana*; (FC-Wv) Fase Clorofórmica *Waltheria viscosissima*; (FD-Hv) Fase Diclorometano *Helicteres velutina*; (FC-Pg) Fase Clorofórmica *Pavonia glazioviana*.

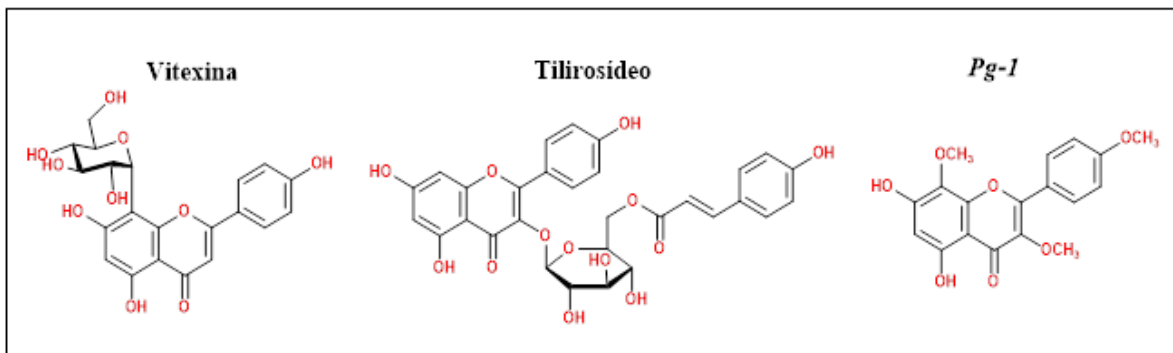
FONTE: O autor (2022).

Os flavonóides vitexina, tilirosídeo e Pg-1, com os extratos utilizados durante o processo de purificação, descritos neste trabalho, foram cedidos pela equipe da Prof^a Dr^a Maria de Fátima Vanderlei de Souza (PgPNSB/DITM/UFPB). Informações mais detalhadas sobre obtenção e determinação estrutural podem ser consultadas em trabalhos anteriores-(FERNANDES et al., 2018, FERREIRA et al., 2019, OLIVEIRA, 2019).

4.3 Ensaios *in silico*

A estrutura química das substâncias vitexina, tilirosídeo e Pg-1 foi obtida na base de dados Pubchem[®] (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) (Figura 11).

FIGURA 11 - ESTRUTURAS DOS FLAVONÓIDES VITEXINA, TILIROSÍDEO E PG-1, OBTIDOS DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA MALVACEAE



FONTE: O autor (2022)

4.3.1 Propriedades farmacológicas por *PASS online*[®]

A previsão dos espectros de atividade das substâncias foi determinada pelo software *PASS online*[®] (<http://www.pharmaexpert.ru/passonline/>). Este software avalia o potencial biológico de moléculas orgânicas quando em contato com o organismo humano, obtendo previsões simultâneas de múltiplos tipos de atividades biológicas com base na estrutura dos compostos em estudo. Os espectros de atividade previstos de um composto são classificados como probabilidade de ser ativo (Pa) ou probabilidade de ser inativo (Pi). Quando Pa é maior que Pi, o composto é considerado experimentalmente ativo (RAKIB et al., 2020).

4.3.2 Biodisponibilidade oral teórica por *Molinspiration Cheminformatics*[®]

A avaliação da biodisponibilidade oral teórica das substâncias foi realizada através do programa *Molinspiration Cheminformatics*[®], um software gratuito encontrado no endereço: <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties> (VERMA et al., 2012). Os parâmetros descritos para cada molécula são avaliados de acordo com a “Regra dos Cinco” de Lipinski (Ro5), que estabelece critérios para compostos contendo boa biodisponibilidade oral teórica. Dessa forma, foi estabelecido que os compostos que são melhor absorvidos na forma oral possuem: Massa Molar (MM) menor ou igual a 500

g.mol⁻¹; máximo de 10 grupos aceptores de ligação de hidrogênio (nON); máximo de 5 grupos doadores de ligação de hidrogênio (nOHNH); área de superfície polar (TPSA) menor ou igual a 140 Å²; coeficiente de lipofilicidade (LogP) menor ou igual a 5,00; coeficiente de solubilidade aquosa (LogS) menor ou igual a -4,00, e número de violações (nviolations) a Ro5 menor ou igual a 1 (LIPINSKI et al., 1997).

4.3.3 Toxicidade teórica por *admetSAR*[®]

Na determinação do potencial toxicológico das substâncias, foi utilizado um software gratuito *admetSAR*[®] (<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar1/>), que verifica, a partir de predições, o potencial *Toxicidade AMES*, *Agentes Cancerígenos*, *Toxicidade Oral Aguda* e *Carcinogenicidade*. O *admetSAR*[®] baseia-se em um conjunto de fragmentos moleculares pré-computadorizados que originam os alertas de toxicidade para cada substância analisada (AHMAD et al., 2016).

4.4 Obtenção de hemácias e células de mucosa oral humana

Os ensaios *in vitro* e *ex-vivo* foram realizados segundo o Código de Ética da Associação Médica Mundial e aprovados pelo comitê de ética (Número do Parecer: 3.621.284 - Anexo 1). As amostras de sangue dos tipos A, B e O e o esfregaço de mucosa oral foram doados por jovens adultos saudáveis de ambos os sexos, com faixa etária de 18 a 40 anos de idade.

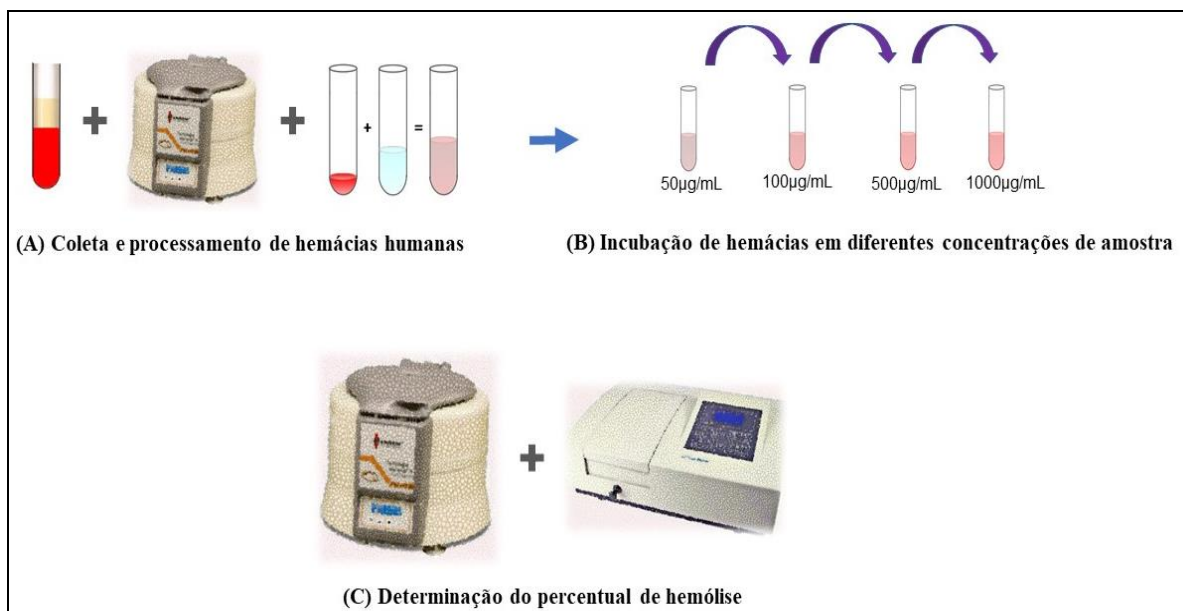
O processamento da amostra de hemácias e células humanas eucarióticas obedeceu a todos os protocolos de segurança de manipulação e descarte de material. A população amostral foi constituída de alunos da Universidade Federal de Campina Grande (campus Patos - PB) dos cursos de Ciências Biológicas e Odontologia, participantes ativos do Laboratório de Fitoterapia, Bioquímica e Microbiologia, coordenado pelo Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho.

4.5 Ensaios *in vitro*

4.5.1 Potencial citotóxico em eritrócitos humanos (sistema ABO)

Alíquotas de sangue humano (tipos A, B e O) foram misturadas com NaCl a 0,9% (1:30) e centrifugadas a 2500 rpm por 5 min. Após repetir este procedimento duas vezes, o sedimento da última centrifugação foi ressuspensão em NaCl a 0,9% para produzir uma suspensão de hemácias a 0,5% livre de leucócitos e plaquetas. Em seguida, 2 mL de suspensões de hemácias foram tratadas com a substância teste, nas concentrações de 50, 100, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$. As amostras foram incubadas por 1 h a $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e mantidas em agitação lenta e contínua (100 rpm). Posteriormente, foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 min. A hemólise foi quantificada por espectrofotometria no comprimento de onda de absorvância máxima (540 nm), como mostra a figura 12. Uma suspensão de hemácias foi utilizada como controle negativo (0% hemólise) e outra suspensão de hemácias com Triton X-100 a 1% foi usada como controle positivo (100% hemólise) (RANGEL et al., 1997). Cada teste foi realizado em triplicata e os dados foram expressos em porcentagens de hemólise que representam a média aritmética de três medidas.

FIGURA 12 - AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE EM ERITRÓCITOS HUMANOS



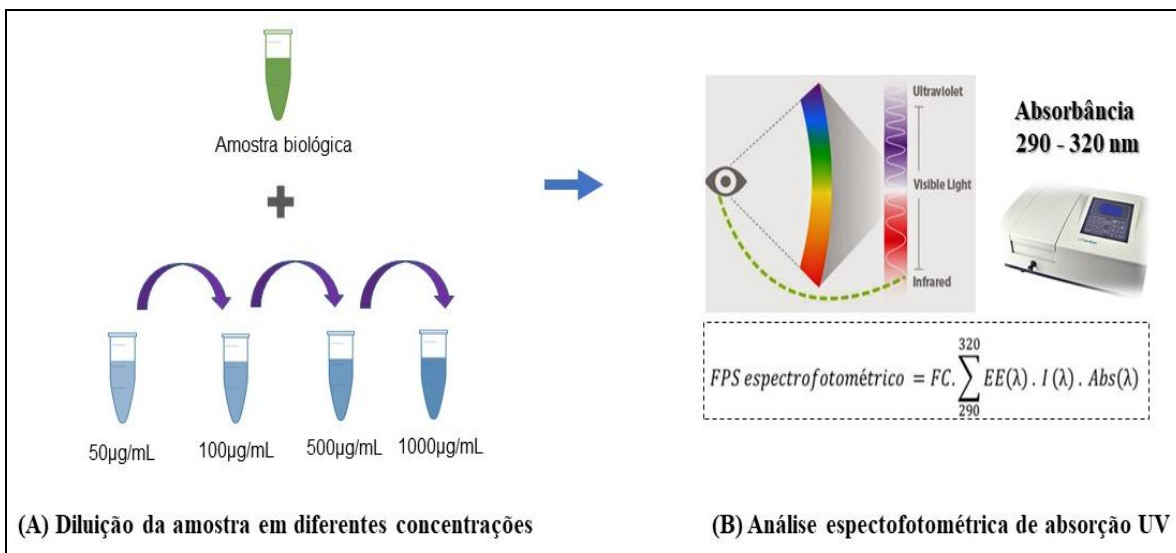
FONTE: O autor (2022)

4.5.2 Determinação do fator de proteção solar (FPS)

Na determinação do fator de proteção solar (FPS), foi utilizado o método espectrofotométrico de amostras em solução adaptado por Mansur et al. (1986). O método propõe a análise das soluções contendo substâncias testes em quatro diferentes concentrações (50, 100, 500 e 1000 µg/mL), alcançando o volume final de 2 mL na análise do FPS com diluição em etanol. Para tanto, as frações foram previamente solubilizadas em água deionizada, levadas ao vórtex e diluídas em solução alcoólica (álcool etílico PA).

As soluções foram submetidas às leituras de suas absorvâncias, de cinco em cinco nm, utilizando-se cubetas de quartzo em espectrofotômetro na faixa do UV (290 a 320 nm). Em seguida, os valores de absorvância obtidos foram substituídos na equação adaptada por Mansur et al. (1986), que relaciona o produto entre o efeito eritematogênico (EE) e a intensidade da radiação (I), que é constante em cada comprimento de onda. Os testes foram feitos em triplicatas, conforme a figura 13.

FIGURA 13 - DETERMINAÇÃO DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR (FPS)



FONTE: O autor (2022)

Equação matemática utilizada no método de Mansur et al. (1986):

$$FPS \text{ espectrofotométrico} = FC. \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \cdot I(\lambda) \cdot Abs(\lambda)$$

Onde: FC = fator de correção (= 10);

EE(λ) = efeito eritematogênico da radiação solar em cada comprimento de onda (λ);

I(λ) = intensidade da radiação solar em cada comprimento de onda (λ);

Abs(λ) = leitura da absorvância obtida da amostra em cada comprimento de onda (λ).

4.5.3 Avaliação do potencial antibacteriano

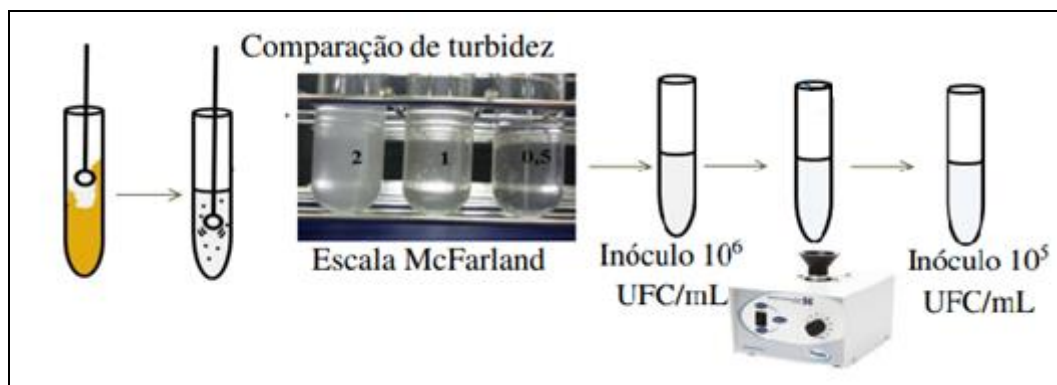
4.5.3.1 Cepas bacterianas e meios de cultura

As cepas de bactérias de interesse clínico foram cedidas pelo Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho. As bactérias (*Staphylococcus aureus* - ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* - ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* - ATCC 9027, *Klebsiella pneumoniae* – KP41 e *Escherichia coli* - ATCC 8539) foram mantidas em Ágar Müller-Hinton (MH) a 4°C. Os inóculos foram obtidos a partir de culturas *overnight* em MH a 37°C e diluídas em solução salina estéril para obter concentração final de aproximadamente $1,5 \times 10^5$ unidade formadoras de colônias por mL (UFC / mL), ajustado pela turvação quando comparado com o padrão 0,5 da escala McFarland (BONA et al., 2014).

4.5.3.2 Isolamento e preparação do inóculo

Os meios de cultura utilizados nos ensaios para avaliação da atividade antimicrobiana foram o caldo MH e o ágar MH, adquiridos na Difco® e preparado de acordo com as instruções do fabricante. A obtenção do inóculo, colônias obtidas de repiques recentes, mantidas em meio *Brain Heart Infusion* (BHI), foram suspensas em solução de NaCl 0,85% estéril e ajustadas de acordo com o padrão 0,5 de McFarland para obtenção de $1,5 \times 10^5$ unidades formadoras de colônias UFC / mL (FREIRE et al., 2014), conforme visto na figura 14.

FIGURA 14 - PREPARAÇÃO DE INÓCULO DAS CEPAS BACTERIANAS



FONTE: O autor (2022)

4.5.3.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

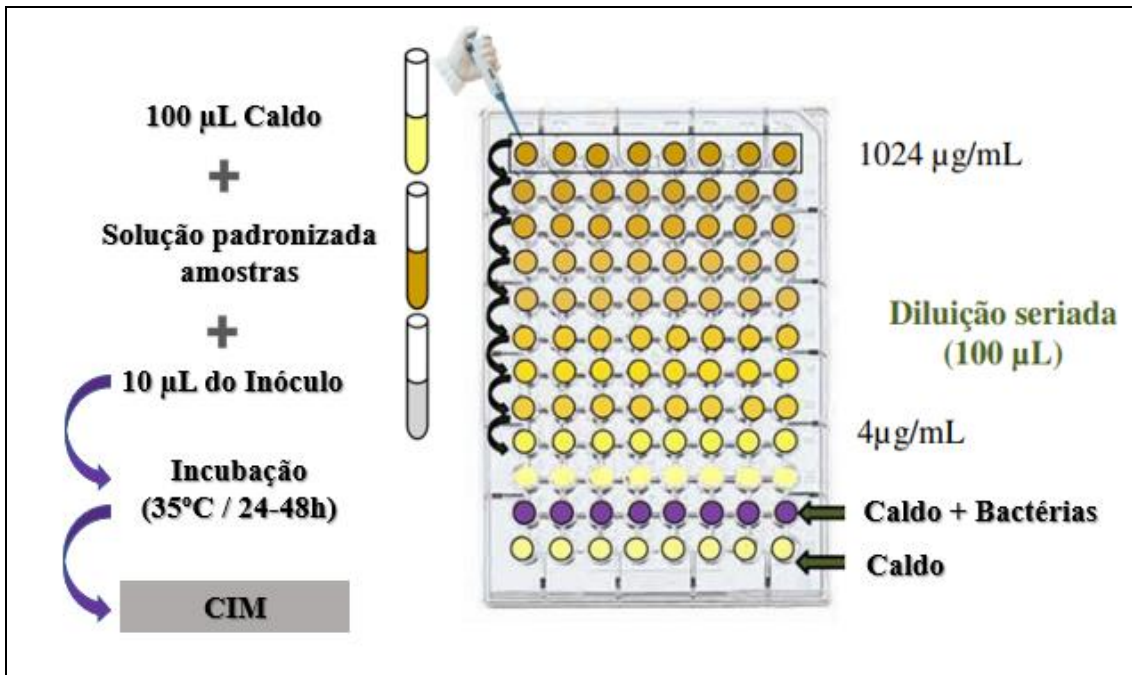
Os ensaios para determinação de atividade antibacteriana do tilirosídeo, vitexina e Pg-1 foram realizados conforme os protocolos da CLSI (2015). As substâncias foram pesadas e preparadas imediatamente antes do uso através de solubilização em dimetil-sulfóxido (DMSO) a 5% e tween 80 a 2%, completando-se o volume final com água destilada esterilizada de forma a se obter emulsões nas concentrações necessárias para realização dos experimentos.

A CIM das substâncias foi determinada utilizando a técnica da microdiluição em caldo e placa para cultura de células (TPP/SWITZERLAND/EUROPA), contendo 96 poços. Foram distribuídos 100 µL de caldo BHI nos poços para microdiluição, e 100 µL das substâncias foram dispensados nas cavidades com diluição seriada a uma razão de dois, dos quais foram obtidas concentrações de 1024 µg/mL a 0,015 µg/mL. Por fim, foi adicionado 10 µL das suspensões das cepas bacterianas ($1,5 \times 10^7$ UFC/mL) nas cavidades. O ensaio foi realizado em triplicata. As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h. Também foram realizados os controles de viabilidade das cepas, esterilidade do meio de cultura e diluentes, em paralelo (CLSI, 2015).

Após o tempo de incubação, foram adicionados 20 µL de resazurina sódica (Sigma-Aldrich®), na concentração de 0,01 % (p/v). As placas foram novamente incubadas a 35 ± 2 °C por 20 min, para posterior leitura dos ensaios, observando a mudança de coloração nos poços de azul para rosa, o que indica crescimento bacteriano. A CIM para cada produto

foi definida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento do microrganismo e/ou verificado pela permanência da coloração do corante indicador de crescimento (ELSHIKH et al., 2016) (Figura 15).

FIGURA 15 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA



FONTE: O autor (2022)

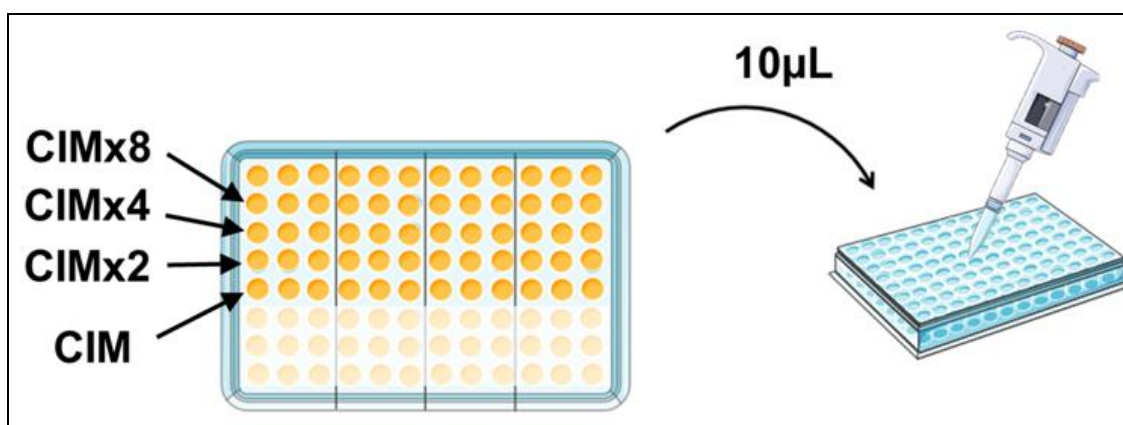
A susceptibilidade das espécies bacterianas no estudo das substâncias testes foi interpretado e considerado como ativo ou inativo, conforme os seguintes critérios: 50-500 µg/mL= forte/ótima atividade; 600-1500 µg/mL= moderada atividade; > acima de 1500 µg/mL=fraca atividade ou produto inativo (HOLETZ; HOMES; STEVENTON, 2002; SARTORATTO et al., 2004; HOUGHTON et al., 2007).

4.5.3.4 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Após a leitura dos resultados da CIM, foram retiradas alíquotas de 10 µL de três diluições a partir da CIM (CIM x 2, CIM x 4 e CIM x 8) para o caldo MH (100 µL/cavidade) em placa de microdiluição para a determinação da CBM. O ensaio foi realizado em triplicata. Após a incubação a 35 ± 2 °C por 24 h, foram adicionados 20 µL

de resazurina. Os ensaios foram incubados a temperatura de 35°C por 20 min para confirmação da concentração capaz de inibir o crescimento total das espécies bacterianas, verificado por uma não mudança da coloração do corante indicador (GUERRA et al., 2012). A CBM foi definida como a menor concentração capaz de causar completa inibição do crescimento bacteriano (SILVA et al., 2020) (Figura 16).

FIGURA 16 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA



FONTE: O autor (2022)

A interpretação dos dados da CBM consiste na avaliação da morte de cepas bacterianas por completo, classificando os resultados em: bacteriostático, quando inibir o crescimento bacteriano sem causar morte imediata ($> 1024 \mu\text{g/mL}$), efeito considerado reversível; e bactericida, com ação de eliminação completa de forma irreversível da cepa bacteriana ($< 512 \mu\text{g/mL}$) (SANTURIO et al., 2007).

4.6 Ensaios *ex-vivo*

4.6.1 Investigação do potencial genotóxico em células de mucosa oral de humanos

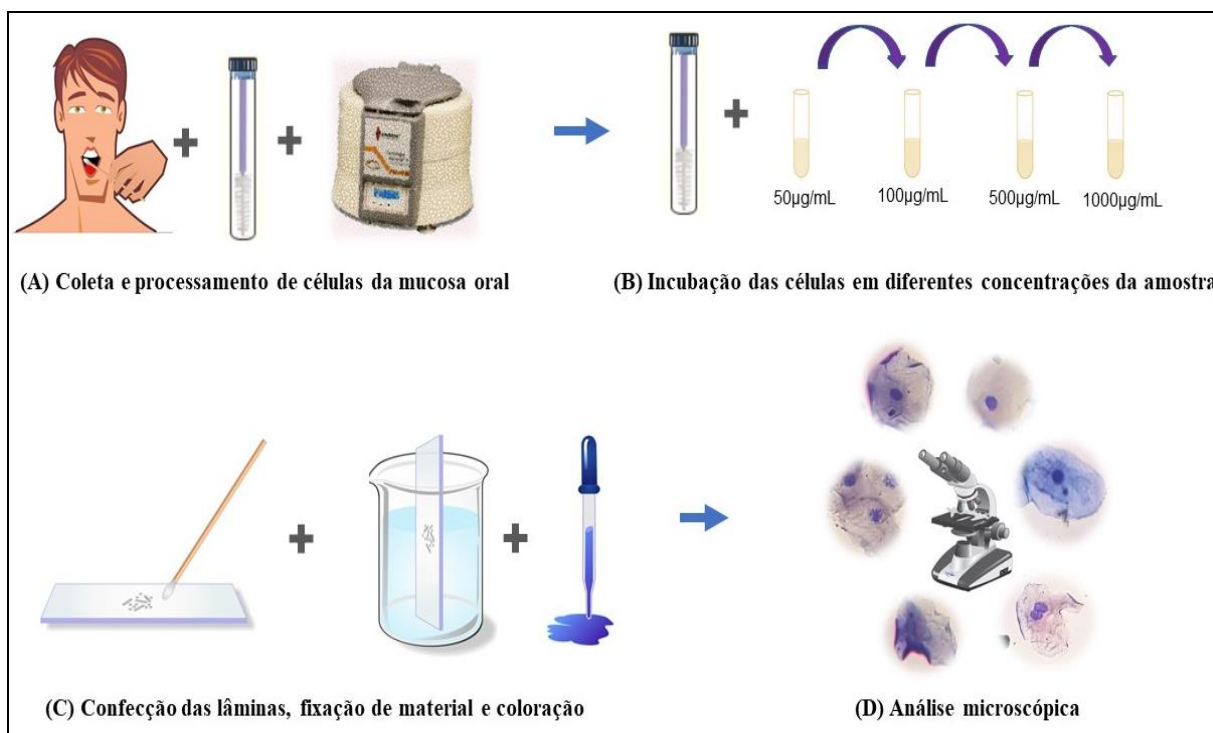
As células epiteliais foram coletadas no lado esquerdo ou direito da mucosa oral por meio de uma *cytobrush* (amostra endocervical/coletor de células), considerada o instrumento mais adequado para a obtenção de células esfoliadas (KASSIE et al., 2001). As células foram mantidas em tubo com 5 mL de NaCl 0,9% (meio de preservação celular)

até o preparo das lâminas. As células controle foram divididas em dois grupos: tratadas com peróxido de hidrogênio (0,0005%) (controle positivo) e aquelas que não receberam tratamento (controle negativo).

As células foram lavadas duas vezes em solução salina, centrifugadas por 10 min a 1.500 rpm e, a seguir, mantidas em 5 mL de solução salina. As amostras foram lavadas mais uma vez e expostas *ex-vivo* às substâncias testes nas concentrações de 50, 100, 500 e 1000 µg/mL, por 30 min. Em seguida, foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. Antes do preparo dos esfregaços, as células homogeneizadas em vórtex foram colocadas sobre lâminas, secas à temperatura ambiente, e fixadas em metanol:ácido acético (3:1) por 15 min (CERQUEIRA et al., 2004; THOMAS et al., 2008).

As lâminas foram mantidas em temperatura ambiente por 12 h. Após este período, foram imersas em água destilada por 1 min e coradas em Giemsa 2% para análise em microscopia óptica (GABRIEL et al., 2006). A toxicidade celular foi avaliada pela presença de indicadores celulares, como micronúcleo, binucleação, cariólise, cariorrexe e macronúcleo (CARRARD et al., 2007; SPONCHIADO et al., 2016). Aproximadamente 1000 células foram analisadas por lâmina (Figura 17).

FIGURA 17 - AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE EM CÉLULAS DE MUCOSA ORAL



FONTE: O autor (2022)

4.7 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos em porcentagens que representam a média aritmética de três medidas. Os dados foram analisados por meio da Análise de Variância (ANOVA) de uma via e do teste *post hoc* de Bonferroni. Os testes foram realizados no software GraphPadPrism (versão 6.0 para Windows, San Diego, CA-USA). As diferenças foram consideradas significativas quando $P \leq 0,05$.

5. Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados obtidos neste estudo foram organizados de forma a facilitar a análise das propriedades toxicológicas e farmacológicas dos flavonóides vitexina, tilirosídeo e Pg-1, oriundos das espécies *W. viscosíssima*, *H. velutna* e *P. glazioviana*, respectivamente. Portanto, nesta seção, os resultados apresentados e as suas respectivas discussões serão estruturados em etapas envolvendo a determinação do perfil toxicológico preditivo *in silico*; a avaliação *in vitro* da citotoxicidade, a determinação do fator de proteção solar e do potencial antibacteriano; e a análise genotóxica *ex-vivo* em células de mucosa oral de humanos.

5.1 Análises *in silico* dos flavonóides vitexina, tilirosídeo e Pg-1

Os resultados expostos referentes à análise *in silico* dos flavonóides estão relacionados à publicação dos artigos científicos disponíveis nos anexos 2, 3 e 4.

5.1.1 Propriedades farmacológicas

A análise preditiva das propriedades bioativas da vitexina, tilirosídeo e Pg-1 demonstra que as moléculas possuem uma probabilidade de ativação (Pa) em relação aos valores de probabilidade de inativação (Pi) para diversas atividades biológicas e antineoplásicas.

Os dados revelaram que todos os flavonóides analisados apresentaram alta probabilidade de ativação (Pa: > 0,700) para as atividades: antimutagênica, antineoplásica, antioxidante e agonista de apoptose. O tilirosídeo se destaca com o melhor potencial de ativação para atividade anti-inflamatória (Pa: 0,759; Pi: 0,009) e anticarcinogênica (Pa: 0,986; Pi: 0,001). A vitexina possui melhor ativação para atividade anti-hemorrágica (Pa: 0,826; Pi: 0,002), e o Pg-1, em especial, tem menor atividade de antagonistas para apoptose de células (Pa: 0,211; Pi: 0,104), como descrito na Tabela 1.

TABELA 1 - PROPRIEDADES BIOATIVAS *in silico* DA VITEXINA, DO TILIROSÍDEO E DO PG-1

Parâmetro	Vitexina		Tilirosídeo		Pg-1	
	Pa	Pi	Pa	Pi	Pa	Pi
Antihemorrágico	0,826	0,002	0,736	0,002	0,528	0,003
Anti-inflamatório	0,606	0,030	0,759	0,009	0,706	0,015
Anticarcinogênico	0,866	0,003	0,986	0,001	0,675	0,010
Antineoplásico	0,836	0,008	0,837	0,008	0,778	0,015
Antimutagênico	0,820	0,004	0,763	0,004	0,925	0,002
Antioxidante	0,780	0,004	0,910	0,003	0,715	0,004
Agonista de apoptose	0,737	0,012	0,790	0,009	0,887	0,005
Antagonista de apoptose	0,251	0,066	0,340	0,015	0,211	0,104

Pa: Probabilidade de ativação, **Pi:** Probabilidade de inativação.

FONTE: O autor (2022)

De acordo com Luca et al. (2016), os flavonóides são moléculas com um importante valor biológico devido à sua diversidade de aplicação farmacológica (por exemplo, sua ação antioxidante, anti-inflamatória e imunológica). Eles encontraram uma correlação entre o consumo de alimentos e algumas enfermidades, uma vez que uma dieta rica em flavonóides tem sido associada a riscos reduzidos de várias doenças crônicas. Os resultados da análise *in silico* deste estudo mostram os possíveis efeitos benéficos do tilirosídeo em vários processos patológicos, indicando que estão de acordo com achados anteriores.

Estudos *in silico* e *in vitro* com *Vitex peduncularis* evidenciaram possíveis atividades terapêuticas, como antinociceptiva, anti-helmíntica, anti-eczema, antiprotozoária, anti-hipercolesterolêmica, hepatoprotetora, antiulcerativa, anti-artrítica, antiprurítica e anti-seborreica, além de efeitos potenciais antimutagênicos (Pa: 0,820 - Pi: 0,004) e anti-hemorrágicos (Pa: 0,826 - Pi: 0,002) (AUNIQ et al., 2019) da vitexina e de outros flavonóides isolados dessa espécie, dando também suporte adicional para nossos resultados iniciais. Além disso, a previsão das propriedades bioativas do Pg-1 corrobora as análises *in silico* de dois análogos (TMF1 e TMF2) que exibem propriedades biológicas semelhantes a esse flavonóide, como as atividades antimutagênica, anticarcinogênica, antioxidante, antineoplásica e anti-inflamatória (OLIVEIRA FILHO et al., 2015; SUDHA; SRINIVASAN, 2018).

Também foi determinada, através da análise *in silico*, a probabilidade de ação farmacológica antineoplásica da vitexina, do tilirosídeo e do Pg-1, para as diferentes neoplasias que atingem órgãos dos sistemas tegumentar, gastrointestinal, urinário e reprodutor feminino (Tabela 2).

TABELA 2 - PROBABILIDADE DE EFEITO ANTINEOPLÁSICO DA VITEXINA, DO TILIROSIDO E DO PG-1

Potencial Antineoplásico	Vitexina		Tilirosídeo		Pg-1	
	Pa	Pi	Pa	Pi	Pa	Pi
Sistema Tegumentar						
Sarcoma	0,259	0,026	0,216	0,044	0,304	0,017
Carcinoma	0,196	0,031	0,210	0,028	0,283	0,016
Melanoma	0,194	0,059	0,230	0,043	0,396	0,012
Células escamosas	0,174	0,028	0,238	0,017	0,347	0,009
Sistema Gastrointestinal e Urinário						
Gástrico	0,208	0,021	0,189	0,028	0,171	0,037
Pâncreas	0,330	0,040	0,327	0,042	0,268	0,087
Cólon	0,247	0,044	0,220	0,051	0,351	0,026
Cólon-retal	0,260	0,045	0,236	0,051	0,372	0,025
Bexiga	0,220	0,029	0,176	0,077	0,213	0,034
Renal	0,224	0,028	0,220	0,030	0,167	0,078
Sistema Reprodutor Feminino						
Cervical	0,325	0,016	0,366	0,012	0,297	0,019
Útero	0,145	0,039	0,123	0,081	0,181	0,015
Ovário	0,164	0,051	0,234	0,029	0,335	0,015

Pa: Probabilidade de ativação, **Pi:** Probabilidade de inativação.

FONTE: O autor (2022)

Os dados obtidos revelaram que o Pg-1 apresentou melhor probabilidade de ação antineoplásica no sistema tegumentar para efeito sobre o: sarcoma (Pa: 0,304; Pi: 0,017),

carcinoma (Pa: 0,283; Pi: 0,016), melanoma (Pa: 0,396; Pi: 0,012) e câncer de células escamosas (Pa: 0,347; Pi: 0,009), quando comparado às demais substâncias testadas, *i.e.* a vitexina e o tilirosídeo. A análise ainda evidenciou que o tilirosídeo possui melhor probabilidade de atividade farmacológica antineoplásica no combate ao melanoma (Pa: 0,230; Pi: 0,043) e às células escamosas (Pa: 0,238; Pi: 0,017) do que o apresentado pela vitexina.

Nos órgãos do sistema urinário e gastrointestinal superior, foi observado que a vitexina obteve melhor potencial antineoplásico em células da bexiga (Pa: 0,220; Pi: 0,029), renais (Pa: 0,224; Pi: 0,028), pancreáticas (Pa: 0,330; Pi: 0,040) e estomacais (Pa: 0,208; Pi: 0,021). O Pg-1 apresentou efeito sobre células do cólon (Pa: 0,247; Pi: 0,028) e na região colón-retal (Pa: 0,247; Pi: 0,044), enquanto o tilirosídeo não demonstrou efeito antineoplásico significativo nos órgãos analisados, com exceção do câncer colón-retal (Pa: 0,236; Pi: 0,051) e pancreático (Pa: 0,327; Pi: 0,042).

O Pg-1 indicou possível efeito de atividade antineoplásica sobre os órgãos do sistema reprodutor feminino: útero (Pa: 0,181; Pi: 0,015) e ovários (Pa: 0,335; Pi: 0,015); e o tilirosídeo apresentou maior potencial anticâncer para a região cervical (Pa: 0,366; Pi: 0,012). A vitexina apresentou potenciais menores do que o Pg-1 e o tilirosídeo, embora resultados satisfatórios tenham sido descritos para o potencial anticâncer cervical (Pa: 0,325; Pi: 0,016).

O desenvolvimento de fármacos naturais com propriedades anticâncer tem ganhado espaço em meio aos quimioterápicos sintéticos, que sabidamente apresentam elevado nível de toxicidade e causam sérios danos às células saudáveis do organismo. Teoricamente, produtos de origem natural, com propriedades antioxidante e anti-inflamatória, poderiam auxiliar as terapias tradicionais e interferir com a atividade das células neoplásicas (GROCHOWSKI et al., 2018), o que tornaria a vitexina, o tilirosídeo e o Pg-1 opções viáveis no combate ao câncer.

Vários testes *in vitro* corroboram os resultados descritos para as moléculas analisadas neste estudo. Nos órgãos dos sistemas gastrointestinal e excretor, as análises realizadas por Rao et al. (2007) mostraram os efeitos do tilirosídeo contra células cancerosas do intestino e fígado, enquanto Tsimplouli et al. (2012) evidenciaram o efeito anticâncer desse flavonóide sobre células da região colón-retal. Além disso, a vitexina teve o efeito antineoplásico descrito por Xue et al. (2014) no sistema gastrointestinal e por Scarpa et al. (2016), na bexiga. Dentre os efeitos descritos para o sistema reprodutor

feminino, o estudo realizado por Zhou et al. (2009) destacou a ação anticâncer da vitexina no ovário e nas células cervicais. Os dados referentes ao sistema tegumentar são respaldados pelo estudo de Rao et al. (2007), que indicou a ação do tilirosídeo contra o câncer de células escamosas e o melanoma. A atividade anticâncer foi também observada em ensaios com células de carcinoma e fibrossarcoma expostos ao flavonóide 5,4'-dihidroxi-6,7,8-trimetoxiflavona (TMF3), substância estruturalmente semelhante ao Pg-1, o que reforça o papel desse grupo de substâncias no combate ao câncer (JAHANIANI et al., 2005).

Apesar dos estudos *in silico* revelarem o potencial de inibição e proliferação de células cancerígenas, com respaldo das análises *in vitro*, os mecanismos de inibição de cada molécula, em relação aos diferentes tipos de câncer citados, necessitam de maiores evidências *in vivo* para a determinação de seus mecanismos de ação. O grande desafio das terapias anticâncer é o dano celular e para que este efeito seja minimizado, a busca de substâncias naturais antineoplásicas de ação comprovada deve visar à eliminação das células doentes, com menor ou nenhum efeito adverso nas células normais (GREENWELL et al., 2015).

5.1.2 Perfil de biodisponibilidade

Os flavonóides estão regularmente presentes na dieta, entretanto sua correta absorção sofre ação de misturas complexas. A ingestão oral dos flavonóides passa por modificações químicas, dentro do trato gastrointestinal, pelas enzimas digestivas e a microbiota residente, e a substância, uma vez absorvida, é metabolizada na parede intestinal, no fígado e nos tecidos periféricos (DUARTE; PÉREZ-VIZCAÍNO, 2015).

Nas pesquisas voltadas para a descoberta de um novo medicamento, o não conhecimento adequado sobre os fatores envolvidos na sua produção, como aqueles relacionados à avaliação farmacocinética e toxicológica, pode levar ao fracasso o seu desenvolvimento. Logo, a definição do perfil farmacocinético da molécula e de sua toxicidade são parâmetros imprescindíveis para a caracterização da bioviabilidade e dos seus efeitos nocivos (OLIVEIRA FILHO et al., 2015).

Além disso, a compreensão da atuação dos fármacos no organismo permite a

identificação de aspectos específicos, desde a sua administração até a sua excreção, que são importantes para a determinação da efetividade clínica do medicamento. Neste estudo, a partir da investigação do perfil de biodisponibilidade, foi observado que o mecanismo farmacocinético da vitexina, do tilirosideo e do Pg-1 sugere a possibilidade de utilização de diferentes formas de administração para estes flavonóides.

De acordo com as propriedades físico-químicas teóricas reveladas pelos flavonóides, aqueles que apresentaram biodisponibilidade oral seguem a regra 5 de Lipinski (Ro5), que especifica propriedades moleculares significativas para a farmacocinética de compostos no organismo. A Ro5 determina os critérios para biodisponibilidade oral: massa molar (MM) ≤ 500 g/mol, número de aceptores de hidrogênio (nON) ≤ 10 , número de doadores de ligações de hidrogênio (nOHNH) ≤ 5 e o número de violações (nViolações) ≤ 1 (LIPINSKI et al., 2001).

A vitexina tem uma massa molar de 432,38 g/mol, total de 31 átomos, nON: 10, nOHNH: 7 e nViolations: 1. Outros aspectos teóricos de biodisponibilidade incluem: coeficiente de lipofilicidade LogP: 0,52, coeficiente de solubilidade aquosa LogS: - 2,39 e a área de superfície polar TPSA: 181,04 Å² (Tabela 3).

TABELA 3 - BIODISPONIBILIDADE FÍSICO-QUÍMICA - VITEXINA

Parâmetro	Vitexina
nON	10
nOHNH	7
nViolations	1
LogP	0,52
LogS	- 2,39
TPSA	181 Å ²

nON: número de aceptores de hidrogênio, **nOHNH**: número de doadores de hidrogênio, **nViolations**: número de violações, **LogP**: coeficiente de lipofilicidade, **LogS**: coeficiente de solubilidade aquosa, **TPSA**: área de superfície polar.

FONTE: O autor (2022)

O flavonóide vitexina apresenta biodisponibilidade oral com propriedade de absorção em membranas celulares. Os parâmetros de LogP: $\leq 5,00$ e LogS: $\leq - 4,00$, caracterizam a molécula com parte solúvel em meios polares e lipofílica, conforme estipulado no Ro5 (LIPINSKI et al., 2001). Os índices justificam uma superfície polar superior ao parâmetro adotado para indicação em TPSA para permeabilidade da membrana: $\leq 140 \text{ \AA}^2$ (SARI et al., 2019).

O tilirosídeo possui massa molar de 594,52 g/mol, total de 43 átomos, nON: 13, nOHNH: 7 e nViolations: 3, LogP: 3.49, LogS: - 3,09 e o TPSA: 216,58 Å^2 (Tabela 4).

TABELA 4 - BIODISPONIBILIDADE FÍSICO-QUÍMICA - TILIOSÍDEO

Parâmetro	Tilirosídeo
nON	13
nOHNH	7
nViolations	3
LogP	3,49
LogS	- 3,09
TPSA	216,58 Å^2

nON: número de aceptores de hidrogênio, **nOHNH**: número de doadores de hidrogênio, **nViolations**: número de violações, **LogP**: coeficiente de lipofilicidade, **LogS**: coeficiente de solubilidade aquosa, **TPSA**: área de superfície polar.

FONTE: O autor (2022)

Os dados sugerem que a molécula não possui biodisponibilidade oral segundo Ro5; além disso, apresenta LogP: 2,49, LogS: - 3,09 e TPSA: 216,58 Å^2 , demonstrando que é altamente lipofílica com potencial para penetrar membranas biológicas (VEBER et al., 2002).

O flavonóide Pg-1 possui massa molar de 344,32 g / mol, total de 25 átomos, nON: 7, nOHNH: 2 e nViolations: 0, LogP: 3,00, LogS: - 3,52 e o TPSA: 98,37 Å^2 , (Tabela 5).

TABELA 5 - BIODISPONIBILIDADE FÍSICO-QUÍMICA – Pg-1

Parâmetro	Pg-1
nON	7
nOHNH	2
nViolations	0
LogP	3,00
LogS	- 3,52
TPSA	98 Å ²

nON: número de aceptores de hidrogênio, **nOHNH**: número de doadores de hidrogênio, **nViolations**: número de violações, **LogP**: coeficiente de lipofilicidade, **LogS**: coeficiente de solubilidade aquosa, **TPSA**: área de superfície polar.

FONTE: O autor (2022)

O Pg-1 apresentou biodisponibilidade oral de Ro5. Outros aspectos teóricos de biodisponibilidade analisados, como LogP: 3,00, LogS: - 3,52 e TPSA: 98,37 Å², sugerem que Pg-1 tem um índice de absorção ao penetrar membranas biológicas, em que LogP: ≤ 5,00, LogS: ≤ - 4,00 e TSA: ≤ 140 classificam a molécula como solúvel em água e com propriedade lipofílica (SARI et al., 2019).

Estudos mostram que os flavonóides alteram a organização das biomembranas; a presença de porções apolares presentes na estruturas de algumas moléculas pode estar associada ao potencial de permeabilidade em membranas celulares, assim como ao desempenho de atividade biológica (TSUCHIYA, 2015; INGÓLFSSON et al., 2014; SELVARAJ et al., 2015). Os dados obtidos reforçam a capacidade de permeabilidade descritas para o tilirosídeo, expressas em valores LogS, LogP e TPSA. A alta lipofilicidade desse flavonóide indica viabilidade para utilização de outras vias na administração da substância *in vivo*, como intramuscular, cutânea e intravenosa, uma vez que não apresenta biodisponibilidade oral.

Por outro lado, a vitexina e o Pg-1 revelaram biodisponibilidade oral e potencial de permeabilidade em membranas, permitindo maior número de vias de administração das substâncias *in vivo*, como oral, intramuscular, cutânea e intravenosa. Propriedades semelhantes foram observadas por Oliveira Filho et al. (2015) em uma molécula análoga

do Pg-1, denominada 5,7,4'-trimetoxiflavona (TMF1), cujas características físico-químicas indicaram que a mesma também possui boa biodisponibilidade oral (nON: 5; nOHNH: 0; LogP: 3,28; MM: 312 g/mol). Assim, ambos os flavonóides, estruturalmente semelhantes, satisfazem o Ro5 e são possíveis candidatos para uso oral.

5.1.3 Perfil de Toxicidade

Os flavonóides exibem muitos efeitos farmacológicos sobre os sistemas biológicos, a saber: antimicrobiano, antiviral, citotóxico, antineoplásico, antioxidante, anti-inflamatório. Estes efeitos são relacionados às propriedades inibitórias que grande parte desses compostos desempenha sobre complexos enzimáticos, incluindo hidrolases, isomerases, oxigenases, oxidoredutases, polimerases, fosfatases, proteínas fosfoquinasas e aminoácido oxidases (MACHADO et al., 2008; RODRIGUES et al., 2015).

As previsões de toxicidade *in silico* investigam se os flavonóides induzem ou possuem propriedades que inibem ações mutagênicas, carcinogênicas e o potencial de toxicidade oral aguda. A análise demonstrou que a vitexina, o tilirosídeo e o Pg-1 não atuam como inibidores de genes (IG) que causam silenciamento de códons, que podem levar à ocorrência de mutação. Além disso, as moléculas não são carcinógenas (C) e sua carcinogenicidade (Car) não foi requerida. A ausência de potencial de mutagenicidade pela Toxicidade AMES (TA) foi demonstrada pela vitexina e Pg-1; para toxicidade oral aguda (TOA), o tilirosídeo e Pg-1 foram classificados como classe III, com valores de DL50 > 500 mg/kg e < 5000 mg/kg. A vitexina foi classificada como classe IV (praticamente não tóxico e não irritante), e sob esta classificação, uma DL50 > 5000 mg/kg é necessária para apresentar um efeito tóxico no organismo (DRWAL et al., 2014) (Tabela 6).

TABELA 6 - ANÁLISE DE TOXICIDADE *in silico* DA VITEXINA, DO TILIROSÍDEO E DO PG-1

Parâmetro		Vitexina	Tilirosídeo	Pg-1
IG	Não inibidor	0,736	0,752	0,825
TA	Ausência de Toxicidade	0,723	0,574	0,925
C	Não carcinogênico	0,955	0,965	0,918
TOA	Classe III	-	0,404	0,521
	Classe IV	0,374	-	-
Car	Não requerido	0,725	0,677	0,614

IG: Inibição de Genes, **TA:** Toxicidade de AMES, **C:** Carcinogênico, **TOA:** Toxicidade Oral Aguda, **Car:** Carcinogenicidade.

FONTE: O autor (2022)

No estudo desenvolvido por Auniq et al. (2019), utilizando flavonóides isolados de *Vitex peduncularis* Wall, a vitexina foi considerada segura, com baixa toxicidade e boa biodisponibilidade oral. Enquanto a toxicidade reduzida demonstrada pelo tilirosídeo, tem seu efeito apoiado nos estudos de Jin et al. (2016) pela capacidade antioxidante da molécula que protege a célula contra o estresse oxidativo. Por tanto, moléculas como os flavonóides que possuem uma estrutura química sujeita à metabolização, envolvendo uma ampla gama de reações (desglicosilação, glucuronidação, sulfatação, metilação), consegue atribuir diferentes propriedades biológicas, entre diferentes moléculas (ERLUND, 2004).

Segundo Sudha e Srinivasan (2018), o estudo realizado com a molécula 5-hidroxi-3', 4', 7-trimetoxiflavona (TMF2) sugeriu que o uso humano desse flavonóide bioativo está dentro do nível aceitável de toxicidade, pois não revelou efeito mutagênico e citotóxico. Dessa forma, o estudo com essa molécula estruturalmente semelhante ao Pg-1 valida os dados obtidos nos parâmetros de toxicidade (IG, TA, C e TOA) do presente estudo.

5.2 Análises *in vitro* dos flavonóides vitexina, tilirosídeo e Pg-1

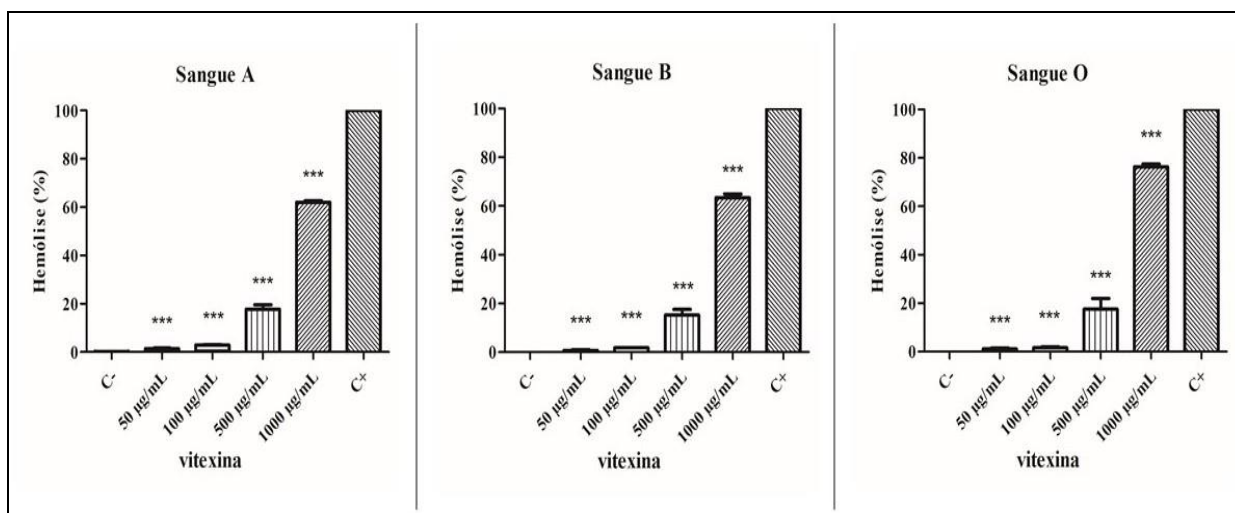
Os dados discutidos nesta seção referente à análise *in vitro* e *ex-vivo* dos flavonóides estão relacionados aos artigos científicos disponíveis nos anexos 4, 5, 6 e 7.

5.2.1 Efeito de citotoxicidade em hemácias de humanos

As hemácias são consideravelmente suscetíveis a danos dos radicais livres (AN et al., 2015). Nesse contexto, os achados do presente estudo são consistentes com a proposta de que o estresse oxidativo causa hemólise. A lise de hemácias foi avaliada e expressa em porcentagem (potencial hemolítico) e classificada como baixa, quando os valores estão entre 0 e 40%, moderada, quando estão entre 40 e 80%, e alta, acima de 80% (RANGEL et al., 1997).

A análise da hemólise revelou que a vitexina não foi significativamente tóxica para hemácias do sistema ABO em nenhuma das concentrações testadas (de 50 a 1000 µg/mL). O potencial de hemólise observada após a exposição à vitexina variou de baixa a moderada (de 1% a 75%). A taxa hemolítica (1000 µg/mL) foi < 75% para o tipo sanguíneo O; < 63% para o tipo sanguíneo B e < 61% para o tipo sanguíneo A. Assim, todos os tipos sanguíneos sofreram hemólise moderada e a classificação hemolítica foi: A < B < O (Figura 18).

FIGURA 18 - EFEITO CITOTÓXICO DA VITEXINA (*W. viscosissima*) CONTRA HEMÁCIAS



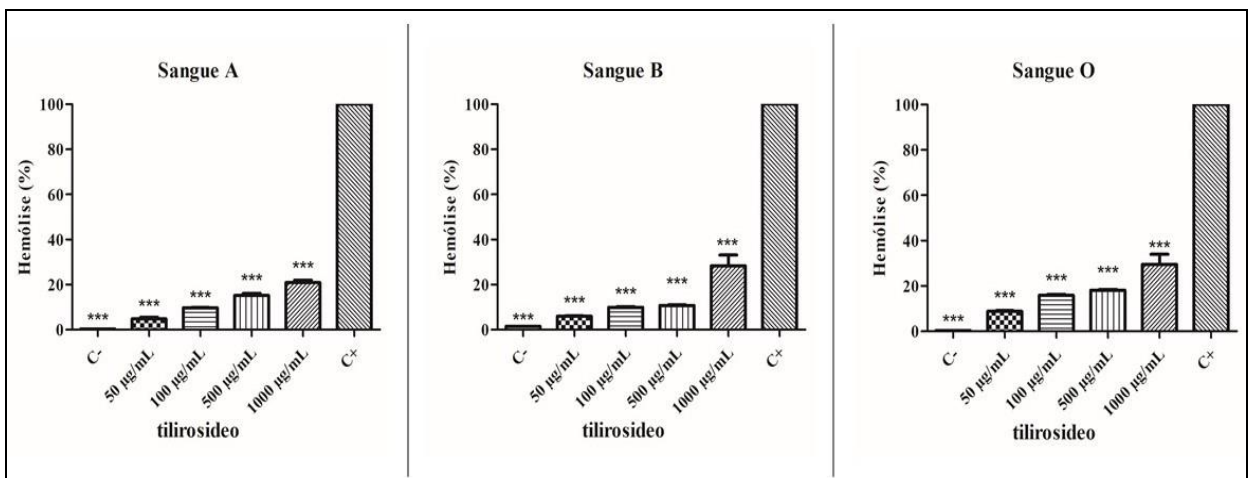
(C-) Controle negativo (hemácias 0,5%), (C +) Controle positivo (1% Triton X-100). P <0,05 (*), P <0,01 (**), e P <0,001 (***) versus controle positivo.

FONTE: O autor (2022)

A medição da sensibilidade de hemácias humanas em diferentes concentrações de

tilirosídeo demonstra reduzidos efeitos citotóxicos. O tilirosídeo exibiu baixo potencial de hemólise em todas as concentrações testadas. Em particular, na concentração mais alta (1000 µg/mL), a taxa hemolítica para os tipos sanguíneos O, B e A foi < 29%, < 28% e < 20%, respectivamente. Portanto, esta substância demonstra promissora viabilidade de interação segura com esse tipo específico de células. A taxa de hemólise obedeceu a seguinte ordem: A < B < O (Figura 19).

FIGURA 19 - EFEITO CITOTÓXICO DO TILIROSIDÉO (*H. velutina*) CONTRA AS HEMÁCIAS

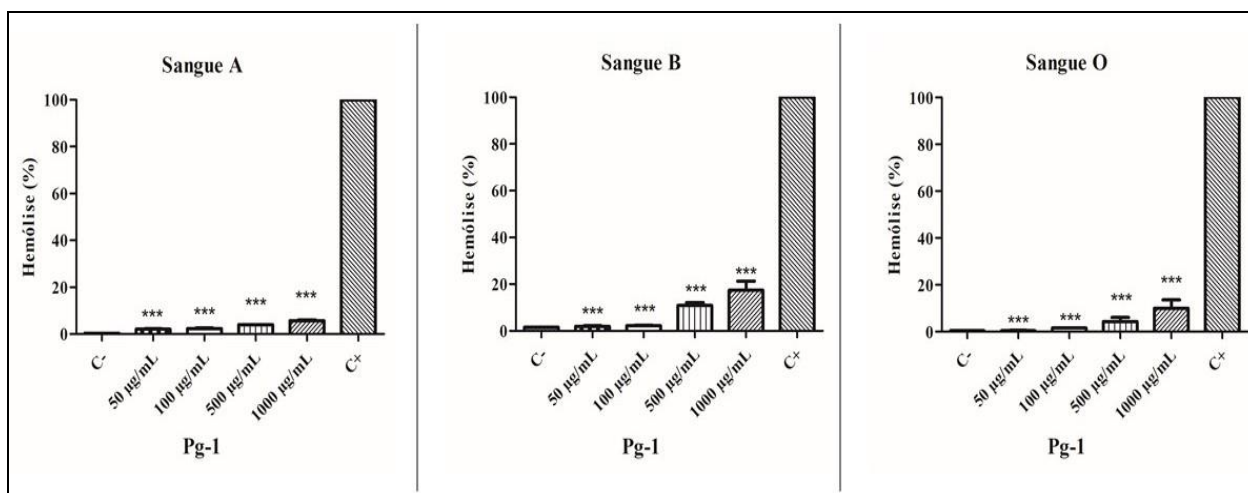


(C-) Controle negativo (hemácias 0,5%), (C+) Controle Positivo (1% Triton X-100). P < 0,05 (*), P < 0,01(**) e P < 0,001 (***) versus controle positivo.

FONTE: O autor (2022)

Uma baixa taxa de hemólise foi observada após a exposição ao Pg-1 em todas as concentrações testadas (50 - 1000 µg/mL). A concentração de 1000 µg/mL obteve as taxas de hemólise: < 17% para o tipo de sangue B, < 9% para o tipo O e < 5% para o tipo A, obedecendo a seguinte ordem: A < O < B (Figura 20).

FIGURA 20 - EFEITO CITOTÓXICO DO PG-1 (*P. glazioviana*) CONTRA HEMÁCIAS



(C⁻) Controle Negativo (hemácias 0,5%), (C⁺) Controle Positivo (1% Triton X-100). P < 0,05 (*), P < 0,01 (***) and P < 0,001 (***) versus controle positivo.

FONTE: O autor (2022)

Os dados evidenciaram uma interação ligeiramente distinta entre os flavonóides e os diferentes tipos de hemácias humanas (sistema ABO). A membrana das hemácias é composta por vários tipos de glicoproteínas e a composição a torna mais suscetível ou resistente a interações com várias moléculas (HOLLMANN et al., 2016). O sistema ABO é caracterizado pela porção antigênica, com presença de monossacarídeos específicos na superfície da membrana de hemácias: Soro tipo A (N-acetilgalactosamina), soro tipo B (D-galactose), soro tipo AB (possui ambos os antígenos) e soro tipo O (não possui antígenos) (VAN GINKEL; SEVANIAN, 1994).

O potencial de hemólise é uma medida relacionada à destruição da membrana plasmática de hemácias e revela o efeito citotóxico de uma substância na célula. A pesquisa conduzida para investigar a capacidade dos flavonóides de inibir o efluxo semelhante a MRP1 (proteína associada à resistência a múltiplas drogas) e induzir hemólise em hemácias humanas revelou atividade hemolítica baixa a moderada com valores de $\leq 50\%$ (BOBROWSKA-HÄGERSTRAND et al., 2003).

O baixo percentual de hemólise e de oxidação pode ser uma vantagem para utilização de produtos naturais e moléculas, sugerindo um papel anti-inflamatório e/ou antioxidante para os flavonóides avaliados, com destaque para vitexina (HOOIJBERG et al., 1997; AN et al., 2015; VENTURINI et al., 2018). Levando em consideração a baixa taxa de lise das hemácias, acredita-se que a concentração de vitexina de 500 µg/mL

apresentou o resultado mais satisfatório, exibindo baixo percentual de hemólise (15% a 17%) em todos os tipos sanguíneos analisados. Em particular, o tipo sanguíneo A (N-acetilgalactosamina) obteve a melhor interação da vitexina com o menor percentual de hemólise. Os dados *in silico* descritos ressaltam suas propriedades bioativas, como as atividades anti-hemorrágica (Pa: 0,826; Pi: 0,002) e anti-inflamatória (Pa: 0,606; Pi: 0,030), e, entre os flavonóides analisados, sugere ser a substância que desempenha o melhor potencial anti-hemorrágico.

Assim como a vitexina, o tilirosídeo (isolado de *H. velutina*) obteve o menor índice de hemólise no sangue tipo A, sugerindo melhor interação com a N-acetilgalactosamina. Estudos desenvolvidos por Al Muqarrabun e Ahmat (2015) evidenciaram que a classe mais comum de metabólitos secundários do gênero *Helicteres* são os flavonóides, que se caracterizam por baixa atividade de hemólise (valores menores ou iguais a 50%). Além disso, os resultados obtidos na análise *in silico* deste estudo respalda as propriedades bioativas do tilirosídeo, como a anti-hemorrágica (Pa: 0,736; Pi: 0,002) e a anti-inflamatória (Pa: 0,759; Pi: 0,009), enfatizando o conceito desta substância ter ação protetora sobre as hemácias.

Estudos realizados por Sudha e Srinivasan (2018) relataram que os flavonóides são a classe mais prevalente de metabólitos secundários no gênero *Pavonia*, apresentando baixo índice de hemólise, com valores inferiores a 50%. Neste trabalho, o baixo efeito hemolítico, após o tratamento com Pg-1 (obtido de *P. glazioviana*), corrobora os achados de Mostardeiro et al. (2014), que destaca a atividade antioxidante e citoprotetora de compostos isolados de *P. xanthologea*. Além disso, os resultados descritos na análise *in silico* sugere que o Pg-1 possui propriedades bioativas como: anti-hemorrágica (Pa: 0,528; Pi: 0,003) e anti-inflamatórias (Pa: 0,706; Pi: 0,015). Dentre os flavonóides analisados neste estudo, o Pg-1 obteve menor probabilidade de citoproteção para hemácias *in silico*. Entretanto, o estudo *in vitro* confirma o seu papel como potente antioxidante, revelando baixos índices de citotoxicidade nas hemácias, o que sugere que esta substância desempenha melhor papel de proteção nessas células.

5.2.2 Determinação do Fator de Proteção Solar (FPS)

A concentração dos flavonóides depende da família e do gênero a qual pertence uma determinada espécie, e ainda pode variar conforme o local de extração na própria

planta, pois os flavonóides encontrados nas folhas podem apresentar diferenças estruturais das moléculas isoladas nas flores, raízes e frutos. Além disso, os fatores abióticos naturais como a radiação solar e incidência de raios UV também influenciam o metabolismo e a produção/disponibilidade desses compostos nos órgãos e espécies vegetais (LILEY; MCKENZIE, 2006).

O Brasil é um país de clima tropical que recebe a maior intensidade de radiações solares entre os países americanos. Esse clima é propício para que as plantas sintetizem compostos polifenólicos, entre eles os flavonóides, que servem como proteção contra os raios UV, e como fonte de moléculas com potencial bioativo de interesse para saúde humana (FINCH et al., 2017).

As substâncias naturais têm sido utilizadas na elaboração de cosméticos como um fator adjuvante dos benefícios desses produtos, que apresentam ação antioxidante, anti-inflamatória e de citoproteção. Com isso, no desenvolvimento de fitocosméticos, há um aumento de preparações tópicas que utilizam combinações de filtros químicos e físicos com substâncias naturais para proteger e cuidar da pele (MUNHOZ et al., 2012).

Dessa forma, os flavonóides são moléculas candidatas para análise de captação dos raios UV, agregando valor farmacológico e as formas de inovação tecnológica para utilização das moléculas. No presente estudo, foi realizada a análise *in vitro* do fator de proteção solar dos EEB Wv, EEB Hv, EEB Pg, FCWv, FDHv e FCPg (Tabela 7).

TABELA 7 - FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR (FPS) DE *H. velutina*, *W. viscosíssima* e *P. glazioviana*

Concentração	<i>H. velutina</i>		<i>W. viscosíssima</i>		<i>P. glazioviana</i>	
	EEB	FD	EEB	FC	EEB	FC
50 µg/mL	3,773	5,671	2,949	4,056	1,252	3,025
100 µg/mL	5,197	11,58	3,884	6,897	2,142	6,227
500 µg/mL	25,01	25,01	17,14	25,01	8,886	25,01
1000 µg/mL	25,01	25,01	25,01	25,01	16,45	25,01

EEB: Extrato Etanólico Bruto; **FD:** Fração Diclorometano; **FC:** Fração Cloroformica

FONTE: O autor (2022)

A resolução RDC nº 30 de 2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece o regulamento técnico científico sobre formulações de protetores solares, cujo fator mínimo de proteção deve ser $> 6_{FPS}$ (BRASIL, 2012). De acordo com os dados obtidos na análise *in vitro*, os compostos, com potencial ação para constituir os fitocosméticos, EEB W_v, EEB H_v, EEB Pg, FCW_v, FDH_v e FCPg obtiveram fator de proteção solar significativo nas concentrações de 500 µg/mL e 1000 µg/mL. Os compostos EEB H_v e FDH_v, provenientes da espécie *H. velutina*, tiveram elevado potencial (25,01_{FPS}), quando comparado com aqueles presentes nas outras espécies vegetais (*W. viscosíssima* e *P. glavioziana*). Vale destacar que todas as frações de FCW_v, FDH_v e FCPg demonstraram alto fator de proteção solar.

Em estudos prévios realizados com extratos de framboesa *Rubus chingii*, o potencial bioativo dos flavonóides foi avaliado, revelando a ocorrência de várias propriedades biológicas, incluindo a atividade antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, e de redução do número de melanócitos, com aplicação na proteção UV (LU et al., 2009). Além disso, foi evidenciado que os flavonóides são inibidores naturais da tirosinase, enzima importante para a biossíntese de melanina, o que indica uma possível ação deste composto no controle da melanogênese (SIMÕES et al., 2020). Tais achados dão respaldo aos resultados apresentados, uma vez que as substâncias dos EEB W_v, EEB H_v, EEB Pg, FCW_v, FDH_v e FCPg são majoritariamente flavonóides.

A avaliação do fator de proteção solar da vitexina, do tilirosídeo e do Pg-1 revelou que a vitexina não produziu efeito protetor significativo no espectro UVB, enquanto o tilirosídeo e Pg-1 tiveram efeitos semelhantes, com alto nível de proteção (25,01_{FPS}), em concentrações de 100 µg/mL a 1000 µg/mL (Tabela 8).

TABELA 8 - FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR (FPS) DOS FLAVONÓIDES VITEXINA, TILIOSÍDEO E PG-1

	Concentração (µg/mL)			
	50 µg/mL	100 µg/mL	500 µg/mL	1000 µg/mL
Vitexina	3,64	1,30	3,09	4,66
Tiliosídeo	18,31	25,01	25,01	25,01
Pg-1	19,16	21,86	25,01	25,01

FONTE: O autor (2022)

A vitexina possui diversas aplicações farmacológicas, entre elas as atividades antioxidante e antitumoral, e a inibição do estresse oxidativo (NIGAM et al., 2018). Entretanto, não há efeito fotoprotetor descrito para flavonóides obtidos da espécie *W. viscosíssima*, e apesar dos compostos encontrados nos EEB Wv e FCWv terem moderado efeito fotoprotetor, sugere-se que a atividade pode ser resultante do sinergismo com outras moléculas presentes nos extratos vegetais.

Em relação ao tilirosídeo e o Pg-1, estudos sobre a produção de fitocosméticos, preparados com uma combinação de sorbitol e tilirosídeo, mostraram a ação anti-inflamatória do composto, com proteção das camadas da pele (epiderme e derme), durante procedimentos estéticos, ao proporcionar efeitos calmante e relaxante na área tratada (PIECZYKOLAN et al., 2019). Já em ensaios desenvolvidos com extratos de folhas de *Blakiella bartsiiifolia*, ricos em flavonóides, contendo a molécula 5,4'-dihydroxy-3,6,7,3'-tetramethoxyflavone (TMF4), análoga ao Pg-1, o fator de proteção solar foi semelhante ao das moléculas isoladas, sugerindo que a proteção UVB se deve à defesa natural das folhas dessas plantas presentes em ecossistemas tropicais expostos a forte incidência solar (CALCAGNO-PISSARELLI et al., 2010). Estes dados estão de acordo com os achados descritos neste estudo que indicam que os produtos extraídos de *H. velutina* (EEB Hv, FCHv e tilirosídeo) e *P. glazioviana* (EEB Pg, FCPg e Pg-1) possuem efeito de fotoproteção.

5.2.3 Avaliação do potencial antibacteriano

5.2.3.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os estudos envolvendo atividade antibacteriana dos produtos naturais têm grandes perspectivas na descoberta e formulações de novos fármacos. A inovação de moléculas candidatas a antibióticos pode ocorrer de duas formas: através do potencial antibacteriano inédito ou devido à associação com efeito sinérgico da molécula estudada e um antibiótico já existente (BONA et al., 2014).

A técnica de microdiluição da CIM consiste em um método *in vitro* considerado simples, econômico e com boa reprodutibilidade. Esse ensaio requer menores quantidades da substância para realização dos testes, ainda que sejam necessárias replicatas na análise para garantir reprodutibilidade estatística. Pode ser aplicado em substâncias com diferentes

níveis de solubilidade, dispondo de resultados bastante sensíveis e determinando diversos níveis de potenciais antibacterianos (AMPARO et al., 2018).

Nesse contexto, há vários ensaios *in vitro* que contribuem para os estudos que procuram desvendar a atividade antibacteriana em produtos naturais. Assim, buscando conhecer o perfil antibacteriano da vitexina, do tilirosídeo e do Pg-1, foram avaliadas as suas respectivas atividades frente às cepas bacterianas Gram-positivas (*E. faecalis* e *S. aureus*) e Gram-negativas (*K. pneumoniae*, *E. coli* e *P. aeruginosa*).

Os resultados evidenciaram forte efeito antibacteriano do Pg-1 contra a cepa de *E. faecalis*, bactéria Gram-positiva, na concentração de 128 µg/mL. Entretanto, os demais flavonóides apresentaram efeito moderado em ambas as cepas de bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *E. faecalis*) com concentração < 1024 µg/mL (Tabela 9).

TABELA 9 - CIM DA VITEXINA, TILIROSIDO E PG-1 CONTRA CEPAS DE *E. faecalis* e *S. aureus*

Amostra	<i>E. faecalis</i> (µg/mL)	<i>S. aureus</i> (µg/mL)
Vitexina	1024	> 1024
Tilirosídeo	> 1024	> 1024
Pg-1	128	> 1024
Meio de cultura	-	-
Microrganismo	+	+

(-): Não houve crescimento bacteriano (+): Crescimento bacteriano

FONTE: O autor (2022)

Dentre as bactérias Gram-positivas, os cocos são as formas bacterianas isoladas com maior frequência em amostras biológicas humanas. As infecções causadas por este grupo podem ocorrer a partir de multiplicação local ou sistêmica. Algumas dessas bactérias apresentam multiplicação com produção de exotoxinas e enzimas (GUIDONI; TOPOROVSKI, 2001).

O gênero *Staphylococcus* é constituído por 33 espécies, muitas delas isoladas em amostras biológicas humanas. Segundo a capacidade de produção da enzima coagulase, estes são classificados em dois grupos: coagulase positivo, cujo agente de grande

importância é o *S. aureus*, e o grupo dos não produtores, como o *S. saprophyticus*, o *S. epidermidis* e o *S. haemolyticus*, estafilococos coagulase negativos (CASTRO, 2019).

Além destes, também se destacam os *Enterococcus*, que são cocos encontrados aos pares ou em cadeias curtas. São anaeróbios facultativos, termoestáveis, que crescem em temperatura de 10 °C a 45 °C. A maioria das espécies é responsável por infecções do trato gastrointestinal do homem, podendo ser encontradas também nas mucosas oral e vaginal e na pele, além de habitar o solo e alguns alimentos (BEZERRA; MELO; MONTENEGRO, 2021).

De modo geral, o *S. aureus* e *E. faecalis* estão comumente associados a infecções hospitalares. Essas bactérias possuem capacidade de disseminação na corrente sanguínea, atingindo os tratos geniturinário, gastrointestinal ou respiratório. Estão relacionadas a um alto número de óbitos por septicemia, podendo ultrapassar o índice de 50 % de letalidade (CASTRO, 2019).

Em relação ao tilirosídeo, os dados obtidos corroboram estudos prévios que mostraram que este flavonóide exibe pouca atividade de inibição para cepa *S. aureus*. Entretanto, foi enfatizado que o mesmo foi capaz de modular positivamente as atividades de outros antibióticos convencionais contra a cepa resistente de *S. aureus*, aumentando, por exemplo, a atividade da norfloxacin, ciprofloxacina, lomefloxacina e ofloxacina ao reproduzir um efeito sinérgico com fármacos convencionais (FALCÃO-SILVA et al., 2009; KUOK et al., 2017).

Nas cepas de bactérias Gram-negativas (*K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *E. coli*), os flavonóides vitexina, tilirosídeo e Pg-1 mostraram forte efeito antibacteriano frente à cepa de *K. pneumoniae*. Dentre essas moléculas, o Pg-1 conseguiu inibir o crescimento na menor concentração testada (32 µg/mL). A cepa de *E. coli* teve forte inibição demonstrada apenas pelo tilirosídeo e pelo Pg-1, ambas na concentração de 512 µg/mL. Entretanto, a *P. aeruginosa* resistiu ao efeito antibacteriano dos flavonóides avaliados, pois esses revelaram uma CIM > 1024 µg/mL (Tabela 10).

TABELA 10 - CIM DA VITEXINA, TILIROSÍDEO E PG-1 CONTRA CEPAS DE *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *E. coli*

Amostra	<i>K. pneumoniae</i> (µg/mL)	<i>P. aeruginosa</i> (µg/mL)	<i>E. coli</i> (µg/mL)
Vitexina	512	> 1024	> 1024
Tilirosídeo	64	> 1024	512
Pg-1	32	> 1024	512
Meio de cultura	-	-	-
Microrganismo	+	+	+

(-): Não houve crescimento bacteriano (+): Crescimento bacteriano

FONTE: O autor (2022)

Na literatura científica existe grande quantidade de informações referentes à ação antibacteriana dos flavonóides. Em estudo realizado por Gumgumjee (2012), utilizando extratos de folhas de *Tamarindus indica* (família Fabacea; nome popular: tamarindo), espécie rica em flavonóides, foi demonstrada atividade antibacteriana contra cepas de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*; com destaque para a forte atividade contra *K. pneumoniae* (cepa bacteriana do trato respiratório).

O efeito sinérgico na diversidade de moléculas presentes em extratos vegetais confere bioatividade diferenciada das análises realizadas em moléculas isoladas. Os flavonóides apigenina e vitexina, por exemplo, isolados de musgo *Plagiomnium* (família Mniaceae), apresentaram efeito de inibição no crescimento de bactérias Gram-negativas que estão associadas a doenças do trato gastrointestinal (*Salmonella typhi*) e urinário (*Proteus mirabilis*) de humanos e animais (BASILE et al., 1999; CUSHNIE; LAMB, 2005). No presente estudo, evidenciou-se a ação antibacteriana da vitexina contra bactérias Gram-negativas, com forte atividade de inibição sobre a *K. pneumoniae*. Desse modo, estes dados, aliados a estudos anteriores, sugerem que a atividade antibacteriana presente em extratos vegetais ricos em flavonóides pode estar associada à presença da vitexina.

O tilirosídeo, por sua vez, teve suas propriedades antibacterianas discutidas em diferentes estudos de forma controversa. ÖZÇELİK et al. (2006) demonstraram o seu potencial antibacteriano para cepas de *E. coli* (2 mg/mL), em concordância com o atual trabalho, cujo potencial contra essa bactéria, na concentração de 512 µg/mL, foi

considerado como sendo de atividade forte. No entanto, os dados apresentados divergem dos resultados descritos por Zhang et al. (2013), em que foi indicada a ausência de atividade antibacteriana relevante do tilirosídeo contra cepas de *E. coli*. Possivelmente a razão para esta divergência se deve à execução de metodologias diferentes e da utilização de concentrações e formulações da molécula de forma não padronizada.

O Pg-1 apresentou efeito inibitório do crescimento bacteriano das bactérias Gram-positiva e Gram-negativa. Dentre os três flavonóides analisados, é o que possui estrutura molecular mais favorável para interação direta com membranas biológicas. Segundo Oliveira (2019), o Pg-1 isolado da espécie *P. glazioviana* exibiu atividade antibacteriana contra cepa *E. coli* ATCC 18739, e neste estudo, o Pg-1, atuando sobre uma linhagem diferenciada de cepas intestinais de *E. coli* ATCC 8539, mostrou-se capaz de inibir fortemente o seu desenvolvimento.

Dentre as cepas bacterianas analisadas, a cepa *K. pneumoniae* possui grande relevância clínica, pois trata-se de uma espécie Gram-negativa altamente prevalente com aparecimento de cepas hipervirulentas que aumentam o número de pessoas suscetíveis a infecções (CORDEIRO et al., 2020). Ela é importante fonte de resistência aos antibióticos, e por isso esse microrganismo alerta os cientistas sobre o aumento do número de infecções graves e a crescente escassez de medicamentos eficazes (PACZOSA; MECSAS, 2016). Dessa forma, substâncias como vitexina, tilirosídeo e o Pg-1, com forte atividade de inibição para cepas de *K. pneumoniae*, são prováveis candidatos a integrar as terapias medicamentosas. Entretanto, outros ensaios com mais cepas dessa espécie devem ser realizados para melhor definir a atividade específica apresentada pela molécula teste.

5.2.3.2 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Na avaliação do potencial antibacteriano de compostos e moléculas bioativas, o composto pode ser considerado bactericida ou bacteriostático de acordo com sua CBM, que deve ser, respectivamente, igual ou duas vezes maior que a CIM ou a CBM ser maior que duas vezes a CIM (HAFIDH et al., 2011). Logo, os testes de CBM foram realizados com os resultados dos flavonóides que obtiveram forte atividade antibacteriana nas cepas Gram-positivas *E. faecalis* e Gram-negativas *K. pneumoniae* e *E. coli*. As cepas *S. aureus* e *P. aeruginosa* com atividade inibitória moderada/fraca não foram avaliadas.

Os resultados da CBM da vitexina, do tilirosídeo e do Pg-1 podem ser vistos na

tabela 11. A vitexina revelou efeito bacteriostático para cepas de *K. pneumoniae* e *E. faecalis*, com crescimento de bactérias na concentração > 1024 µg/mL, na qual a molécula apenas inibe o crescimento/reprodução bacteriana, sem matar de imediato as bactérias.

O tilirosídeo foi a única molécula que apresentou efeito bactericida contra cepa clínica de *K. pneumoniae* com CBM de 128 µg/mL, capaz de inibir de imediato as bactérias. O Pg-1 foi considerado bactericida para as cepas de *E. faecalis* e *E. coli*, enquanto o efeito bacterioestático foi observado na cepa de *K. pneumoniae*.

TABELA 11 - CBM DA VITEXINA, TILIOSÍDEO E PG-1 CONTRA CEPAS DE *K. pneumoniae*, *E. faecalis* e *E. coli*

Amostra	<i>K. pneumoniae</i> (µg/mL)	<i>E. faecalis</i> (µg/mL)	<i>E. coli</i> (µg/mL)
Vitexina	> 1024 Bacteriostático	> 1024 Bacteriostático	* *
Tiliosídeo	128 Bactericida	* *	> 1024 Bacteriostático
Pg-1	> 1024 Bacteriostático	128 Bactericida	512 Bactericida

(*): Não avaliado

FONTE: O autor (2022)

Os flavonóides possuem o mecanismo de atividade antimicrobiana relacionado à sua capacidade em formar complexos com proteínas solúveis ou com a parede celular das bactérias. Dessa forma, a indução na variação de solubilidade que as moléculas isoladas provocam no meio que desempenham sua atividade, modifica o potencial ativo induzindo/inibindo ações enzimáticas, abertura de canais, expressões gênicas, afetando as funções das membranas e do metabolismo (ASHRAF et al., 2011).

Alguns estudos relatam a atividade antimicrobiana de extratos de espécies de Malvaceae (TELES et al., 2015) e de seus compostos isolados, como flavonóides e glicosídeos flavonoídicos (FILHO et al., 2013). Para a classe dos flavonóides avaliados, o Pg-1 exibiu atividade bactericida contra cepas de bactérias intestinais, estando de acordo com estudos que mostram atividade antibacteriana em moléculas estruturalmente similares

e compostos oriundos de espécies vegetais dessa família (OLIVEIRA, 2019).

A atividade antibacteriana dos flavonóides está sendo cada vez mais documentada. Substâncias naturais e extratos de plantas com relatos na medicina popular vêm sendo testados *in vitro* para atividade antibacteriana por muitos grupos de pesquisa (AKBAR et al., 2019). O presente estudo respalda o potencial antibacteriano dos flavonóides vitexina, tilirosídeo e Pg-1, de espécies pertencentes à família Malvaceae, o que reforça a importância da continuidade em pesquisar substâncias com potencial antibacteriano em comparação com outras espécies de bactérias patogênicas para humanos.

5.3 Análises *ex-vivo* dos flavonóides vitexina, tilirosídeo e Pg-1

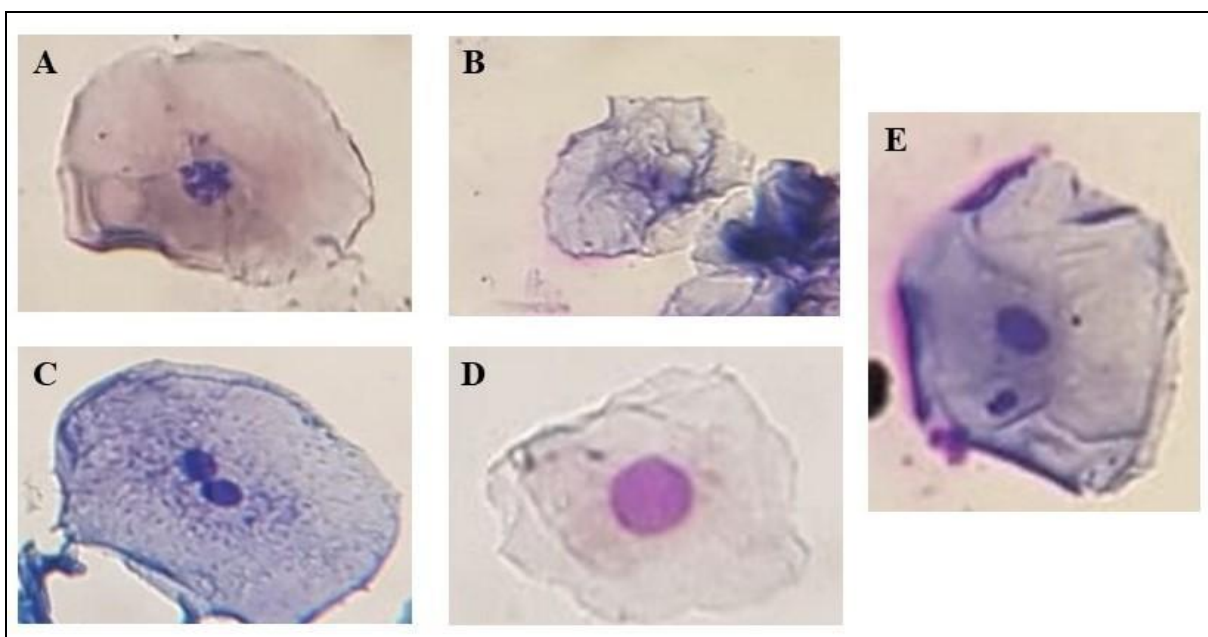
5.3.1 Avaliação de genotoxicidade em células da mucosa oral de humanos

Os testes de genotoxicidade são realizados para identificar a capacidade de interação de extratos/substâncias, em baixas concentrações, com os ácidos nucléicos. Quando os agentes tóxicos interagem com o DNA, eles frequentemente produzem aberrações cromossômicas, alterações da estrutura do DNA, que por sua vez, podem resultar em alterações celulares irreversíveis que levam à morte celular por necrose/apoptose. Isso também pode levar a danos que serão transmitidos às células filhas durante a divisão celular (VARANDA et al., 2002; SPONCHIADO et al., 2016).

As células desenvolveram vários mecanismos de reparo do DNA, mas se as lesões no material genético não forem ajustadas, elas levam a mutações que se manifestam em uma série de doenças genéticas que têm características comuns, principalmente o desenvolvimento de câncer (CLANCY, 2008; JACKSON; BARTEK, 2009; SWIFT; GOLSTEYN, 2014).

A toxicidade celular foi avaliada por meio da presença de indicadores celulares (micronúcleos, binucleação, cariólise, cariorrexe e macronúcleos), conforme pode ser visto na Figura 21.

FIGURA 21 - FOTOMICROGRAFIA DE CÉLULAS ESFOLIADAS DA MUCOSA ORAL



(a) cariorrexe, (b) cariólise, (c) binucleação, (d) um macronúcleo e (e) um micronúcleo. Ampliação X1000.

FONTE: O autor (2022)

Os micronúcleos são cromossomos quebrados e fragmentados que foram perdidos durante a mitose. Sua frequência determina o grau de exposição do DNA a agentes nocivos exógenos e o consequente dano provocado (POPOVA et al., 2007; ANTONIO et al., 2017). Células contendo macronúcleos, devido ao contato com substâncias tóxicas, apresentam hiperatividade nuclear que aumenta o diâmetro do núcleo, causando divisão celular, o que resulta em binucleação (POPOVA et al., 2007). Além disso, alterações envolvendo cariólise e cariorrexe são observadas quando a célula é induzida a sofrer necrose/apoptose. Na cariorrexe, a cromatina se fragmenta e a membrana nuclear desaparece, enquanto na cariólise ocorre a dissolução completa do núcleo com perda do material nuclear. Assim, quanto mais intensas essas alterações se manifestarem, mais grave é o estado patológico das células/tecidos (ANTONIO et al., 2017).

A vitexina induziu poucas alterações celulares, quando comparada ao grupo controle positivo, mas apresentou resultados semelhantes aos do controle negativo. O baixo índice de genotoxicidade teve maior padrão de células normais (> 85%) em todas as concentrações (50 a 1000 $\mu\text{g/mL}$), embora alterações celulares importantes, como macronúcleos e binucleação, tenham sido observadas na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 12). Apesar da ocorrência de alterações celulares, o índice de concentração é

menor do que as alterações vistas no controle positivo, demonstrando baixo efeito genotóxico desempenhado por essa substância.

TABELA 12 - PERFIL DE GENOTOXICIDADE - VITEXINA

Grupo	Micronúcleos (%)	Binucleação (%)	Cariólise (%)	Cariorrexe (%)	Macronúcleo (%)	Normal (%)
C -	2,22 ± 0,11	1,88 ± 0,11	0,77 ± 0,22	0,55 ± 0,22	0,001 ± 0,00	94,56 ± 0,22
C +	4,00 ± 0,88	4,33 ± 0,38	5,44 ± 0,72	5,11 ± 0,67	4,55 ± 0,80	76,56 ± 3,08
Vitexina (µg / mL)						
1000	0,55 ± 0,29*	4,00 ± 0,33	1,33 ± 0,50*	2,77 ± 0,22*	4,66 ± 0,33	86,67 ± 0,38*
500	0,55 ± 0,22*	2,22 ± 0,22*	1,66 ± 0,33*	2,22 ± 0,11*	2,88 ± 0,11*	90,44 ± 0,48*
100	0,44 ± 0,11*	1,44 ± 0,29*	1,88 ± 0,40*	1,11 ± 0,22*	3,22 ± 0,29*	91,89 ± 0,40*
50	2,11 ± 0,29*	4,66 ± 0,38	3,66 ± 1,64*	2,55 ± 0,48*	2,88 ± 0,29*	84,11 ± 0,22*

(C-) Controle negativo, (C+) Controle positivo, * p < 0,05 versus controle positivo

FONTE: O autor (2022)

Os resultados do estudo *in silico* corroboraram as informações descritas nesta etapa do estudo, na qual a vitexina revelou possuir efeito farmacológico para indução de apoptose (Pa: 0,737; Pi: 0,012) e o menor efeito como inibidor de apoptose (Pa: 0,251; Pi: 0,066). Logo, o efeito agonista apoptótico *in silico* e o baixo efeito genotóxico *ex-vivo* reforçam o nível de segurança na utilização dessa molécula como alvo terapêutico não indutor de alterações gênicas e o potencial combate à continuidade de erros genéticos.

O tilirosídeo também induziu poucas alterações celulares quando comparada ao grupo controle positivo, mas apresentou resultados semelhantes aos do controle negativo. Dentre os flavonóides analisados, o tilirosídeo exibiu o menor efeito genotóxico na relação exposição/concentração.

O baixo índice de genotoxicidade apresentado pelo tilirosídeo teve maior padrão de células normais (> 90%) nas concentrações mais altas (500 e 1000 µg/mL), embora algumas alterações celulares tenham sido detectadas: binucleação, macronúcleo, cariólise e cariorrexe. Esse conjunto de variações celulares foi inferior ao descrito no controle positivo (H₂O₂), sugerindo um limite seguro de baixa toxicidade quanto à concentração e tempo de exposição ao tilirosídeo (Tabela 13).

TABELA 13 - PERFIL GENOTÓXICO DO TILIROSÍDEO

Grupo	Micronúcleos (%)	Binucleação (%)	Cariólise (%)	Cariorrexe (%)	Macronúcleo (%)	Normal (%)
C-	2,22 ± 0,11	1,88 ± 0,11	0,77 ± 0,22	0,55 ± 0,22	0,001 ± 0,00	94,56 ± 0,22
C+	4,00 ± 0,88	4,33 ± 0,38	5,44 ± 0,72	5,11 ± 0,67	4,55 ± 0,80	76,56 ± 3,08
Tilirosídeo (µg/mL)						
1000	0,77 ± 0,11*	3,33 ± 0,57	1,66 ± 0,19*	1,66 ± 0,19*	2,22 ± 0,29*	90,33 ± 1,07*
500	1,00 ± 0,005*	3,00 ± 0,19*	1,77 ± 0,11*	1,55 ± 0,48*	2,44 ± 0,11*	90,22 ± 0,40*
100	1,00 ± 0,50*	2,00 ± 0,33	2,66 ± 0,50*	1,88 ± 0,11*	3,33 ± 0,50	89,11 ± 1,23*
50	1,44 ± 0,29*	2,77 ± 0,29*	3,55 ± 0,72	3,00 ± 0,76*	3,77 ± 0,80	85,44 ± 1,31*

(C-) Controle negativo, (C +) Controle positivo, * p < 0,05 versus controle positivo.

FONTE: O autor (2022)

As alterações celulares (binucleação e macronúcleos) mencionadas no ensaio de genotoxicidade refletem o início da indução na reatividade celular fisiológica quando células escamosas são expostas a altas concentrações (1000 µg/mL – tilirosídeo) de novas substâncias. Dessa forma, os resultados ressaltam a análise *in silico* que mostra o potencial efeito farmacológico da molécula na indução de apoptose (Pa: 0,790; Pi: 0,009), e o menor efeito na atuação como inibidor da apoptose (Pa: 0,340; Pi: 0,015).

Estudos desenvolvidos por Jain et al. (2014) descreveram que compostos fenólicos extraídos de frutos secos de *Helicteres isora* apresentaram alto efeito antioxidante e antitumoral, demonstrando a importância das plantas como fonte considerável de moléculas naturais com ampla capacidade de eliminar radicais e proteger as células e seus componentes contra danos. Essas informações corroboram os resultados deste estudo, visto que o gênero *Helicteres* é rico em compostos fenólicos e flavonóides, apresenta baixa toxicidade, atividade antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral. No entanto, não foram encontrados na literatura dados específicos sobre os efeitos do tilirosídeo na genotoxicidade da mucosa oral humana.

O Pg-1 exibiu baixa genotoxicidade em todas as concentrações (50 a 1000 µg/mL), com padrão de células normais > 84%. Os dados evidenciaram que a concentração de 1000 µg/mL teve o menor efeito genotóxico sobre as células (células normais > 91%). Entretanto, algumas alterações celulares foram observadas (macronúcleo e binucleação),

apesar da incidência ser inferior à descrita no controle positivo (H₂O₂) e compatível com os achados do controle negativo, indicando uma discreta reatividade celular e um limiar seguro de baixa toxicidade (Tabela 14).

TABELA 14 - PERFIL GENOTÓXICO DO PG-1

Grupo	Micronúcleo (%)s	Binucleação (%)	Cariólise (%)	Cariorrexe (%)	Macronúcleo (%)	Normal (%)
C-	2,22 ± 0,11	1,88 ± 0,11	0,77 ± 0,22	0,55 ± 0,22	0,001 ± 0,00	94,56 ± 0,22
C+	4,00 ± 0,88	4,33 ± 0,38	5,44 ± 0,72	5,11 ± 0,67	4,55 ± 0,80	76,56 ± 3,08
Pg-1 (µg/mL)						
1000	0,33 ± 0,01*	1,55 ± 0,58*	1,44 ± 0,22*	1,44 ± 0,11*	3,66 ± 0,19*	91,56 ± 0,44*
500	0,22 ± 0,11*	2,33 ± 0,50*	2,55 ± 0,80*	3,66 ± 1,01*	5,33 ± 0,33	85,89 ± 1,78*
100	0,22 ± 0,11*	1,77 ± 0,58*	2,44 ± 0,44*	7,33 ± 0,19	3,55 ± 0,94*	84,67 ± 1,07*
50	0,55 ± 0,11*	3,00 ± 0,33*	2,88 ± 0,11*	1,77 ± 0,58*	6,55 ± 0,58	85,22 ± 0,72*

(C-) Controle negativo, (C +) Controle positivo, * p < 0,05 versus controle positivo

FONTE: O autor (2022)

Os resultados respaldam os dados obtidos na análise *in silico* do presente estudo, que faz referência ao papel potencial da Pg-1 na indução de apoptose (Pa: 0,887; Pi: 0,005), em consonância com a probabilidade reduzida da atividade inibitória da apoptose (Pa: 0,211; Pi: 0,104). Abordagens anteriores *in vitro* e *in silico* evidenciaram as atividades antiproliferativa e indutora de apoptose dos flavonóides análogos ao Pg-1. A 5,7,4'-trimetoxiflavona, por exemplo, inibiu a proliferação e induziu a morte celular em células de câncer de mama, e conferiu proteção contra radicais livres, indicando a ação antioxidante da molécula (AL MUQARRABUN; AHMAT, 2015).

Neste estudo, os dados demonstram que a vitexina, o tilirosídeo e o Pg-1 não apresentam genotoxicidade para células de mucosa oral de humanos, pois a exposição a esses flavonóides não resultou em danos na informação genética dessas células. Uma vez que a genotoxicidade avalia os danos causados ao DNA, a forma que as moléculas podem perturbar a estrutura do material genético e prejudicar os mecanismos de reparo pode levar a ocorrência de alterações morfofuncionais, resultando na transformação de células normais em cânceres (CHAVES, 2016).

6. Conclusões

6. Conclusões

O estudo contribuiu para o conhecimento do perfil toxicológico e bioativo dos flavonóides isolados de plantas pertencentes à família Malvaceae.

A partir da metodologia proposta foi possível observar que:

Estudo *in silico*

- A farmacocinética da vitexina e Pg-1 indica que essas moléculas apresentam biodisponibilidade por via oral;
- O tilirosídeo demonstrou não possuir biodisponibilidade por via oral;
- Todos os flavonóides avaliados mostraram-se não mutagênicos e não carcinogênicos;
- A probabilidade de atividade biológica revelou que os flavonóides possuem potencial antioxidante, pró-apoptótico e antineoplásico, e que apresentam atividade antineoplásica de forma específica para órgãos dos sistemas, a saber:
 - No sistema tegumentar, o Pg-1 obteve atividade para: sarcoma, carcinoma invasor, melanoma e câncer de células escamosas;
 - No sistema gastrointestinal e excretor, a vitexina destaca-se com maior probabilidade de proteção contra o câncer: gástrico, pancreático, renal e da bexiga;
 - No sistema reprodutor feminino, o tilirosídeo apresenta provável atividade contra o câncer cervical e o Pg-1, contra o câncer de útero e ovário;

Estudo *in vitro*

- O fator de proteção solar dos flavonóides destacou o efeito fotoprotetor ($> 25,01_{FPS}$) para do tilirosídeo e do Pg-1; a vitexina não produziu efeito significativo para proteção no espectro UVB.
- A análise de citotoxicidade *in vitro* mostrou que a vitexina, o tilirosídeo e o Pg-1 tiveram baixa taxa de hemólise ($< 40\%$) na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$.
- Atividade Antibacteriana
 - A CIM revelou forte efeito do Pg-1 frente a cepas Gram-positiva *E. faecalis* (128 $\mu\text{g/mL}$), a vitexina e tilirosídeo não demonstraram efeito significativo

para as espécies testadas. A vitexina, o tilirosídeo e o Pg-1 conseguiram inibir cepas Gram-negativas como a *K. pneumoniae* e *E. coli*;

- A CBM demonstrou que a vitexina possui efeito bacteriostático para cepas de *K. pneumoniae* e *E. faecalis*, o tilirosídeo apresentou efeito bactericida contra cepa de *K. pneumoniae*, o Pg-1 foi considerado bactericida para as cepas de *E. faecalis* e *E. coli*, e bacterioestático na cepa de *K. pneumoniae*.

Estudo *ex-vivo*

- A genotoxicidade, em modelo *ex-vivo* com células da mucosa oral de humanos, revelou que as substâncias testadas não induziram mutações ou alterações significativas, mesmo em concentrações mais altas (1000 µg/mL).

Dessa forma, a baixa capacidade citotóxica e genotóxica da vitexina, do tilirosídeo e do Pg-1 sugere que a de concentração de 500 µg/mL seja segura para avaliação dos potenciais bioativos destes flavonóides.

7. Referências

7. REFERÊNCIAS

AGUIAR, C. Botânica para Ciências Agrárias e do Ambiente. **Volume I-morfologia e função**. 2012.

AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. **Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 75-81, 2002.

AHMAD, W.; JANTAN, I.; BUKHARI, S. N. *Tinospora crispa* (L.) Hook. F. & Thomson: a review of its ethnobotanical, phytochemical, and pharmacological aspects. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, p. 59, 2016.

AHMED, M. R.; AHMED, S.; SUNNY, S. S. I.; KAE, A.; MAHMUD, S. M.; KABIR, M. H.; MAHMUD, S.; SHAON, S. M. A study on diversity of medicinal plant usage by folk medicinal practitioners in different villages of Dhunatupazila, Bogra District, Bangla. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 6, n. 1, p. 177- 186, 2017.

AKBAR, N.; SIDDIQUI, R.; SAGATHEVAN, K.; IQBAL, M.; KHAN, N. A. Gut bacteria of water monitor lizard (*Varanus salvator*) are a potential source of antibacterial compound (s). **Antibiotics**, v. 8, n. 4, p. 164, 2019.

AL MUQARRABUN, L. M. R.; AHMAT, N. Medicinal uses, phytochemistry and pharmacology of family Sterculiaceae: a review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 92, p. 514-530, 2015.

ALMEIDA, S. Malvaceae, família. **Knook, Enciclopédia Temática**. 2016. Disponível em < <http://knook.net/ciencterravida/biologia/malvaceae-familia/>>. Acesso em 14 nov. 2021.

AMPARO, T. R.; BRAGA, V. C. C.; SEIBERT, J. B.; SOUZA, G. D.; TEIXEIRA, L. F. M. Métodos para *in vitro* da atividade antimicrobiana de plantas medicinais: a necessidade de avaliação da atividade. **Infarma**, v. 30, n. 1, pág. 50-9, 2018.

AN, F.; CAO, X.; QU, H.; WANG, S. Attenuation of oxidative stress of erythrocytes by the plant-derived flavonoids vitexin and apigenin. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 70, n. 11, p. 724-732, 2015.

ANDRADE, T. U.; EWALD, B. T.; FREITAS, P. R.; LENZ, D.; ENDRINGER, D. C. *Pavonia alnifolia* A. St. Hil.: *in vivo* hypotensive effect and *in vitro* ace inhibitory activity. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n.1, p. 124-126, 2012.

ANTONIO, E. L.; NASCIMENTO, A. J. D.; LIMA, A. A. S. D.; LEONART, M. S. S.; FERNANDES, Â. Genotoxicidade e citotoxicidade dos raios x em crianças submetidas à radiografia panorâmica. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 35, p. 296-301, 2017.

ANTUNES, R. M. P.; LIMA, E. D. O.; PEREIRA, M. S.; CAMARA, C. D. A.; ARRUDA, T. A. D.; CATÃO, R. M. R.; SILVA, T. M. S. Atividade antimicrobiana "in vitro" e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos

sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 517-524, 2006.

ARORA, A.; BYREM, T. M.; NAIR, M. G.; STRASBURG, G. M. Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 373, n. 1, p. 102-109, 2000.

ARORA, S.; RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR, K. M. Nanotoxicology and *in vitro* studies: The need of the hour. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 258, n. 2, p. 151-165, 2012.

ASHRAF, A.; SARFRAZ, R. A.; RASHID, M. A.; SHAHID, M. Antioxidant, antimicrobial, antitumor, and cytotoxic activities of an important medicinal plant (*Euphorbia royleana*) from Pakistan. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, n. 1, p. 109-115, 2015.

AUNIQ, R. B. J.; CHY, M. N. U.; ADNAN, M.; ROY, A.; ISLAM, M. A.; KHAN, T. N.; HASAN, M. Z.; AHMED, S.; KHAN, M. F.; ISLAM, N.; KHAN, M. I.; HOSSAIN, M. A.; KABIR, M. A.; MUKUT, M. T. H.; ISLAM S. Assessment of anti-nociceptive and anthelmintic activities of *Vitex Peduncularis* Wall. leaves and *in silico* molecular docking, ADME/T, and PASS prediction studies of its isolated compounds. **Journal of Complementary Medicine Research**, v. 10, n. 4, p. 170-185, 2019.

BALOGUN, S. O.; DAMAZO, A. S.; OLIVEIRA MARTINS, D. T. *Helicteres sacarolha* A. St.-Hil. et al.: gastroprotective and possible mechanism of actions in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 166, p. 176-184, 2015.

BASILE, A.; GIORDANO, S.; LÓPEZ-SÁEZ, J. A.; COBIANCHI, R. C. Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. **Phytochemistry**, v. 52, n. 8, p. 1479-1482, 1999.

BEZERRA, J. W. A.; COSTA, A. R.; DE FREITAS, M. A.; RODRIGUES, F. C.; SOUZA, M. A.; SILVA, A. R. P.; SANTOS, A. T. L.; LINHARES, K. V. A.; COUTINHO, H. D. M.; SILVA, J. R. L. D.; MORAIS-BRAGA, M. F. B. Chemical composition, antimicrobial, modulator and antioxidant activity of essential oil of *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 65, p. 58-64, 2019.

BEZERRA, M. E. C.; MELO, R.; MONTENEGRO, F. Resistência aos antibióticos de uso oral a partir de isolados de urina de pacientes não hospitalizados. **Avanços em Medicina**, p. 96-101, 2021.

BOBROWSKA-HÄGERSTRAND, M.; WRÓBEL, A.; MRÓWCZYŃSKA, L.; SÖDERSTRÖM, T.; SHIRATAKI, Y.; MOTOHASHI, N.; MOLNÁR, J.; MICHALAK, K.; HÄGERSTRAND, H. Flavonoids as inhibitors of MRP1-like efflux activity in human erythrocytes. A structure–activity relationship study. **Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics**, v. 13, n. 11, p. 463-469, 2003.

BOLZANI, V. S. Biodiversidade, bioprospecção e inovação no Brasil. **Ciência e Cultura**,

68, 1, 04-05, 2016.

BONA, E. A. M. D.; PINTO, F. G. D. S.; FRUET, T. K.; JORGE, T. C. M.; MOURA, A. C. D. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, p. 218-225, 2014.

BOUAYED, J.; BOHN, T. Exogenous antioxidants—double-edged swords in cellular redox state: health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 3, n. 4, p. 228-237, 2010.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução (2012). RDC nº 30, de 1º de junho de 2012. Aprova o Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos e dá outras providências. Diário Oficial da União. 4 jun 2012;(Seção 1):83-84.

BUNNAGE, M. E. Getting pharmaceutical R&D back on target. **Nature chemical biology**, v. 7, n. 6, p. 335-339, 2011.

CALCAGNO-PISSARELLI, M. P.; ALONSO-AMELOT, M.; MORA, R.; RODRÍGUEZ, D.; NÚÑEZ, J. L. Á. Foliar exudates of *Blakiella bartsiiifolia* (SF Blake) Cuatrec.(Asteraceae, Astereae). A preliminary study of the chemical composition. **Avances en Química**, v. 5, n. 3, p. 161-166, 2010.

CARIDADE, T.N.S., RUSCELI, D.A., OLIVEIRA, A.N.A., SOUZA, T.S.A., FERREIRA, N.C.F., AVELAR, D.S., TELES, Y.C.F., SILVEIRA, E.R., ARAÚJO, R.M. Chemical composition of four different species of the *Waltheria* genus. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 80, p. 81-83, 2018.

CARRARD, V. C.; FERREIRA, L. A.; LAUXEN, I. D. S.; COSTA, C. H.; RADOS, P. V. Teste dos micronúcleos: Um biomarcador de dano genotóxico em células descamadas da mucosa bucal. **Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre. Porto Alegre**. Vol. 48, n. 1/3 (jan./dez. 2007), p. 77-81, 2007.

CARTAYA, O.; REYNALDO, Inés. Flavonoides: características químicas y aplicaciones. **Cultivos tropicales**, v. 22, n. 2, p. 5-14, 2001.

CARVALHO, P. R. C.; AGUIAR, J. S.; MATIAS, W. N.; GOMES, R. A.; TELES, Y. C. F.; SOUZA, M. F. V.; MEDEIROS, P. L.; SILVA, E. C.; GONÇALVES-SILVA, T.; NASCIMENTO, S. C. *In vitro* and *in vivo* antitumor effects of the flavonol glycosides isolated of *Herissantia crispa* (L.) Brizicky. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.30, n. 2, p.253-257, 2011.

CASIMIRO-JÚNIOR, F.; CHAVES, O. S.; FERNANDES, M. M. M. S.; AGRA, M. DE F.; TELES, Y. C. F.; SOUZA, M. F. V. Substâncias isoladas de *Pavonia cancellata* (L.) (*Malvaceae*). **36 Reunião. da Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**, Águas de Lindoia-SP, 2013

CASTRO, B. G. Prevalência de bactérias Gram-positivas em infecção do trato urinário.

Revista Brasileira de Análises Clínicas, Goiânia, v. 51, n. 4, p. 322-7, 2019.

CERQUEIRA, E. M. M.; GOMES-FILHO, I. S.; TRINDADE, S.; LOPES M. A.; PASSOS, J. S.; MACHADO-SANTELLI, G. M. Genetic damage in exfoliated cells from oral mucosa of individuals exposed to X-rays during panoramic dental radiographies. **Mutation Research**, v. 562, p. 11-117, 2004.

CHAVES, O. S. **Estudo fitoquímico e antimicrobiano de duas espécies de malvaceae: Pavonia malacophylla (Link & Otto) Garcke e Sida rhombifolia L.** 2016. 204p. Tese (Doutorado em Produtos naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba.

CHAVES, O. S.; GOMES, R. A.; TOMAZ, A. C. A.; FERNANDES, M. G.; MENDES JUNIOR, L. G.; AGRA, M. F.; BRAGA, V. A.; SOUZA, M. F. V. Secondary metabolites from *Sida rhombifolia* L. (Malvaceae) and the vasorelaxant activity of Cryptilepinone. **Molecules**, v. 18, n. 1, p. 2769 – 2777, 2013.

CHICARO, P.; PINTO, E.; COLEPICOLO, P.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Flavonoids from *Lychnophora passerina* (Asteraceae): potential antioxidants and UV-protectants. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, n. 3, p. 239-243, 2004.

CLANCY, S. DNA damage & repair: mechanisms for maintaining DNA integrity. **Nature Education**, v. 1, n. 1, p. 103, 2008.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and in experimental animal infections. **Antibiotics in Laboratory Medicine**, v. 3, p. 739-787, 1991.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard M07-A10. Pennsylvania, United States of America: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2015.

COFFEY, A.; JANSEN, M. A. K. Effects of natural solar UV-B radiation on three *Arabidopsis* accessions are strongly affected by seasonal weather conditions. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 134, p. 64-72, 2019.

CORDEIRO, L.; DINIZ-NETO, H.; FIGUEIREDO, P.; SOUZA, H.; SOUSA, A.; ANDRADE-JÚNIOR, F.; MELO, T.; FERREIRA, E.; OLIVEIRA, R.; ATHAYDE-FILHO, P.; BARBOSA-FILHO, J.; OLIVEIRA-FILHO, A.; LIMA, E. Potential of 2-Chloro-N-(4-fluoro-3-nitrophenyl) acetamide against *Klebsiella pneumoniae* and *in vitro* toxicity analysis. **Molecules**, v. 25, n. 17, p. 3959, 2020.

CORRÊA, M.P. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. In: **Dicionário de Plantas úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Imprensa Nacional Brasília, 1984.

CRETTON, S.; DORSAZ, S.; AZZOLLINI, A.; FAVRE-GODAL, Q.; MARCOURT, L.; EBRAHIMI, S. N.; VOINESCO, F.; MICHELLOD, M.; SANGLARD, D.; GINDRO, K.;

- WOLFENDER, J.; CUENDET, M.; CHRISTEN, P. Antifungal quinoline alkaloids from *Waltheria indica*. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 2, p. 300-307, 2016.
- CRUZ, F. R. **Sterculiaceae Vent. no estado de São Paulo**. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) – Instituto de Botânica da Secretária de Estado do Meio Ambiente. São Paulo, SP, 2007.
- CUSHNIE, T. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, n. 5, p. 343-356, 2005.
- DESWAL, D. P.; CHAND, U. Standardization of the tetrazolium test for viability estimation in ricebean (*Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi&ohashi) seeds. **Seed Science and Technology**, v. 25, n. 3, p. 409-417, 1997.
- DRWAL, M. N.; BANERJEE, P.; DUNKEL, M.; WETTIG, M. R.; PREISSNER, R. ProTox: a web server for the *in silico* prediction of rodent oral toxicity. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. W1, p. W53-W58, 2014
- DUARTE, J.; PÉREZ-VIZCAÍNO, F. Protección cardiovascular con flavonoides: enigma farmacocinético. **Ars Pharmaceutica (Internet)**, v. 56, n. 4, p. 193-200, 2015.
- DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELINA, C. Anti-candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 305-311, 2005.
- DUCHOWICZ, P. R.; TALEVI, A.; BELLERA, C.; BRUNO-BLANCH, L. E.; CASTRO, E. A. Application of descriptors based on Lipinski's rules in the QSPR study of aqueous solubilities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 11, p. 3711-3719, 2007.
- ELSHIKH, M.; AHMED, S.; FUNSTON, S.; DUNLOP, P.; MCGAW, M.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. **Biotechnology Letters**, v. 38, n. 6, p. 1015-1019, 2016.
- ERLUND, I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. **Nutrition research**, v. 24, n. 10, p. 851-874, 2004.
- ESTEVEZ, G. L. O gênero *Pavonia* Cav. (Malvaceae) na região Sudeste do Brasil. **Boletim do Instituto de Botânica**, v. 15, p.125-194, 2001.
- ESTRADA-REYES, R.; UBALDO-SUÁREZ, D.; ARAUJO-ESCALONA, A. G. Los flavonoides y el sistema nervioso central. **Salud Mental**, v. 35, n. 5, p. 375-384, 2012.
- EVANS, B. C.; NELSON, C. E.; SHANN, S. Y.; BEAVERS, K. R.; KIM, A. J.; LI, H.; NELSON, H. M.; GIORGIO, T. D.; DUVALL, C. L. *Ex vivo* red blood cell hemolysis assay for the evaluation of pH-responsive endosomolytic agents for cytosolic delivery of biomacromolecular drugs. **Journal of Visualized Experiments**, n. 73, p. e50166, 2013.

FALCÃO-SILVA, V. S.; SILVA, D. A.; SOUZA, M. D. F. V.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P. Modulation of drug resistance in *Staphylococcus aureus* by a kaempferol glycoside from *Herissantia tiubae* (Malvaceae). **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 23, n. 10, p. 1367-1370, 2009.

FALCO, A. Doença de Alzheimer: hipóteses etiológicas e perspectivas de tratamento. **Química Nova**, v. 39, n. 1, p. 63-80, 2016.

FALLER, A. L. K.; FIALHO, E. F. N. U. Polyphenol content and antioxidant capacity in organic and conventional plant foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, n. 6, p. 561-568, 2010.

FATHIMA, A.; RAO, J. R. Selective toxicity of Catechin—a natural flavonoid towards bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 14, p. 6395-6402, 2016.

FERNANDES, D. A.; ASSIS, E. B. D.; SOUZA, M. S. R.; SOUZA, P. I. V. D.; SOUZA, M. D. F. V. D. *Helicteres* L. Species (Malvaceae Sensu Lato) as source of new drugs: a review. **Química Nova**, v. 43, n. 6, p. 787-803, 2020.

FERNANDES, D. A.; BARROS, R. P. C.; TELES, Y. C. F.; OLIVEIRA, L. H. G.; LIMA, J. B.; SCOTTI, M. T.; NUNES, F. C.; CONCEIÇÃO, A. S.; SOUZA, M. D. F. V. Compostos larvicidas extraídos de *Helicteres velutina* K. Schum (Sterculiaceae) avaliados contra *Aedes aegypti* L. **Molecules**, v. 24, n. 12, p. 2315, 2019.

FERNANDES, D. A.; SOUZA, M. S. R.; TELES, Y. C. F.; OLIVEIRA, L. H. G.; LIMA, J. B.; CONCEIÇÃO, A. S.; NUNES, F. C.; SILVA, T. M. S.; SOUZA, M. F. V. New sulphated flavonoid and larvicidal activity of *Helicteres velutina* K. Schum (Sterculiaceae). **Molecules**, 23, 2784, 2018.

FERNANDES, M. M. M. S. **Estudo fitoquímico pioneiro de *Pavonia cancellata* (L.) - Malvaceae**. 2013. 95p. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba.

FERNANDES-JÚNIOR, A. J.; KONNO, T. U. P. Malvaceae do Parque Estadual do Ibitipoca, Estado de Minas Gerais, Brasil. **Hoehnea**, v. 44, n. 4, p. 505-523, 2017.

FERREIRA, M. D. L.; FERNANDES, D. A.; NUNES, F. C.; TELES, Y. C.; ROLIM, Y. M.; SILVA, C. M. D.; ALBUQUERQUE, J. B. L.; AGRA, M. F.; SOUZA, M. D. F. Phytochemical study of *Waltheria viscosissima* and evaluation of its larvicidal activity against *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 5, p. 582-590, 2019.

FERREIRA, V. B.; SILVA, T. T. C.; COUTO, S. R. M.; SRUR, A. U. O. S. Total phenolic compounds and antioxidant activity of organic vegetables consumed in Brazil. **Food and Nutrition Sciences**, v. 6, n. 09, p. 798, 2015.

FERRERA, T. S.; HELDWEIN, A. B.; SANTOS, C. O.; SOMAVILLA, J. C.; SAUTTER, C. K. Substâncias fenólicas, flavonoides e capacidade antioxidante em erveiras sob

diferentes coberturas do solo e sombreamentos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 2, p. 588-596, 2016.

FILHO, A. A. O.; FERNANDES, H. M.; SOUSA, J. P.; GABRIELA, L. A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; OLIVEIRA, T. L. Antibacterial activity of flavonoid 5.7. 4'-trimethoxyflavone isolated from *Praxelis clematides* RM King & Robinson. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 12, n. 4, p. 400-404, 2013.

FINCH, B. E.; MARZOOGHI, S.; DI TORO, D. M.; STUBBLEFIELD, W. A. Phototoxic potential of undispersed and dispersed fresh and weathered Macondo crude oils to Gulf of Mexico marine organisms. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 10, p. 2640-2650, 2017.

FREIRE, I. C. M.; PÉREZ, A. L. A. L.; CARDOSO, A. M. R.; MARIZ, B. A. L. A.; ALMEIDA, L. F. D.; CAVALCANTI, Y. W.; PADILHA, W. W. N. Atividade antibacteriana de óleos essenciais sobre *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 372-377, 2014.

GABRIEL, H. E.; CROTT, J.; GHANDOUR, H.; CHOI S, W.; DALLAL, G.; KEYES, M.; JANG, H.; LIU, Z.; NADEAU, M.; JOHNSTON, A.; MAGER, D.; MASON, J. Chronic cigarette smoking is associated with diminished folate status, altered folate form distribution, and increased genetic damage in the buccal mucosa of healthy adults. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 83, p. 835–841, 2006.

GARCIA, C. M. **Estudo fitoquímico e atividade biológica de *Pavonia distinguenda* A. St.-Hill. et. Naudin e *Dorstenia brasiliensis* Lam.** 2007. 218p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Santa Maria.

GEVRENOVA, R.; BADJAKOV, I.; NIKOLOVA, M.; DOICHINOVA, I. Phenolic derivatives in raspberry (*Rubus* L.) germplasm collection in Bulgaria. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 50, p. 419-427, 2013.

GLISZCZYŃSKA-ŚWIGŁO, A.; KAŁUŻEWICZ, A.; LEMAŃSKA, K.; KNAPLEWSKI, M.; TYRAKOWSKA, B. The effect of solar radiation on the flavonol content in broccoli inflorescence. **Food Chemistry**, v. 100, n. 1, p. 241-245, 2007.

GODINHO, C. S.; DA SILVA, C. M.; MENDES, C. S. O.; FERREIRA, P. R. B.; DE OLIVEIRA, D. A. Estudo fitoquímico de espécies arbóreas do cerrado. **Revista Multitexto**, v. 3, n. 2, p. 64-70, 2016.

GOMES, R. A.; RAMIREZ, R. R. A.; MACIEL, J. K. S.; AGRA, M. F.; SOUZA, M. F. V.; FALCÃO-SILVA, V. S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P. Phenolic compounds from *Sidastrum micranthum* (A. St.-Hil.) fryxell and evaluation of acacetin and 7, 4'-Di-O-methylisoscutearein as motulator of bacterial drug resistance. **Química Nova**, v. 34, n. 8, p. 1385-1388, 2011.

GÓRNIAK, I.; BARTOSZEWSKI, R.; KRÓLICZEWSKI, J. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. **Phytochemistry Reviews**, v. 18, n. 1, p. 241-

272, 2019.

GOTO, T.; HORITA, M.; NAGAI, H.; NAGATOMO, A.; NISHIDA, N.; MATSUURA, Y.; NAGAOKA, S. Tiliroside, a glycosidic flavonoid, inhibits carbohydrate digestion and glucose absorption in the gastrointestinal tract. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 56, n. 3, p. 435-445, 2012.

GREENWELL, M.; RAHMAN, P. K. S. M. Medicinal plants: their use in anticancer treatment. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 6, n. 10, p. 4103, 2015.

GROCHOWSKI, D. M.; LOCATELLI, M.; GRANICA, S.; CACCIAGRANO, F.; TOMCZYK, M. A review on the dietary flavonoid tiliroside. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 5, p. 1395-1421, 2018.

GUALBERTO, F. T. A. **Estudos bibliográfico do gênero Pavoniae fitoquímico de Pavonia malacophylla (Link & Otto) Garke - Malvaceae**. 2013. 60p. Monografia (Graduação em Farmácia)- Universidade Federal da Paraíba

GUERRA, F. Q. S. **Atividade antibacteriana do óleo essencial de Citrus limon frente cepas multidroga resistentes do gênero Acinetobacter**. 2012. 70 p. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, 2012.

GUIDONI, E. B.; TOPOROVSKI, J. Infecção urinária na adolescência. **Jornal de Pediatria**, v. 77, n. 2, p. 165-169, 2001.

GULLÓN, B.; LÚ-CHAU, T. A.; MOREIRA, M. T.; LEMA, J. M.; EIBES, G. Rutin: A review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability. **Trends in food science & technology**, v. 67, p. 220-235, 2017

GUMGUMJEE, N. M.; KHEDR, A.; HAJAR, A. S. Antimicrobial activities and chemical properties of *Tamarindus indica* L. leaves extract. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 32, p. 6172-6181, 2012.

HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques**, v. 11, n. 3, p. 137-147, 2000.

HAFIDH, R. R.; ABDULAMIR, A. S.; VERN, L. S.; BAKAR, F. A.; ABAS, F.; JAHANSHIRI, F.; SEKAWI, Z. Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. **The Open Microbiology Journal**, v. 5, p. 96, 2011.

HAN, N.; GU, Y.; YE, C.; CAO, Y.; LIU, Z.; YIN, J. Antithrombotic activity of fractions and components obtained from raspberry leaves (*Rubus chingii*). **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 181-185, 2012

HANSCH, C.; LEO, A.; MEKAPATI, S. B.; KURUP, A. Qsar and Adme. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 12, p. 3391-3400, 2004.

HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochemical Pharmacology**, v. 32, n. 7, p. 1141-1148, 1983.

HOELZEL, S. C.; VIEIRA, E. R.; GIACOMELLI, S. R.; DALCOL, I. I.; ZANATTA, N.; MOREL, A. F. An unusual quinolinone alkaloid from *Waltheria douradinha*. **Phytochemistry**, v. 66, n. 10, p. 1163-1167, 2005.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HOLLMANN, A.; MARTÍNEZ, M.; NOGUERA, M. E.; AUGUSTO, M. T.; DISALVO, A.; SANTOS, N. C.; SEMORILE, L.; MAFFÍA, P. C. Role of amphipathicity and hydrophobicity in the balance between hemolysis and peptide–membrane interactions of three related antimicrobial peptides. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 141, p. 528-536, 2016.

HOOIJBERG, J. H.; BROXTERMAN, H. J.; HEIJN, M.; FLES, D. L. A.; LANKELMA, J.; PINEDO, H. M. Modulation by (iso) flavonoids of the ATPase activity of the multidrug resistance protein. **Federation of European Biochemical Societies letters**, v. 413, n. 2, p. 344-348, 1997.

HOUGHTON, P. J.; HOWES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 3, p. 391-400, 2007.

HUANG, Y. W.; WU, H. C.; ARONSTAM, R. S. Toxicity of Transition Metal Oxide Nanoparticles: Recent Insights from *in vitro* Studies. **Materials**, v. 3, p. 18, 2010.

HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Flavonóis e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 19, n. 1, p. 97-108, 2008.

INGÓLFSSON, H. I.; THAKUR, P.; HEROLD, K. F.; HOBART, E. A.; RAMSEY, N. B.; PERIOLE, X.; JONG, D. H.; ZWAMA, M.; YILMAZ, D.; HALL, K.; MARETZKY, T.; HEMMINGS JR., H. C.; BLOBEL, C.; MARRINK, S. J.; KOCER, A.; SACK, J. T.; ANDERSEN, O. S. Phytochemicals perturb membranes and promiscuously alter protein function. **America Chemical Society Chemical Biology**, v. 9, n. 8, p. 1788-1798, 2014.

JACKSON, S. P.; BARTEK, J. The DNA-damage response in human biology and disease. **Nature**, v. 461, n. 7267, p. 1071-1078, 2009.

JAHANIANI, F.; EBRAHIMI, S. A.; RAHBAR-ROSHANDEL, N.; MAHMOUDIAN, M. Xanthomicrol is the main cytotoxic component of *Dracocephalum kotschyii* and a potential anti-cancer agent. **Phytochemistry**, v. 66, n. 13, p. 1581-1592, 2005.

JAIN, A.; RANADE, R.; PRITAM, P.; JOSHI, N.; VAVILALA, S. L.; JAIN, A. A comparative study of antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents in different parts of *Helicteres isora* L. **American Journal of Life Sciences**, v. 2, n. 5, p. 292-302, 2014.

JIN, X.; SONG, S.; WANG, J.; ZHANG, Q.; QIU, F.; ZHAO, F. Tiliroside, the major component of *Agrimonia pilosa* Ledeb ethanol extract, inhibits MAPK/JNK/p38-mediated inflammation in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 macrophages. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 12, n. 1, p. 499-505, 2016.

KASSIE, F.; DARROUDI F.; KUNDI, M.; SCHULTE-HERMANN, R.; KNASMULLER, S. Khat (*Catha edulis*) consumption causes genotoxic effects in humans. **International Journal of Cancer**, v. 92, p. 329-332, 2001.

KHAN, A. A.; OMER, K. A.; TALIB, A.; AHMED, H.; JAVED, M. A.; SARMIDI, R. M. Alternativa anticâncer promissora em fitoextratos tropicais verdes. **Arquivos Brasileiros de Biologia e Tecnologia**, v. 59, 2016.

KUBITZKI, K.; BAYER, C. (Ed.). **Flowering Plants·Dicotyledons: Malvales, Capparales and Non-betalain Caryophyllales**. Springer Science & Business Media, 2013.

KUMAR, M. S.; SRIKIRAN CHAKRAVARTHY, S.; BABU, P. R.; RAO, K. V.; REDDY, V. D. Classification of cytochrome P450s in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Systematics and Evolution**, v. 301, n. 1, p. 211-216, 2015.

KUMAR, R.; ROY, I.; OHULCHANSKKY, T. Y.; VATHY, L. A.; BERGEY, E. J.; SAJJAD, M.; PRASAD, P. N. *In vivo* biodistribution and clearance studies using multimodal organically modified silica nanoparticles. **American Chemical Society Nano**, v. 4, n. 2, p. 699-708, 2010.

KUOK, C. F.; HOI, S. O.; HOI, C. F.; CHAN, C. H.; FONG, I. H.; NGOK, C. K.; MENG L. R.; FONG, P. Synergistic antibacterial effects of herbal extracts and antibiotics on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A computational and experimental study. **Experimental Biology and Medicine**, v. 242, n. 7, p. 731-743, 2017.

LEAL, R. S. **Estudos etnofarmacológicos e fitoquímicos espécies medicinais *cleome spinosa* Jacq, *Panovia varians* Moric e *Croton cajuaçara* Benth**. 2018. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

LELIÈVRE, D.; JUSTINE, P.; CHRISTIAENS, F.; BONAVENTURE, N.; COUTET, J.; MARROT, L.; COTOVIO, J. The EpiSkin phototoxicity assay (EPA): development of an *in vitro* tiered strategy using 17 reference chemicals to predict phototoxic potency. **Toxicology In Vitro**, v. 21, n. 6, p. 977-995, 2007.

LI, Z.; ZHANG, H., LI, Y., CHEN, H., WANG, C., WONG, V. K. W.; JIANG, Z.; ZHANG, W. Phytotherapy using blueberry leaf polyphenols to alleviate non-alcoholic

fatty liver disease through improving mitochondrial function and oxidative defense. **Phytomedicine**, p. 153209, 2020.

LILEY, J. B.; MCKENZIE, R. L. Where on Earth has the highest UV. **UV Radiation and its Effects: an update**, v. 68, p. 36-37, 2006.

LIMA, M. M., LÓPEZ, J. A., DAVID, J. M., SILVA, E. P., GIULIETTI, A. M., DE QUEIROZ, L. P., DAVID, J. P. Acetylcholinesterase activity of alkaloids from the leaves of *Waltheria brachypetala*. **Planta Medica**, v. 75, n. 04, p. 335-337, 2009.

LIPINSKI, C. A. L. F. Poor aqueous solubility—an industry wide problem in drug discovery. **American Pharmaceutical Review**, v. 5, n. 3, p. 82-85, 2002.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanceddrug Delivery Reviews**, v. 23, n. 1-3, p. 3-25, 1997.

LOPES, L. G. **Estudo químico de *Pavonia multiflora* A. St-Hil. (Malvaceae), planta endêmica do Espírito Santo**. 2014. 117p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Espírito Santo.

LOPES, N. L.; GRIJALVA, E. P. G.; PEREZ, D. L. A.; HEREDIA, J. B. Flavonoids as cytokine modulators: a possible therapy for inflammation-related diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 6, p. 01-15, 2016.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Mediciniais no Brasil – Nativas e Exóticas**. Nova Odessa – SP, Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, P. 469 – 470, 2002.

LU, Y. H.; CHEN, J.; WEI, D. Z.; WANG, Z. T.; TAO, X. Y. Tyrosinase inhibitory effect and inhibitory mechanism of tiliroside from raspberry. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 5, p. 1154-1160, 2009.

LUCA, V. S.; MIRON, A.; APROTOSOAI, A. C. The antigenotoxic potential of dietary flavonoids. **Phytochemistry Reviews**, v. 15, n. 4, p. 591-625, 2016.

LUCENA, J. A. D. S.; MÉLO GUEDES, J. P. Uso de fitoterápicos na prevenção e no tratamento da hipertensão arterial sistêmica. **Revista Brasileira de Educação e Saúde**, v. 10, n. 1, p. 15-22, 2020.

MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonoides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução (Descontinuado)**, v. 27, n. 1/2, 2008.

MANSUR, J. D. S.; BREDER, M. N. R.; MANSUR, M. C. D. A.; AZULAY, R. D. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **Anais Brasileiros Dermatologia**, p. 121-4, 1986.

MARASCIULO, C.; CAVINATTO, S.; DALCOL, I. I.; MOREL, A. F. **Análises de toxicidade aguda em camundongos e citotoxicidade frente a *Artemia salina* (TSA) de**

Pavonia distinguenda ST. Hill e Naude. In: 29º Reunião da Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia, 2006.

MARQUES, S. D. G.; FERREIRA, M. D. L.; FERNANDES, O. M. S.; AGRA, M. F.; LUNA-FREIRE, K. R.; SOUZA M. F. V. “Substâncias sulfatadas de *Sidastrum paniculatum* (L.) FRYXELL (Malvaceae)”. In: XXV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 06 a 09/09/2018, Centro de Convenções Frei Caneca, São Paulo- SP. **Anais Eletrônicos**.

MARTÍNEZ-FLÓREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J. M.; TUÑÓN, M. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrición Hospitalaria**, v. 17, n. 6, p. 271-278, 2002.

MAZZOTTI, M. R. R. M.; LIMA, J. B.; ARAUJO, T. A.; TELES, Y. C. F.; CONCEIÇÃO, A. S.; SOUZA, M. F. V. S. Constituintes fenólicos de *Pavonia glazioviana* Gürke: estudo fitoquímico pioneiro. In: X Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, Juazeiro – Bahia, 2010. **Anais Eletrônicos**. Bahia, 2010.

MERINO, F. J. Z.; OLIVEIRA, V. B.; PAULA, C. S.; CANSIAN, F. C.; SOUZA, A. M.; ZUCHETTO, M.; HIROTA, B. C. K.; DUARTE, A. F. S.; KULIK, J. D.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Análise fitoquímica, potencial antioxidante e toxicidade do extrato bruto etanólico e das frações da espécie *Senecio westermanii* Dusén frente à *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, n. 4, p. 1031-1040, 2015.

MONTEILLIER, A.; CRETTON, S.; CICLET, O.; MARCOURT, L.; EBRAHIMI, S.N.; CHRISTEN, P.; CUENDET, M. Cancer chemopreventive activity of compounds isolated from *Waltheria indica*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 203, p. 214-225, 2017.

MOREIRA, H. J. C. **Manual de identificação de plantas infestantes: hortifruti** / Henrique José da Costa Moreira, Horlandezan Belirdes Nippes Bragança – São Paulo: FMC Agricultural Products, 2011.

MOSTARDEIRO, C. P.; MOSTARDEIRO, M. A.; MOREL, A. F.; OLIVEIRA, R. M.; MACHADO, A. K.; LEDUR, P.; CADONÁ, F. C.; SILVA, U. F.; CRUZ, I. B. M. The *Pavonia xanthogloea* (Ekman, Malvaceae): Phenolic compounds quantification, anti-oxidant and cytotoxic effect on human lymphocytes cells. **Pharmacognosy Magazine**, v. 10, n. Suppl 3, p. S630, 2014.

MUNHOZ, V. M.; LONNI, A. A. S. G.; MELLO, J. C. P.; LOPES, G. C. Avaliação do fator de proteção solar em fotoprotetores acrescidos com extratos da flora brasileira ricos em substâncias fenólicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 2, 2012.

NIGAM, M.; SAKLANI, S.; PLYGUN, S.; MISHRA, A. P. Antineoplastic potential of the *Vitex* species: An overview. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, v. 17, n. 5, 2018.

NINOMIYA, K.; MATSUDA, H.; KUBO, M.; MORIKAWA, T.; NISHIDA, N.; YOSHIKAWA, M. Potent anti-obese principle from *Rosa canina*: structural requirements

and mode of action of trans-tiliroside. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, n. 11, p. 3059-3064, 2007.

OLIVEIRA FILHO, A. A.; FERNANDES, H. M.; ASSIS, T. J. C.; MEIRELES, D. R.; EDELTRUDES, O.; LIMA, E.; PÊSSOA, H. L. F. Pharmacological and toxicological analysis of flavonoid 5,7,4'-trimethoxyflavone: An *in silico* approach. **International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research**. 7(3); 431-434, 2015.

OLIVEIRA, A. M. F.; PINHEIRO, L. S.; PEREIRA, C. K. S.; MATIAS, W. N.; GOMES, R. A.; CHAVES, O. S.; SOUZA, M. F. V.; ALMEIDA, R. N.; ASSIS, T. S. Total phenolic content and antioxidant activity of some Malvaceae family species. **Antioxidants**, v. 1, n. 1, p. 33-43, 2012.

OLIVEIRA, I. M. A. **Fitoterapia: interações medicamentosas e toxicidadena Farmácia de Oficina**. 2016. 184 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Fernando Pessoa.

OLIVEIRA, M. D. S. **Estudo fitoquímico de *Pavonia glazioviana* Gurke e *Sida rhombifolia* L. (Malvaceae), preparação de derivados de criptolepinona, avaliação antimicrobiana e antioxidante dos compostos obtidos**. 2019. 201 p. Tese (Doutorado em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de Medicamentos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

ÖZÇELİK, B.; ORHAN, I.; TOKER, G. Antiviral and antimicrobial assessment of some selected flavonoids. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 61, n. 9-10, p. 632-638, 2006.

PABÓN-BAQUERO, L. C.; OTÁLVARO-ÁLVAREZ, Á. M.; FERNÁNDEZ, M. R. R.; CHAPARRO-GONZÁLEZ, M. P. Plant extracts as antioxidant additives for food industry. **Antioxidants in Foods and its Applications**, 2018.

PACE-ASCIAK, Cecil R. et al. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 235, n. 2, p. 207-219, 1995.

PACZOSA, M. K.; MECSAS, J. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 3, p. 629-661, 2016

PANDEY, A. K.; KUMAR, S. Perspective on plant products as antimicrobial agents: A review. **Pharmacologia**, v. 4, n. 7, p. 469-480, 2013.

PANIZZI, L.; CAPONI, C.; CATALANO, S.; CIONI, P. L.; MORELLI, I. *In vitro* antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, n. 2, p. 165-168, 2002.

PAUL, S. D.; MAZUMDER, R.; BHATTACHARYA, S.; JHA, A. K. An *ex vivo* study of amphotericin-B nanoparticle for ocular delivery. **British Biomedical Bulletin**, v. 1, n. 2, p. 119-125, 2013.

PERES, W. Radicais Livres em níveis biológicos. **Pelotas: Ed. Universidade Católica de Pelotas**, p. 49-81, 1994.

PETRUSSE, E.; BRAIDOT, E.; ZANCANI, M.; PERESSON, C.; BERTOLINI, A.; PATUI, S.; VIANELLO, A. Plant flavonoids—biosynthesis, transport and involvement in stress responses. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 7, p. 14950-14973, 2013.

PIASECKA, A.; JEDRZEJCZAK - REY, N.; BEDNAREK, P. Secondary metabolites in plant innate immunity: conserved function of divergent chemicals. **New Phytologist**, v. 206, n. 3, p. 948-964, 2015.

PIECZYKOLAN, A.; PIETRZAK, W.; NOWAK, R.; PIELCZYK, J.; ŁAMACZ, K. Optimization of extraction conditions for determination of Tiliroside in *Tilia L.* flowers using an LC-ESI-MS/MS method. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2019, 2019.

POPOVA, L.; KISHKILOVA, D.; HADJIDEKOVA, V. B.; HRISTOVA, R. P.; ATANASOVA, P.; HADJIDEKOVA, V. V.; ZIYA, D.; HADJIDEKOV, V. G. Micronucleus test in buccal epithelium cells from patients subjected to panoramic radiography. **Dentomaxillofacial Radiology**, v. 36, n. 3, p. 168-171, 2007.

RAJALAKSHMI, P.; VADIVEL, V.; SUBASHINI, G.; PUGALENTHI, M. Phytochemical screening and antioxidant activity of *Mahonia leschenaultii* Wall. and *Pavonia odorata* Wild leaves. **International Journal of Advanced Research**, v. 4, n. 5, p. 1751-1757, 2016.

RAKIB, A.; AHMED, S.; ISLAM, M. A.; HAYE, A.; UDDIN, S. N.; UDDIN, M. M. N.; HOSSAIN, M. K.; PAUL, A.; EMRAN, T. B. Antipyretic and hepatoprotective potential of *Tinospora crispa* and investigation of possible lead compounds through *in silico* approaches. **Food Science & Nutrition**, v. 8, n. 1, p. 547-556, 2020.

RANGEL, M.; MALPEZZI, E. L.; SUSINI, S. M.; DE FREITAS, J. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. **Toxicon**, v. 35, p. 305-309, 1997.

RAO, Y. K.; GEETHANGILI, M.; FANG, S. H.; TZENG, Y. M. Antioxidant and cytotoxic activities of naturally occurring phenolic and related compounds: a comparative study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 9, p. 1770-1776, 2007.

REUS, A. A.; USTA, M.; KRUL, C. A. M. The use of *ex vivo* human skin tissue for genotoxicity testing. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 261, n. 2, p. 154-163, 2012.

REYGAERT, W. C. The antimicrobial possibilities of green tea. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 434, 2014.

RODRIGUES DA SILVA, L.; MARTINS, L. D. V.; BANTIM FELICIO CALOU, I.; MEIRELES DE DEUS, M. D. S.; FERREIRA, P. M. P.; PERON, A. P. Flavonoides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico. **Acta Toxicológica Argentina**,

v. 23, n. 1, p. 36-43, 2015.

RODRIGUES, L. S.; DA SILVA, A. R. A.; MACÊDO, A. A. M. Noni (*Morinda citrifolia* Linn.): Determinação fitoquímica e potencial antioxidante pelo método DPPH. **Conexões-Ciência e Tecnologia**, v. 11, n. 4, p. 47-54, 2017

SANTOS, E. A. D.; CARVALHO, C. M. D.; COSTA, A. L.; CONCEIÇÃO, A. S.; MOURA, F. D. B. P.; SANTANA, A. E. G. Bioactivity evaluation of plant extracts used in indigenous medicine against the snail, *Biomphalaria glabrata*, and the larvae of *Aedes aegypti*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

SANTOS, R. B.; VALE, W. F. S.; COSTA, C. L. S. Planejamento estrutural, desenvolvimento e análise de propriedades farmacocinéticas *in silico* de análogos do ácido salicílico para fins cosméticos. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 1, p. 103-112, 2017.

SANTURIO, J. M.; SANTURIO, D. F.; POZZATTI, P.; MORAES, C.; FRANCHIN, P. R.; ALVES, S. H. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, v. 37, p. 803-808, 2007.

SARI, S.; BARUT, B.; ÖZEL, A.; KURUÜZÜM-UZ, A.; ŞÖHRETOĞLU, D. Tyrosinase and α -glucosidase inhibitory potential of compounds isolated from *Quercus coccifera* bark: *in vitro* and *in silico* perspectives. **Bioorganic Chemistry**, v. 86, p. 296-304, 2019.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 275-280, 2004.

SCARPA, E. S.; EMANUELLI, M.; FRATI, A.; POZZI, V.; ANTONINI, E.; DIAMANTINI, G.; DI RUSCIO, G.; SARTINI, D.; ARMENI, T.; PALMA, F.; NINFALI, P. Betacyanins enhance vitexin-2-O-xyloside mediated inhibition of proliferation of T24 bladder cancer cells. **Food & Function**, v. 7, n. 12, p. 4772-4780, 2016.

SELVARAJ, S.; KRISHNASWAMY, S.; DEVASHYA, V.; SETHURAMAN, S.; KRISHNAN, U. M. Influence of membrane lipid composition on flavonoid-membrane interactions: Implications on their biological activity. **Progress in Lipid Research**, v. 58, p. 1-13, 2015.

SEZGIN, Y. The approach to phytotherapy applications: A case report of hyperkalemia. **Acta Endocrinologica (Bucharest)**, v. 16, n. 1, p. 95, 2020.

SILVA, A. L. L.; ARAUJO, M. G. S.; BASTOS, M. L. A.; BERNARDO, T. H. L.; OLIVEIRA, J. F. S.; SILVA JUNIOR, E. F.; SANTOS-JUNIOR, P. F. S.; ARAUJO, M. V.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. X.; VERÍSSIMO, R. C. S. S. Evaluation of antibacterial, cytotoxic, and antioxidant activity of the plant species *Opuntia cochenillifera* (L.) Mill. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1 Suppl. 1, p. 307-315, 2016.

SILVA, C. M. A. **Metabólitos secundários de plantas do semi-árido de Pernambuco uma inovação no controle de fitopatógenos**. 2013. 112 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia) - Universidade Federal de Pernambuco.

SILVA, D. F.; ALBUQUERQUE, A. C. L.; OLIVEIRA LIMA, E.; BAEDER, F. M.; LUNA, A. B. H.; RIBEIRO, E. D.; ROCHA, J. F.; SOARES, M. S. M.; COSTA, L. J.; RODRIGUES, W. C. S. P.; SERRÃO, M. C. P. N.; CARDOSO, A. M. R.; RAMOS, A. E.; MAIA, G. L. A.; FILHO, J. M. B.; FRANÇA, F. M. G.; PERUZZO, D. C.; FILHO, A. A. O.; K. R. Kantovitz. Antimicrobial and anti-adherent potential of the ethanolic extract of *Praxelis clematidea* (Griseb.) RM King & Robinson on pathogens found in the oral cavity. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 10, p. e9189109237-e9189109237, 2020.

SILVA, M. D. S. A.; SILVA, M. A. R.; HIGINO, J. S.; PEREIRA, M. S. V.; CARVALHO, A. D. A. Atividade antimicrobiana e antiaderente *in vitro* do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. sobre bactérias orais planctônicas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 236-40, 2008.

SILVA, M. G.; BILAR, A. B. C.; MENDONÇA PIMENTEL, R. M. Bioma Caatinga sob a perspectiva de estudantes residentes em áreas rurais. **JEAP**, v. 2, n. 2, p. 160-166, 2017.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017, p. 848.

SIMÕES, M. M.; SILVA LEITE, M. F. M.; MARQUES, F. M. C.; SANTOS, B.; MEDEIROS, M. M. A. C.; OLIVEIRA FILHO, A. A. Análise do perfil fitoquímico e da atividade fotoprotetora do extrato aquoso de *Plectranthus ornatus* codd.(boldo chinês). **Revista Brasileira de Educação e Saúde**, v. 10, n. 1, p. 156-161, 2020.

SINGH, M.; GOVINDARAJAN, R.; RAWAT, A. K. S.; KHARE, P. B. Antimicrobial flavonoid rutin from *Pteris vittata* L. against pathogenic gastrointestinal microflora. **American Fern Journal**, v. 98, n. 2, p. 98-103, 2008.

SOUSA GOMES, R. V. R.; VILELA, V. L. R.; NÓBREGA GOMES, E.; MAIA, A. J.; ATHAYDE, A. C. R. Análise fitoquímica de extratos botânicos utilizados no tratamento de helmintoses gastrintestinais de pequenos ruminantes. **Revista Caatinga**, v. 24, n. 4, p. 172-177, 2011.

SOUSA, M. S. B.; VIEIRA, L. M.; SILVA, M. D. J. M. D.; LIMA, A. D. Nutritional characterization and antioxidant compounds in pulp residues of tropical fruits. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 3, p. 554-559, 2011.

SOUZA, C. A. S.; DE ALMEIDA, L. N.; DOS SANTOS CRUZ, E.; SILVA, C. M. L.; JÚNIOR, J. A. C. N.; DA SILVA, F. A.; SERAFINI, M. R. Controle de qualidade físico-químico e caracterização fitoquímica das principais plantas medicinais comercializadas na feira-livre de Lagarto-SE. **Scientia Plena**, v. 13, n. 9, 2017.

SPONCHIADO, G.; ADAM, M. L.; SILVA, C. D.; SOLEY, B. S.; DE MELLO-SAMPAYO, C.; CABRINI, D. A.; CORRER, C. J.; OTUKI, M. F. Quantitative

genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 178, p. 289-296, 2016.

SRINIVAS, N.; SANDEEP, K. S.; ANUSHA, Y.; DEVENDRA, B. N. *In vitro* cytotoxic evaluation and detoxification of monocrotaline (Mct) alkaloid: an *in silico* approach. **International Invention Journal of Biochemistry and Bioinformatics**, v. 2, n. 3, p. 20-29, 2014.

STAHL, W.; ALE-AGHA, N.; POLIDORI, M. C. Non-antioxidant properties of carotenoids. **Biological Chemistry**. v. 383, n.3-4, p. 553-558, 2002.

SUDHA, A.; SRINIVASAN, P. Bioassay-guided isolation and antioxidant evaluation of flavonoid compound from aerial parts of *Lippianodiflora* L. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

SUDHA, A.; SRINIVASAN, P.; KANIMOZHI, V.; PALANIVEL, K.; KADALMANI, B. Antiproliferative and apoptosis-induction studies of 5-hydroxy 3', 4', 7-trimethoxyflavone in human breast cancer cells MCF-7: an *in vitro* and *in silico* approach. **Journal of Receptors and Signal Transduction**, v. 38, n. 3, p. 179-190, 2018.

SWIFT, L. H.; GOLSTEYN, R. M. Genotoxic anti-cancer agents and their relationship to DNA damage, mitosis, and checkpoint adaptation in proliferating cancer cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 3, p. 3403-3431, 2014.

TELES, Y. C. F.; MONTEIRO, R. P.; SILVA OLIVEIRA, M.; RIBEIRO-FILHO, J. O papel do estresse oxidativo na síndrome metabólica. **Journal of the Health Sciences Institute** v. 33, n.1, p. 89-93, 2015.

THOMAS, P.; HARVEY, S.; GRUNER, T.M.; FENECH, M. The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 638, n. 1-2, p. 37-47, 2008.

TIWARU, K. P.; MINOCHA, P.K. Pavophylline, a new saponin from the stem of *Pavonia zeylanica*. **Phytochemistry**. v. 19, n. 4, p.701-704, 1980.

TONIN, L. T. D. **Síntese e avaliação da atividade antiprotozoário, antitumoral e antimicrobiana de 1-fenilsubstituído- β -carbolicinas contendo os grupos n-alquilcarboxamida, 1,2,4-triazol e 1,3,4-tiadiazol na posição-3**. 2009. 234p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Maringá.

TOROPOVA, M. A. Drug metabolism as an object of computational analysis by the Monte Carlo method. **Current Drug Metabolism**, v. 18, n. 12, p. 1123-1131, 2017.

TSIMPLOULI, C.; DEMETZOS, C.; HADZOPOULOU-CLADARAS, M.; PANTAZIS, P.; DIMAS, K. *In vitro* activity of dietary flavonol congeners against human cancer cell lines. **European Journal of Nutrition**, v. 51, n. 2, p. 181-190, 2012.

TSUCHIYA, H. Membrane interactions of phytochemicals as their molecular mechanism

applicable to the discovery of drug leads from plants. **Molecules**, v. 20, n. 10, p. 18923-18966, 2015.

VAHITHA, R.; VENKATACHALAM, M. R.; MURUGAN, K.; JEBANESAN, A. Larvicidal efficacy of *Pavonia zeylanica* L. and *Acacia ferruginea* D. C. against *Culex quinquefasciatus* Say. **Bioresource Technology**, v. 82, p. 203-204, 2002.

VAN GINKEL, G.; SEVANIAN, A. Lipid peroxidation-induced membrane structural alterations. **Methods in Enzymology**, v. 233, p. 273-288, 1994.

VARANDA, E. A.; POZETTI, G. L.; LOURENÇO, M. V.; VILEGAS, W.; RADDI, M. S. G. Genotoxicity of *Brosimum gaudichaudii* measured by the Salmonella/microsome assay and chromosomal aberrations in CHO cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n. 2, p. 257-264, 2002.

VASQUES, C. A. R.; CÔRTEZ, S. F.; MEDEIROS, I. A. Muscarinic agonist proprieties of the hydrobutanol extract from aerial parts of *Waltheria viscosissima* A. St. Hil. (Streculiaceae) in rats. **Phytoterapy Research**. 13, p. 312-317, 1999.

VEBER, D. F.; JOHNSON, S. R.; CHENG, H. Y.; SMITH, B. R.; WARD, K. W.; KOPPLE, K. D. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 2615-2623, 2002.

VELASCO, M. V. R.; BALOGH, T. S.; PEDRIALI, C. A.; SARRUF, F. D.; BABY, A. R. Novas metodologias analíticas para avaliação da eficácia fotoprotetora (*in vitro*)—revisão. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 1, 2011.

VENTURINI, C. L.; MACHO, A.; ARUNACHALAM, K.; ALMEIDA, D. A. T.; ROSA, S. I. G.; PAVAN, E.; BALOGUN, S. O.; DAMAZO, A. S.; MARTINS, D. T. O. Vitexin inhibits inflammation in murine ovalbumin-induced allergic asthma. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 97, p. 143-151, 2018.

VERMA, A.; MASOODI, M.; AHMED, B. Lead finding from whole plant of *Marrubium vulgare* L. with hepatoprotective potentials through *in silico* methods. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 3, p. S1308-S1311, 2012.

VIANA, G. A.; SAMPAIO, C. G.; MARTINS, V. E. P. Produtos naturais de origem vegetal como ferramentas alternativas para o controle larvário de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. **Journal of Health & Biological Sciences**, v. 6, n. 4, p. 449-462, 2018.

WANG, S.; YU, H.; WICKLIFFE, J. K. Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO₂. **Toxicology In Vitro**, v. 25, n. 8, p. 2147-2151, 2011.

XU, Q.; BOYLAN, N. J.; SUK, J. S.; WANG, Y. Y.; NANCE, E. A.; YANG, J. C.; MCDONNELL, P. J.; CONE, R. A.; DUH, E. J.; HANES, J. Nanoparticle diffusion in, and microrheology of, the bovine vitreous *ex vivo*. **Journal of Controlled Release**, v. 167, n. 1, p. 76-84, 2013.

XUE, H. F.; YING, Z. M.; ZHANG, W. J.; MENG, Y. H.; YING, X. X.; KANG, T. G. Hepatic, gastric, and intestinal first-pass effects of vitexin in rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 52, n. 8, p. 967-971, 2014.

YANG, K.; LAMPRECHT, S. A.; LIU, Y.; SHINOZAKI, H.; FAN, K.; LEUNG, D.; NEWMARK, H.; STEELE, V. E.; KELLOFF, G. J.; LIPKIN, M. Chemoprevention studies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxymethane-treated mouse colon. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 9, p. 1655-1660, 2000.

YE, Q.; LIU, K.; SHEN, Q.; LI, Q.; HAO, J.; HAN, F.; JIANG, R. W. Reversal of multidrug resistance in cancer by multi-functional flavonoids. **Frontiers in Oncology**, v. 9, p. 487, 2019.

ZHANG, Q.; FAN, D.; XIONG, B.; KONG, L.; ZHU, X. Isolation of new flavan-3-ol and lignan glucoside from *Loropetalum chinense* and their antimicrobial activities. **Fitoterapia**, v. 90, p. 228-232, 2013.

ZHANG, X.; ZHOU, C.; ZHA, X.; XU, Z.; LI, L.; LIU, Y.; ZHU, B. Apigenin promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells through JNK and p38 MAPK pathways. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 407, n. 1-2, p. 41-50, 2015.

ZHANG, Y. J.; FAN, L. L.; ZHANG, Y. J.; LI, L. J.; DENG, F. M.; TANG, K.; HAN, R. Protective effect of total flavonoids of *Nitraria tangutorun* Bobr. against vascular endothelial cells injury induced by hydrogen peroxide. **Lishizhen Medicene and Materia Medica Research**, v. 20, p. 562-564, 2009.

ZHOU, Y.; LIU, Y. E.; CAO, J.; ZENG, G.; SHEN, C.; LI, Y.; ZHOU, M.; CHEN, Y.; PU, W.; POTTERS, L.; SHI, Y. E. Vitexins, nature-derived lignan compounds, induce apoptosis and suppress tumor growth. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 16, p. 5161-5169, 2009.

8. News

8.1 Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, CITOTÓXICA E MUTAGÊNICA DE PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS

Pesquisador: ALESON PEREIRA DE SOUSA

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 20419319.5.0000.5181

Instituição Proponente:

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.653.358

Apresentação do Projeto:

INTRODUÇÃO

Inúmeras doenças microbianas de origens bacteriana, viral ou fúngica são relatadas na literatura. Em muitos casos, os responsáveis pelas infecções adquirem resistência ao medicamento utilizado, e por isso grande número de antimicrobianos tem sido desenvolvido pela indústria farmacêutica (KUBO et al., 1993; KOSHI; CHERIAN, 1995; DEUS et al., 2011).

Para que um produto, seja ele natural ou sintético, venha se tornar um medicamento seguro e eficaz, é necessário a realização de estudos toxicológicos para determinação de padrões de segurança que devem ser determinados antes da utilização do medicamento na clínica. Dessa forma, o estudo da toxicologia de um produto é de grande valia, pois permite a caracterização dos efeitos deletérios das drogas ocorridos a partir da sua administração, contribuindo para decidir se um produto deve ser adotado ou não para uso clínico (SARAIVA et al., 2012).

Um dos modelos experimentais utilizados para avaliação da toxicidade in vitro é o ensaio de citotoxicidade em eritrócitos. Esse teste é usado como método de triagem para toxicidade de novas drogas objetivando estimar o dano que elas podem produzir in vivo em eritrócitos do organismo (SCHREIER et al., 1997; APARICIO et al., 2005).

A genotoxicidade é a área da genética que estuda os efeitos de determinadas substâncias sobre a

Endereço: Rua Horácio Nóbrega S/N
Bairro: Belo Horizonte CEP: 58.704-000
UF: PB Município: PATOS
Telefone: (83)3421-7300 Fax: (83)3421-4047 E-mail: cep@fiponline.edu.br



COMITÊ DE ÉTICA
EM PESQUISA
FACULDADES INTEGRADAS DE PATOS

FACULDADES INTEGRADAS DE PATOS - FIP



Continuação do Parecer: 3.653.358

estrutura do DNA, que pode resultar em um processo denominado mutagênese. Neste sentido, os agentes que alteram a sequência do DNA são considerados “tóxicos” para os genes e são, então, chamados de genotóxicos (SILVA et al., 2003). Assim, as pesquisas sobre genotoxicidade podem também comprovar o efeito anticarcinogênico de algumas substâncias (PAOLINI, 2003).

Dessa forma, este projeto objetiva-se avaliar o potencial antimicrobiano e citotóxico das amidas sintéticas N-(4-flúor-3-nitrofenil) acetamida, 2-Cloro-N-(4-flúor-3-nitrofenil) acetamida, 2-Bromo-N-(4-flúor-3-nitrofenil) acetamida, 2-Bromo-N- fenilacetamida, 2-cloroN-fenilacetamida; híbridos moleculares do Triclosan: (5-cloro-2-(2,4- iclorofenoxi)fenil-2- acetoxibenzoato, 5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenil-2-(3-benzoilfenil)propanoato, 5-cloro-2- (2,4-diclorofenoxi)fenil-2-(4-obutifenil)propanoato); os isômeros R - (+)--citronelol e S - (-) -citronelol, dos óleos essenciais de Eucalyptus citriodora, Eucalyptus globulus, Lúpulo Columbus, extratos de Hordeum vulgare, Spondias mombin, Tracheophyta e Urtica dioica L. e os flavonoides Vitexina, Tilirosídeo e Trimetoxiflavona, para contribuir com a descoberta de novas drogas com potencial farmacológico promissor.

HIPÓTESES

As substâncias em estudo possuem atividade antimicrobiana frente aos microrganismos de interesse clínico desse estudo, bem como possuem atividade antioxidante e toxicidade reduzida. As atividades biológicas envolvendo as substâncias em estudo não foram ainda investigadas detalhadamente em relação à sua capacidade antibacteriana e antifúngica. Este trabalho propõe-se a investigar a hipótese de que estas substâncias podem desempenhar ação antimicrobiana frente aos microrganismos de interesse clínico. Também será testada a hipótese de que estas substâncias isoladas apresentem efeito oxidante, hemolítico e potencial mutagênico reduzido.

METODOLOGIA

Os ensaios laboratoriais referentes ao estudo da atividade antibacteriana serão realizados no Laboratório de Pesquisa de Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e/ou Sintéticos Bioativos, localizado no Centro de Ciências da Saúde (CCS) do Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) / João Pessoa - PB, sob coordenação da Prof.^a Dr.^a Edeltrudes de Oliveira Lima. Os microrganismos utilizados nos ensaios serão isolados, identificadas quanto à espécie e analisados sobre os seus perfis de resistência antibiótica.

Os ensaios toxicológicos e da avaliação da atividade antioxidante das substâncias serão realizados no Laboratório de Bioquímica da Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas, localizado no Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina

Endereço: Rua Horácio Nóbrega S/N

Bairro: Belo Horizonte

CEP: 58.704-000

UF: PB

Município: PATOS

Telefone: (83)3421-7300

Fax: (83)3421-4047

E-mail: cep@fiponline.edu.br



COMITÉ DE ÉTICA
EM PESQUISA
FACULDADES INTEGRADAS DE PATOS

FACULDADES INTEGRADAS DE PATOS - FIP



Continuação do Parecer: 3.653.358

Grande (UFCG) / Patos – PB, sob coordenação do Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho.

Objetivo da Pesquisa:

Investigar o potencial antimicrobiano e a toxicidade in vitro das amidas sintéticas N-(4-flúor-3-nitrofenil) acetamida, 2-Cloro-N-(4-flúor-3-nitrofenil) acetamida, 2-Bromo-N-(4- flúor-3-nitrofenil) acetamida, 2-Bromo-N- fenilacetamida, 2-cloro-N-fenilacetamida; híbridos moleculares do Triclosan: (5-cloro -2-(2,4-diclorofenoxi)fenil-2- cetoxibenzoato, 5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenil-2-(3-benzoilfenil)propanoato, 5-cloro-2-(2,4- iclorofenoxi)fenil-2-(4-isobutifenil)propanoato); os isômeros R - (+)--citronelol e S - (-) -citronelol, dos óleos essenciais de Eucalyptus citriodora, Eucalyptus globulus, Lúpulo Columbus, extratos de Hordeum vulgare, Spondias mombin, Tracheophyta e Urtica dioica L. e os flavonoides Vitexina, Tilirosídeo e Trimetoxiflavona.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e os benefícios foram descritos conforme a Resolução 466/2012 do CNS/MS.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Verifica-se direcionamento metodológico adequado à realização de um trabalho com relevância acadêmica, científica e social.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os Termos foram apresentados de acordo com a Norma Operacional 001/2013 do CNS/MS.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Cumpridas as pendências lançadas no parecer anterior, nos posicionamos de maneira FAVORÁVEL à realização do estudo.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este documento tem validade de CERTIDÃO DE APROVAÇÃO para coleta dos dados propostos ao estudo. Destacamos que a CERTIDÃO PARA PUBLICAÇÃO só será emitida após o envio do RELATÓRIO FINAL do estudo proposto, via Plataforma Brasil.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_144908	14/10/2019		Aceito

Endereço: Rua Horácio Nóbrega S/N
Bairro: Belo Horizonte CEP: 58.704-000
UF: PB Município: PATOS
Telefone: (83)3421-7300 Fax: (83)3421-4047 E-mail: cep@fiponline.edu.br



COMITÉ DE ÉTICA
EM PESQUISA
FACULDADES INTEGRADAS DE PATOS

FACULDADES INTEGRADAS DE PATOS - FIP



Continuação do Parecer: 3.653.358

Básicas do Projeto	_E1.pdf	20:53:22		Aceito
Outros	PROJETOEMENDA.pdf	14/10/2019 20:49:58	ALESON PEREIRA DE SOUSA	Aceito
Outros	Emenda.pdf	14/10/2019 20:46:41	ALESON PEREIRA DE SOUSA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	01/10/2019 17:33:48	ALESON PEREIRA DE SOUSA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	01/10/2019 17:33:19	ALESON PEREIRA DE SOUSA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CARTAUFCG.pdf	09/09/2019 21:12:28	ALESON PEREIRA DE SOUSA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CARTAUFPB.pdf	09/09/2019 21:12:12	ALESON PEREIRA DE SOUSA	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	TERMOCONFIDENCIALIDADE.pdf	09/09/2019 21:11:36	ALESON PEREIRA DE SOUSA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TERMOPESQUISADOR.pdf	09/09/2019 21:11:12	ALESON PEREIRA DE SOUSA	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	09/09/2019 21:10:26	ALESON PEREIRA DE SOUSA	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	09/09/2019 21:07:22	ALESON PEREIRA DE SOUSA	Aceito
Folha de Rosto	Scan0080.pdf	05/09/2019 17:45:27	ALESON PEREIRA DE SOUSA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PATOS, 21 de Outubro de 2019

Assinado por:
Lídia Pinheiro da Nóbrega
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Horácio Nóbrega S/N
Bairro: Belo Horizonte CEP: 58.704-000
UF: PB Município: PATOS
Telefone: (83)3421-7300 Fax: (83)3421-4047 E-mail: cep@fiponline.edu.br

8.2 Anexo 2 – Accepted paper: *Scientific Electronic Archives*

Sousa et al. Properties of vitexin, tiliroside and 5,7-dihydroxy-3,8,4'-trimethoxy flavonoids in the treatment of diseases of the female reproductive system: an *in silico* approach

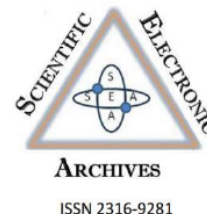
Scientific Electronic Archives

Issue ID: Sci. Elec. Arch. Vol. 13 (3)

March 2021

DOI: <http://dx.doi.org/10.36560/14320211313>

Article link: <https://sea.ufr.edu.br/SEA/article/view/1313>



Properties of vitexin, tiliroside and 5,7-dihydroxy-3,8,4'-trimethoxy flavonoids in the treatment of diseases of the female reproductive system: an *in silico* approach

Aleson Pereira de Sousa

Universidade Federal da Paraíba
aleson_155@hotmail.com

Micaelly da Silva Oliveira

Universidade Federal da Paraíba

Diégina Araújo Fernandes

Universidade Federal da Paraíba

Maria Denise Leite Ferreira

Universidade Federal da Paraíba

Laísa Vilar Cordeiro

Universidade Federal da Paraíba

Helivaldo Diógenes da Silva Souza

Universidade Federal da Paraíba

Maria de Fátima Vanderlei de Souza

Universidade Federal da Paraíba

Hilzeth de Luna Freire Pessoa

Universidade Federal da Paraíba

Abrahão Alves de Oliveira Filho

Universidade Federal de Campina Grande

Rita de Cássia da Silveira e Sá

Universidade Federal da Paraíba

Abstract. Problems in the female reproductive system appear at the beginning of the reproductive cycle and persist until hormonal regulation in menopause. The drug therapies currently used can cause intolerance and susceptibility to other diseases, making it important to search for alternative therapeutic approaches that can be adopted during your reproductive life. Women use several species of plants to treat reproductive disorders. Some species are rich in bioactive molecules, such as flavonoids. The present study evaluated the bioactive *in silico* profile of three flavonoids: tyroside (Kaempferol-3-O- β -D-(6''-Ep-coumaryl) glucopyranoside), Pg-1 (5,7-dihydroxy-3,8, 4'-trimethoxy) and vitexin (5,7,4'-trihydroxyflavone-8-

8.3 Anexo 3 – Accepted paper: *Archives of Health Investigations*

Arch Health Invest (2021) 10(3):373-376
http://dx.doi.org/10.21270/archi.v10i3.5195

© 2021 - ISSN 2317-3009

Artigo de Revisão

Potencial bioativo dos flavonoides vitexina, tilirosídeo e 5,7-dihidroxi-3,8,4'-trimetoxi no tratamento de doenças crônicas e neoplasias do sistema gastrointestinal e excretor

Properties of the flavonoids vitexin, tiliroside and 5,7-dihydroxy-3,8,4' trimethoxy in the treatment of chronic diseases and neoplasia of the gastrointestinal and excretory systems

Propiedades de los flavonoides vitexina, tilirosídeo y 5,7-dihidroxi-3,8,4' trimetoxi en el tratamiento de enfermedades crónicas y neoplasias de los sistemas gastrointestinal y excretorio

Aleson Pereira de SOUSA¹
Diégina Araújo FERNANDES²
Maria Denise Leite FERREIRA²
Laisa Vilar CORDEIRO²
Helivaldo Diógenes da Silva SOUZA²
Maria de Fátima Vanderlei de SOUZA²
Hilzeth de Luna Freire PESSOA²
Abrahão Alves de OLIVEIRA FILHO³

Rita de Cássia da Silveira e SÁ¹

¹Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, Universidade Federal da Paraíba (DITM/UFPB) 58051-970 - João Pessoa - PB, Brasil

²Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, 58033-455, João Pessoa-PB, Brasil

³Professor Doutor, Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande - UFCG 58428-830 Campina Grande - PB, Brasil

Resumo

As doenças crônicas representam o principal grupo de doenças com elevados índices de mortalidade. Dessa forma, a utilização de plantas medicinais por adultos no tratamento de enfermidades ou amenização de seus sintomas é uma prática alternativa que vem sendo adotada mundialmente. O avanço científico e a modernização contribuem substancialmente para descoberta de substâncias naturais para produção de novos fármacos, com uma grande possibilidade de terem menor grau de toxicidade. Algumas dessas plantas são ricas em moléculas dotadas de potencial biotecnológico, como os flavonoides. O presente estudo avaliou o perfil bioativo *in silico* de três flavonoides: tilirosídeo (Kaempferol-3-O-β-D-(6"-Ep-coumaril) glucopiranosídeo), Pg-1 (5,7-dihidroxi-3,8,4'-trimetoxi) e vitexina (5,7,4'-trihidroxiflavona-8-C-β-glucopiranosídeo). Foi abordada a ação preditiva antineoplásica em órgãos do sistema gastrointestinal e urinário e a atividade protetora contra doenças crônicas (diabetes, hipertensão, catarata, osteoporose, hipercolesterolemia, disfunção de tireoide e doenças renais). O estudo demonstrou que a vitexina apresentou efeito antidiabetes (tipo II) e antihipercolesterolemia; o tilirosídeo, atividade antidiabetes (tipo I), antihipercolesterolemia, antihipóxico, antinefrítico e antiosteoporótico, e o Pg-1, ação anticatarata, anti-hipertensiva e antitireoideana. A avaliação da probabilidade do potencial antineoplásico mostrou que a vitexina possui melhor potencial anticâncer no pâncreas, estômago, bexiga e rim, e efeito anti-*Helicobacter pylori*. O Pg-1 apresentou maior atividade anticâncer no cólon e na região cólon-retal. O tilirosídeo, apesar de exibir menor efeito em relação às demais substâncias, evidenciou atividade satisfatória anticâncer pancreática e cólon-retal. Portanto, estas moléculas podem tornar-se importantes candidatas a fármacos naturais como recurso terapêutico de combate a doenças crônicas e ao câncer do sistema gastrointestinal e urinário.

Descritores: Produtos Naturais; Simulação por Computador; Doença Crônica.

Abstract

The chronic diseases represent the main group of diseases with high mortality rates. Thus, the use of medicinal plants to treat different ailments or to ameliorate their symptoms by the adult population is an alternative practice that is being used worldwide. Scientific advances and modernization contribute substantially to the discovery of natural substances for the production of new drugs with a possible low toxicity risk. Some of these plants are rich in molecules with biotechnological potential, such as flavonoids. The present study evaluated the *in silico* bioactive profile of three flavonoids: tiliroside (Kaempferol-3-O-β-D-(6"-Ep-coumaril) glucopyranoside), Pg-1 (5,7-dihydroxy-3,8,4'-trimethoxy) and vitexin (5,7,4'-trihydroxyflavone-8-C-β-glucopyranoside). The antineoplastic predictive action on organs of the gastrointestinal and urinary systems and the protective activity against chronic diseases (diabetes, hypertension, cataracts, osteoporosis, hypercholesterolemia, thyroid dysfunction and kidney diseases) were addressed. The study demonstrated that vitexin had anti-diabetes (type II) and anti-hypercholesterolemia action; tiliroside exhibited antidiabetes (type I), antihypercholesterolemia, antihypoxic, antinephritic and antiosteoporotic activity, and Pg-1 showed anti-cataract, anti-hypertensive and anti-thyroid effect. The evaluation of the probability of the antineoplastic potential demonstrated that vitexin has a better anticancer potential in the pancreas, stomach, bladder and kidney in addition to anti-*Helicobacter pylori* effect. Pg-1 showed higher activity against colon and colorectal cancer. Tiliroside, despite exhibiting lower effect than the other substances, displayed satisfactory pancreatic and colorectal anticancer activity. Therefore, these molecules are possible important new drug candidates from natural products as a therapeutic resource against chronic diseases and the gastrointestinal and urinary systems cancers.

Descriptors: Biological Products; Computer Simulation; Chronic Disease.

Resumen

Las enfermedades crónicas representan el principal grupo de enfermedades con altas tasas de mortalidad. Así, el uso de plantas medicinales por parte de adultos en el tratamiento de enfermedades o el alivio de sus síntomas es una práctica alternativa que se ha adoptado a nivel mundial. Los avances científicos y la modernización contribuyen sustancialmente al descubrimiento de sustancias naturales para la producción de nuevos fármacos, con una gran posibilidad de tener un menor grado de toxicidad. Algunas de estas plantas son ricas en moléculas con potencial biotecnológico, como los flavonoides. El presente estudio evaluó el perfil bioactivo *in silico* de tres flavonoides: tilirosida (Kaempferol-3-O-β-D-(6"-Ep-coumaril) glucopiranosídeo), Pg-1 (5,7-dihidroxi-3,8, 4'-trimetoxi) y vitexina (5,7,4'-trihidroxiflavona-8-C-β-glucopiranosídeo). Se abordó la acción predictiva antineoplásica sobre órganos del aparato gastrointestinal y urinario y la actividad protectora frente a enfermedades crónicas (diabetes, hipertensión, cataratas, osteoporosis, hipercolesterolemia, disfunción tiroidea y enfermedades renales). El estudio demostró que la vitexina tenía un efecto anti-diabetes (tipo II) y anti-hipercolesterolemia; tilirosida, actividad antidiabética (tipo I), antihipercolesterolemia, antihipóxica, antinefrítica y antiosteoporótica, y Pg-1, anti-catarata, antihipertensiva y anti-tiroidea. La evaluación de la probabilidad del potencial antineoplásico mostró que la vitexina tiene un mejor potencial anticancerígeno en el páncreas, estómago, vejiga y riñón, y tiene un efecto anti-*Helicobacter pylori*. Pg-1 mostró una mayor actividad anticancerígena en el colon y en la región colon-rectal. La tilirosida, a pesar de mostrar menos efecto que otras sustancias, mostró una actividad anticancerígena pancreática y colon-rectal satisfactoria. Por tanto, estas moléculas pueden convertirse en importantes candidatas a fármacos naturales como recurso terapéutico para combatir enfermedades crónicas y el cáncer de los sistemas gastrointestinal y urinario.

Descritores: Productos Biológicos; Simulación por Computador; Enfermedad Crónica.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas houve uma mudança epidemiológica no padrão de morbimortalidade da população mundial, com o

aumento da carga de mortalidade por doenças crônicas em comparação às doenças infecciosas¹. As neoplasias, as doenças



Avaliação *in silico* e *in vitro* dos flavonoides vitexina, tilirosideo e 5,7-dihidroxi-3,8,4'-trimetoxi: Avaliação do FPS e predição da atividade anti câncer

In silico and *in vitro* evaluation of vitexin, tiliroside and 5,7-dihydroxy-3,8,4'-trimethoxy flavonoids: FPS evaluation and prediction of anti cancer activity

A. P. de Sousa^{1*}; M. K. dos S. Nunes¹; M. da S. Oliveira¹; D. A. Fernandes²; M. D. L. Ferreira²; L. V. Cordeiro²; H. D. da Silva Souza³; M. de F. V. de Souza²; H. de L. F. Pessoa¹; A. A. de Oliveira Filho⁴; R. de C. da Silveira e Sá¹

¹Departamento de Fisiologia e Patologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, 58033-455, João Pessoa-PB, Brasil

²Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, 58033-455, João Pessoa-PB, Brasil

³Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, 58033-455, João Pessoa-PB, Brasil

⁴Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, 58708-110, Patos-PB, Brasil

*aleson_155@hotmail.com

(Recebido em 03 de novembro de 2020; aceito em 15 de dezembro de 2020)

Os produtos naturais têm sido utilizados para combater os crescentes efeitos danosos causados pela exposição solar, adicionando fórmulas químicas a compostos ou substâncias naturais para potencializar o efeito protetor na pele. Através de análises *in silico* e *in vitro*, o presente estudo avaliou o efeito farmacológico contra o câncer de pele e o fator de proteção solar de três flavonoides: Hv-1 (Kaempferol-3-O-β-D-(6"-Ep-coumaril) glucopiranosideo), Pg-1 (5,7-dihidroxi-3,8,4'-trimetoxi) e Wv-1 (5,7,4'-trihidroxi-flavona-8-C-β-glucopiranosideo), bem como seus respectivos compostos naturais (extratos etanólicos brutos – EEBs e frações diclorometano/clorofórmio – FC/FD), oriundos de processos de extração em espécies da família Malvaceae. Os resultados da análise *in silico* demonstraram que o Pg-1 possui maior probabilidade de potencial antineoplásico para o tratamento do sarcoma, do carcinoma, do melanoma e do câncer de células escamosas, enquanto o Hv-1 apresenta efeito antineoplásico no combate ao melanoma e ao câncer nas células escamosas. O Wv-1 apresentou baixa ativação antineoplásica em neoplasias do sistema tegumentar. A análise *in vitro* revelou que os compostos dos EEBsHv e FDHv, e as frações (FCWv, FDHv e FCPg) tiveram elevado fator de proteção solar (25,01_{FPS}). O estudo das substâncias isoladas mostrou que o Wv-1 não produziu efeito protetor significativo no espectro UVB, contudo o Hv-1 e o Pg-1 apresentaram efeitos semelhantes, com alto nível de proteção (25,01_{FPS}). Os dados indicam que os compostos analisados poderiam tornar-se alternativas terapêuticas como fitoterápicos e as moléculas isoladas, candidatas promissoras a fitofármacos com efeito fotoprotetor e atividade anticâncer no sistema tegumentar.

Palavras-chave: produtos naturais, antineoplásico, fator de proteção solar

Natural products have been used to combat the increasing damaging effects of sun exposure with the addition of chemical formulas to natural compounds or substances to enhance the protective effect on the skin. Using *in silico* and *in vitro* analyzes, the present study evaluated the pharmacological effect on the treatment of skin cancer and the solar protection factor of three flavonoids: Hv-1 (Kaempferol-3-O-β-D-(6"-Ep-coumaril) glucopyranoside), Pg-1 (5,7-dihydroxy-3,8,4'-trimethoxy) and Wv-1 (5,7,4'-trihydroxyflavone-8-C-β-glucopyranoside) as well as their respective natural compounds (crude ethanolic extracts - CEEs and dichloromethane/chloroform fractions - DF/CF) obtained by extraction processes from species of the Malvaceae family. The results of the *in silico* analysis demonstrated that Pg-1 has greater probability in the antineoplastic potential against sarcoma, carcinoma, melanoma and squamous cell cancer, while Hv-1 exhibited an antineoplastic effect against melanoma and squamous cells cancer. Wv-1 showed low antineoplastic activation against neoplasms of the integumentary system. The *in vitro* analysis revealed that the CEEsHv and DFHv compounds and the fractions (CFWv, DFHv and CFPg) displayed high solar protection factor (25.01_{SPF}). The analysis of the isolated substances showed that Wv-1 did not produce a significant protective effect on the UVB spectrum; however Hv-1 and Pg-1 presented similar effects with a

8.5 Anexo 5 – Accepted paper: *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* (*Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*)











ISSN 2179-443X



ORIGINAL ARTICLE

In silico, in vitro and ex-vivo Toxicological Profiling of 5,7,4'-Trihydroxyflavone-8-C- β -Glucopyranoside - Vitexin

Aleson Pereira de Sousa^{1,4} * , Maria Denise Leite Ferreira² , Diégina Araújo Fernandes² , Laísa Vilar Cordeiro² , Maria de Fátima Vanderlei de Souza^{1,2} , Hilzeth de Luna Freire Pessoa^{1,2} , Abrahão Alves de Oliveira Filho³ , Rita de Cássia da Silveira e Sá^{1,4} 

¹Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de Medicamentos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil

²Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil

³Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, Brasil

⁴Departamento de Fisiologia e Patologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil

*Corresponding author: aleson_155@hotmail.com

Abstract

This study aimed to evaluate the *in silico*, *in vitro*, and *ex-vivo* toxicity of vitexin, the flavonoid 5,7,4'-trihydroxyflavone-8-C- β -glucopyranoside from *Waltheria viscosissima*. The chemical structure and predicted bioactive properties were also *in silico* analyzed. The *in vitro* and *ex-vivo* assays were performed according to the Ethics Code of the World Medical Association and were approved by the Ethics Committee of University Center of Patos (protocol number: 3.621.284). *In silico* analysis suggested that the molecule presents good oral bioavailability and good absorption; penetrating biological membranes. The toxicity tests revealed the potential effectiveness of the molecule in cellular protection against free radicals, in addition to possible antimutagenic, anticarcinogenic, antioxidant, antineoplastic, anti-inflammatory, anti-hemorrhagic and apoptosis agonist activity. Hemolytic and genotoxic assessment detected low hemolysis rates in human red blood cells and no cellular toxicity against oral mucosa cells. The data suggest that vitexin is a safe molecule for possible therapeutic application and its toxicity profile indicates viability for future studies.

Keywords: Hemolytic. Genotoxicity. Toxicity. *Waltheria viscosissima*.

How to cite

Sousa AP, Ferreira MDL, Fernandes DA, Cordeiro LV, Souza MFV, Pessoa HLF, Oliveira Filho AA, Silveira e Sá RC. In silico, in vitro and ex-vivo Toxicological Profiling of 5,7,4'-Trihydroxyflavone-8-C- β -Glucopyranoside - Vitexin. Rev Ciênc Farm Básica Apl. 2021;42:e709. <https://doi.org/10.4322/2179-443X.0709>

INTRODUCTION

The development of medicines originating from naturally-derived products involves study of a wide variety of plant species, identifying their constituents (phytochemistry), and analyzing the bioactive efficacy of the isolated substances through their interactions with target molecules, to elucidate possible pharmacological mechanisms (Monks et al., 2002).

Financial support: APS, CAPES for financial support and the PhD scholarship; DAF, CAPES for financial support and the PhD scholarship; LVC, CAPES for financial support and the PhD scholarship.

Conflicts of interest: The authors declare no conflict of interest.

Received on October 09 2020. Accepted on December 04, 2020.



Copyright © Sousa et al. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Rev Ciênc Farm Básica Apl. 2021;42:e709 | <https://doi.org/10.4322/2179-443X.0709>

1/9

Original Article

Analysis of the toxicological and pharmacokinetic profile of Kaempferol-3-O- β -D-(6''-E-p-coumaryl) glucopyranoside - Tiliroside: *in silico*, *in vitro* and *ex vivo* assay

Análise do perfil toxicológico e farmacocinético de Kaempferol-3-O- β -D-(6''-E-p-cumaril) glucopiranosídeo - Tilirosídeo: ensaio *in silico*, *in vitro* e *ex vivo*

A. P. Sousa^{a*}, D. A. Fernandes^b, M. D. L. Ferreira^c, L. V. Cordeiro^b, M. F. V. Souza^{a,b}, H. L. F. Pessoa^a, A. A. Oliveira Filho^a and R. C. S. Sá^a

^aUniversidade Federal do Paraíba – UFPB, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Fisiologia e Patologia, Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de Medicamentos, João Pessoa, PB, Brazil

^bUniversidade Federal do Paraíba – UFPB, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, João Pessoa, PB, Brazil

^cUniversidade Federal de Campina Grande – UFCG, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Patos, PB, Brazil

Abstract

Tiliroside is a glycosidic flavonoid present in many plants species including *Helicteres velutina* K. Schum (Malvaceae sensu lato), commonly known in Brazil as "pitó". This molecule has been shown to have many biological activities, however no study has been carried out to investigate the toxicity of this substance. The present work aimed to evaluate the possible cellular toxicity *in silico*, *in vitro* and *ex vivo* of the kaempferol-3-O- β -D-(6''-E-p-coumaryl) glucopyranoside (tiliroside), through chemical structure analysis, toxicity assessment and predictive bioactive properties, using human samples for *in vitro* and *ex vivo* tests. The *in silico* analysis suggests that tiliroside exhibited great absorption index when penetrating biological membranes. In addition, it also displayed considerable potential for cellular protection against free radicals, and anticarcinogenic, antioxidant, antineoplastic, anti-inflammatory, anti-hemorrhagic and antithrombotic activities. The assessment of the hemolytic and genotoxic effects of tiliroside showed low hemolysis rates in red blood cells and absence of cellular toxicity in the oral mucosa cells. The data obtained indicate that this molecule could be a promising therapeutic approach as a possible new drug with biotechnological potential.

Keywords: hemolytic, genotoxicity, toxicity, *Helicteres velutina*.

Resumo

O tilirosídeo é um flavonóide glicosídico presente em muitas espécies de plantas, incluindo *Helicteres velutina* K. Schum (Malvaceae sensu lato), conhecida no Brasil como "pitó". Esta molécula mostrou ter muitas atividades biológicas, porém nenhum estudo foi realizado para investigar a toxicidade dessa substância. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a possível toxicidade celular *in silico*, *in vitro* e *ex vivo* do kaempferol-3-O- β -D-(6''-E-p-coumaril) glucopiranosídeo (tilirosídeo), por meio de análises de estrutura química, toxicidade avaliação e propriedades bioativas preditivas, utilizando amostras humanas para testes *in vitro* e *ex vivo*. A análise *in silico* sugere que o tilirosídeo exibe bom índice de absorção para penetrar nas membranas biológicas. Além disso, apresentou considerável potencial de proteção celular contra os radicais livres e com atividades anticarcinogênicas, antioxidante, antineoplásica, anti-inflamatória, anti-hemorrágica e antitrombótica. A avaliação dos efeitos hemolíticos e genotóxicos do tilirosídeo mostrou baixas taxas de hemólise nas hemácias e ausência de toxicidade em células da mucosa oral. Os dados obtidos indicam que esta molécula pode possuir uma abordagem terapêutica promissora como uma possível nova droga com potencial biotecnológico.

Palavras-chave: hemolítica, genotoxicidade, toxicidade, *Helicteres velutina*.

1. Introduction

The use of natural products as sources of new drugs has become a valuable resource for humankind over the years. Plants exhibit a multitude of applications and advantages that are instrumental in people healing from physical ailments and, for this reason, have raised scientific interest

as targets in the investigation of their biotechnological potential (Hikal et al., 2017).

The genus *Helicteres* (Malvaceae sensu lato) comprises indigenous species found in the Northeast and Southeast regions of Brazil. Phytochemical and pharmacological

*e-mail: alexson_105@hotmail.com

Received: September 30, 2020 – Accepted: December 30, 2020

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Brazilian Journal of Biology, 2023, vol. 83, e244027 | <https://doi.org/10.1590/1539-8984.244027>

1/8



In silico, *in vitro*, and *ex vivo* studies of the toxicological and pharmacological properties of the flavonoid 5,7-dihydroxy-3,8,4'-trimethoxy

A.P. Sousa^{1,2,3}, M.S. Oliveira^{2,3}, D.A. Fernandes^{2,3}, M.D.L. Ferreira^{2,3}, L.V. Cordeiro^{2,3},
M.F.V. Souza^{2,3}, L.M.D. Fernandes^{2,3}, H.D.S. Souza^{3,4}, A.A. Oliveira Filho^{4,5},
H.L.F. Pessoa^{1,5}, and R.C.S. Sá^{1,5}

¹Departamento de Fisiologia e Patologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil

²Departamento de Ciência Farmacêutica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil

³Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil

⁴Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB, Brasil

Abstract

Phytochemical studies of the species *Pavonia glazioviana* were performed. Quercetin, kaempferol, acacetin, and trimethoxylated flavonoid compounds (which present biological activity) were isolated. We aimed to evaluate the *in silico*, *in vitro*, and *ex vivo* toxicity of flavonoid 5,7-dihydroxy-3,8,4'-trimethoxy (Pg-1) obtained from *P. glazioviana* through chemical structure analyses, toxicity assessment, and predictive bioactive properties, using human samples in *in vitro* tests. *In silico* analysis suggested that Pg-1 presents a good absorption index for penetrating biological membranes (for oral bioavailability), while also suggesting potential antimutagenic, anticarcinogenic, antioxidant, antineoplastic, anti-inflammatory, anti-hemorrhagic, and apoptosis agonist bioactivities. Assessment of hemolytic and genotoxic effects revealed low hemolysis rates in red blood cells with no cellular toxicity in oral mucosa cells. The reduced cytotoxic activity suggested the safety of the concentrations used (500–1000 µg/mL), and demonstrated the varied interactions of Pg-1 with the analyzed cells. The data obtained in the present study suggested potential therapeutic application, and the non-toxic profile indicated viability for future studies.

Key words: *Pavonia glazioviana*; Genotoxicity; Hemolytic; Toxicity; Bioavailability

Introduction

The genus *Pavonia cav* (Malvaceae) presents roughly 270 species distributed worldwide. In Brazil, there are 142 registered species, among which 92 are regionally endemic to Northeastern and Southeastern Brazil (1). One example in Northeastern Brazil is *Pavonia glazioviana*, a plant popularly known as 'malva-da-chapada' or 'tampa-cabaça' (2). Studies carried out by Oliveira (3) show the presence of flavonoids among the main constituents of the species including quercetin, kaempferol, acacetin, tiliroside, and trimethoxyflavone, which display antibacterial, antifungal, and antioxidant activities (4).

5,7-dihydroxy-3,8,4'-trimethoxy (Pg-1) is a trimethoxylated flavonoid present in *P. glazioviana* for which larvicidal activity has been reported (3), but its bioactive potential and toxicological profile remain unclear. However, it is necessary to analyze the safety levels of new natural molecules with therapeutic potential. Based on

this, this study aimed to perform *in silico* tests to determine the theoretical molecular toxicity (chemical structure, toxicity assessment predictions, and its predictive bioactive properties) of Pg-1, isolated from *P. glazioviana*. *In vitro* and *ex vivo* tests with human cells were also carried out to investigate hemolysis and genotoxicity indexes in erythrocytes and oral mucosa cells, respectively.

Material and Methods

Plant material

Aerial parts of *P. glazioviana* were collected in February 2015 in Jeremoabo (Bahia, Brazil) at 09°44'34.6"S and 38°52'20.4"W and identified by Prof. Adilva de Souza Conceição (Bahia State University - UNEB). A voucher specimen (registration number 28709) was deposited in the Bahia State University Herbarium (Paulo Afonso

Correspondence: A.P. Sousa: <aleson_155@hotmail.com>

Received January 15, 2021 | Accepted June 10, 2021

Avaliação da citotoxicidade *in vitro* e genotoxicidade *ex-vivo* em compostos da *Pavonia glazioviana* Gürke (Malvaceae)

Evaluation of in vitro cytotoxicity and ex-vivo genotoxicity in compounds from Pavonia glazioviana Gürke (Malvaceae)

Aleson Pereira de Sousa^{1*}, Laís Vilar Cordeiro², Maria de Fátima Vanderlei de Souza³, Helivaldo Diógenes da Silva Souza⁴, Rita de Cássia da Silveira e Sá⁵, Abrahão Alves Oliveira Filho⁶

¹Mestre em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal da Paraíba, PB, Doutorando em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos pela Universidade Federal da Paraíba, PB; ²Mestra em Biologia Celular e Molecular pelo Programa de Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal da Paraíba, PB, Doutoranda pelo Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba, PB; ³Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela Universidade Federal da Paraíba, PB, Doutora em Ciências pela Universidade de São Paulo, SP, Professora Titular da Universidade Federal da Paraíba, PB; ⁴Bacharel em Química pela Universidade Federal da Paraíba, PB, Mestre e Doutor em Química pela Universidade Federal da Paraíba, PB; ⁵Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, Mestre em Morfologia pela Universidade Federal de Minas Gerais, MG, Doutora e Pós-doutora em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela Universidade Federal da Paraíba, PB, Pós-doutora em Métodos Alternativos em Experimentação Animal na Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, USA, Professora Titular da Universidade Federal da Paraíba, PB; ⁶Farmacêutica-Bioquímica, Mestre e Doutor em Farmacologia pelo Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela Universidade Federal da Paraíba, PB, Professor da Universidade Federal de Campina Grande-PB

Resumo

Introdução: as terapias alternativas que utilizam plantas medicinais e fitoterápicos são bastante comuns no Brasil. Dentre várias espécies vegetais brasileiras utilizadas em terapias destacam-se as espécies da família Malvaceae. **Objetivos:** o presente estudo teve como objetivo avaliar a citotoxicidade *in vitro* e a genotoxicidade *ex-vivo* em compostos da *Pavonia glazioviana* Gürke espécie brasileira pertencente à família Malvaceae. **Metodologia:** métodos *in vitro* foram utilizados para verificar o potencial citotóxico por meio de ensaios hemolíticos e anti-hemolíticos e de análise genotóxica *ex-vivo*. O Extrato Etanólico Bruto (EEB) e Fração Clorofórmica (FC) foram obtidos na amostra vegetal utilizada neste estudo. **Resultados:** os produtos EEB-Pg e FC-Pg apresentaram baixo efeito citotóxico apenas nas concentrações de 50 e 100 µg / mL. As amostras expostas às concentrações de 500 e 1000 µg / mL apresentaram índice hemolítico alto e moderado com lise superior a 60%. Foi descrito efeito anti-hemolítico moderado em todas as amostras tratadas com 500 e 1000 µg / mL, com hemólise < 60%. Além disso, os compostos mostraram baixo efeito genotóxico *ex-vivo*, com um índice geral de células normais superior a 84% em todas as concentrações. **Conclusões:** os resultados sugerem um baixo perfil tóxico dos compostos obtidos da espécie *Pavonia glazioviana*, indicando limites seguros para o uso desses produtos naturais.

Palavras-chave: Fitoterápicos. Hemolítico. Anti-hemolítico. Genotóxico

Abstract

Introduction: alternative therapies using medicinal plants and herbal medicines are quite common in Brazil. Among several Brazilian plant species used in therapies, the species of the Malvaceae family stand out. **Objectives:** the present study aimed to evaluate the *in vitro* cytotoxicity and *ex-vivo* genotoxicity in compounds of the Brazilian *Pavonia glazioviana* Gürke belonging to the Malvaceae family. **Methodology:** *in vitro* methods were used to verify the cytotoxic potential through hemolytic and antihemolytic assays and the *ex-vivo* genotoxic analysis. The Crude Ethanolic Extract (CEE) and Chloroformic Fraction (CF) was obtained in vegetal sample used on this study. **Results:** the CEE-Pg and CF-Pg products only showed a low cytotoxic effect at the concentrations of 50 and 100 µg/mL. The exposure to the concentrations of 500 and 1000 µg/mL showed a high to moderate hemolytic index with lysis higher than 60%. A moderate anti-hemolytic effect was described in all samples treated with 500 and 1000 µg/mL, with hemolysis <60%. In addition, the compounds showed low *ex-vivo* genotoxic effect with a general index of normal cells greater than 84% at all concentrations. **Conclusion:** the results suggest a low toxic profile of the compounds obtained from the *Pavonia glazioviana* Gürke species belonging to the Malvaceae family, indicating safe limits for the use of these natural products.

Keywords: Phytotherapy. Hemolytic. Antihemolytic. Genotoxic.

INTRODUÇÃO

As terapias alternativas que utilizam plantas medicinais e fitoterápicos vêm crescendo mundialmente, pois

Correspondente/Corresponding: *Aleson Pereira de Sousa – End: Universidade Federal de Paraíba (UFPB) – 58051-900 João Pessoa-PB, Brasil. – Tel: (83) 9 9632 7961 – Email: aleson_133@hotmail.com

8.9 Anexo 9 – Accepted paper: Revista de Ciências Médicas e Biológicas

Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas

Departamento de Farmacia
Facultad de Ciencias
Sede Bogotá



Bogotá D. C., Colombia, 17 de febrero de 2022

Investigador
ALESON PEREIRA DE SOUSA
Department of Physiology and Pathology,
Federal University of Paraíba,
João Pessoa, Brazil,

Estimada colega Aleson,

Mediante esta comunicación me es grato informarle que su manuscrito titulado "*In vitro* cytotoxicity and *ex-vivo* genotoxicity in compounds from *Waltheria viscosissima* A. St. Hil. Brazilian species of the Malvaceae family *sensu lato*", escrito por Aleson Pereira de Sousa, Maria Denise Leite Ferreira, Laís Vilar Cordeiro, Maria de Fátima Vanderlei de Souza, Helivaldo Diógenes da Silva Souza, Rita de Cássia da Silveira e Sá y Abrahão Alves de Oliveira Filho, ha sido aceptado para publicación en nuestra revista (Vol. 51, No. 3, diciembre de 2022).

En este orden de ideas, esperamos enviarle las respectivas pruebas de imprenta tan pronto como sea posible.

Sin otro particular y agradeciendo por la atención prestada me suscribo de usted.

Cordial saludo,

Prof. Fleming Martínez R., D.Sc.
Director-Editor RCCQF

2
AÑOS
Bicentenario
0

[Página 1 de 1]
Elaboró: F. Martínez

Av. Carrera 30 # 43-03 - Ciudad Universitaria
Edificio 450, FARMACIA
(+57 1) 3165080 - (+57 1) 3165000 Ext. 14606
Bogotá, D. C., Colombia
fmartinezr@unal.edu.co

Proyecto
cultural y colectivo
de nación