



WANDERLEY JOSÉ MANTOVANI BITTENCOURT

***Tournefortia paniculata* VENT: A PHYTOCHEMICAL
AND BIOLOGICAL APPROACH**

LAVRAS-MG
2019

WANDERLEY JOSÉ MANTOVANI BITTENCOURT

***Tournefortia paniculata* VENT: A PHYTOCHEMICAL AND BIOLOGICAL APPROACH**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares área de concentração em Bioatividade de Plantas Medicinais, para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora:
Professora Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci

**LAVRAS
2019**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Bittencourt, Wanderley José Mantovani.

Tournefortia paniculata Vent: a phytochemical and biological
approach / Wanderley José Mantovani Bittencourt. - 2019.

95 p. : il.

Orientador(a): Suzan Kelly Vilela Bertolucci.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. bioprospecção. 2. Inibição enzimática. 3. quimioprevenção
do câncer. I. Bertolucci, Suzan Kelly Vilela. II. Título.

WANDERLEY JOSÉ MANTOVANI BITTENCOURT

***Tournefortia paniculata* VENT: A PHYTOCHEMICAL AND BIOLOGICAL APPROACH**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares área de concentração em Bioatividade de Plantas Medicinais, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 21 de fevereiro de 2019

Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci	UFLA
Dra. Aline Carvalho Pereira	UFLA
Dra. Lidiane Orlandi	UNILAVRAS
Dra. Denise Coutinho Endringer	UVV
Dr. Lucas Apolinário Chibli	UFLA

Orientadora

Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci

Lavras – MG

2019

*"A minha avó Marília pelo apoio, incentivo e amor sempre
constantemente.
Ao meu pai Darwin pelo carinho, incentivo e acima de tudo
exemplo de vida e retidão."
Dedico*

AGRADECIMENTOS

Inicialmente a Deus, pelo dom da vida, força, saúde e por ter colocado no meu caminho pessoas tão iluminadas para que não apenas essa, mas todas as outras etapas da minha vida se cumprissem.

À Universidade Federal de Lavras em especial ao Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares pela oportunidade.

À professora Suzan, minha orientadora, pelo apoio, carinho, paciência e até mesmo pelos puxões de orelha quando necessário. Foi graças a todo esse apoio que hoje posso me sentir apto a ser o melhor profissional que poderia ser.

Ao professor José Eduardo, pelas brincadeiras, conselhos sábios e acima de tudo pelo apoio e incentivo em todas as etapas. Com certeza serei eternamente grato por todas as palavras de incentivo e com o cuidado de pai que mesmo muitas vezes velado, se fazia presente.

A Professora Ana Paula Peconick, exemplo de pessoa e professora. Capaz de fazer as piores situações se tornarem apenas mais uma experiência. Também agradeço pelas inúmeras oportunidades e pela confiança no meu trabalho.

À professora Roberta Hilsdorf Picolli pelas risadas e ensinamentos. Pelo carinho e dedicação que me acompanharam desde o mestrado.

À Professora Marcia Amorim, pelas conversas, apoio e por sempre estar disponível seja para uma conversa ou para me aturar sempre. Um exemplo de professora e amiga acima de tudo.

Aos Professores Luciane Vilela e Wilson Magela, pelo apoio e disposição durante todos esses anos. Pelos ensinamentos e pelos conselhos.

Aos professores Denise Endringer (UVV), Nelma Oliveira e Marcelo Boriollo (UNIFENAS) e Geraldo Célio (UFOP) pelo valioso apoio e auxílio nos resultados aqui apresentados.

Aos colegas de laboratório e de vida, que entre risos e lágrimas estiveram sempre lado a lado, dando apoio e suporte mútuo. Vocês não imaginam como foram importantes em vários momentos em que o desânimo teimava em me abater.

Aos técnicos Annete, Paulinho, Leandro, Giulia e principalmente Luizinho que sempre me apoiaram e auxiliaram sempre que era necessário. Não apenas essa tese, mas todos os outros trabalhos tiveram um pouco do carinho de vocês conosco.

Ao professor Smail, que sempre nos colocava para a frente, nos incentivava, e nos direcionava quando todo o experimento teimava em dar errado. Seu apoio foi fundamental para que essas páginas se fizessem reais.

Aos colegas do NEMAC/NEPRON e NEIMBIO que entre sorrisos e aprendizados sempre estavam lá, para o que der e vier. Saibam que foram fundamentais.

À minha família, que sempre foi meu suporte e porto seguro. Que sempre me mostrou que por mais difícil que fosse a jornada, no final de tudo seria apenas mais uma etapa cumprida e que com certeza teria valido a pena.

A todos aqueles cujo conhecimento secular passado por diversas gerações puderam oferecer condições e conhecimento para que não apenas esse trabalho, mas muitos outros em todo o mundo pudessem se concretizar.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos e ao CNPq e FAPEMIG pelo suporte financeiro ao longo da pesquisa.

Enfim, são tantas as pessoas a quem deveria agradecer que poderia utilizar todas as páginas desse trabalho apenas dedicando a vocês.

Saibam que cada página dessa tese tem um pouco do carinho e apoio de vocês e que meu sonho nunca teria se realizado se não fosse a presença de vocês na minha vida.

Obrigado e que Deus os abençoe sempre.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar, mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”. (Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

Tournefortia paniculata Vent. é uma planta medicinal, tradicionalmente conhecida como marmelinho e utilizada no tratamento de afecções do trato urinário. Incipientes são os estudos sobre o potencial medicinal e a fitoquímica dessa planta. Com vistas a esse respeito, objetivou-se realizar estudos fitoquímicos e de bioprospecção de atividades antidiabética, antimicrobiana, antioxidante e quimiopreventiva de preparações extrativas *T. paniculata*. Preparação extrativa obtida a partir da percolação exaustiva das folhas pulverizadas de *T. paniculata* com etanol 92°INMP, forneceu o extrato bruto etanólico (EB), o qual foi ressuspenso em água e, sequencialmente particionado com *n*-hexano (HEX), diclorometano (DCM), acetato de etila (EtOAc) e *n*-butanol (BuOH) para obtenção das respectivas frações. O presente trabalho gerou dois artigos que contribuíram com informações químico-biológico de *T. paniculata*. No primeiro, estas preparações foram avaliadas quanto ao seu potencial no tratamento e prevenção de complicações do diabetes por meio de atividades inibitórias *in vitro* das enzimas α -amilase, α -glicosidase e lipoxidase, bem como as atividades bactericidas e fungicidas. Além disso, foi estabelecida a relação entre o perfil químico e estas atividades biológicas através de análises de perfis cromatográficas por CLAE-DAD e de componentes principais (PCA). A fração DCM apresentou os melhores resultados de inibição das enzimas α -amilase ($0,038 \pm 0,021$ mg/mL) e lipoxidase ($0,217 \pm 0,006$ mg/mL), enquanto a fração EtOAc apresentou maior atividade inibitória para a α -glicosidase ($0,035 \pm 0,009$ mg/mL). Nenhuma preparação de *T. paniculata* foi ativa contra *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 25955, empregando a técnica de microdiluição em caldo. A fração DCM apresentou atividade contra a cepa de *Candida dubliniensis* (CIM = 1000 μ g/mL) e contra a cepa de *Issatchenkia orientalis* (CIM = 500 μ g/mL). Análises de PCA entre as atividades biológicas e as áreas dos 10 picos majoritários incomuns dos perfis cromatográficos indicaram correlação positiva e efeito sinérgico entre as substâncias de alta e baixa polaridade. Concluímos que a fração DCM e AcOEt foram as de maior potencial para investigações mais aprofundadas na área de prevenção e tratamento de complicações do diabetes. No segundo artigo foi avaliado o potencial antioxidante e quimiopreventivo do EB e frações de *T. paniculata*. A fração BuOH foi a que apresentou atividade antioxidante mais promissora nos ensaios de sequestro de radicais livres DPPH ($0,05 \pm 0,00$), capacidade antioxidante total ($4,14 \pm 0,14$), poder redutor de íons Fe^{+3} ($8,96 \pm 0,20$) e capacidade de absorção de radicais de oxigênio ($5,51 \pm 0,05$), assim como maiores teores de compostos fenólicos totais ($130,23 \pm 1,95$) e de flavonas/flavonóis totais ($5,08 \pm 0,07$). Análises por UPLC-MS-ESI da fração BuOH permitiram a identificação parcial de um derivado glicosilado do ácido siríngico. Nos ensaios de quimioprevenção, nenhuma preparação de *T. paniculata* foi capaz de inibir o TNF- κ . Entretanto, as frações HEX ($2 \pm 0,16$) e DCM ($2 \pm 0,11$) induziram a atividade da quinona redutase (QR), sem apresentar citotoxicidade. Devido a recuperação de maior massa, a fração HEX foi selecionada para fracionamento em coluna aberta de sílica gel fornecendo a subfração quimiopreventiva RH2. Análises por UPLC-MS-ESI da subfração RH2 sugeriram a presença de uma mistura de um derivado heterosídeo-piperazínico e de um derivado heterosídeo-piperidínico de núcleo triterpênico. Conclui-se que preparações extrativas de *T. paniculata* possuem potencial medicinal para o tratamento e prevenção do diabetes e como agentes antioxidante e quimiopreventivo.

Palavras chave: Bioprospecção. Inibição Enzimática. Antidiabético. Quimioprevenção. Antimicrobiano.

ABSTRACT

Tournefortia paniculata Vent. is a medicinal plant, traditionally known as marmelinho and used in the treatment of urinary tract disorders. There are incipient studies on the medicinal potential and phytochemistry of this plant. In this point of view, this study aimed to perform phytochemical and bioprospecting studies of antidiabetic, antimicrobial, antioxidant and chemopreventive activities of *T. paniculata* extractive preparations. Extractive preparation obtained from the exhaustive percolation of the powdered leaves of *T. Paniculata* with ethanol 92° INMP, provided the crude ethanolic extract (CE), which was resuspended in water and sequentially partitioned with *n*-hexane (HEX), dichloromethane (DCM), ethyl acetate (EtOAc) and *n*-butanol (BuOH) to obtain the respective fractions. The present work generated two articles that contributed to the chemical-biological information of *T. paniculata*. In the first, these preparations were evaluated for their potential in the treatment and prevention of diabetes complications through *in vitro* inhibitory activities of α -amylase, α -glucosidase and lipoxidase enzymes, as well as the bactericidal and fungicides activities. In addition, the relationship between the chemical profile and these biological activities was established through chromatographic profiles by HPLC-DAD and principal components (PC) analyses. The DCM fraction showed the best inhibition results of α -amylase (0.038 ± 0.021 mg/mL) and lipoxidase (0.217 ± 0.006 mg/mL) enzymes, while EtOAc fraction showed higher inhibitory activity for α -glucosidase (0.035 ± 0.009 mg/mL). No preparation of *T. paniculata* was active against *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 25955, employing the broth microdilution technique. The DCM fraction showed activity against the *Candida dubliniensis* strain (CIM=1000 μ g/mL) and against the strain of *Issatchenkia orientalis* (CIM=500 μ g/mL). PC analysis between the biological activities and the areas of the 10 uncommon major peaks of the chromatographic profiles indicated a positive correlation and synergistic effect between the high and low polarities substances. We conclude that the DCM and EtOAc fractions were the most potential for further investigations in the area of prevention and treatment of diabetes complications. In the second article, the antioxidant and chemopreventive potential of CE and its fractions of *T. paniculata* were evaluated. The BuOH fraction was the most promising antioxidant activity for DPPH free radical scavenging (0.05 ± 0.00), total antioxidant capacity (4.14 ± 0.14), power reduction of Fe⁺³ ions (8.96 ± 0.20) and Oxygen Radical Absorbance Capacity (5.51 ± 0.05), as well as higher levels of total phenolic compounds (130.23 ± 1.95) and total flavones/flavonols (5.08 ± 0.07). BuOH fraction UPLC-MS-ESI analysis allowed the partial identification of a glucoside derivative of the syringic acid. In chemoprevention assays, no preparation of *T. paniculata* was able to inhibit TNF-K β . However, the HEX (2 ± 0.16) and DCM (2 ± 0.11) fractions induced quinone reductase (QR) activity, without presenting cytotoxicity. Due to the greater mass recovery, HEX fraction was selected for further fractionation in the silica gel column providing the RH2 chemopreventive subfraction. UPLC-MS-ESI analysis of RH2 suggested the presence of a mixture of a heteroside-piperazine derivative and a heteroside-piperidine derivative of triterpenic nucleus. It is concluded that extractive preparations of *T. paniculata* have medicinal potential for the treatment and prevention of diabetes complications and as antioxidant and chemopreventive agents.

Keywords: Bioprospecting. Enzymatic Inhibition. Antidiabetic. Chemoprevention. Antimicrobial.

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

- Figura 1** – Aspectos botânicos de *Tournefortia paniculata*.....20
- Figura 2** – Representação esquemática da via da lipoxidase na formação de mediadores inflamatórios.....28

MANUSCRITO 1

- Figure 1** – Fingerprint by HPLC-DAD a 210 nm of *Tournefortia paniculata* preparations...50
- Figure 2** – Scores and loadings of the principal component analysis (PCA) in matrix correlation constructed using data of the extractive preparations of *Tournefortia paniculata* and the area of the 10 distinct major peaks in the chromatographic profiles of the preparations and biological activities responses.....51

MANUSCRITO 2

- Figura 1** – Representação esquemática das etapas de fracionamento do extrato bruto etanólico de *Tournefortia paniculata*. EtOH: etanol; HEX: n-hexano; DCM: diclorometano; EtOAc: acetato de etila; BuOH: butanol; MeOH: metanol.....62
- Figura 2** – Cromatograma UPLC-PDA e espectro UV do pico eluído em 2,98 min (A) e espectro ESI-MS/MS no modo negativo do pico eluído em 2,98 min da fração BuOH de *Tournefortia paniculata*.....71
- Figura 3** – Perfis por CLAE-DAD a 210 nm das frações HEX e DCM e subfração RH2 de *Tournefortia paniculata*.....74
- Figura 4** – Perfil cromatográfico da subfração RH2 de *Tournefortia paniculata* obtido por UPLC-DAD (A); Cromatograma total de íons (TIC) no modo positivo e possíveis estruturas químicas (B); e, espectros MS-ESI no modo positivo (C) e MS²-ESI da substância com TR 9,73 min (D).....76

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO 1

Table 1 – Microorganisms used in the antifungal test.....	43
Table 2 – Inhibition of α -amylase and α -glucosidase enzymes by <i>Tournefortia paniculata</i> crude extract and fractions.....	45
Table 3 – Inhibitory activity of lipoxidase enzyme by <i>Tournefortia paniculata</i> and its fractions.....	46
Table 4 – Antifungal activities of <i>Tournefortia paniculata</i> preparations.....	48
Table 5 – Peak areas selected for chemometric analysis, obtained from the chromatographic profiles of the preparations.....	49

MANUSCRITO 2

Tabela 1 – Atividades antioxidantes de preparações de <i>Tournefortia paniculata</i> pelos ensaios de eliminação de radicais DPPH, capacidade antioxidante total (CAT), poder redutor (PR) e capacidade de absorção de radicais livres de oxigênio (ORAC).....	68
Tabela 2 – Concentração de compostos fenólicos totais (CFT) e de flavonas/flavonóis totais (FFT) em preparações de <i>Tournefortia paniculata</i>	69
Tabela 3 – Citotoxicidade em células de carcinoma hepático humano HepaG2 e de melanoma humano MV3 e indução da Quinona Redutase (QR) e pelo extrato bruto etanólico (EB) de <i>Tournefortia paniculata</i> e suas frações HEX, DCM, AcOEt e BuOH.....	72
Tabela 4 – Indução da Quinona Redutase (QR) e citotoxicidade em células de hepatoma murino Hepa1c1c7 das subfrações RH1 a RH5 de <i>Tournefortia paniculata</i>	74

LISTA DE ESTRUTURAS QUÍMICAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Tournefolal.....	21
Ácido tournefólico A.....	21
Ácido tournefólico B.....	21
Éster etílico do ácido tournefólico.....	21
Ácido salvianólico A.....	21
Ácido salvianólico F.....	21
Ácido isossalvianólico.....	21
Ácido litospérmico.....	21
Ácido rosmarínico.....	21

MANUSCRITO 1

MANUSCRITO 2

Erigesídeo C	73
Ácido glicosiríngico	73
Ácido 28(1-piperazinil) oleanólico 3-O-[2-O-(6-desoxi- α -L-manopiranosil)- α -L-arabinopiranosil]	76
Ácido 28(1-piperidinil) oleanólico 3-O-[2-O-(6-desoxi- α -L-manopiranosil)- α -L-arabinopiranosil]	76

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS (em ordem alfabética)

AAPH - 2, dihidrocloruro 2'-diazobis (2-amidinopropano)

ABTS - 2,2'- diazino do ácido etilbenzotiazolino sulfônico

ACoEt – Fração acetato de etila

APAP – Acetominofeno

APG – Angiosperm Phylogeny Group

ATCC – Coleção de Culturas Tipo Americana

AUC – Área Abaixo da Curva de Fluorescência

AVC – Acidente Vascular Cerebral

BHA - Butil-hidroxianisol

BHT - Butil-hidroxitolueno

BuOH – Fração butanol

CAT – Capacidade Antioxidante Total

CAT – Catalase

CCD – Vide TLC

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

D.O. – Densidade óptica

DAD – Detecção por Arranjo de Diodos

DCM – Fração Diclorometano

DM2 – Diabetes Mellitus tipo 2

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

EE – Extrato Etanólico

ERO – Espécie reativa de oxigênio

FDA – Administração de Medicamentos e Alimentos

FRAP – Poder Redutor Pela Redução do Ferro

GP – Galato de propila

GPx – Glutationa peroxidase

GSH – Glutathiona

Hepa1c1c7 – Linhagem Celular de Hepatoma de rato

HepaG2 – Linhagem Celular de Carcinoma hepático humano

HEX – Fração Hexânica

HPLC – vide CLAE

IL-1 β – Interleucina 1 β

IL-6 – Interleucina 6

LOX – Lipoxidase tipo I

LOX2 – Lipoxidase tipo 2

LOX3a – Lipoxidase tipo 3a

LOX3b – Lipoxidase tipo 3b

mAU – Unidades de Mili Absorbância

MV3 – Linhagem Celular de Melanoma Humano

NADPH - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

NF- κ B – Fator de Necrose Tumoral Kappa Beta

nm – nanômetro

ORAC - Capacidade de Absorção dos Radicais Oxigenados

PR – vide FRAP

QR – Quinona redutase

RENISUS - Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde

RNA – Acido ribonucléico

SOD – Superóxido dismutase

TBARS – Ácido tiobarbitúrico

TCA – Ácido tricloroacético

TFC – Flavonóides totais

TLC – Cromatografia em camada delgada

TNF- α – Fator de necrose tumoral Alfa

TPC – Fenóis totais

UPLC – Cromatografia líquida de Ultra Performance

WHO – Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1 Plantas medicinais na descoberta de novas drogas	18
2.2 Aspectos químicos e botânicos de <i>Tournefortia paniculata</i>.....	19
2.3 Atividades antioxidantes.....	23
2.4 Utilização de produtos naturais com potencial antibiótico	25
2.5 Atividades antidiabéticas e de controle glicêmico mediados por moléculas naturais	26
2.6 Atividade anti-inflamatória de produtos naturais pela via de inibição da lipoxidase.....	28
2.7 Quimioprevenção do câncer e sua importância na pesquisa com plantas medicinais	29
REFERÊNCIAS.....	31
MANUSCRITO 1.....	38
Potential of <i>Tournefortia paniculata</i> Vent. extractive preparations to treat diabetes complications and its correlation with HPLC-DAD chemical profiles	38
INTRODUCTION.....	38
MATERIALS AND METHODS.....	40
RESULTS AND DISCUSSION.....	45
CONCLUSION.....	52
REFERENCE	53
MANUSCRITO 2.....	58
Atividades antioxidante e quimiopreventiva <i>in vitro</i> do extrato etanólico e frações de <i>Tournefortia paniculata</i> Vent.....	58
INTRODUÇÃO	59
MATERIAIS E MÉTODOS.....	60
RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIAS	79
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	94

1 INTRODUÇÃO

O Brasil está incluso na lista de países com maior recurso vegetal associado às potencialidades farmacológicas. Entre as 500 mil espécies vegetais catalogadas no mundo, o Brasil possui cerca de 55 mil espécies. Apesar de o país possuir vasta diversidade de flora, estima-se que apenas 15% das espécies catalogadas tenham sido estudadas em algum momento para utilização na medicina (ZAGO E DE MOURA, 2018).

Estudos envolvendo a bioprospecção de compostos farmacologicamente ativos tem despertado de forma significativa o interesse de pesquisadores do mundo todo. A medida em que a população mundial voltou seus olhos à utilização de plantas medicinais como fonte de matéria prima empregadas para o tratamento das mais diversas doenças, faz-se necessário avaliar suas potencialidades químico-biológicas, bem como realizar estudos de validação científica ao conhecimento popular (GOMES *et al.*, 2016).

Observa-se, nos últimos anos, uma grande preocupação com o bem-estar físico que tem feito com que inúmeras pessoas busquem por alternativas seguras, acessíveis e confiáveis de prevenção ou tratamento de enfermidades que tem despontado como causadores de males maiores. Nesse contexto, doenças causadas por desordens oxidativas tem assumido a responsabilidade por inúmeros agravos à saúde pública como diabetes, eventos cardíacos severos, aterosclerose, reações inflamatórias e alérgicas, danos ao DNA e principalmente o desenvolvimento do câncer (FERREIRA E MATSUBARA, 1997; VENEREO GUTIÉRREZ, 2002; KOURY E DONANGELO, 2003; UPRITCHARD *et al.*, 2003; COLLINS, 2005; JÚNIOR *et al.*, 2005).

Também existem enorme preocupação com relação às infecções fúngicas ou bacterianas decorrentes da incapacidade que o indivíduo acometido por distúrbios oxidativos possa apresentar, assim como, as complicações decorrentes da incapacidade de uma resposta imunológica competente no combate a essas infecções. Em casos mais severos, como em pacientes oncológicos, é possível que o quadro do paciente possa converter em sepse e óbito (STAUDINGER E PÈNE, 2014).

Diante deste cenário, a área médico-farmacêutica tem buscado alternativas terapêuticas capazes de prevenir e tratar doenças como diabetes, inflamações, infecções bacterianas ou fúngicas e associar essas atividades à capacidade de impedir o estresse oxidativo por meio de testes de capacidade antioxidantes (SHAKYA, 2016).

O marmelinho é uma espécie vegetal originária da Ásia e das Américas, cujo nome científico é *Tournefortia paniculata* Vent. (Boraginaceae). É uma planta considerada medicinal, popularmente empregada como antisséptico de vias urinárias e no tratamento da litíase renal

(BERTOLUCCI, S. K. *et al.*, 2000). Pesquisas realizadas por Simão, Corrêa, *et al.* (2012), Simão *et al.* (2013), Simao *et al.* (2014), Simão, Correa, Prete, *et al.* (2014) e Simão *et al.* (2015) sugeriram o potencial uso de extratos de *T. paniculata* como inibidores de enzimas digestivas e no tratamento de obesidade.

Visando aprofundar e explorar o potencial biológico de *Tournefortia paniculata*, o presente estudo objetivou realizar análises fitoquímicas e de bioprospecção de atividades antidiabética, antimicrobiana, antioxidante e quimiopreventiva de preparações extrativas desta planta medicinal.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Plantas medicinais na descoberta de novas drogas

As plantas constituem um rico arsenal de substâncias bioativas que o homem vem utilizando durante toda a sua evolução seja com propósitos medicinais ou até mesmo como drogas de abuso (MACIAS *et al.*, 2007). Estudos atuais envolvendo as mais modernas terapias medicamentosas não alcançariam o patamar atual sem a contribuição de produtos naturais como aquelas derivadas de plantas superiores, algas, toxinas animais e microrganismos (ZHU *et al.*, 2011).

As plantas produzem grande diversidade de compostos orgânicos divididos em metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários possuem função basicamente estrutural, plástica e de reserva energética. Aos metabólitos secundários são atribuídas numerosas atividades de interesse biológico, tem-se nesses metabólitos a produção de compostos voláteis e pigmentos úteis na atração de polinizadores bem como substâncias tóxicas para defesa contra predadores. Aparentemente tais compostos não apresentam nenhuma ligação com o crescimento e desenvolvimento da planta (DEWICK, 2002; TAIZ E ZEIGER, 2006).

Fenalti *et al.* (2016) constaram em suas pesquisas com 893 artigos científicos a utilização de 776 espécies diferentes aplicadas a atividades biológicas distintas. Dentre estas atividades encontradas, as com maior frequência foram as atividades antiparasitárias, antioxidantes, anti-inflamatórias e antinociceptivas. Os autores do estudo ressaltam ainda a importância de se aprofundar a pesquisa com plantas medicinais não apenas quanto ao número de espécies, como também ampliar o leque de possíveis atividades biológicas, dada a complexidade química de muitas plantas.

A natureza, de forma geral, produz grande parte dos compostos farmacologicamente ativos conhecidos. Dentre os mais diversos reinos, o reino vegetal é aquele que mais contribui com o suprimento de metabólitos secundários e a maioria desses de grande valor de acordo com suas mais diversas aplicações na medicina, cosmética, alimentos e agroquímica. As plantas possuem mecanismos de defesas complexos que as protegem de outras plantas ou predadores. Esses mecanismos de defesa são de natureza química e geralmente envolvem substâncias pertencentes à classe de metabólitos secundários (PINTO *et al.*, 2002; BUCHANAN *et al.*, 2015).

A flora brasileira ainda não possui estudos suficientes para a elaboração de modernas e completas monografias capazes de melhor elucidar seus compostos secundários bem como sua utilização prática. Muitas espécies são utilizadas de forma empírica, com pouco ou nenhum

suporte científico que torna evidente uma grave lacuna no conhecimento, identificação, efetividade e segurança no seu uso (FOGLIO *et al.*, 2006). Essa informação é bastante encorajadora no estudo com plantas medicinais, elencando seus usos como recursos terapêuticos, pois o reino vegetal possui uma pequena parcela de espécies já estudada bem como uma vasta gama de novas moléculas e medicamentos em potencial para serem descobertos.

Assim, técnicas de descoberta, isolamento e caracterização química tornam-se importantes na compreensão química de espécies utilizadas popularmente a fim de compreender e identificar metabólitos secundários de interesse médico-farmacêutico, assim como caracterizar as espécies pela identificação de seu marcador químico (LEITE, 2009; SIMÕES *et al.*, 2016).

2.2 Aspectos químicos e botânicos de *Tournefortia paniculata*

A família Boraginaceae foi descrita por Jussieu em 1789, e assim nomeada por sua borragem, que significa planta herbácea de aplicações medicinais. Em árvore filogenética, pelo sistema APG (Angiosperm Phylogeny Group) IV, apresenta as quatro subfamílias da mesma, junto às Hydrophyllordeae, com cerca de 70-85% suporte. A família ainda é objeto de estudo neste sentido (disponível em www.mobot.org)

As Boraginaceae são plantas que variam de ervas a grandes árvores. As folhas são simples, geralmente alternas, raro opostas ou verticiladas e com estípula ausente. Inflorescência predominantemente de tipos cimosos mais ou menos amplas de ramos escorpioides ou helicoides. Flores hermafroditas e unissexuais, por aborto, diclamídeas, actinomorfas ou zigomorfas. Cálice gamossépalo, tubuloso, com lobos curtos ou meio profundos, corola tubulosa, infundibuliformes, campanulada, hipocrateriforme ou rotácea. Androceu com cinco estames livres, excertos ou não, com filetes curtos ou longos, antera bilocular, rimosa, com lóculos globosos, ovoides e oblongos. Gineceu composto de dois a quatro carpelos, constituindo ovário súpero, com dois a quatro lóculos, uniovulados, raro, uniloculares, com quatro óvulos anátropos e estilete inteiro ou bipartido no ápice. Fruto indeiscente, carnoso, constituindo uma drupa com dois a quatro lóculos ou pirenado por aborto ou um esquizocarpo dissolvido em quatro núculas livres ou concrecidas duas a duas, com estrutura drupácea e raramente o fruto é seco (SMITH, 1970).

O gênero *Tournefortia* caracteriza-se por constituir-se de árvores ou subarbustos, folhas alternas, pecioladas e inteiras; inflorescência em cimeira escorpioide com flores abundantes e

pequenas; cálice 5-partido de sépalas unidas apenas na base; corola tubular cilíndrica com lobos normalmente lineares; estames 5, inclusos com filetes curtos inseridos na base, anteras ovais, oblongas ou lanceoladas, apiculadas ou armadas; ovário 4-locular; estilete terminal simples, óvulos abaixo do ápice, lateralmente afixos e pêndulos; fruto drupas pequenas, com exocarpo carnoso, 4-pirenado; 1 ou 2 sementes pêndulas ou oblíquas; embrião com cotilédones ovais ou elípticos (GUIMARÃES *et al.*, 1971).

Os estudos químicos e biológicos com a espécie *Tournefortia paniculata* (Figura 1) são ainda superficiais, uma vez que a espécie ainda carece de análises fitoquímicas mais complexas, a fim de identificar frações ou substâncias farmacologicamente ativas.

Figura 1 – Aspectos botânicos de *T. paniculata*.

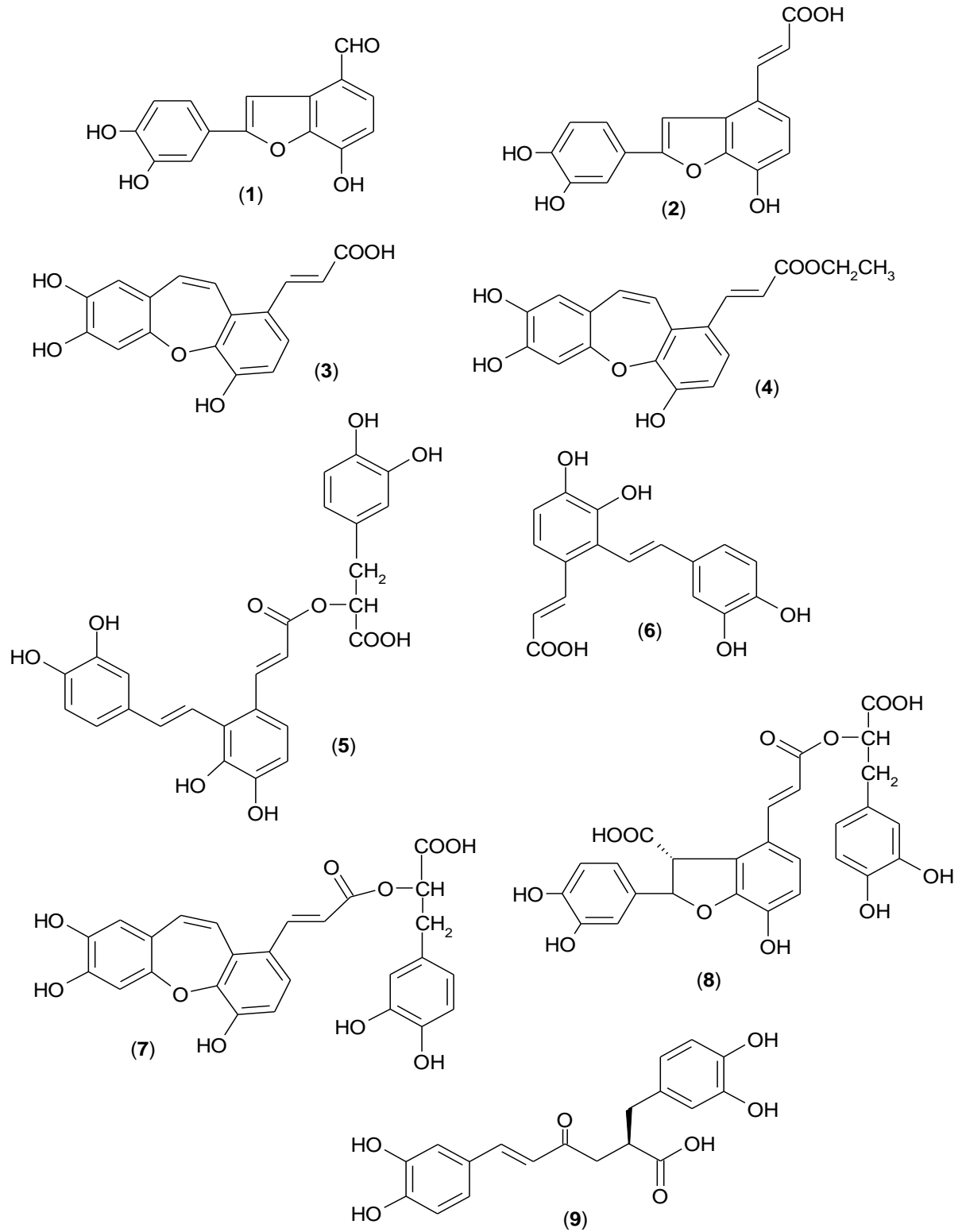


Fonte: Acervo dos autores

Do ponto de vista químico, Moraes *et al.* (2007) através de análises de prospecção fitoquímica do extrato etanólico de *Tournefortia paniculata* descreveram resultados positivos para a presença de flavonoides, taninos, cumarinas e esteroides. Estudos preliminares realizados por Simao *et al.* (2014) utilizando diferentes solventes e técnicas extrativas evidenciaram a presença de ácidos orgânicos, açúcar reduzido, antraquinonas, carotenoides, catequinas, lactonas sesquiterpênicas e outras lactonas, flavonoides, saponinas e taninos.

Compostos de natureza fenólica foram amplamente descritos na literatura para *Tournefortia sarmentosa*, incluindo a presença de tournefolal (1), ácidos tournefólicos A (2) e B (3), éster etílico do ácido tournefólico B (4), ácidos salvianólicos A (5) e F (6), ácido isosalvianólico C (7), ácido litospérmico (8) e ácido rosmarínico (9) (Figura 2) (LIN *et al.*, 2002). Com exceção do ácido salvianólico F, todos os outros compostos isolados apresentaram

atividade antioxidante superior ao probucol, um potente medicamento utilizado na prevenção de eventos cardíacos e complicações diabéticas.



Fonte: (LIN *et al.*, 2002)

Não obstante, o gênero *Tournefortia* é fruto de promissoras pesquisas no mundo todo pela sua grande variabilidade química e potenciais farmacológicos diversos, como redução de peso corporal, atividade amebicida, antiprotozoária, antioxidante, antibiótica, anti-inflamatória, dentre outras (LIN *et al.*, 1999; LIN *et al.*, 2002; TENG *et al.*, 2012)

Efeitos de proteção hepática foram observados para o extrato aquoso de *Tournefortia sarmentosa* (TENG *et al.*, 2012). Doses de 250 a 500mg/kg desse extrato aquoso reduziram de forma significativa a concentração plasmática de enzimas responsáveis pelo dano hepático (transaminase glutâmico oxalacética, transaminase glutâmico pirúvica e fosfatase alcalina, $p < 0.01$) bem como marcadores inflamatórios, como o Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α), Interleucina 1 β (IL-1 β) e Interleucina 6 (IL-6) em ratos tratados com acetaminofeno (APAP).

Os níveis de malondialdeído, um marcador de estresse celular, ($p < 0.05$) e de enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GPx), ($p < 0.05$) também apresentaram redução em ratos intoxicados por APAP tratados com *Tournefortia sarmentosa*. Hepatócitos de ratos incubados com APAP reduziram a viabilidade celular e aumentaram a peroxidação lipídica. A estimulação por APAP também apresentou redução nos níveis de glutathiona (GSH) e reduziu as atividades das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx. Tratamento prévio dos hepatócitos com extrato aquoso de *T. sarmentosa*, antes e durante a estimulação com APAP, atenuou a peroxidação lipídica e aumentou a viabilidade celular e níveis de GSH com melhora na atividade antioxidantes das enzimas (TENG *et al.*, 2012).

Estudos recentes também comprovaram que o extrato aquoso de *Tournefortia sarmentosa* promoveu o aumento fagocítico de *Escherichia coli* por células modificadas HL-60 e neutrófilos (CHEN *et al.*, 2014). O extrato de *T. sarmentosa* também inibiu a sobrevivência de *E. coli* fagocitado pelas células modificadas HL-60.

Para a espécie *Tournefortia paniculata* os estudos biológicos ainda são incipientes. Relatos populares indicam que o decocto das folhas de *T. paniculata* são empregados como diurético, no tratamento da litíase renal e no tratamento de infecções urinárias (BERTOLUCCI, S. K. *et al.*, 2000). O extrato aquoso de *Tournefortia paniculata* não apresentou genotoxicidade, fosfolipase e efeito coagulante, hemolítico e fibrinogenolítico (SIMÃO, CORREA, PRETE, *et al.*, 2014).

Simão *et al.* (2015) demonstraram que a utilização de folhas pulverizadas e extrato aquoso (25% p/v) das folhas de *Tournefortia paniculata* induziu atividade antiobesidade em ratos Wistar, divididos em grupos distintos submetidos a uma dieta hipercalórica nas dosagens de 50mg da planta pulverizada e 1 mL do extrato aquoso respectivamente administrados uma

vez ao dia. As mesmas preparações também apresentaram atividade hipoglicemiante demonstrada pela análise bioquímica plasmática dos animais. Em estudos preliminares, (SIMÃO, CORRÊA, *et al.*, 2012) já haviam demonstrado as atividades *in vitro* do extrato aquoso (25% p/v) de *Tournefortia paniculata* na inibição enzimática das enzimas α -amilase e α -glicosidase antes e após a exposição ao suco gástrico.

2.3 Atividades antioxidantes

As últimas décadas têm sido marcadas pelo crescente interesse nas pesquisas com potencial antioxidante de diversos compostos, principalmente os compostos de origem natural. De acordo com John e Shahidi (2010), a atividade antioxidante em plantas pode ser explicada pela presença de β -caroteno, tocoferol, vitamina C e compostos fenólicos. Essa informação pode ser explicada pelo fato desses compostos doarem elétrons livres da cadeia do radical causado pelo estresse oxidativo.

O Oxigênio é uma das moléculas mais importantes para que se mantenha a vida na Terra. As células aeróbicas dependem dessa molécula para que as reações bioquímicas de fosforilação oxidativa ocorram. Por ser uma reação com altas concentrações de Oxigênio existe no interior das mitocôndrias alto consumo desse elemento químico e consecutivo acúmulo de cadeias proteicas de transporte eletrônico (ANDERS *et al.*, 2006).

De acordo com Tangvarasittichai (2015), a cadeia de transporte de elétrons responsável pela formação de espécies reativas de oxigênio podem ocorrer na mitocôndria, nos peroxissomos e no sistema do citocromo P450. Existem ainda enzimas como as cicloxigenases, xantina oxidase, óxido nítrico sintase desacoplada e NADPH (fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina) sintetase que podem acelerar a produção das espécies reativas de Oxigênio. Como resultado desse processo oxidativo pode-se haver o acúmulo de íons oxigênio, também chamados de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) (INOUE *et al.*, 2003; ANDERS *et al.*, 2006; FIGUEIRA *et al.*, 2013).

O organismo possui mecanismos de controle que objetivam reduzir a produção de ERO. Hábitos saudáveis como a prática de atividades físicas e alimentação rica em frutas e verduras auxiliam na redução da produção de ERO e auxiliam na homeostase e manutenção do organismo (DA SILVA OLIVEIRA *et al.*, 2011)

De acordo com Stadtman e Levine (2000) e Richter *et al.* (1988) espécies reativas de oxigênio são produzidas o tempo todo e oxidam, de forma irreversível, lipídios, proteínas,

carboidratos e até mesmo ácidos nucleicos, que são moléculas indispensáveis para a manutenção das funções essenciais do organismo.

Turrens (2003) elenca algumas das ERO mais comuns como o radical ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH^\cdot) e espécies não radicalares como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a molécula de oxigênio (O_2) sendo o ânion superóxido o mais destrutivo entre esses.

A produção de ERO é constantemente associada a doenças cardiovasculares (AGARWAL *et al.*, 2012), complicações circulatórias decorrentes do acúmulo da fração LDL (lipoproteína de baixa densidade) nas paredes de vasos e artérias (VOGIATZI *et al.*, 2009), infarto do miocárdio (RAPOLA *et al.*, 1997) e até mesmo câncer (HEINONEN *et al.*, 1994)

De acordo com Moure *et al.* (2001), o uso de antioxidantes naturais vem aumentando nos últimos anos tendo em vista que a população tem se preocupado mais com a prevenção de doenças degenerativas e em manter a boa forma.

Existem no mercado inúmeros produtos contendo antioxidantes sintéticos como o butil-hidroxitolueno (BHT), butil-hidroxianisol (BHA), terc-butilhidroquinona (TBHQ) e galato de propila (GP). No total, existem 40 antioxidantes sintéticos permitidos para uso em produtos destinados à utilização humana (ALIMENTARIUS, 2016).

A utilização desses antioxidantes sintéticos tem sido bastante controlada pelos órgãos ligados ao Ministério da Saúde do Brasil e já são proibidos em diversos países pelo fato de pesquisas indicarem que esses compostos são, em grande medida, tóxicos para animais. Tal fato tem feito com que a procura por antioxidantes naturais aumente ao passo que apresentam baixos riscos ao serem utilizados pela população e conseguem manter as características organolépticas inerentes ao produto inicialmente adquirido (BOROSKI *et al.*, 2015).

Muitas podem ser as técnicas empregadas para a compreensão dos mecanismos antioxidantes tal como para a avaliação da capacidade antioxidante de uma planta ou composto isolado oriundo de um vegetal superior. A escolha dos métodos a serem utilizados devem considerar os mecanismos de ação dos quais se pretende avaliar (BOROSKI *et al.*, 2015)

Atualmente as técnicas *in vitro* são as mais utilizadas nos laboratórios. Apesar de sofrerem algumas críticas por parte dos pesquisadores por não propiciarem condições biológicas condizentes com fenômenos reais, essas técnicas são capazes de fornecer uma útil ferramenta de pré-triagem entre as espécies vegetais com potencial antioxidante, e a possibilidade de avaliação do melhor estágio de maturação e condições de cultivo dessa planta (WOLFE E LIU, 2008).

Os principais métodos *in vitro* de avaliação de potencial antioxidantes são aqueles que empregam o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), Capacidade de Absorção dos

Radicais Oxigenados (ORAC) e Capacidade Antioxidante Total (CAT) que avaliam a transferência de elétrons de espécies antioxidantes para estabilizar os radicais livres enquanto ensaios de poder de redução monitoram o potencial de doação de elétrons pelas espécies antioxidantes. Um outro mecanismo importante diz respeito a utilização de íons metálicos como o Fe (II) que são catalizadores de reações Fenton (BOROSKI *et al.*, 2015).

2.4 Utilização de produtos naturais com potencial antibiótico

Antibióticos abarcam quaisquer compostos ou moléculas capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos e bactérias. São considerados bactericidas ou fungicidas aqueles capazes de causar a morte de bactérias ou fungos e bacteriostáticos, e fungistáticos aqueles capazes apenas de inibir o crescimento celular (WALSH, 2003).

Apesar de existirem desde sempre e identificadas apenas no século XVI, foi no início do século XIX que houve a possibilidade de bactérias e fungos serem atribuídos como agentes causadores de diversas doenças como a tuberculose e febre tifoide, dentre outras. A partir desse momento iniciou-se a busca por compostos químicos capazes de matar esses agentes microscópicos causadores de doenças em concentrações que sejam bem administradas e toleradas ao hospedeiro (PATRICK, 2013).

Entre as décadas de 1960 e 1980 houve grande desenvolvimento no número de novos agentes antibióticos naturais e análogos àqueles já existentes no mercado. A partir da década de 1980, poucos medicamentos antibióticos foram desenvolvidos e se iniciaram os relatos de microrganismos resistentes aos medicamentos já existentes. (FERNANDES, 2006)

Os principais antibióticos existentes na atualidade são, na sua maioria, medicamentos com princípios obtidos por meios naturais ou protótipos obtidos a partir dessas moléculas. As classes mais empregadas na atualidade são os β -Lactâmicos e glicopeptídeos que impedem a formação da parede celular, os macrolídeos e aminoglicosídeos que impedem a síntese proteica bacteriana, a rifampicina que impede a formação do RNA bacteriano, as fluoroquinolonas que bloqueiam a replicação do DNA e por fim as sulfonamidas que comprometem a formação de ácidos nucleicos (WALSH, 2003; PATRICK, 2013).

A partir dos anos 2000, com a grande necessidade de se desenvolver novos medicamentos antibióticos capazes de combater o número sempre crescente de microrganismos resistentes, e com o alto número de tentativas sem sucesso de se obter, de forma sintética,

medicamentos eficientes, os grandes laboratórios se voltaram a bioprospecção de moléculas naturais com potencial antibiótico (FERNANDES, 2006).

Em levantamento proposto por Newman e Cragg (2016), o número de medicamentos antibióticos liberados pelo FDA (Administração de Medicamentos e Alimentos) nos Estados Unidos entre 1981 e 2014 são inferiores apenas ao número de quimioterápicos contra o câncer. Nesse levantamento, os autores demonstram um número de 83 medicamentos oriundos de produtos naturais contra apenas 29 antibióticos sintéticos. Esses dados comprovam a eficiência e segurança quanto a liberação e pesquisas com plantas medicinais no desenvolvimento de novos antibióticos.

No Brasil, essa preocupação quanto ao uso de plantas medicinais atinge o âmbito da saúde pública. De acordo com Marmitt *et al.* (2015), das 71 espécies reconhecidas pela Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), 18 espécies apresentam atividade antibiótica comprovada.

Marmitt *et al.* (2015) ainda citam algumas plantas de grande importância para o fortalecimento dessa lista como a *Achilea millefolium* no controle microbiológico e cicatrização de feridas (JALALI *et al.*, 2012), a *Aloe vera* no controle de *Streptococcus mutans* (BERTOLINI *et al.*, 2012), *Bacharis trimera*, *Bidens pilosa* e *Tagetes minuta* no controle de *Staphylococcus mutans* e *Streptococcus agalactiae*. A lista consta ainda com uma planta da família Boraginaceae a *Cordia curassavica* utilizada no combate de *Porphyromonas gingivalis* (PIMENTEL *et al.*, 2012).

Marmitt *et al.* (2015) ressaltam ainda o aumento no número de publicações científicas no âmbito das pesquisas antibióticas com plantas medicinais após a implantação do RENISUS.

2.5 Atividades antidiabéticas e de controle glicêmico mediados por moléculas naturais

A pesquisa com vistas à obtenção de drogas naturais alternativas às sintéticas já existentes para o controle glicêmico tem se tornado significativa, uma vez que tanto as drogas existentes como o uso de insulina apresentam efeitos colaterais capazes de limitar seu uso por grande parte da população (ALI *et al.*, 2006).

O amido é a fonte energética de grande parte dos seres vivos, incluindo desde plantas superiores até mesmo animais (VIEILLE *et al.*, 2001). Trata-se de um polissacarídeo composto basicamente de unidades de D-glicose e considerado o principal carboidrato sintetizado por plantas com grande importância na alimentação humana (VILLALBA, 2012). Em sua

constituição existem dois tipos de polímeros de glicose, a amilose formada por cadeias longas, não ramificadas e com ligações $\alpha 1 \rightarrow 4$ e amilopectinas, também formadas por cadeias longas, ramificadas e com ligações $\alpha 1 \rightarrow 4$ e ramificações com ligações $\alpha 1 \rightarrow 6$ (NELSON E COX, 2018).

As endo-amilases, também conhecidas como α -amilase (EC 3.2.1.1) são enzimas que catalisam a quebra das ligações glicosídicas $\alpha 1 \rightarrow 4$ presentes no interior do amido convertendo o em mono e polissacarídeos sendo considerada uma enzima de grande importância em processos biológicos e também patológicos do organismo (RIBEIRO E SERAVALLI, 2007).

Um outro grupo de enzimas usado na degradação de amido são as exo-amilases, representadas pela α -glicosidase (EC 3.2.1.50) responsáveis por quebrar as ligações glicosídicas $\alpha 1 \rightarrow 4$ externas das amiloses, amilopectinas e polissacarídeos (OTA *et al.*, 2009).

A hiperglicemia pós prandial é um fator muito importante no desenvolvimento da Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) e frequentemente associada a complicações como as alterações micro e macro vasculares (KIM *et al.*, 2005). Tangvarasittichai (2015) ainda afirma que uma das complicações decorrentes do diabetes tipo 2 não controlada diz respeito ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio que são capazes de gerar danos diversos aos sistemas celulares. Esse aumento nas espécies reativas de oxigênio acarretam o desenvolvimento de outras doenças como a resistência à insulina, obesidade e até mesmo a complicação do quadro hiperglicêmico.

Para controlar a glicemia, existem no mercado diversas alternativas terapêuticas como os sensibilizadores que aumentam a resposta à insulina, os secretagogos que aumentam a liberação de insulina, os inibidores da digestão de carboidratos os inibidores enzimáticos de α -amilase e de α -glicosidase, dentre outros (ALVES DA CONCEIÇÃO *et al.*, 2017). As reais utilizações dessas classes farmacológicas devem ser avaliadas de acordo com a necessidade do paciente.

Assim, a utilização de inibidores de α -amilase e α -glicosidase são duas opções terapêuticas indicadas para o tratamento da DM2 (ASSOCIATION, 2014) e agem reduzindo os níveis séricos de glicose pós prandial retardando sua captação através da inibição das enzimas presentes no trato digestivo (KIM *et al.*, 2005; GOMES E LERARIO, 2009). A α -glicosidase está presente nas vilosidades do enterócito e catalisa o lançamento de monossacarídeos das terminações não reduzidas dos oligossacarídeos e dissacarídeos (LEBOVITZ, 1997; KUMAR *et al.*, 2011).

A α -glicosidase está amplamente distribuída nos tecidos de microrganismos, plantas e animais. Já se apresentam descritos na literatura produtos naturais capazes de inibir atividade da α -glicosidase (KIM *et al.*, 2005; TADERA *et al.*, 2006; TUNDIS *et al.*, 2010; KUMAR *et al.*,

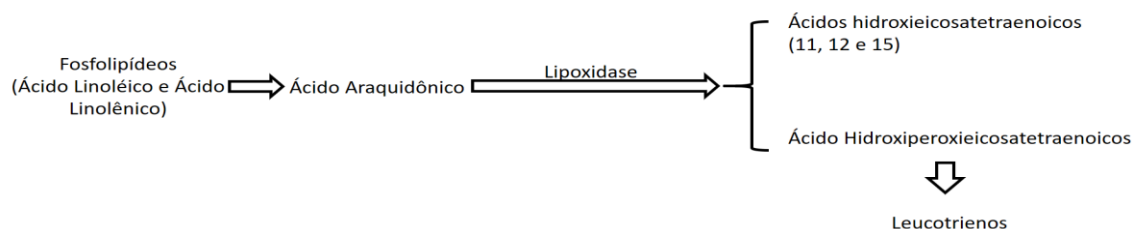
2011), assim como já existem no mercado algumas drogas sintéticas capazes de inibir as enzimas α -amilase e α -glicosidase como a acarbose, a voglibose e o miglitol (LEBOVITZ, 1997). Os inibidores de α -glicosidase também aumentam a liberação de incretinas que podem ser associadas a benefícios no tratamento de pacientes pré-diabéticos (MORIYA *et al.*, 2009).

As atividades inibitórias das enzimas α -amilase e α -glicosidase em extratos aquosos de *Tournefortia paniculata* já foram testadas antes e depois da estimulação pelo suco gástrico por Simão, Duarte, *et al.* (2012), entretanto a análise química e biológica e as frações ativas por polaridade crescente ainda não foram avaliadas. A identificação de frações químicas capazes de permitir uma avaliação por atividade biomonitorada no desenvolvimento de novas drogas ainda não foi desenvolvido.

2.6 Atividade anti-inflamatória de produtos naturais pela via de inibição da lipoxidase

A lipoxidase participa de uma importante via da cascata inflamatória na qual envolve a presença de ácidos graxos, como substrato, pela via do ácido araquidônico na presença de espécies reativas de oxigênio produzidas pela ativação leucocitária (ANOOP E BINDU, 2015). Na figura 3 é possível observar um fragmento da cadeia de ação da lipoxidase na biotransformação de ácidos graxos em mediadores inflamatórios.

Figura 2 – Representação esquemática da via da lipoxidase na formação de mediadores inflamatórios



Fonte: Imagem adaptada de (KITAMURA E CHEMISTRY, 1984) .

Delafronte (2014) descreve a presença de quatro tipos isolados de lipoxidase e as designa como LOX, LOX2, LOX3a e LOX3b. Tais moléculas são descritas como isoenzimas globulares, solúveis em solução salina e formadas por uma cadeia simples de polipeptídeo.

De acordo com as variáveis moleculares da lipoxidase, a tipo 1 é a que apresenta maiores atividades biológicas comprovadas *in vitro* e maior estabilidade térmica. (MONTEIRO *et al.*, 2004).

Atualmente, os estudos envolvendo a lipoxidase tem sido amplamente estudada uma vez que estão presentes na maioria das células de defesa do organismo como nos leucócitos, nos polimorfonucleados, nos basófilos, nos mastócitos, nos eosinófilos e nos macrófagos. A lipoxidase também participa ativamente de diversas cadeias da cascata inflamatória podendo desenvolver no paciente desde uma simples alergia tópica até uma severa disfunção cardíaca (AUSTIN E MOALEM-TAYLOR, 2013).

Importantes pesquisas associam as concentrações da enzima lipoxidase a algumas importantes e letais doenças como o acidente vascular cerebral (AVC). Gulcher *et al.* (2005) demonstra a relação intrínseca existente entre altas concentrações de lipoxidase e a presença de AVC isquêmico.

2.7 Quimioprevenção do câncer e sua importância na pesquisa com plantas medicinais

O câncer é um conjunto de mais de 200 diferentes doenças de ordem multifatorial, ou seja, não existe uma causa única e elucidada para o desenvolvimento e evolução. No entanto, pesquisadores já compreendem uma gama de fatores como hábitos alimentares, hábitos de vida, genética familiar dentre outros (BATISTA, 2010; SIEGEL *et al.*, 2017).

De acordo com Stewart e Wild (2014) o câncer é a segunda doença, não transmissível, mais prevalente no mundo com 14 milhões de novos casos documentados e 8 milhões de óbitos registrados. A estimativa desses autores é que esses números nas próximas duas décadas cheguem a 22 milhões de novos casos e 13 milhões de óbitos.

Batista (2010) ainda afirma que o câncer é uma doença causada por múltiplos fatores que, acumulados ao longo do tempo, causam mutações celulares de caráter fenotípica. Esse processo ocorre em três etapas básicas, a iniciação que ocorre em alguns dias, a promoção que pode levar alguns anos e finalmente a progressão que pode ocorrer entre 1 e 5 anos. Uma vez iniciado o processo com alterações feitas ao nível do Ácido Desoxirribonucleico (DNA), torna-se um processo irreversível.

A partir do momento em que o tratamento posterior ao desenvolvimento da doença, além de causar severos efeitos colaterais, não apresenta resultados tão satisfatórios quanto desejáveis, a quimioprevenção tornou-se o objetivo de muitos pesquisadores. Assim, compostos diversos tem sido estudados na tentativa de retardar ou inibir o início do processo carcinogênico (MANACH *et al.*, 2009; BATISTA, 2010).

A quimioprevenção do câncer de acordo com Sporn (1976) é definida como a utilização de agentes químicos, naturais e biológicos com o objetivo terapêutico de suprimir, prevenir e

até mesmo reverter tanto as fases iniciais da carcinogênese como a progressão de células pré-malignas invasivas.

Assim, muitos fitoquímicos têm se despontado com excelentes resultados na quimioprevenção do câncer. Muitos compostos fitoquímicos têm sido estudados, seja em pesquisas clínicas, estudos epidemiológicos, carcinogênese ou em estudos em linhagem celular (Russo, 2007).

Atualmente, um dos principais testes utilizados para análise de quimioprevenção do câncer é o teste da indução da quinona redutase, uma enzima capaz de converter quinonas em hidroquinonas e, conseqüentemente, reduzir o ciclo oxidativo celular, sendo considerado, por esse mecanismo, um composto quimiopreventivo (BARTIKOVA *et al.*, 2015).

Na literatura não foram encontradas pesquisas relacionadas à quimioprevenção por qualquer das vias para a espécie *Tournefortia paniculata*. Por ser considerada uma espécie promissora e pertencente a uma família com crescentes pesquisas de interesse farmacológico, a investigação se torna essencial para a elucidação químico-biológica para determinação quimiopreventiva.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, M. et al. Dynamic action of carotenoids in cardioprotection and maintenance of cardiac health. **Molecules**, v. 17, n. 4, p. 4755-4769, 2012.

ALI, H.; HOUGHTON, P.; SOUMYANATH, A. α -Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 107, n. 3, p. 449-455, 2006.

ALIMENTARIUS, C. Codex Executive Committee Concludes 71st Session. 2016.

ALVES DA CONCEIÇÃO, R.; NOGUEIRA DA SILVA, P.; BARBOSA, M. Fármacos para o tratamento do diabetes tipo II: uma vista ao passado e um olhar para o futuro. **Rev Virtual Quim**, v. 9, n. 2, p. 514-34, 2017.

ANDERS, M.; ROBOTHAM, J. L.; SHEU, S.-S. Mitochondria: new drug targets for oxidative stress-induced diseases. **Expert opinion on drug metabolism & toxicology**, v. 2, n. 1, p. 71-79, 2006.

ANOOP, M.; BINDU, A. In-vitro Anti-inflammatory Activity Studies on *Syzygium zeylanicum* (L.) DC Leaves. **Int J Pharm Res Rev**, v. 4, n. 8, p. 18-27, 2015.

ASSOCIATION, A. D. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes care**, v. 37, n. Supplement 1, p. S81-S90, 2014.

AUSTIN, P.; MOALEM-TAYLOR, G. J. N. P. C. U. P. N. Y. Pathophysiology of neuropathic pain: inflammatory mediators. **Neuropathic Pain. Cambridge University Press: New York**, v. 7, p. 77-89p, 2013.

BARTIKOVA, H. et al. Effect of oral administration of green tea extract in various dosage schemes on oxidative stress status of mice in vivo. **Acta Pharmaceutica**, v. 65, n. 1, p. 65-73, Mar 2015.

BATISTA, M. S. H. **O Papel dos Fitoquímicos na Quimioprevenção do Cancro**. 2010. (Dissertação de Mestrado). Universidade do Porto, Porto, Portugal.

BERTOLINI, P. F. R. et al. Antimicrobial capacity of Aloe vera and propolis dentifrice against *Streptococcus mutans* strains in toothbrushes: an in vitro study. **Journal of applied oral science**, v. 20, n. 1, p. 32-37, 2012.

BERTOLUCCI, S. K. et al. Micropropagação de *Tournefortia cf paniculata* Cham. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 3, n. 1, p. 43-49, 2000.

BOROSKI, M. et al. **Antioxidantes: princípios e métodos analíticos**. 1ed. Curitiba: 2015. 141p ISBN 978-85-8192-730-5.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. John Wiley & Sons, 2015. ISBN 0470714220.

CHEN, M.-L. et al. The caffeic acid in aqueous extract of *Tournefortia sarmentosa* enhances neutrophil phagocytosis of *Escherichia coli*. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v. 36, n. 6, p. 390-396, 2014.

COLLINS, A. R. Assays for oxidative stress and antioxidant status: applications to research into the biological effectiveness of polyphenols. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, n. 1, p. 261S-267S, 2005.

DA SILVA OLIVEIRA, D. et al. Vitamina C, carotenoides, fenólicos totais e atividade antioxidante de goiaba, manga e mamão procedentes da Ceasa do Estado de Minas Gerais. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 33, n. 1, p. 89-98, 2011.

DELAFRONTE, B. **Determinação da atividade das enzimas lipoxigenases (L1 e L3) em oito genótipos de soja desenvolvidos pela Embrapa Soja**. 2014. Universidade Tecnológica Federal do Paraná

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. John Wiley & Sons, 2002. ISBN 0471496413.

FENALTI, J. M. et al. Diversidade das plantas brasileiras com potencial anti-helmíntico. **VITTALLE-Revista de Ciências da Saúde**, v. 28, n. 1, p. 38-49, 2016.

FERNANDES, P. Antibacterial discovery and development—the failure of success? **Nature biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 1497, 2006.

FERREIRA, A.; MATSUBARA, L. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da associação médica brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FIGUEIRA, T. R. et al. Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health. **Antioxidants & redox signaling**, v. 18, n. 16, p. 2029-2074, 2013.

FOGLIO, M. A. et al. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **Construindo a história dos produtos naturais**, v. 7, p. 1-8, 2006.

GOMES, J. V. D. et al. TRIAGEM FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES TROMBOLÍTICA E CITOTÓXICA DE CECROPIA HOLOLEUCA MIQ.(URTICACEAE), LIPPIA ALBA (MILL.) NE BR. EX P. WILSON (VERBENACEAE) E ZANTHOXYLUM RHOIFOLIUM LAM (RUTACEAE). **Infarma-Ciências Farmacêuticas**, v. 28, n. 1, p. 10-15, 2016.

GOMES, M. D. B.; LERARIO, A. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2009. **Sociedade Brasileira de Diabetes.**, 2009.

GUIMARÃES, E. F. et al. FLORA DA GUANABARA: FLACOURTIACEACEAE—OLACACEAE—BORAGINACEAE. **Rodriguésia**, n. 38, p. 143-246, 1971.

GULCHER, J. R. et al. Genes contributing to risk for common forms of stroke. **Trends in molecular medicine**, v. 11, n. 5, p. 217-224, 2005.

HEINONEN, O. P. et al. Effect of vitamin-E and beta-carotene on the incidence of lung-cancer and other cancers in male smokers. **New England Journal of Medicine**, v. 330, n. 15, p. 1029-1035, 1994.

INOUE, M. et al. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. **Current medicinal chemistry**, v. 10, n. 23, p. 2495-2505, 2003.

JALALI, F. S. S.; TAJIK, H.; HADIAN, M. Efficacy of topical application of alcoholic extract of yarrow in the healing process of experimental burn wounds in rabbit. **Comparative Clinical Pathology**, v. 21, n. 2, p. 177-181, 2012.

JOHN, J. A.; SHAHIDI, F. Phenolic compounds and antioxidant activity of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). **Journal of Functional Foods**, v. 2, n. 3, p. 196-209, 2010.

JÚNIOR, D. A. et al. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **J Bras Pneumol**, v. 31, n. Suppl 1, p. 60-68, 2005.

KIM, Y.-M. et al. Inhibitory effect of pine extract on α -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia. **Nutrition**, v. 21, n. 6, p. 756-761, 2005.

KITAMURA, K. J. A.; CHEMISTRY, B. Biochemical characterization of lipoxygenase lacking mutants, L1-less, L-2-less, and L-3-less soybeans. **Agricultural and biological chemistry**, v. 48, n. 9, p. 2339-2346, 1984.

KOURY, J. C.; DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Rev nutr**, v. 16, n. 4, p. 433-41, 2003.

KUMAR, S. et al. α -glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes. **Pharmacognosy reviews**, v. 5, n. 9, p. 19, 2011.

LEBOVITZ, H. E. Alpha-glucosidase inhibitors. **Endocrinology and metabolism clinics of North America**, v. 26, n. 3, p. 539-551, 1997.

LEITE, J. P. V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. Atheneu, 2009. ISBN 857379237X.

LIN, Y.-L. et al. Anti-Lipid-Peroxidative Principles from *Tournefortia sarmentosa*. **Journal of natural products**, v. 65, n. 5, p. 745-747, 2002.

LIN, Y.-L. et al. Phenolic compounds from *Tournefortia sarmentosa*. **Journal of natural products**, v. 62, n. 11, p. 1500-1503, 1999.

MACIAS, F. A.; GALINDO, J. L.; GALINDO, J. C. Evolution and current status of ecological phytochemistry. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22-24, p. 2917-2936, 2007.

MANACH, C. et al. The complex links between dietary phytochemicals and human health deciphered by metabolomics. **Mol. Nutr. Food Res**, v. 53, n. 10, p. 1303-1315, 2009.

MARMITT, D. J. et al. Plantas com potencial antibacteriano da relação nacional de plantas medicinais de interesse do sistema único de saúde: revisão sistemática. **Revista de Saúde Pública de Santa Catarina**, v. 8, n. 2, p. 135-152, 2015.

MONTEIRO, M. R. P. et al. Qualidade protéica de linhagens de soja com ausência do Inibidor de Tripsina Kunitz e das isoenzimas Lipoxigenases. **Revista de Nutrição**, 2004.

MORAES, L. D.; DE SOUSA, O. V.; YAMAMOTO, C. H. Avaliações Qualitativas e Quantitativas da Variação de Metabólitos Secundários em *Tournefortia paniculata* Cham (Boraginaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S2, p. 1032-1034, 2007.

MORIYA, R. et al. Activation of sodium-glucose cotransporter 1 ameliorates hyperglycemia by mediating incretin secretion in mice. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 297, n. 6, p. E1358-E1365, 2009.

MOURE, A. et al. Natural antioxidants from residual sources. **Food chemistry**, v. 72, n. 2, p. 145-171, 2001.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger-7**. Artmed Editora, 2018. ISBN 858271534X.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of natural products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

OTA, M. et al. Action of α -D-glucosidase from *Aspergillus niger* towards dextrin and starch. **Carbohydrate polymers**, v. 78, n. 2, p. 287-291, 2009.

PATRICK, G. L. **An introduction to medicinal chemistry**. Oxford university press, 2013. ISBN 0199697396.

PIMENTEL, S. P. et al. Protective effect of topical *Cordia verbenacea* in a rat periodontitis model: immune-inflammatory, antibacterial and morphometric assays. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 12, n. 1, p. 224, 2012.

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química nova**, p. 45-61, 2002.

RAPOLA, J. M. et al. Randomised trial of α -tocopherol and β -carotene supplements on incidence of major coronary events in men with previous myocardial infarction. **The Lancet**, v. 349, n. 9067, p. 1715-1720, 1997.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de alimentos**. Instituto Mauá de Tecnologia, 2007. ISBN 8521203667.

RICHTER, C.; PARK, J.-W.; AMES, B. N. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 17, p. 6465-6467, 1988.

RUSSO, G. L. Ins and outs of dietary phytochemicals in cancer chemoprevention. **Biochemical pharmacology**, v. 74, n. 4, p. 533-544, 2007.

SHAKYA, A. K. Medicinal plants: future source of new drugs. **International Journal of Herbal Medicine**, v. 4, n. 4, p. 59-64, 2016.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2017. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 67, n. 1, p. 7-30, 2017.

SIMÃO, A. A.; CORRÊA, A. D.; CHAGAS, P. M. B. Inhibition of digestive enzymes by medicinal plant aqueous extracts used to aid the treatment of obesity. **J. Med. Plant. Res**, v. 6, n. 47, p. 5826-5830, 2012.

SIMAO, A. A. et al. Chemical composition of medicinal plants used as auxiliary treatments for obesity. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 37, 2014.

SIMÃO, A. A. et al. Pharmacotoxic evaluation of extracts of medicinal plants used in the treatment of obesity. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 8, n. 43, p. 1103-1109, 2014.

SIMÃO, A. A.; DUARTE, A.; BATISTA, P. M. Inhibition of digestive enzymes by medicinal plant aqueous extracts used to aid the treatment of obesity. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 47, p. 5826-5830, 2012.

SIMÃO, A. A. et al. Antioxidants from medicinal plants used in the treatment of obesity. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 3, n. 3, p. 429, 2013.

SIMÃO, A. A. et al. Anti-obesity Effects of the Administration of *Tournefortia paniculata* Cham Extract on Wistar Rats Subjected to a Hypercaloric Diet. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, n. 4, p. 494-503, 2015.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Artmed Editora, 2016. ISBN 8582713657.

SMITH, L. B. **Boraginaceae. In: Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí: R. Reitz, 1970.

SPORN, M. B. Approaches to prevention of epithelial cancer during the preneoplastic period. **Cancer research**, v. 36, n. 7 Part 2, p. 2699-2702, 1976.

STADTMAN, E. R.; LEVINE, R. L. Protein oxidation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 899, n. 1, p. 191-208, 2000.

STAUDINGER, T.; PÈNE, F. Current insights into severe sepsis in cancer patients. **Revista Brasileira de terapia intensiva**, v. 26, n. 4, p. 335-338, 2014.

STEWART, B.; WILD, C. P. World cancer report 2014. 2014.

TADERA, K. et al. Inhibition of α -glucosidase and α -amylase by flavonoids. **Journal of nutritional science and vitaminology**, v. 52, n. 2, p. 149-153, 2006.

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

TANGVARASITTICHAJ, S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. **World journal of diabetes**, v. 6, n. 3, p. 456, 2015.

TENG, C.-Y. et al. *Tournefortia sarmentosa* extract attenuates acetaminophen-induced hepatotoxicity. **Pharmaceutical biology**, v. 50, n. 3, p. 291-396, 2012.

TUNDIS, R.; LOIZZO, M.; MENICHINI, F. Natural products as α -amylase and α -glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: an update. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 10, n. 4, p. 315-331, 2010.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **The Journal of physiology**, v. 552, n. 2, p. 335-344, 2003.

UPRITCHARD, J. E. et al. Spread supplemented with moderate doses of vitamin E and carotenoids reduces lipid peroxidation in healthy, nonsmoking adults. **The American journal of clinical nutrition**, v. 78, n. 5, p. 985-992, 2003.

VENEREO GUTIÉRREZ, J. R. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. **Revista Cubana de medicina militar**, v. 31, n. 2, p. 126-133, 2002.

VIEILLE, C.; ZEIKUS, G. J. J. M.; REVIEWS, M. B. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 65, n. 1, p. 1-43, 2001.

VILLALBA, C. M. A. **ESTUDOS ESTRUTURAIS DE PROTEÍNAS: INIBIDOR DE ALFA-AMILASE DE Secale cereale, GTPase YchF E ENOLASE DE Trypanosoma cruzi**. 2012. 121p (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR.

VOGIATZI, G.; TOUSOULIS, D.; STEFANADIS, C. The role of oxidative stress in atherosclerosis. **Hellenic J cardiol**, v. 50, n. 5, p. 402-409, 2009.

WALSH, C. **Antibiotics: actions, origins, resistance**. American Society for Microbiology (ASM), 2003. ISBN 1555812546.

WOLFE, K. L.; LIU, R. H. Structure– activity relationships of flavonoids in the cellular antioxidant activity assay. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 18, p. 8404-8411, 2008.

ZAGO, L. D. M. S.; DE MOURA, M. E. P. Vinte e dois anos de pesquisa sobre plantas medicinais: uma análise cienciométrica. **Tecnia**, v. 3, n. 1, p. 157-173, 2018.

ZHU, F. et al. Clustered patterns of species origins of nature-derived drugs and clues for future bioprospecting. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 31, p. 12943, 2011.

MANUSCRITO 1

Potential of *Tournefortia paniculata* Vent. extractive preparations to treat diabetes complications and its correlation with HPLC-DAD chemical profiles

Abstract

Tournefortia paniculata Vent is a plant of subtropical characteristics used in folk medicine to treat inflammations and urinary tract infections. Scientific studies with this species are incipient and require chemical-biological investigations. This study aimed to evaluate the α -amylase, α -glucosidase and lipoxidase inhibition, as well the bactericidal and fungicide activities of *Tournefortia paniculata* crude ethanolic extract (CE) and fractions. In addition, aimed to establish the relationship between chemical profile and such biological activities through chromatographic fingerprint and chemometric analyses. The CE was obtained by exhaustive percolation of powdered leaves of *Tournefortia paniculata*. The fractions were obtained from the sequential fractionation by liquid-liquid partition with *n*-hexane (HEX), dichloromethane (DCM), ethyl acetate (EtOAc) and *n*-Butanol (BuOH). The antimicrobial activities were evaluated against *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 25955 and *Candida* spp, employing the broth microdilution technique. The α -amylase, α -glucosidase, lipoxidase enzymes inhibition was carried according to Trinh *et al.* (2016), Popova *et al.* (2015) and Frum e Viljoen (2006), respectively. All bacteria showed resistance against CE and its fractions. DCM fraction showed activity against *Candida dubliniensis* strain (MIC=1000 μ g/mL) and CE, DCM and BuOH fractions against *Issatchenkia orientalis* strain (MIC=500 μ g/mL). The DCM fraction showed the best results into α -amylase (0.038 \pm 0.021mg/mL) and lipoxidase (0.217 \pm 0.006mg/mL) enzymes inhibition. The EtOAc fraction showed the highest α -glucosidase inhibitory activity (0.035 \pm 0.009mg/mL). HPLC-DAD fingerprint analysis showed expressive differences in the chemical profiles of the preparations. In order to establish the relationship between the evaluated biological activities responses and unidentified chromatographic peaks, a principal component (PC) analysis was been done. The constituents responsible for such potential biological activities indicated the peaks 2, 7 and 9 responsible to inhibit α -amylase and α -glucosidase enzymes, as well have antifungal activities against *Issatchenkia orientalis* / *Candida krusei* and *Candida dubliniensis*. Peaks 3, 4, 5, 6 and 8 showed positive correlation in lipoxidase enzyme inhibition. We concluded that, the DCM and AcOEt fraction was the most promising for further phytochemistry and biological studies with *Tournefortia paniculata*, due to the most proeminent potential to treat and prevent diabetes complications.

Key words: enzymes inhibition, antimicrobial, HPLC fingerprint analysis, biological activity relationship, principal component analysis.

INTRODUCTION

The WHO (World Health Organization) recommend that herbal drugs based on popular knowledge should have scientific certification about parts, extractions and doses (ORGANIZATION, 1999). *Tournefortia paniculata* Vent. (Boraginaceae), popularly named as “marmelinho” and “cura sarna” belongs from Mediterranean region, United States occurring principally in tropics and subtropics. In Brazil this plant is popularly used as diuretic and to

treat urinary infections and renal lithiasis (BERTOLUCCI, S. K. V. *et al.*, 2000). About this species only few studies were published in the literature (MORAES *et al.*, 2007; SIMÃO, DUARTE, *et al.*, 2012; SIMÃO *et al.*, 2013; SIMÃO, CORREA, FONSECA, *et al.*, 2014; SIMÃO, CORREA, PRETE, *et al.*, 2014; SIMÃO *et al.*, 2015), with no substantial data concerning chemical composition or its biological activities.

Preliminary phytochemical analysis revealed the positive presence of saponins, tannins, flavonoids, steroids and triterpenoids (MORAES *et al.*, 2007; SIMÃO *et al.*, 2013; SIMÃO, CORREA, PRETE, *et al.*, 2014). Regarding to biological activity, Simão, Duarte, *et al.* (2012) demonstrated *in vitro* activity of the aqueous crude extract of *Tournefortia paniculata* into the inhibition of α -amylase and α -glucosidase enzymes. However, only this biological potential had been described to *T. paniculata* extract in the scientific literature, pointing out need for deeper studies.

Type II diabetes mellitus (T2DM) is a noncommunicable chronic syndrome. Its characterized by the abnormal insulin secretion and its resistance to act into target tissue (PRABHA *et al.*, 2018). The International Diabetes Federation (IDF) estimated that 11% of aged 20–79 years (415 million adults) presented diabetes mellitus all over the world in 2015. The estimative of diabetic people in 2040 can reach about to 642 million, principally from the regions experiencing economic transitions (ZHENG *et al.*, 2018).

Two important tools to comprehend and to control T2DM scientific proven are the inhibitions of α -amylase e α -glucosidase enzymes. These enzymes are responsible by the bowel carbohydrate digestion (MCDUGALL E STEWART, 2005; HEMALATHA *et al.*, 2016).

According to Nitzan *et al.* (2015), Domingueti *et al.* (2016) and Zheng *et al.* (2018) type II diabetes mellitus can present many complications. These complications can include infections, with urinary infections as the most common, vascular complications and inflammations occurred by lipid mediators as resolvins, protectins and principally lipoxins. These inflammatory complications are considered the ninth principal responsible of reduced world life expectancy in diabetic people.

Nitzan *et al.* (2015) say that urinary tract infection is commonly associated to diabetic patients. They associate that high urinary and renal parenchymal glucose levels create a favorable environment for microorganisms' growth and multiplication. In addition, these authors show themselves concerned about the number of prescriptions of antibiotic and the resistance of these microorganisms against the existent drugs at present.

So, the diagnosis and treatment are very important to prevent eventual complications (SCHNARR E SMAILL, 2008). The principal bacteria responsible by urinary infection are

Pseudomonas spp, gram-negative bacteria, *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. from Enterobacteriaceae family (LEVY *et al.*, 2004). In this context, its common to find fungi infections caused principally by *Candida* spp (SOBEL *et al.*, 2006).

According to Tersey *et al.* (2015), an important pathway involved in diabetic inflammations is directly associated to a class of enzymes known as lipoxidase. The lipoxidase enzyme is involved in other diabetes complications as vein inflammations and circulatory injury such endothelial cells damage and hemodynamic imbalance caused by atherosclerosis (DOMINGUETI *et al.*, 2016).

Suzuki *et al.* (2015) also describe a range of affected tissues by the increase levels of lipoxidase as blood vessels, the brain, and the kidney implicating in a multiple organ damage caused by diabetes. Dobrian *et al.* (2019) associates the uncontrolled lipoxidase activity to some important Type 1 and 2 diabetes complications such as retinopathy, nephropathy, neuropathy, and from atherosclerotic cardiovascular disease. This work associates lipoxidase levels to pancreatic islets damage caused by the macrophages activation.

HPLC fingerprint analysis is a kind of multi-index quality control way to comprehend and reflect the variety and quantity of chemical components that grant comprehensively the integral function of herbal drugs components (HUANG *et al.*, 2019). It is also important to mention that plant drug derivatives are complex mixtures and often exhibit synergism. Thus, synergistic effects of bioactive constituents on plant extracts would explain the greater effectiveness of plant drug derivatives compared to their isolated constituents (WAGNER E ULRICH-MERZENICH, 2009). Due to the determination of the relationship between chemical composition of complex matrices and biological activity to be a complex task for research into natural products, chemometrics tools has been employed to solve it (SCHOLZ *et al.*, 2004; GARZA-JUÁREZ *et al.*, 2011; SEPTANINGSIH *et al.*, 2018).

In this context, in order to comprehend the relationship between chemical profile and biological activities related to diabetes and its complications, the aim of this work was to evaluate the α -amylase, α -glucosidase and lipoxidase inhibition, as well the bactericidal and fungicide activities of *Tournefortia paniculata* crude ethanolic extract and fractions associate with chromatographic fingerprint and principal component analysis.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material

The plant material was grown in the Medicinal Garden of the Federal University of Lavras. The harvest occurred in the months of October and November of 2013 in the morning. Leaves were collected from all parts of the plants and dried in an oven with forced air circulation at 40°C until obtaining constant weight. The material was authenticated by the Agricultural Research Company of Minas Gerais (EPAMIG) in Belo Horizonte, Brazil, and a voucher was incorporated into the PAMG herbarium (PAMG-57.806).

Preparation of extracts and fractions

Dried plant material (2 kg) was ground in a knife mill and the extracts were prepared by exhaustive percolation with 92 INPM ethanol at room temperature. The ethanol was removed under vacuum in a rotatory evaporator at 40°C to produce the crude extract (CE, 58,072 g). Three portions of it (10 g) were suspended in water (300 mL) and sequentially partitioned with equal volumes (3×100 mL) of *n*-hexane (HEX), dichloromethane (DCM), ethyl acetate (EtOAc) and *n*-butanol (BuOH). Solvents were removed in a rotavapor, at maximum temperature of 40 °C. The process was repeated 3 times to afford the HEX (6,46 g), DCM (2,81 g), EtOAc (1,60 g) and *n*-BuOH (1,30 g).

Enzymes inhibition assays

α-amylase inhibition

The α-amylase inhibition assay was performed according to Trinh *et al.* (2016) with adaptations. In a 96-well microplate, 25μL of the sample were added, 75μL of phosphate buffer pH 6.8 and 10μL of α-amylase (0.5 mg/ml in phosphate buffer). The plate was incubated in a kiln with digital temperature control for 10 min at 37°C. An aliquot of 125μL of 1% starch solution was added, homogenized and again incubated at 37°C for 10 min. Finally, 50μL of iodine solution was added and the absorbance at 620nm was immediately taken. The sample solvent was used as a negative control. The results were expressed in IC₅₀.

α-glucosidase inhibition

The α-glucosidase inhibition test was performed according to Popova *et al.* (2015), with some adaptations. Initially in a microtube, 30μL of the sample were added, 300μL of phosphate buffer pH 6.8 and 70μL of a solution of 2.5IU/mL of α-glucosidase in phosphate buffer. The microtubes were homogenized and incubated at 37°C for 10 minutes. After incubation an aliquot of 320μL of a solution of 30mg/mL Nitrophenyl-α-dD-glucopyranoside and incubated

again at 37°C for 15 minutes. After incubation, 275µL were transferred to microplates of 96 wells and absorbances were acquired at 405nm. The sample solvent was used as a negative control. The results were expressed in IC₅₀ (mg/mL).

Lipoxidase inhibition

The lipoxidase inhibition assay was performed according to Frum e Viljoen (2006), with some adaptations. Volume of 25µL of linoleic acid solution 1%(V/V) in borate buffer pH 9; 450µL of borate buffer pH 9 and 10µL of the samples were added in a quartz bucket at concentrations of 10, 5 and 2, 5mg/mL in methanol. Then, 450µL of pH 9 borate buffer was added. Next, 10µL of lipoxidase 5mg/mL was added to the buffer. The bucket was homogenized and the absorbances were measured every 20 seconds for 5 minutes at 234 nm against blank solution. *Curcuma longa* was used as positive control and sample solvents as negative control. The results were expressed in IC₅₀ (mg/mL).

Antimicrobial assays

Bactericidal assay

The bacteria *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 and *Klebsiella pneumoniae* ATCC 25955 donated by LABENT (Laboratory of Enterobacteria) of FIOCRUZ (Oswaldo Cruz Foundation) were used. The stock culture of the strains was stored in freezing medium (glycerol -15 mL, bacterial peptone - 0.5 g, yeast extract - 0.3 g, NaCl - 0.5 g, distilled water 100 mL, pH 7.0).

The culture was thawed at room temperature and reactivated by inoculating 100µL aliquots into tubes containing 10mL of Brain Heart Infusion (BHI) broth and incubated at 37°C / 24h. Standardization of the inoculum was performed by growth curve.

After reactivation, 50µL aliquot of the inoculum was transferred to 30 mL of Tryptone Soy Broth (TSB) and incubated at 37°C, and periodic readings (one-hour intervals) were performed in a spectrophotometer (OD 600 nm) and plating in Tryptone Soy Agar (TSA) with incubation at 37°C /24h. The culture was standardized in 10⁸ CFU mL⁻¹.

The minimum inhibitory concentration (MIC) of the crude extract and fractions was determined by using the microdilution technique in broth in 96-well polystyrene plates (WAYNE, 2008), with adaptations.

For this, extracts and fractions were resuspended in 10% (w/v) DMSO and serially diluted 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/132 (v/v). An aliquot of 150µL of the solutions were added to the wells and 10µL of the standard culture was inoculated. Plates were sealed and

incubated at 37°C/24h. After this period, the absorbance read at 620nm to determining the minimum inhibitory concentration.

Antifungal assay

The microorganisms used are listed in Table 1. The inoculum for susceptibility tests was carried out by microdilution as set forth by the recommendation protocol (CLSI DOCUMENT M27-A3, 2008; CLSI DOCUMENT M27-S4, 2012). The yeasts were grown overnight at 37 °C in Sabouraud Dextrose Agar (Merck) plates, and inocula for the assays were prepared by diluting scrape cell mass in 0.85% NaCl solution, adjusted to 0.5 Mc Farland scale and confirmed by spectrophotometric reading at 625nm. Cell suspensions were finally diluted to 5.0×10^3 CFU/mL. After that, 50µL of diluted extract were added in 50 µL of RPMI-1640 in microplates (96 wells) + 100µL of microorganisms' standard.

The samples were incubated at 37 °C for 24-48 hours, in triplicate. Amphotericin B resuspended in DMSO was used as standard control diluted 1:50 in RPMI-1640 (CANTÓN *et al.*, 2003). The microplates were incubated at 37°C for 48 hours.

According to Aligiannis *et al.* (2001), the concentration to improve vegetal activity used is considered strong if the Minimal Antifungal Activity (MAA) is lower than 500 mg/mL, moderate between 600 mg/mL and 1,500 mg/mL and weak inhibition if MIC present result upper than 1,600 mg/mL.

Table 1 – Microorganisms used in the antifungal test.

Reference strain
<i>Candida albicans</i> (ATCC® MYA-2876™) — SC5314
<i>Candida albicans</i> (ATCC® 90028™)
<i>Candida glabrata</i> IZ 07 (Referência FOP/UNICAMP)
<i>Candida lusitanae</i> (ATCC® 200950™)
Type strain
<i>Issatchenkia orientalis</i> (ATCC® 6258-MINI-PACK™) — <i>Candida krusei</i> CBS 573
<i>Candida tropicalis</i> (ATCC® 750™) — <i>Candida tropicalis</i> CBS 94
<i>Diutina rugosa</i> (ATCC® 10571™) — <i>Candida rugosa</i> CBS 613
<i>Candida dubliniensis</i> (ATCC® MYA-646™) — <i>Candida dubliniensis</i> CBS 7987
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (ATCC® 6260™) — <i>Candida guilliermondii</i> CBS 566
<i>Candida parapsilosis</i> (ATCC® 22019-MINI-PACK™) — <i>Candida parapsilosis</i> CBS

604

Phytochemical analysis

Phytochemical screening

The preliminary phytochemical analysis gives information on the presence or absence of different classes of secondary metabolites. The phytochemical screening was carried according to Matos (2009) and were performed from CE for the detection of the following compounds: steroidal or triterpenic saponins, alkaloids, tannin, anthocyanin, and coumarin.

HPLC-DAD profiles

HPLC-DAD profiles were performed in HPLC Agilent 1200 series (Agilent Technologies®, Waldbronn, Germany) equipped with a quaternary pump (G1311A) with degasser system (G1322A), ALS autosampler (G1322A) and TCC heater assembly (G1316A). A variable-wavelength ultraviolet detector (G1315D) was used to obtain chromatograms at 210 nm. The equipment was controlled by the OpenLAB software version A07.04, build 04.07.28. For sample preparation, an aliquot of 10 mg of CE and 5 mg of HEX, DCM, EtOAc and BuOH fractions were dissolved with 1.0 mL MeOH, at room temperature, in an ultrasound bath for 20min. After centrifugation at 8400 g for 10 min, the supernatant (10 µL) were automatically injected onto the HPLC system. Separations were performed on a reversed-phase analytical column C18 (Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies®, USA) with a silica-based packing (5 µm × 150 mm × 4.6 mm I.D.). A Security Guard Cartridge (Zorbax ODS 4-Pack, Agilent Technologies®, USA) was used as pre-column (5 µm × 12.5 mm × 4.6 mm I.D.) at a temperature of 40°C. Water (A) and acetonitrile (B) were used as eluents, both containing 0.01% (v/v) of phosphoric acid, using a linear gradient at a flow rate of 1.0 mL/min as follow: 0 min 95%A, 5% B; 60 min 5% A, 95% B, followed by 5 min isocratic elution and then returned to initial conditions in 5min.

The 10 uncommon major peaks of the chromatograms were selected for chemometric analysis. For this purpose, we considered the areas related to the most abundant peaks in the chemical profiles of the preparations. To ensure the purity and identity of the selected chromatographic peaks, a spectral homogeneity analyzes of 3 points of each peak were determined by DAD at wavelengths of 210 nm. Co-eluted peaks were manually integrated to ensure the spectral purity of the selected peaks.

Statistical Analysis

Statistical analyzes were submitted to the Scott Knott Test at 5% probability by Statistical R software. The statistical analysis of the observed data was performed according to the R Development Core Team (2012).

Principal Component Analysis (PCA), using Statistica software (trial version 13.4, StatSoft Inc., USA), were performed in order to investigate the relationship between quantitative chemical composition data of the preparations obtained by the areas of the 10 major peaks selected in the chromatograms and biological activities of the preparations. The analyzed data set constituted a 15×5 matrix. The rows constituted the samples (CE and fractions) and the columns the variables used in the analysis: areas of the 10 major peaks selected in the chromatographic profiles (Figure 1 and Table 4) and the corresponding biological responses (α -amylase, α -glucosidase, lipoxidase enzymes inhibition and antifungal assays – Tables 1, 2 and 3). Standardized average data were subjected to multivariate analysis and the results are shown by the scores and loadings plots, with two main components (PC) explained by their variances.

RESULTS AND DISCUSSION

The inhibition of α -amylase and α -glucosidase role an important function into the digestion of polysaccharides and posterior intestinal absorption of glucose. This mechanism controls the post-prandial levels of glucose and is directly involved with the glucose blood levels and to control insulin peaks (BHUTKAR E BHISE, 2012).

The results of inhibition of α -amylase and α -glucosidase enzymes of *Tournefortia paniculata* CE and fractions are presented in table 1.

Table 2 – Inhibition of α -amylase and α -glucosidase enzymes by *Tournefortia paniculata* crude extract and fractions.

Preparation *	α -Amylase (IC ₅₀ = mg/mL)	α -Glucosidase (IC ₅₀ = mg/mL)
CE	-	0.138±0.007 ^a
HEX	-	0.050±0.003 ^c
DCM	0.038 ± 0.021	0.096±0.002 ^b
EtOAc	-	0.035±0.009 ^d
BuOH	-	0.094±0.002 ^b

***CE**: ethanolic crude extract; **HEX**: *n*-hexane fraction; **DCM**: dichlorometane fraction; **EtOAc**: ethyl acetate fraction; **BuOH**: *n*-butanol fraction. Means followed by distinct letters in the columns differ from each other by the Scott-Knott test ($P < 0.05$). – signal means no activity.

Trinh *et al.* (2016) found IC₅₀ values for acarbose, a drug used as control to inhibit α -amylase and α -glucosidase of 0.108 mg/mL and 0.083 mg/mL, respectively. In view of the

above, DCM fraction of *Tournefortia paniculata* presented 284,21% more active than acarbose to inhibit α -amylase and has slight high activity than acarbose to inhibit α -glucosidase. It is also worth considering that HEX and EtOAc fractions presented 166% and 237.14%, respectively more active to inhibit α -glucosidase. This data represents a promisor use of such *T. paniculata* fractions to prevent or treat type II diabetes mellitus.

The inhibition of lipoxidase enzyme in diabetic people also roles an important factor to prevent severe complications. According to Shukla e Choudhary (2018), the mechanisms of inflammation which involve the metabolism of arachidonic acid play an important role to comprehend some complications occurred with noncontrolled diabetes. It can be metabolized by the lipoxidase pathway to hydroperoxyeicosatetraenoic acids and leukotrienes. This fact activates mechanisms of oxidation, production of defenses cells and severe damage in important tissues as kidney, veins, heart and principally pancreatic islets. So, the inhibition of lipoxidase enzyme as represent on table 2 can help people to treat some inflammatory complications occurred by activation of arachidonic acid pathway.

Table 3 – Inhibitory activity of lipoxidase enzyme by *Tournefortia paniculata* and its fractions

Preparation*	Lipoxidase (IC₅₀ = mg/mL)
CE	0.381±0,026b
HEX	0.276±0.022c
DCM	0.217±0.006d
EtOAc	0.629±0.034a
BuOH	0.295±0.001c
<i>Curcuma longa</i>	0.412±0.044b

***CE:** ethanolic crude extract; **HEX:** *n*-hexane fraction; **DCM:** dichlorometane fraction; **EtOAc:** ethyl acetate fraction; **BuOH:** *n*-butanol fraction; *Curcuma longa*: positive control. Means followed by distinct letters in the columns differ from each other by the Scott-Knott test (P <0.05)

The values found for the lipoxidase inhibition was between 108.13% in CE and 189.86% in DCM fraction when compared with those found for *Curcuma longa*, a herbal drug widely use as anti-inflammatory in herbal medicine (CONNEY *et al.*, 1991; SRIVASTAVA *et al.*, 1995). Phytochemical screening of CE of *Tournefortia paniculata* showed the presence of steroidal or triterpenic saponins, but did not found the presence of alkaloids, tannins, anthocyanin, and coumarin. The presence of steroidal or triterpenic saponins could be related to the anti-inflammatory activity for *T. paniculata* preparations, since these compounds has scientific evidence for this purpose (IBRAHIM *et al.*, 2017; KANG *et al.*, 2019).

Anti-inflammatory activities have also been proven for species belonging to Boraginaceae family as *Symphytum officinale* (GRUENWALD *et al.*, 2007), *Cordia curasavica* (DE SOUZA *et al.*, 2004) and *Cordia ecalyculata* Vell (LORENZI E MATOS, 2008).

The use of anti-inflammatory drugs has aroused the interest of countless researchers. Among the main pathways of anti-inflammatory mechanisms are cyclooxygenase inhibitors and lipoxygenase inhibitors. Since cyclooxygenase inhibitors have strong restrictions on use in patients with cardiac risk, they have included this class of medications in the list of medications with restricted sale to prescription retention (ERBAS *et al.*, 2015). Under this perspective, the search for lipoxygenase-inhibiting medicines has aroused great interest because they do not present such restrictions.

T2DM is also associated with increasing rates of infections, including most commonly urinary tract infections (NITZAN *et al.*, 2015; WILKE *et al.*, 2015). The antibacterial potential of ethanolic crude extract and fractions of *Tournefortia paniculata* leaves was evaluated on strains of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumonia*, since these bacteria according to Flores-Mireles *et al.* (2015) are common to infect the urinary tract.

Tournefortia paniculata did not exhibit any potential antibacterial activity against the tested uropathogens. León *et al.* (2014) reported that *Tournefortia densiflora*, another Boraginaceae plant, extract had better activity against fungi than bacteria. Since urinary tract infections can be caused by a wide range of pathogens, including Gram-negative and Gram-positive bacteria, as well as fungi (WIKANINGTYAS E SUKANDAR, 2016), this work also evaluated anti-*Candida* potential of *T. paniculata* CE and fractions.

According to Sobel *et al.* (2006), medical progress over the last 30 years has been attended by a concomitant increase in the prevalence of candiduria as well as in the incidence of *Candida* urinary tract infections. For many years *C. albicans* was the most prevalent species isolated from the urinary tract. With the advent and increasing use of fluconazole, non-*albicans* *Candida* species have emerged and are now dominant. These non-*albicans* species may not only be well adapted to the kidney and collecting system, but also more difficult to eradicate than *C. albicans* (SEIFU E GEBISSA, 2018).

Two strain of yeast showed sensitivity to *Tournefortia paniculata* preparations and the results for both are shown in Table 3. The DCM fraction presented moderate activity (MIC=1000µg/mL) against *Candida dubliniensis* strain. The CE, together with the DCM and BuOH fractions, showed to be strong effective in the fight against the species *Issatchenkia orientalis* (MIC=500µg/mL) followed by the moderate activity of the EtOAc fraction (MIC = 1000µg/mL). According Seifu e Gebissa (2018), *Issatchenkia orientalis* is the most resistant

species to existing drugs for the treatment of urinary tract infections. Studies showed antifungal activities against *Cladosporium cucumerinum* and *Candida albicans* of phenolic compounds isolated from *Cordia linnaei* and *Cordia curassavica*, two boraginaceous plants (IOSET *et al.*, 1998; 2000). In addition, the antifungal property of *Tournefortia paniculata* has not been reported prior to this study.

In the face of the biological activities responses, DCM fraction showed the most promising biological activities to treat and prevent diabetes complications and the AcOEt fractions was the best to inhibit α -glucosidase enzyme.

Table 4 – Antifungal activities of *Tournefortia paniculata* preparations.

Preparation	Minimum Inhibitory Concentration (MIC) — $\mu\text{g/mL}$						
	2000	1000	500	250	125	62.5	31.25
<i>Candida dubliniensis</i> (ATCC® MYA-646™)							
CE	+	+	+	+	+	+	+
HEX	+	+	+	+	+	+	+
DCM	-	MIC	+	+	+	+	+
AcOEt	+	+	+	+	+	+	+
BuOH	+	+	+	+	+	+	+
<i>Issatchenkia orientalis</i> (ATCC® 6258-MINI-PACK™)							
CE	-	-	MIC	+	+	+	+
HEX	+	+	+	+	+	+	+
DCM	-	-	MIC	+	+	+	+
AcOEt	-	MIC	+	+	+	+	+
BuOH	-	-	MIC	+	+	+	+

+ and - correspond to presence and absence of microbial growth, respectively. All MIC concentrations were considered fungistatic.

HPLC-DAD fingerprint analysis at 210 nm were performed under the same conditions to point out differences and / or similarities in the chemical profile of EB and *T. paniculata* fractions. The chromatographic profile and the relative abundance of the 10 major chromatographic peaks are shown in the Figure 1 and Table 4, respectively. The chromatograms of the preparations highlight the predominance of peaks in the range of 0 to 25 min, corresponding to substances of higher polarity and, in the range of 65 to 75 min, the prevalence of low polarity compounds. The chemical profiles of the CE, HEX, DCM and AcOEt fractions were the most complex due to the crowd presence of peaks with areas below 1% throughout the analysis time (Figure 1). It also noted that the chemical profiles of HEX and DCM fractions were quite similar, in comparison with other ones.

Table 5 – Peak areas selected for chemometric analysis, obtained from the chromatographic profiles of the preparations.

Sample	Peaks/RT (min)										
	s*	1/1.7	2/7.0	3/11.1	4/14.9	5/17.8	6/20.4	7/65.2	8/67.0	9/68.9	10/72.7
CE		43100		88594	371559	12616	46988	15332	693763	21739	84669
		08	19124	5	6	1	6	58	3	27	9
HEX		41823		11262	105783	41863	14448	20918	131724	34592	76520
		5	59760	3	9	9	1	05	2	51	3
DCM		14620	17386	33549	225370	24609	19941	38017	197825	53396	60666
		2	0	8	1	33	50	46	9	65	2
EtOAc		12753	40847	69521	444133	35651	90178	32338	173387	48747	66586
		62	68	8	1	23	6	78	6	21	7
BuOH		54663		72575	298757	48584	26539	96460	153812	21942	71730
		3	0	07	36	6	42	1	74	29	6

***CE**: ethanolic crude extract; **HEX**: *n*-hexane fraction; **DCM**: dichlorometane fraction; **EtOAc**: ethyl acetate fraction; **BuOH**: *n*-butanol fraction. **RT**: retention time.

The biological activity of medicinal herbs is usually associated with synergistic effects between different constituents. Fingerprint analysis without individually determining metabolite identities have been used to determine the relationship between chemical and biological activities. Due to the chromatographic fingerprint analysis provide a vast amount of information than data derived from the identification and quantification of individual chemical markers, processing the chromatographic data obtained from this type of analysis is complex; therefore, chemometric tools such as principal component analysis (PCA) can be used (GARZA-JUÁREZ *et al.*, 2011). Some publications explore the usefulness of chromatographic fingerprints and chemometric analysis as a tool to predict the activity of plants (SCHOLZ *et al.*, 2004; GARZA-JUÁREZ *et al.*, 2011).

Thus, we investigated the relationship between the 10 major chromatographic peaks of the CE and fractions of *Tournefortia paniculata* (Figure 1 and Table 4) and the determined biological activities (α -amylase, α -glucosidase, lipoxidase enzymes inhibition and antifungal assays – Tables 1, 2 and 3).

The PCA recorded that the accumulated variance of the first two components was 66.65% of the total variation observed, with the first principal component accounting for 38.25% and the second 28.40% (Figure 3).

Figure 1 – Fingerprint by HPLC-DAD a 210 nm of *Tournefortia paniculata* preparations.

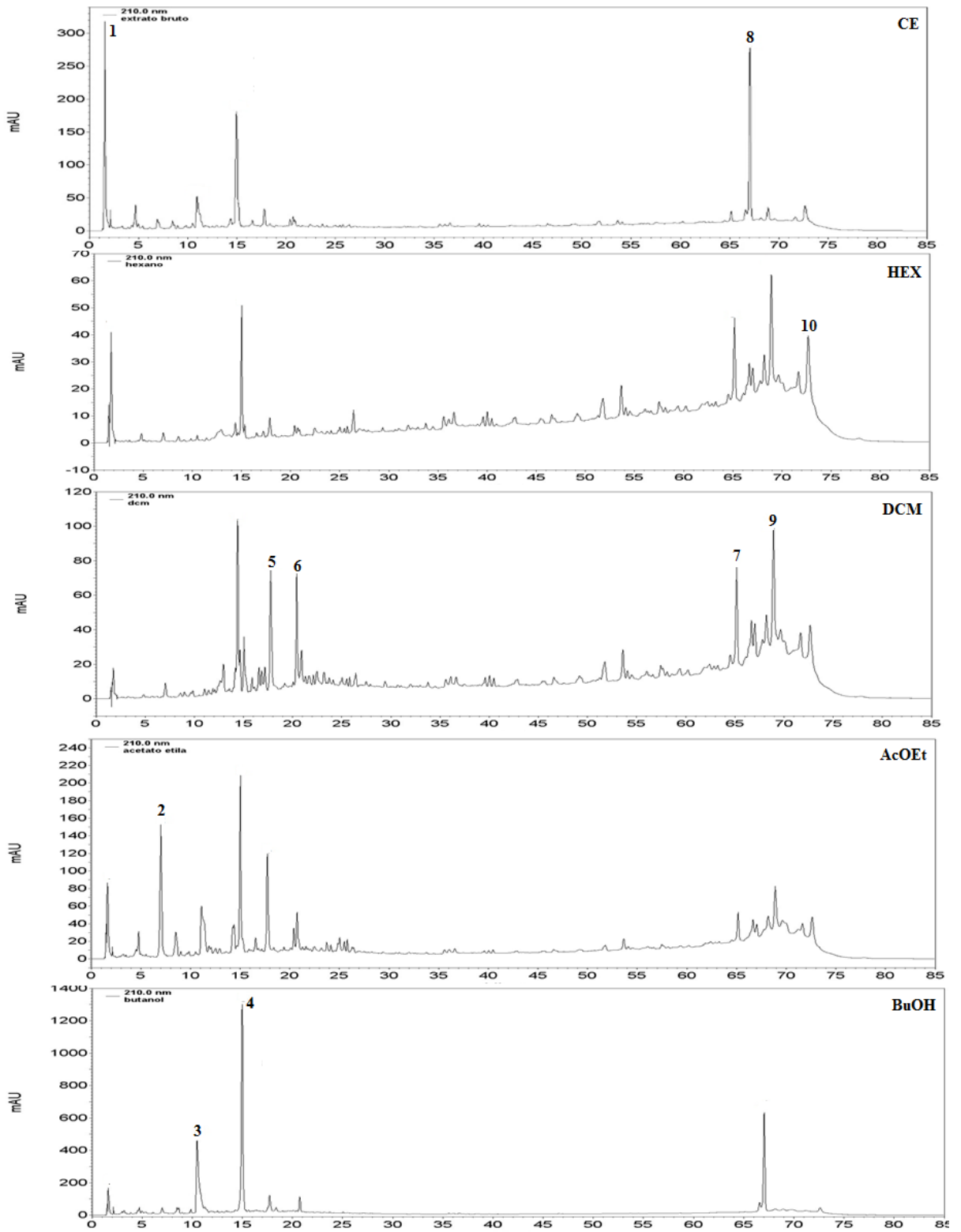
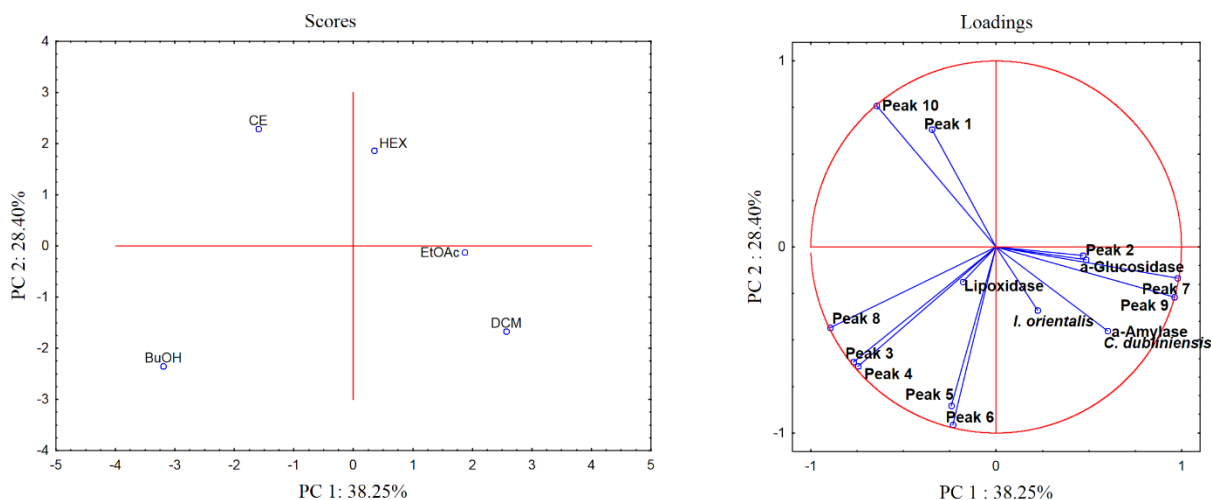


Figure 2 – Scores and loadings of the principal component analysis (PCA) in matrix correlation constructed using data of the extractive preparations of *Tournefortia paniculata* and the area of the 10 uncommon major peaks in the chromatographic profiles of the preparations and biological activities responses.



The scores plot in CP1 clearly discriminate the samples showing the expressive differences in the chromatographic profiles. Except for DCM and AcOEt fractions, which showed quite similar chromatographic profiles, demonstrated by clustering of those preparations in the same quadrant on the CP1 score plot.

The loadings plot on CP1 clearly shows the positive correlation between peaks 7 and 9 for the inhibition activity of the α -amylase e α -glucosidase enzymes and also for antifungal activities against *Issatchenkia orientalis*/*Candida krusei* and *Candida dubliniensis*. Peak 2 also showed a high level of positive correlation for α -glucosidase inhibition activity. Regarding lipoxidase enzyme inhibition, a high intensity positive correlation was observed for peaks 3 and 4. The DCM fraction was the most potent in inhibiting the lipoxidase enzyme (Table 2), however the lipoxidase vector in the loading plot of Figure 3 is not explained by PC1, but by PC2. By analyzing the DCM chromatogram profile, peaks 4, 5 and 6 account for this activity, being the peak 4 the one with the strongest positive correlation (Figure 2 and Table 4).

It is important to emphasize the abundance of peak 4 in all chromatographic profiles, which was higher in the BuOH fraction. Besides this, peak 3 was also more abundant in the BuOH fraction than in other profiles, which underline a synergistic effect of peaks 3 and 4 in inhibiting the lipoxidase enzyme. Although peaks 5, 6 and 8 should also be considered responsible for this activity, suggesting the existence of synergism.

The HEX and BuOH fractions were the second most potent in inhibiting the lipoxidase enzyme. However, different chemical components contribute to lipoxidase inhibition in these fractions. By overlaying the loadings plot over the scores in CP1 and by individually analysis of the selected peaks in those chemical profiles, we can observe the separation of peaks 7 and 9 for the HEX fraction and peaks 3, 4, 5, 6 and 8 for the DCM fraction. This observation suggests a positive relationship between the respective peaks and such biological activity.

In the overlap of score plot over loadings plot in PC1 (Figure 3) it was possible to confirm the superiority of α -glucosidase inhibition by the AcOEt fraction, as well the DCM fraction demonstrated the most promising *Tournefortia paniculata* preparation to treat and prevent diabetes complications. It is also important to keep in mind that, the DCM fractions showed the most complex chemical profile, which shows the potential of *T. paniculata* for the development of a herbal medicine, due to the synergistic effects reported in this study.

CONCLUSION

The present study provides guidance on the potential of extractive preparations of *Tournefortia paniculata* for the treatment and prevention of diabetes complications.

Principal component analysis was been done in order to investigate the relationship between the evaluated biological activities responses and quantitative chemical composition. The constituents responsible for such potential biological activities indicated the peaks 2, 7 and 9 to inhibit α -amylase and α -glucosidase enzymes and fungal susceptibility of *Issatchenkia orientalis* / *Candida krusei* and *Candida dubliniensis*. Peaks 3, 4, 5, 6 and 8 give positive correlation to inhibit lipoxidase enzyme.

The DCM fraction was the most promising for further phytochemical and biological studies. Regarding the inhibitory activity of the α -glucosidase enzyme, the AcOEt fraction was the most effective to inhibit α -glucosidase enzyme. Our research group has been engaged in a deep investigation of medicinal potential and phytochemistry analyses about this medicinal herb, in order to assign its beneficial to treat and prevent diabetes type 2.

REFERENCE

ALIGIANNIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 9, p. 4168-4170, 2001.

BERTOLUCCI, S. K. V. et al. Micropropagation of *Tournefortia paniculata* Cham. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 3, n. 1, p. 43-49, 2000.

BHUTKAR, M.; BHISE, S. In vitro assay of alpha amylase inhibitory activity of some indigenous plants. **Int. J. Chem. Sci**, v. 10, n. 1, p. 457-62, 2012.

CANTÓN, E. et al. Minimum fungicidal concentrations of amphotericin B for bloodstream *Candida* species. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 45, n. 3, p. 203-206, 2003.

CONNERY, A. H. et al. Inhibitory effect of curcumin and some related dietary compounds on tumor promotion and arachidonic acid metabolism in mouse skin. **Advances in enzyme regulation**, v. 31, p. 385-396, 1991.

DE SOUZA, G. C. et al. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, n. 1, p. 135-143, 2004.

DOBRIAN, A. et al. Role of the 12-lipoxygenase pathway in diabetes pathogenesis and complications. **Pharmacology & therapeutics**, v. 195, p. 100-110, 2019.

DOMINGUETI, C. P. et al. Diabetes mellitus: the linkage between oxidative stress, inflammation, hypercoagulability and vascular complications. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 30, n. 4, p. 738-745, 2016.

ERBAS, M. et al. Comparison of the effectivity of oral and intra-articular administration of tenoxicam in patients with knee osteoarthritis. **Revista brasileira de anestesiologia**, v. 65, n. 5, p. 333-337, 2015.

FLORES-MIRELES, A. L. et al. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. **Nature reviews microbiology**, v. 13, n. 5, p. 269, 2015.

FRUM, Y.; VILJOEN, A. M. In Vitro 5-Lipoxygenase Activity of Three Indigenous South African Aromatic Plants Used in Traditional Healing and the Stereospecific Activity of Limonene in the 5-Lipoxygenase Assay. **Journal of Essential Oil Research**, v. 18, 2006.

GARZA-JUÁREZ, A. et al. Correlation between chromatographic fingerprint and antioxidant activity of *Turnera diffusa* (Damiana). **Planta medica**, v. 77, n. 09, p. 958-963, 2011.

GRUENWALD, J.; BRENDLER, T.; JAENICKE, C. **PDR for herbal medicines**. Thomson, Reuters, 2007. ISBN 1563636786.

HEMALATHA, P. et al. Distribution of phenolic antioxidants in whole and milled fractions of quinoa and their inhibitory effects on α -amylase and α -glucosidase activities. **Food chemistry**, v. 199, p. 330-338, 2016.

HUANG, X.-L. et al. Evaluation of quality of *Salvia miltiorrhiza* Bunge from different provenances by HPLC-DAD fingerprint combined with Chemometrics Method. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2019, IOP Publishing. p.012163.

IBRAHIM, M. H.; OMAR, H.; ZAIN, N. A. M. Salicylic acid enhanced photosynthesis, secondary metabolites, antioxidant and lipoxygenase inhibitory activity (LOX) in *Centella asiatica*. **Annual Research & Review in Biology**, v. 17, n. 4, 2017.

IOSET, J.-R. et al. Antifungal and larvicidal meroterpenoid naphthoquinones and a naphthoxirene from the roots of *Cordia linnael*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 5, p. 729-734, 1998.

_____. Antifungal and larvicidal cordiaquinones from the roots of *Cordia curassavica*. **Phytochemistry**, v. 53, n. 5, p. 613-617, 2000.

KANG, S.-H. et al. Biotransformation of Food-Derived Saponins, Platycosides, into Deglycosylated Saponins Including Deglycosylated Platycodin D and Their Anti-Inflammatory Activities. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 67, n. 5, p. 1470-1477, 2019.

LEÓN, L.-D. et al. Effect of crude plant extracts from some Oaxacan flora on two deleterious fungal phytopathogens and extract compatibility with a biofertilizer strain. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 383, 2014.

LEVY, C. E. et al. **Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção em serviços de saúde**. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília. 2004

LORENZI, H.; MATOS, F. J. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. ISBN 8586714186.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 3ed. Fortaleza, CE: Edições UFC, 2009. ISBN 85-7282-026-4.

MCDUGALL, G. J.; STEWART, D. The inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes. **Biofactors**, v. 23, n. 4, p. 189-195, 2005.

MORAES, L. D.; DE SOUSA, O. V.; YAMAMOTO, C. H. Avaliações Qualitativas e Quantitativas da Variação de Metabólitos Secundários em *Tournefortia paniculata* Cham (Boraginaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S2, p. 1032-1034, 2007.

NITZAN, O. et al. Urinary tract infections in patients with type 2 diabetes mellitus: review of prevalence, diagnosis, and management. **Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy**, v. 8, p. 129, 2015.

ORGANIZATION, W. H. **WHO monographs on selected medicinal plants**. World Health Organization, 1999. ISBN 9241545372.

POPOVA, M. et al. Antioxidant and α -glucosidase inhibitory properties and chemical profiles of Moroccan propolis. **Natural Product Communications**, v. 10, p. 1961–1964, 2015.

PRABHA, B. et al. Antidiabetic potential of phytochemicals isolated from the stem bark of *Myristica fatua* Houtt. var. *magnifica* (Bedd.) Sinclair. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 12, p. 3461-3467, 2018.

SCHNARR, J.; SMAILL, F. Asymptomatic bacteriuria and symptomatic urinary tract infections in pregnancy. **European journal of clinical investigation**, v. 38, p. 50-57, 2008.

SCHOLZ, M. et al. Metabolite fingerprinting: detecting biological features by independent component analysis. **Bioinformatics**, v. 20, n. 15, p. 2447-2454, 2004.

SEIFU, W. D.; GEBISSA, A. D. Prevalence and antibiotic susceptibility of Uropathogens from cases of urinary tract infections (UTI) in Shashemene referral hospital, Ethiopia. **BMC infectious diseases**, v. 18, n. 1, p. 30, 2018.

SEPTANINGSIH, D. A. et al. Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS) Fingerprint Combined with Chemometrics for Identification of Metabolites Content and Biological Activities of *Curcuma aeruginosa*. **Indonesian Journal of Chemistry**, v. 18, n. 1, p. 43-52, 2018.

SHUKLA, A.; CHOUDHARY, A. Evaluation of in vitro antidiabetic and anti-inflammatory activities of leaves extract of *boehmeria rugulosa*. **Asian J Pharm Clin Res**, v. 11, n. 9, 2018.

SIMÃO, A. A. et al. Chemical composition of medicinal plants used as auxiliary treatments for obesity. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 37, 2014.

SIMÃO, A. A. et al. Pharmacotoxic evaluation of extracts of medicinal plants used in the treatment of obesity. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 8, n. 43, p. 1103-1109, 2014.

SIMÃO, A. A.; DUARTE, A.; BATISTA, P. M. Inhibition of digestive enzymes by medicinal plant aqueous extracts used to aid the treatment of obesity. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 47, p. 5826-5830, 2012.

SIMÃO, A. A. et al. Antioxidants from medicinal plants used in the treatment of obesity. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 3, n. 3, p. 429, 2013.

SIMÃO, A. A. et al. Anti-obesity Effects of the Administration of *Tournefortia paniculata* Cham Extract on Wistar Rats Subjected to a Hypercaloric Diet. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, n. 4, p. 494-503, 2015.

SOBEL, J. D. et al. Suppressive antibacterial therapy with 0.75% metronidazole vaginal gel to prevent recurrent bacterial vaginosis. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 194, n. 5, p. 1283-1289, 2006.

SRIVASTAVA, K.; BORDIA, A.; VERMA, S. Curcumin, a major component of food spice turmeric (*Curcuma longa*) inhibits aggregation and alters eicosanoid metabolism in human blood platelets. **Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids**, v. 52, n. 4, p. 223-227, 1995.

SUZUKI, H. et al. Arachidonate 12/15-Lipoxygenase-Induced Inflammation and Oxidative Stress Are Involved in the Development of Diabetic Cardiomyopathy. **Diabetes & Metabolic Syndrome-Clinical Research & Reviews**, v. 64, n. 2, p. 618-630, 2015.

TERSEY, S. A. et al. Minireview: 12-lipoxygenase and islet β -cell dysfunction in diabetes. **Molecular Endocrinology**, v. 29, n. 6, p. 791-800, 2015.

TRINH, B. T.; STAERK, D.; JÄGER, A. K. Screening for potential α -glucosidase and α -amylase inhibitory constituents from selected Vietnamese plants used to treat type 2 diabetes. **Journal of ethnopharmacology**, v. 186, p. 189-195, 2016.

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, v. 16, n. 2-3, p. 97-110, 2009.

WAYNE, P. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**: National committee for clinical laboratory standards, NCCLS. M100-S9: 120-6 p. 2008.

WIKANINGTYAS, P.; SUKANDAR, E. Y. The antibacterial activity of selected plants towards resistant bacteria isolated from clinical specimens. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 1, p. 16-19, 2016.

WILKE, T. et al. Epidemiology of urinary tract infections in type 2 diabetes mellitus patients: An analysis based on a large sample of 456,586 German T2DM patients. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 29, n. 8, p. 1015-1023, 2015.

ZHENG, Y.; LEY, S. H.; HU, F. B. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. **J Nature Reviews Endocrinology**, v. 14, n. 2, p. 88, 2018.

MANUSCRITO 2

Atividades antioxidante e quimiopreventiva *in vitro* do extrato etanólico e frações de *Tournefortia paniculata* Vent.**Resumo**

Tournefortia paniculata Vent. é uma planta medicinal da família Boraginaceae originária dos Estados Unidos e do Mediterrâneo. A atividade antioxidante está relacionada às atividades quimiopreventiva e antitumoral, pois o estresse oxidativo pode causar danos ao DNA provocando mutações que podem levar à malignidade. O presente estudo objetivou avaliar o potencial antioxidante e quimiopreventivo do extrato bruto etanólico (EB) e frações de folhas de *T. paniculata*. O pó das folhas foi exaustivamente percolado com etanol 92°INMP para fornecer o EB, o qual foi ressuspenso em água e, sequencialmente particionado com *n*-hexano (HEX), diclorometano (DCM), acetato de etila (EtOAc) e *n*-butanol (BuOH) para obtenção das respectivas frações. A fração BuOH foi a que apresentou atividade antioxidante mais promissora nos ensaios de sequestro de radicais livres DPPH ($0,05 \pm 0,00$), capacidade antioxidante total ($4,14 \pm 0,14$), poder redutor de íons Fe^{+3} ($8,96 \pm 0,20$) e capacidade de absorção de radicais de oxigênio ($5,51 \pm 0,05$), assim como maiores teores de compostos fenólicos totais ($130,23 \pm 1,95$) e de flavonas/flavonóis totais ($5,08 \pm 0,07$). Análises por UPLC-DAD-ESI-MS da fração BuOH permitiram a identificação parcial de um derivado glicosilado do ácido siríngico como componente majoritário dessa fração. Nos ensaios de quimioprevenção, nenhuma preparação de *T. paniculata* foi capaz de inibir o TNF- $k\beta$. Entretanto, as frações HEX ($2 \pm 0,16$) e DCM ($2 \pm 0,11$) induziram a atividade da quinona redutase (QR), sem apresentar citotoxicidade. Devido a recuperação de maior massa, a fração HEX foi selecionada para fracionamento em coluna aberta de sílica gel fornecendo a subfração quimiopreventiva RH2. Análises fitoquímicas da subfração RH2 sugeriram a presença de uma mistura de um derivado heterosídeo-piperazínico e heterosídeo-piperidínico de núcleo triterpênico. Conclui-se que o fracionamento biomonitorado do EB das folhas de *Tournefortia paniculata* apontou dados inéditos da composição química e atividades antioxidantes e quimiopreventivas para a espécie.

Palavras Chave: Marmelinho, espécie reativa de oxigênio, prevenção do câncer, UPLC-DAD-ESI-MS, ensaio bioguiado.

Abstract

Tournefortia paniculata Vent. is a medicinal plant belonging to Boraginaceae family originally from United States and Mediterranean. Antioxidant activity is related to chemopreventive and antitumoral activities, because oxidative stress can cause damage to DNA bringing mutations that can lead to malignancy. This study aimed to evaluate the antioxidant and chemopreventive potential of crude ethanolic extract (EB) and fractions of *T. paniculata*'s leaves. The powdered leaves were exhaustively percolated with 92°INMP ethanol to give crude ethanolic extract (EB). EB was suspended in water and sequentially partitioned with *n*-hexane (HEX), dichloromethane (DCM), ethyl acetate (EtOAc) and *n*-Butanol (BuOH). The BuOH fraction showed the most promising antioxidant activity in the trials of DPPH free radical sequestration assays (0.05 ± 0.00), total antioxidant capacity (4.14 ± 0.14), Fe^{+3} ion reducing power (8.96 ± 0.20) and oxygen radical absorption capacity (5.51 ± 0.05), as well as higher contents of total phenolic compounds (130.23 ± 1.95) and total flavones/flavonols (5.08 ± 0.07). The UPLC-

PDA-ESI-MS analysis of the BuOH fraction were able to partially identify a glucoside derivative of syringic acid as the major constituent of this fraction. In chemoprevention tests, no preparation of *T. paniculata* was able to inhibit TNF-K β . However, the HEX (2 ± 0.16) and DCM (2 ± 0.11) fractions induced quinone reductase (QR) activity, without cytotoxicity. Due to the higher mass recovery, the HEX fraction was selected to fractionation on a silica gel column to furnish the RH2 chemopreventive subfraction. The RH2 phytochemical analysis suggested the presence of a mixture of a heteroside-piperazine and a heteroside-piperidine derivatives of triterpene nucleus. In conclusion, the biomonitored fractionation of the EB of *Tournefortia paniculata* leaves afforded unpublished data about chemical composition, antioxidant and chemopreventive activities for this specie.

Keywords: 'Marmelinho', reactive oxygen species, cancer prevention, UPLC-PDA-ESI-MS, bioguided assay.

INTRODUÇÃO

Tournefortia paniculata Vent, popularmente conhecida como marmelinho, é uma planta originária dos Estados Unidos e Mediterrâneo (SIMÃO *et al.*, 2015). Na medicina popular brasileira, suas folhas são utilizadas como diurético, anti-inflamatório e no tratamento de nefrolitíase (BERTOLUCCI, S. K. V. *et al.*, 2000).

Estudos fitoquímicos, toxicológicos e farmacológicos são indispensáveis para comprovar a segurança e eficácia terapêutica das plantas medicinais (DA VEIGA, 2008). Dentre as técnicas mais amplamente empregadas no estudo químico-biológico das plantas medicinais estão os estudos fitoquímicos monitorados por atividades biológicas *in vitro* ou *in vivo* que visam isolar e caracterizar quimicamente as substâncias que apresentam melhores índices de segurança e eficácia conforme o teste biológico avaliado (CHIN *et al.*, 2006).

Testes antioxidantes são importantes para melhor elucidação de diversos fenômenos patológicos associados ao fenômeno do “estresse oxidativo” (PATRIDGE *et al.*, 2016). Estas desordens oxidativas podem ser causadas principalmente por alguns fatores como poluentes, radiação, produtos químicos e toxinas que causam reações como a peroxidação de lipídeos, desestabilidade no emparelhamento do elétron, dentre outros. Essas reações de desequilíbrio podem causar danos ao DNA, doenças cardiovasculares, desordens inflamatórias, aterosclerose e principalmente o câncer (HALLIWELL, 1996; NAIDU *et al.*, 2016; PATRIDGE *et al.*, 2016).

A quimioprevenção de câncer é descrita como a utilização de compostos naturais ou sintéticos para prevenir, retardar ou reverter o processo de carcinogênese (SPORN, 1976). Os agentes quimiopreventivos de câncer devem apresentar baixa toxicidade e neutralizar as células cancerígenas (DUVOIX *et al.*, 2005).

Além de não apresentar citotoxicidade, um agente quimiopreventivo do câncer deve inibir enzimas responsáveis pela geração de espécies conhecidas como enzimas de detoxificação (Fase I) e captadoras de radicais e eletrólitos (Fase II) (SPENCER *et al.*, 1991; CUENDET *et al.*, 2006; PEZZUTO, 2008). Dentre as enzimas de fase II, o NAD(P)H quinona redutase (QR) é conhecido por ser um marcador preventivo, a indução dessa enzima é associada à proteção contra agentes tóxicos e pela sua atividade antioxidante (CUENDET *et al.*, 2006).

Estudos têm demonstrado que a pesquisa envolvendo a indução de QR é um importante recurso na elucidação de mecanismos envolvidos na quimioprevenção, uma vez que pela via de destoxificação, essa enzima é capaz de promover a redução de quinonas eletrofílicas em hidroquinonas (CUENDET *et al.*, 2006; PEZZUTO, 2008). A QR é amplamente encontrada nos mamíferos, principalmente, no tecido hepático. Nos testes de indução da QR são utilizadas células de hepatoma de ratos (Hepa 1c1c7), pois a quantificação de QR é mais facilmente detectada nessa classe tissular (PROCHASKA E SANTAMARIA, 1988; CUENDET *et al.*, 2006; PEZZUTO, 2008).

Um outro marcador relacionado à quimioprevenção de câncer é a capacidade de inibição do fator nuclear de transcrição kappa beta (NF- κ B). De acordo com Park e Christman (2006), essa classe de proteínas se liga ao DNA e regula a transcrição de genes relacionados à cascata inflamatória e a expressão de citocinas inflamatórias como interleucina 1B (IL-1B), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral – α (TNF- α). Prolongados períodos de quadros inflamatórios podem levar ao aumento nas concentrações de NF- κ B causando proliferação celular descontrolada bem como a resistência à apoptose e, com isso, a carcinogênese (PERKINS, 2012).

Nesse contexto, objetivou-se avaliar o potencial antioxidante e quimiopreventivo do extrato bruto etanólico e de frações oriundas de folhas de *Tournefortia paniculata*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal

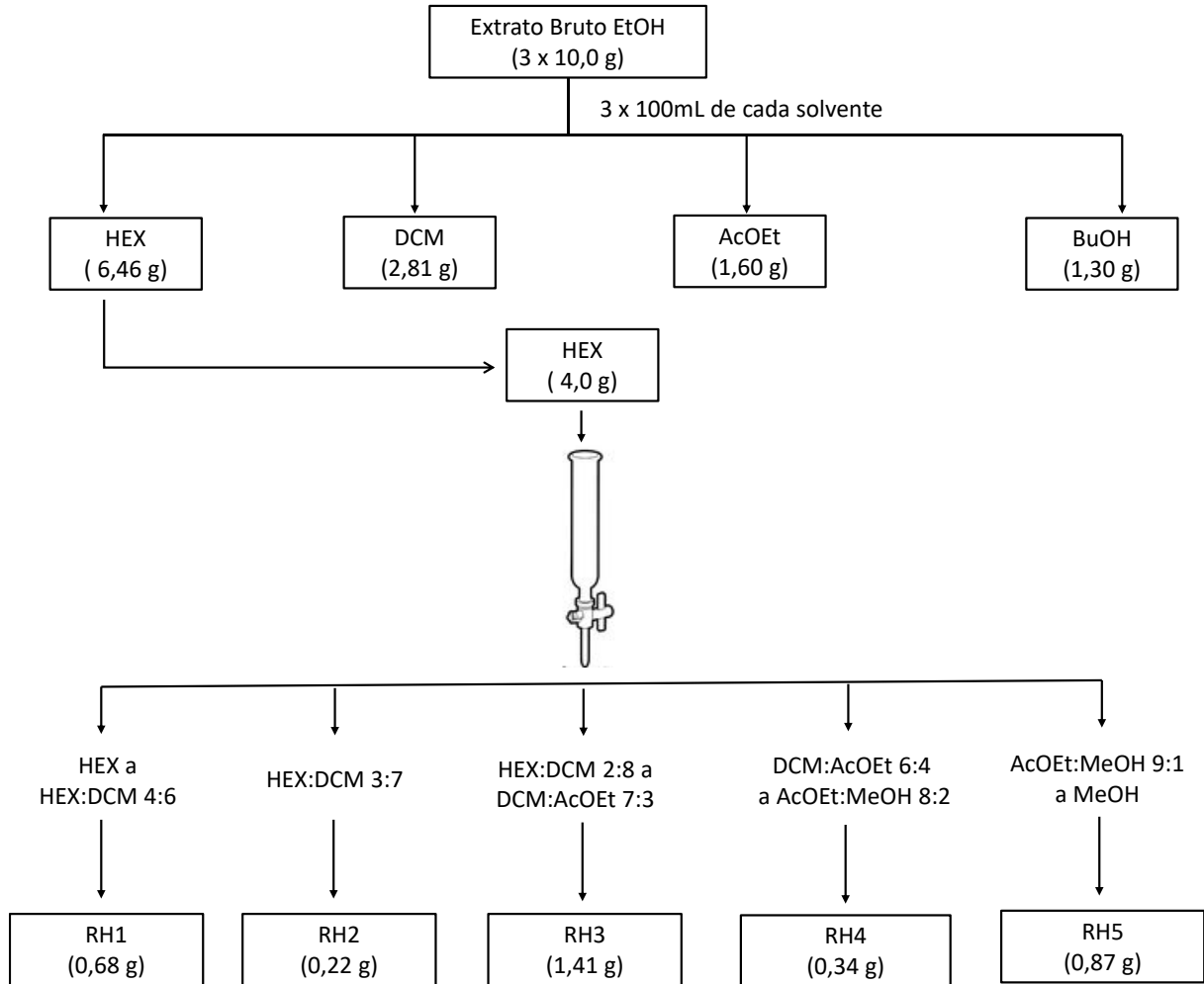
O material vegetal foi coletado no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG, localizado nas coordenadas 21° 14' S e 45° 00 W, a 918 m de altitude. O material botânico foi herborizado e depositado no Herbário PAMG da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), em Belo Horizonte, Brasil sob registro número PAMG-57806.

Preparo do extrato bruto e fracionamentos

A obtenção do extrato bruto e frações encontra-se esquematizada na Figura 1. Folhas de *Tournefortia paniculata* foram selecionadas e desidratadas em estufa ventilada a 40°C. O material vegetal foi pulverizado em moinho de facas e, exaustivamente percolado com etanol 92°INMP para fornecer o extrato bruto etanólico (EB, 58,07 g). Três porções de 10 g de EB foram suspensas em água (300 mL) e particionadas sequencialmente (3 x 100 mL) com *n*-hexano (HEX), diclorometano (DCM), acetato de etila (EtOAc) e *n*-butanol (BuOH). Os solventes de EB e frações foram removidos em rotavapor a temperatura máxima de 40 °C, armazenados em frascos de vidro e conservados em freezer a -20°C, até as análises.

As frações HEX e DCM foram ativas no ensaio de indução de quinona redutase. No entanto, devido a fração HEX ter apresentado perfil químico mais simplificado e maior recuperação de massa, esta fração (4,0g) foi selecionada para fracionamento em cromatografia em coluna de sílica gel 60G (Merck 0,2-0,5 mm) (Figura 1). A eluição da coluna empregou série eluotrópica empregando-se hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, conforme mostra a Figura 1. Soluções de *p*-anisaldeído e Liebermann–Burchard foram empregadas como reagentes para monitoramento dos perfis cromatográficos por cromatografia de camada delgada (CCD) (WAGNER E BLADT, 1996). As frações com perfis similares foram reunidas para dar as subfrações: RH1 a RH5, cujas massas recuperadas e eluentes são mostradas na Figura 1.

Figura 1 – Representação esquemática das etapas de fracionamento do extrato bruto etanólico de *Tournefortia paniculata*. EtOH: etanol; HEX: *n*-hexano; DCM: diclorometano; EtOAc: acetato de etila; BuOH: butanol; MeOH: metanol.



Ensaio antioxidante e doseamento de compostos fenólicos

DPPH (2,2-Diphenil-1-picrylhidrazil)

A atividade sequestradora do DPPH (1,1-difenil-1,2-picrilhidrazil) foi determinada pelo método proposto por Brand-Williams *et al.* (1995). Foram adicionados 250µl de solução etanólica de DPPH em 50µL da amostra, a mistura foi incubada durante 60 minutos no escuro à temperatura ambiente. Após esse tempo, a absorbância foi medida em 517nm. O BHT foi usado como controle positivo e a atividade de captura de radicais livres pelo DPPH foi expressa pela porcentagem de inibição, calculada pela fórmula:

$$AA\% = \left(100 - \frac{Abs\ amostra - Abs\ branco}{Abs\ controle} \times 100\right)$$

Onde: AA% é a atividade de eliminação de radicais; *Abs amostra* são os valores de absorvância para extrato bruto e frações; *Abs branco* é a absorvância do solvente e *Abs controle* a absorvância do BHT. A atividade sequestradora de radicais livres foi expressa como IC₅₀.

Capacidade Antioxidante Total (CAT)

Este teste avalia a complexação de molibdênio para determinar o CAT. A capacidade antioxidante total foi medida com base no método de redução do molibdato de amônio descrito por Prieto *et al.* (1999). Os extratos (200µL das diluições de 1/1) foram misturados com 1500µL da solução reagente (ácido sulfúrico 0,6M, fosfato monobásico de sódio 28mM, molibdato de amônio 4mM). Após 90 minutos de incubação a 95 ° C, as amostras foram arrefecidas até à temperatura ambiente e as suas absorvâncias foram medidas a 695 nm. O CAT foi determinado usando uma curva padrão de ácido ascórbico ($y = 3,11148x - 0,0123$ e $R^2 = 0,999$). Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos em mg equivalentes em ácido ascórbico/g folha seca (mg EqAA/g).

Poder Redutor (PR)

O ensaio de PR foi realizado seguindo Loizzo *et al.* (2012). Esse ensaio baseia-se principalmente no princípio de redução de íons férricos para a sua forma ferrosa a um pH mais baixo, o que resulta na formação de um complexo cromático de tripiridiltriazina ferrosa, por exemplo, o complexo férrico-tripiridiltriazina (FeIII-TPZ) é reduzido ao complexo ferroso (FeII-TPZ) na presença de um antioxidante (RUFINO *et al.*, 2006). Um volume de 25µL de amostra, 100µL de tampão fosfato pH 6.0 e 100µL de ferricianeto a 1% foram adicionados a um microtubo, misturados em vórtice e mantidos a 50°C durante 10 minutos. Em seguida, 100µL de ácido tricloroacético a 10%, 300µL de água e 60µL de solução de FeCl₃ a 0,1% foram transferidos para o microtubo. Uma alíquota de 250µL foi transferida para microplacas, e a intensidade da cor azul esverdeada foi medida a 700 nm contra o branco do reagente. O ácido ascórbico foi utilizado como solução padrão da concentração de 0,3125mg/mL a 0,0195mg/mL e os resultados foram expressos em equivalente ácido ascórbico por mg de folha seca (mg EqAA/g).

Capacidade de Absorvância do Radical Oxigênio (ORAC)

As amostras foram analisadas de acordo com Ou *et al.* (2001) com pequenas modificações. As amostras foram diluídas com tampão fosfato de sódio (75mM, pH 7.4) numa

concentração de 1mg/mL. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços com paredes negras. O poço branco recebeu 30µL de tampão fosfato enquanto os padrões receberam 30µl de solução de Trolox (vitamina E solúvel em água) e as amostras receberam 30µl de amostra diluída. Além disso, todos os poços experimentais receberam 150µL de fluoresceína sódica (37,6mg/mL). A placa foi colocada num leitor de microplacas, ajustado com D.O. 250nm e incubada durante 15 min a 37°C. Imediatamente, antes de iniciar as medições, 30µl de AAPH (42,5mg/mL) foram adicionados a cada poço por um auto injetor para iniciar a reação e posteriormente ler a cada minuto por 150 minutos. Medidas finais de fluorescência foram expressas em relação à leitura inicial. Os resultados foram calculados com base nas diferenças nas áreas sob a curva de decaimento da fluoresceína de sódio (AUC) entre o branco e uma amostra e são expressos como mg equivalente de Trolox Equivalente por g de folha seca (mg TroloxEq/g).

Compostos Fenólicos Totais (CFT)

O teor de compostos fenólicos totais dos extrato etanólico e frações foi determinado utilizando-se reagente Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) de acordo com Kim *et al.* (2003) com modificações. Resumidamente 50µL de extrato e frações ou solução padrão de ácido gálico (0, 5% em etanol PA) foi misturado em 500µL de reagente de Folin-Ciocalteu seguido de 7% de bicarbonato de sódio (Na₂CO₃). Em seguida, a mistura foi incubada por 120 minutos à temperatura ambiente escura e centrifugada por 5.000 rpm. Uma alíquota de 275µL de cada amostra em triplicata foi adicionada em 96 microplacas de poliestireno. Uma curva variou de 0062 a 0004 mg/mL em uma solução de etanol de ácido gálico (Sigma, Brasil) foi obtida. O teor de fenólicos totais foi expresso em equivalente a mg de ácido gálico (GAE) por mg de extrato de peso seco, calculado utilizando-se fórmula, $y = 19,984 x + 0,973$, $R^2 = 0,999$, o resultado foi expresso em mg equivalente de ácido gálico /g folha seca (mg EqAG/g).

Teor de flavonas/flavonóis totais (FFT)

O teor de flavonas/flavonóis dos extrato bruto e frações foi realizado de acordo com o método determinado por Ahn *et al.* (2007). Uma alíquota de 100µL de extratos brutos e frações foi misturada com 100µL de AlCl₃ (10% p/v). Após 40 minutos, a absorbância foi tomada a 420 nm. O teor de flavonas/flavonóis totais foi determinado por meio de uma curva padrão de quercetina ($y = 17,983 x + 0,36$, $R^2 = 0,999$). Os teores de flavonas/flavonóis dos extratos foram expressos em miligramas equivalentes em quercetina por g de folha seca (mg EqQ/g).

Ensaio quimiopreventivos

Ensaio in vitro de indução da quinona redutase (QR)

As linhagens foram incubadas em capela microbiológica de fluxo laminar, nível de segurança B2 umedecida a 37 °C e 5% de CO₂ com 95% de umidade relativa. As amostras analisadas foram solubilizadas em dimetil sulfoxido (DMSO), na concentração de 4mg/mL, constituindo assim a solução estoque. Essa solução foi mantida a -20 °C, até o momento de uso.

O ensaio de indução da QR foi realizado segundo método descrito por Prochaska e Santamaria (1988) e modificado por Gerhäuser *et al.* (1997). Para a avaliação de amostras como indutores da enzima quinona redutase, empregou-se cultura de hepatoma de rato, Hepa1c1c7 (ATCC® CRL-2026).

Inibição do fator nuclear -κB (NF-κB)

A inibição do NF-κB foi realizada segundo Homhual *et al.* (2006). Células da linhagem de hepatoma humano 293.12 - PTA-5554-NF-κB transfectadas com o gene NF-κB luciferase reporter foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 2×10^4 células incubadas por 48hs. Extratos foram testados a uma concentração de 20µg.ml⁻¹.

Após tratamento com os extratos as células foram incubadas por 6 horas. TNF-α (5ng/mL) foi usado como controle positivo. Após esse período as células foram lavadas com PBS e o teste de luciferase foi conduzido com uso de kit Luc assay system from Promega® de acordo com as instruções do fabricante. Ação da luciferase foi monitorada com uso de aparelho leitor de placas Multis-Mode Microplate Reader, Filter Max F5, (Molecular Devices Spectra, USA). Os resultados foram expressos como percentagem de inibição de NF-κB. N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK) IC₅₀ = 3.8 nM foi usado como controle de inibição de NF-κB. A inibição é calculada com relação aos níveis basais de inibição do controle negativo onde as células são tratadas 0,5% dimetilsulfoxido (DMSO). Amostras consideradas ativas são as que possuem uma inibição acima de 50% (ENDRINGER, 2007). Os experimentos foram feitos em triplicata.

Ensaio de citotoxicidade

A citotoxicidade dos extratos foi avaliada pelo método de Sulforodamina B que se associam eletrostaticamente aos resíduos de aminoácidos básicos das proteínas das células sobreviventes (RUBINSTEIN *et al.*, 1990; SKEHAN *et al.*, 1990). Células de HepaG2 (ATCC® HB-8065™), MV3 (ATCC® CVCL_W280™) e Hepa1c1c7 (ATCC® CRL-2026) foram

cultivadas em meio Dulbecco's modified Eagle's (DEMEM) adicionado de 100UI.ml⁻¹ penicilina, e 100 g.ml⁻¹estreptomicina (Sigma-USA) a 37°C, umidade controlada e 5% CO₂ e semeadas em uma placa de 96 poços na densidade de 5.10⁴ células/ml. Todos os extratos foram testados na concentração de 20µg.ml⁻¹. Após 72 horas de incubação as células foram fixadas com 50µl de 20% TCA (ácido tricloroacético) por 30 min a 4°C. Após esse período, a placa foi lavada quatro vezes com água de torneira. As proteínas aderidas foram coradas com 50µl de 0,4% SRB em 1% ácido acético por poço e incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, enxaguadas com 1% ácido acético 4 vezes, cuidadosamente. Após secar por 30 a 60 minutos ou overnight, os cristais foram solubilizados com 200 µl de Tris base pH 10 por 5 minutos no homogeneizador. A densidade ótica foi determinada a 515nm. A sobrevivência foi calculada em relação ao controle negativo 0,5% DMSO (dimetilsulfóxido). Para o controle positivo foi utilizado camptotensina (10µM)

Análises cromatográficas

Análises por UPLC-DAD e UPLC-MS-ESI-MS/MS

As análises foram realizadas em um sistema Waters ACQUITY UPLC (Waters, Milford, Massachusetts, EUA), composto de bomba binária, amostrador automático, degaseificador em linha e detector de arranjo de diodos (Waters, Milford, Massachusetts, EUA). Os dados foram processados usando MassLynx4.1 (Waters, Milford, Massachusetts, EUA). Primeiramente, foi preparada uma solução com concentração de 5 mg/mL em metanol da subfração. Procedeu-se a solubilização com auxílio do banho de ultrassom por 10 minutos, seguida de centrifugação a 8400 rpm, por 10 minutos, e os sobrenadantes obtidos foram filtrados diretamente para vial de vidro.

A separação foi realizada em uma coluna Acquity UPLC BEH HILIC (150 × 2,1 mm id; 1,7 µm; Waters, Milford, Massachusetts, EUA) em combinação com uma coluna-guarda Acquity UPLC BEH HILIC (5 × 2,1 mm; 1,7 µm; Waters, Milford, Massachusetts, EUA). Empregou-se eluição em gradiente de água (A) e acetonitrila (B), ambos acidificados com ácido fórmico 0,1% v/v (5 a 95% B em 10 min, 95 a 5% B em 1 min, seguido por 2 min de eluição isocrática), fluxo de 0,3 mL/min, e temperatura da coluna ajustada para 40°C. O volume de injeção foi de 3 µL. Para a fonte de ionização por electrospray (ESI), nos modos de varredura total negativos e positivos ($m/z = 100$ a 2000), foram utilizadas as seguintes condições: tensão capilar de 3,54 kV; tensão de cone de 17 V; temperatura da fonte de 120 ° C; temperatura de dessolvatação de 300°C.

Análises de perfis cromatográficos por CLAE-DAD

Alíquotas de 5mg das frações HEX e DCM e subfrações (RH1 a RH5) foram pesadas diretamente para microtubos e solubilizadas em 1mL de metanol grau CLAE. As amostras foram solubilizadas em banho de ultrassom, durante 15 min, seguido de centrifugação a 8.400 g, por 10 min. Empregaram-se os sobrenadantes para análise por CLAE-DAD. Foram injetadas alíquotas de 10µL dos sobrenadantes, de modo automático, no sistema cromatográfico.

Os perfis cromatográficos por CLAE-DAD foram realizados em um sistema de cromatografia líquida Agilent 1200 (Agilent Technologies®, Waldbronn, Alemanha) equipado com uma bomba quaternária (G1311A) com sistema degaseificador (G13222A), amostrador automático ALS (G1322A) e conjunto aquecedor TCC (G1316A). Utilizou-se um detector de ultravioleta de comprimento de onda variável (G1315D) para obter cromatogramas a 210 nm. O equipamento foi controlado pelo *software* OpenLAB versão A07.04, build 04.07.28. As separações foram realizadas em uma coluna analítica de fase reversa C18 (Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies®, EUA) com um empacotamento à base de sílica (5 µm × 150 mm × 4,6 mm I.D.) e pré-coluna (5 µm × 12,5 mm × 4,6 mm I.D.) na temperatura de 40°C. Utilizou-se água (A) e acetonitrila (B) como eluentes, ambos contendo 0,01% (v/v) de ácido fosfórico, utilizando um gradiente linear de 1,0 mL/min como segue: 0 min 95% A, 5 % B; 60 min 5% A, 95% B, seguido por 5 min de eluição isocrática e retorno às condições iniciais de corrida.

Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram submetidas ao Teste de Scott Knott a 5% de probabilidade pelo software Estatístico R.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diferenças estatisticamente significativas foram observadas frente a atividade antioxidante *in vitro* de *Tournefortia paniculata* conforme a preparação e o ensaio empregado (Tabela 1). A fração BuOH foi a que apresentou a mais potente atividade antioxidante, pois em todos os ensaios foram observados valores de atividades estatisticamente mais significativos. Embora, no ensaio DPPH, o BHT (controle positivo) foi mais significativo que a fração BuOH, no ensaio CAT, esta fração foi 56% superior ao BHT. Conforme Bošković *et al.* (2017), ambos os métodos, DPPH e CAT, são baseados no mecanismo de transferência de elétrons, o que pode ter contribuído para corroborar a atividade antioxidante da fração BuOH por esse mecanismo.

Tabela 1 – Atividades antioxidantes de preparações de *Tournefortia paniculata* pelos ensaios de eliminação de radicais DPPH, capacidade antioxidante total (CAT), poder redutor (PR) e capacidade de absorção de radicais livres de oxigênio (ORAC).

Preparações*	DPPH (IC ₅₀ =mg/mL)	CAT PR ORAC		
		(mg AAEq/g)		(mg Trolox Eq/g)
EB	0,077±0,002c	2,55±0,07c	4,13±0,12c	4,74±0,06b
HEX	0,132±0,001d	2,39±0,07d	6,43±0,41b	1,76±0,67d
DCM	0,157±0,003e	3,36±0,07b	6,45±0,72b	2,79±0,32c
AcOEt	0,052±0,001b	3,23±0,02b	8,72±0,05a	4,81±0,05b
BuOH	0,051±0,002b	4,14±0,14a	8,96±0,20a	5,51±0,05a
BHT	0,016±0,001a	2,64±0,02c	-	

***EB:** extrato bruto; **HEX:** fração *n*-Hexano; **DCM:** fração diclorometano; **EtOAc:** fração acetato de etila; **BuOH:** fração *n*-butanol; **BHT:** hidroxitolueno butilado (controle positivo). As médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem umas das outras pelo teste Scott-Knott ($P < 0, 5$).

As atividades antioxidantes de extratos aquoso e etanólico, obtidos por maceração a temperatura ambiente e sob agitação por 1 h das folhas de *Tournefortia paniculata*, já haviam sido demonstradas por Simão *et al.* (2013). Estes autores consideraram que dentre outras plantas medicinais, *T. paniculata* apresentou atividade antioxidante moderada frente ao ensaio de sequestro de radicais ABTS, o qual possui mecanismo antioxidante similar ao ensaio de sequestro de radicais livres DPPH. No entanto, no presente estudo nota-se que, com exceção da fração HEX para os ensaios DPPH, CAT e ORAC e da fração DCM para os ensaios DPPH e ORAC, houve potencialização da atividade antioxidante nas frações em comparação àquelas do EB de *T. paniculata*.

O ensaio para determinar o poder redutor nas preparações, fundamenta-se no princípio de redução dos íons férricos (Fe^{+3}) em um pH ácido para sua forma ferrosa (Fe^{+2}) (LOIZZO *et al.*, 2012). Nota-se que não houve diferenças estatisticamente significativas entre as frações BuOH e AcOEt que foram superiores. Entretanto, as frações HEX e DCM também apresentaram considerável atividade redutora de íons férricos em comparação ao EB (Tabela 1).

Por fim, no ensaio ORAC, a fração BuOH ($5,51 \pm 0.05$ mg TroloxEq/g) confirmou sua melhor atividade antioxidante em relação as demais preparações. O ensaio ORAC mede a capacidade de eliminação dos radicais peroxila e, portanto, reflete a atividade antioxidante da cadeia radical clássica por transferência de átomo de H. Este ensaio pode ser considerado superior a outros métodos, pois utiliza uma técnica de área sob a curva (AUC) e, assim, combina

o tempo de inibição e o grau de inibição da ação de radicais livres por um antioxidante em uma única quantidade (BOULANOUAR *et al.*, 2013). Nesse ensaio, *Tournefortia paniculata* apresentou atividade antioxidante 10 vezes mais potente que *Cordia exaltata* Lam., uma planta da família Boraginaceae (SILVA *et al.*, 2007).

A concentração de compostos fenólicos totais nos extratos e frações de *Tournefortia paniculata* variou de 10,52±0,05 até 130,23±1,95 mg EqAG/g de folhas secas e de flavonas/flavonóis totais de 2,39±0,04 a 5,08±0,07 mg EqQ/g de folhas secas (Tabela 2).

A presença de uma quantidade significativa de compostos fenólicos totais (130,23±1,95 mg EqAG/g) e de flavonas/flavonóis totais (5,08±0,07 EqQ/g) na fração BuOH pode ter contribuído para sua proeminente atividade antioxidante, desde que a relação entre compostos fenólicos e atividades antioxidantes já é bem descrita na literatura (PIETTA *et al.*, 1998; MARQUES *et al.*, 2012). Não há na literatura dados sobre a composição química de *T. paniculata*, entretanto diversos compostos de natureza fenólica isolados da espécie *Tournefortia sarmentosa* Lam., tais como: tournefolal e ácidos tournefólicos A e B e salvinólico (LIN *et al.*, 2002), corroboram com os dados de quantificação de compostos fenólicos em *T. paniculata*.

Tabela 2 – Concentração de compostos fenólicos totais (CFT) e de flavonas/flavonóis totais (FFT) em preparações de *Tournefortia paniculata*.

Preparações*	CFT (mg EqAG/g)	FFT (mg EqQ/g)
EB	27,33±0,27c	2,39±0,04e
HEX	10,83±0,32d	4,10±0,18c
DCM	10,52±0,05d	3,06±0,10d
EtOAc	40,85±1,75b	4,47±0,03b
BuOH	130,23±1,95a	5,08±0,07a

*EB: extrato bruto etanólico; HEX: fração *n*-hexano; DCM: fração diclorometano; EtOAc: fração acetato de etila; BuOH: fração butanólica. CFT (mg Eq AG/g): Teor de compostos fenólicos totais em mg equivalentes de ácido gálico/g de folhas secas; FFT (mg EqQ/g): Flavonas/Flavonóis totais em mg equivalentes de quercetina/ g de folhas secas. As médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem umas das outras pelo teste Scott-Knott (P < 0, 5).

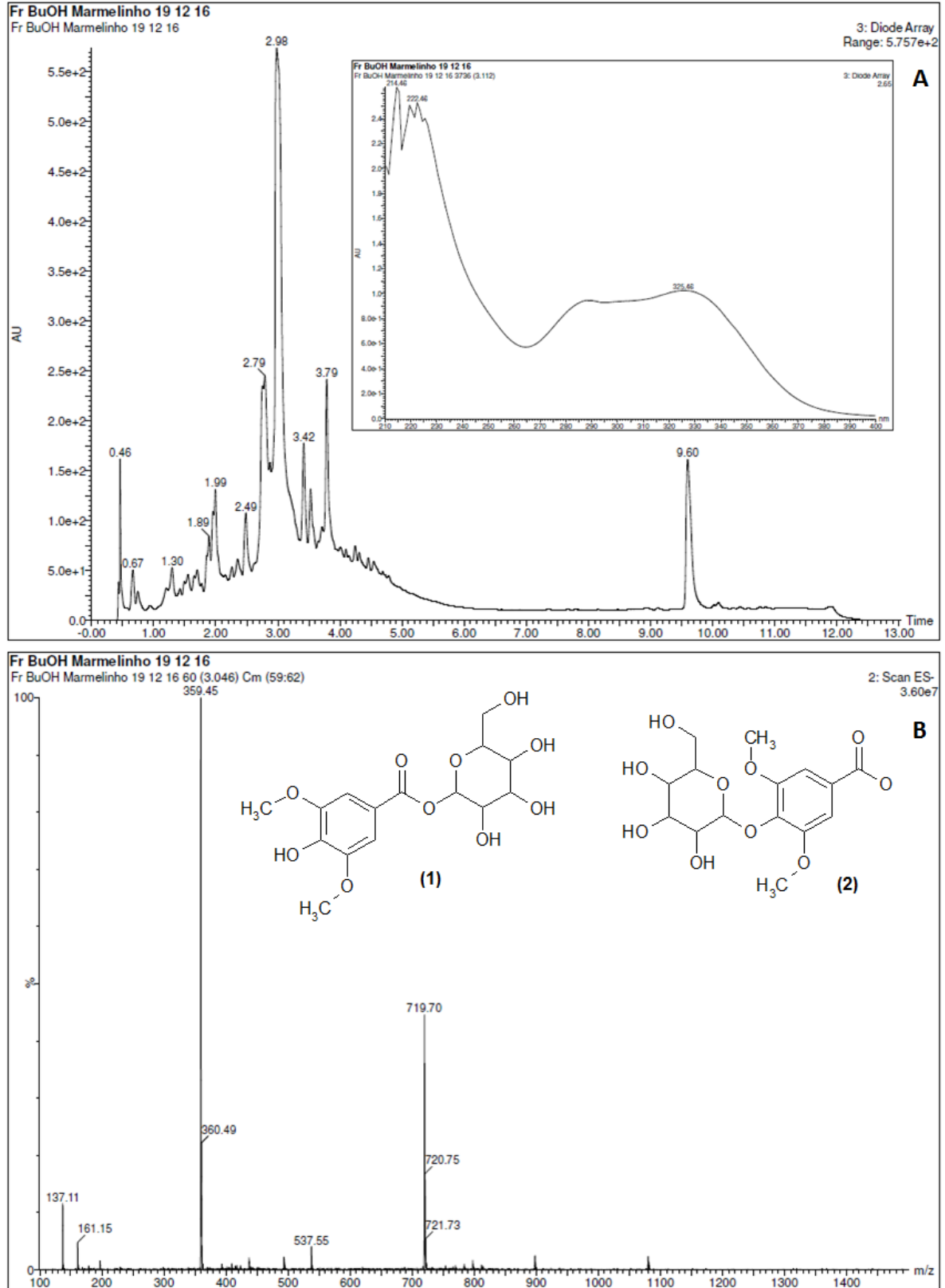
Uma vez que a fração BuOH apresentou maior atividade antioxidante, esta foi analisada por UPLC-DAD-ESI-MS/MS (Figura 2). O espectro de absorção molecular no UV do pico majoritário da fração BuOH exibiu perfil espectral característico de um derivado glicopiranosídico do ácido siríngico (KLICK E HERRMANN, 1988). O espectro ESI-MS/MS no modo negativo do constituinte eluído em 2,98 min revelou um íon molecular desprotonado em *m/z* 359 Da [M - H]⁻, sugerindo uma massa molecular de 360 Da, compatível com a fórmula

molecular $C_{15}H_{20}O_{10}$, sugestiva de ser o erigesídeo C (1) ou o ácido glicosiríntrico (2) (Figura 2B). O padrão de fragmentação observado está de acordo com o reportado na literatura para derivado glicosídico do ácido siríntrico (YUE *et al.*, 1994; HE *et al.*, 2018). Nota-se, no espectro ESI/MS no modo negative, o pico em m/z 719 $[2M-H]^-$, que foi atribuído ao íon dimérico resultante de um derivado glicosídico do ácido siríntrico (Figura 2B).

O íon molecular, por sua vez, rendeu o íon $[M-179-CO_2]^-$ m/z 137 atribuído à perda de um resíduo de hexose ($C_6H_{11}O_6$) e à perda de CO_2 comum de derivados do ácido hidroxibenzóico (SUN *et al.*, 2007). O íon fragmento de menor intensidade em m/z 197 sugere a presença de um derivado siríntrico e o íon fragmento em m/z 161 a perda de H_2O de um resíduo de hexose ($C_6H_{11}O_6$). No entanto, análises complementares como, por exemplo, ressonância magnética de H e de ^{13}C empregando técnicas unidimensionais e bidimensionais, se fazem necessárias para a elucidação estrutural inequívoca do derivado glicosilado do ácido siríntrico presente nas folhas de *Tournefortia paniculata*.

Devido a forte relação entre as atividades antioxidante e quimiopreventiva, as preparações de *T. paniculata* foram submetidas aos ensaios de viabilidade celular das linhagens HepaG2 e MV3; de indução da QR; e, de inibição do NF- κ B. De acordo com Léon-Gonzalez *et al.* (2015), o efeito quimiopreventivo do câncer de polifenóis antioxidantes envolve sua capacidade de prevenir ou reduzir os danos celulares mediados pelo estresse oxidativo, seja capturando as espécies reativas de oxigênio, quelação de metais, e/ou induzindo a expressão de genes de controle da resposta antioxidante que codificam enzimas desintoxicantes, entre outros mecanismos.

Figura 2. Cromatograma UPLC-PDA e espectro UV do pico eluído em 2,98 min (A) e espectro ESI-MS/MS no modo negativo do pico eluído em 2,98 min da fração BuOH de *Tournefortia paniculata*.



O EB e as frações de *Tournefortia paniculata* demonstraram ausência de citotoxicidade em linhagens celulares de carcinoma hepático humano HepaG2. Os índices de sobrevivência celular entre as preparações avaliadas compreenderam a faixa de 89,68% a 95,93% (Tabela 3). Esse tipo celular é bastante importante nas pesquisas de citotoxicidade uma vez que são capazes de demonstrar a hepatotoxicidade de uma amostra com 80% de sensibilidade e 90% de especificidade (O'BRIEN *et al.*, 2006; NOOR *et al.*, 2009).

Tabela 3 – Citotoxicidade em células de carcinoma hepático humano HepaG2 e de melanoma humano MV3 e indução da Quinona Redutase (QR) e pelo extrato bruto etanólico (EB) de *Tournefortia paniculata* e suas frações HEX, DCM, AcOEt e BuOH.

Preparações	HepaG2 (%)	MV3 (%)	Indução QR (DC, µg/mL)
EB	91,53±8,05	82,93±3,89	1±0,0
HEX	92,06±12,12	82,04±2,30	2±0,16
DCM	94,80±9,44	86,01±16,86	2±0,11
AcOEt	95,93±11,06	59,95±9,35	1±0,0
BuOH	89,68±4,07	72,42±10,07	1±0,0

Médias seguidas de desvio padrão; – representa resultado negativo para o teste. DC: Valor médio da concentração necessária para dobrar a atividade específica da quinona redutase (QR), sendo que valores ≥ 2 , expressam atividade.

Por outro lado, apenas o EB e as frações HEX e DCM não foram citotóxicas para a linhagem de melanoma humano MV3, cujos valores de viabilidade celular foram acima de 82,04%. As frações AcOEt e BuOH demonstraram ser citotóxicas para a linhagem MV3 com taxas de sobrevivência de 59,95% e 72,42%, respectivamente. Esses resultados sugerem potencial atividade antitumoral em células de melanoma humano MV3, uma vez que a pesquisa quimioterápica para o câncer busca compostos e substâncias citotóxicas e antiproliferativas (XU *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2006).

No que tange a inibição de NF-κB, nenhuma das amostras foi capaz de inibir este marcador biológico, o que implica em ineficiência das amostras no controle inflamatório no processo inicial de formação de células cancerígenas. Dessa forma, com a atividade de NF-κB operante, é possível que as células evitem o processo apoptótico e aumentem a capacidade proliferativa e migratória (DOLCET *et al.*, 2005; NAKANISHI E TOI, 2005).

Por outro lado, o ensaio de indução da QR *in vitro* foi utilizado como marcador para avaliar a capacidade das amostras em atuarem como indutoras da atividade metabólica da Fase II. A indução da atividade de QR em células de hepatoma de rato, Hepa1c1c7, é uma ferramenta

bem definida e importante para o rastreio de novos fitoquímicos com potencial quimiopreventivo (KANG E PEZZUTO, 2004; DA SILVA *et al.*, 2018).

Para um fitocomplexo ser considerado um agente quimiopreventivo, ele deve ser isento de citotoxicidade, o que não ocorreu com a fração BuOH que apresentou proeminente atividade antioxidante devido seu alto teor de compostos fenólicos, provavelmente de um derivado do ácido siríngico. Com isso, devido as frações HEX e DCM não terem apresentado citotoxicidade frente as linhagens HepaG2 e MV3 e terem apresentado no ensaio de indução QR valores de $DC \geq 2,0$, o que remete que são ativadoras da QR1, estas frações foram consideradas quimiopreventivas.

A análise dos perfis químicos por CLAE-DAD indicou semelhança nos perfis cromatográficos das frações HEX e DCM (Figura 3), o que poderia explicar os resultados similares no ensaio de indução da QR para essas frações. No entanto, devido a fração HEX ter apresentado perfil cromatográfico um pouco menos complexo e, por ter tido maior recuperação de massa (6,48g, Figura 1), ela foi selecionada para fracionamento em coluna aberta de sílica gel. O fracionamento da fração HEX resultou em cinco subfrações (RH1 a RH5, Figura 1), que foram novamente avaliadas frente aos ensaios de indução da QR (Tabela 4). As subfrações RH2, RH3 e RH4 apresentaram valor $DC \geq 2$, o que demonstra seus potenciais quimiopreventivos pela capacidade de induzir a QR. No entanto, RH2 foi considerada a de maior potencial por também apresentar menor citotoxicidade para as células Hepa1c1c7.

Análise por CCD de RH2 revelada com o reagente de Liebermann–Burchard indicou se tratar de uma substância de natureza triterpênica, evidenciada por duas bandas violáceas adjacentes. Análises comparativas de perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD da fração HEX e das suas subfrações (RH2 a RH4), indicaram que RH2 se encontrava em etapa avançada de purificação, uma vez que foi detectada apenas uma substância majoritária no TR de 66,44 min (Figura 3).

Figura 3 – Perfis por CLAE-DAD a 210 nm das frações HEX e DCM e subfração RH2 de *Tournefortia paniculata*.

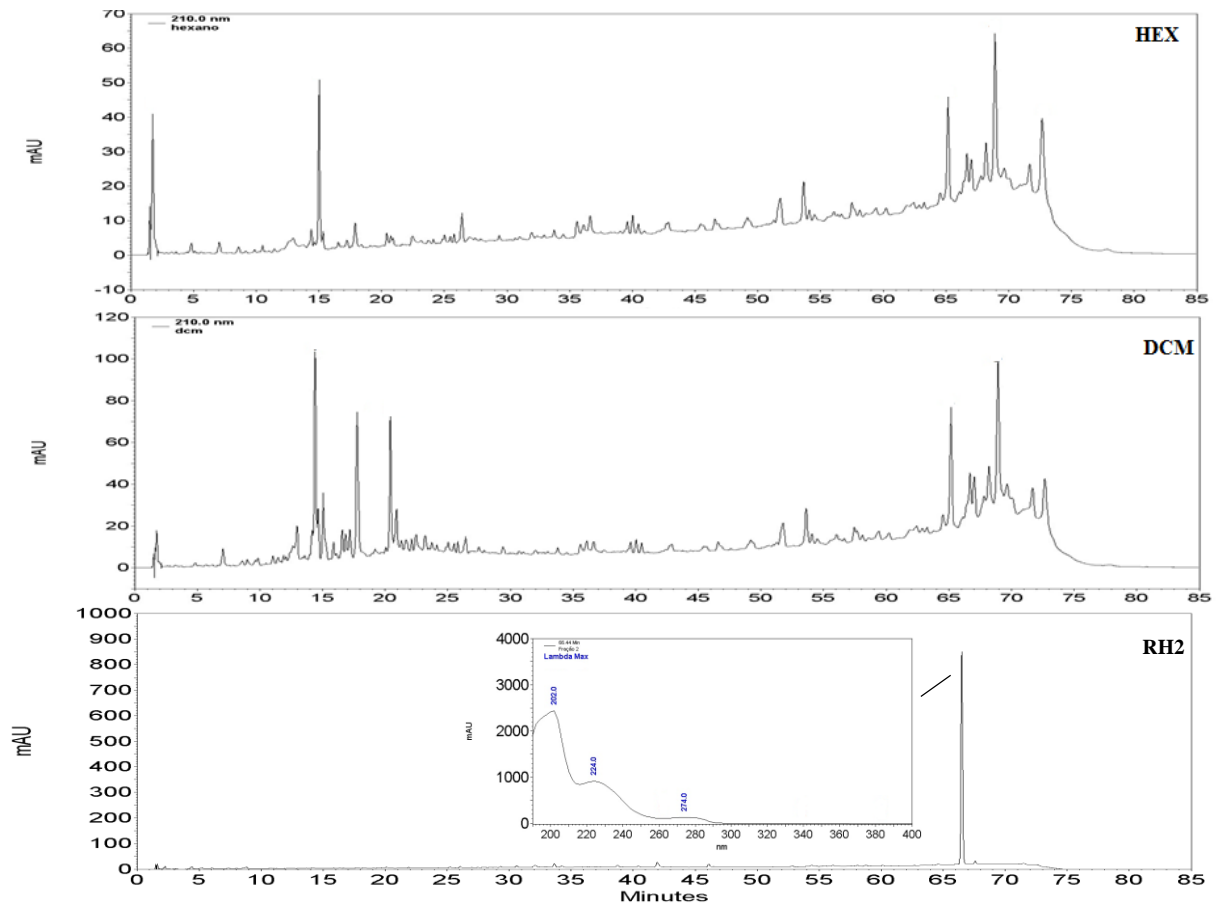


Tabela 4 – Indução da Quinona Redutase (QR) e citotoxicidade em células de hepatoma murino Hepa1c1c7 das subfrações RH1 a RH5 de *Tournefortia paniculata*.

Amostra	Indução QR (DC, $\mu\text{g/mL}$)	Hepa1c1c7 (%)
RH1	1 \pm 0,0	152,8 \pm 24,78
RH2	2 \pm 0,04	94,5 \pm 15,53
RH3	2 \pm 0,02	78,70 \pm 2,45
RH4	2 \pm 0,04	68,10 \pm 0,65
RH5	1 \pm 0,0	68,60 \pm 11,60

Médias seguidas de desvio padrão; DC: Valor médio da concentração necessária para dobrar a atividade específica da quinona redutase (QR), sendo que valores ≥ 2 expressam atividade.

A fim de se obter informações acerca da natureza química dessa(s) substância(s), análises por UPLC-DAD-ESI-MS/MS foi realizada para RH2. O perfil cromatográfico

registrado por UPLC-DAD da subfração RH2 indicou perfil similar àquele obtido por CLAE-DAD (Figura 3), cujo TR da substância majoritária foi eluído em 9,66 min (Figura 4A). Os espectros no UV dos picos correspondentes a esta substância majoritária em ambos perfis cromatográficos apresentaram bandas de absorções similares (λ_{max} em 202, 224 e 274 nm). A absorção no UV-vis em 202nm, embora seja um comprimento de onda inespecífico, é condizente com a absorção olefínica de núcleos triterpênicos (SCOTT, 1964; WEI E YANG, 2014). No cromatograma total de íons no modo positivo observaram-se a presença de dois picos eluídos em 9,73 e 9,88 min, corroborando com as análises realizadas por CCD que evidenciaram a presença de duas bandas adjacentes (Figura 4B).

A varredura completa (*full scan*) por UPLC-MS-ESI no modo positivo da fração RH2 (Figura 4C) mostrou os picos de $[M+H]^+$ 803 e 804 Da. A proposta de fragmentação descrita a seguir para esses íons fragmentos protonados corroboram com a provável identidade triterpênica da subfração quimiopreventiva (RH2). O íon molecular protonado $[M+H]^+$ de m/z 803 Da foi atribuído ao pico eluído em 9,73 min, cuja fórmula molecular sugerida $C_{45}H_{74}O_{10}N_2$ pode ser possivelmente atribuída, por exemplo, a presença do ácido 28(1-piperazinil) oleanólico 3-O-[2-O-(6-desoxi- α -L-manopiranosil)- α -L-arabinopiranosil] (Figura 4B). Já o pico em 9,88 min foi atribuído ao íon molecular protonado $[M+H]^+$ de m/z 804 Da, de formula molecular provável $C_{46}H_{75}O_{10}N$, pode ser indicativa, por exemplo, da presença do ácido 28(1-piperidinil) oleanólico 3-O-[2-O-(6-desoxi- α -L-manopiranosil)- α -L-arabinopiranosil] (Figura 4B).

Figura 4 – Perfil cromatográfico da subfração RH2 de *Tournefortia paniculata* obtido por UPLC-DAD (A); Cromatograma total de íons (TIC) no modo positivo e possíveis estruturas químicas (B); e, espectros MS-ESI no modo positivo (C) e MS²-ESI da substância com TR 9,73 min (D).



Comum a ambos os picos (9,73 e 9,88 min) observaram-se íons fragmentos em m/z 149 Da, indicativo da perda de uma deoxi-hexose $[M-C_{39}H_{63}O_6N_2+H]^+$ para o derivado piperazínico e $[M-C_{40}H_{64}O_6N+H]^+$ para o derivado piperidínico; e, em m/z 279 correspondente a perda de um resíduo de deoxi-hexose + um resíduo de hexose $[M-C_{34}H_{55}ON_2-H_2O+H]^+$ para o derivado piperazínico e $[M-C_{35}H_{56}ON-H_2O+H]^+$ para o derivado piperidínico.

O íon fragmento em m/z 392 Da $[M-C_{29}H_{48}O+H]^+$ possivelmente corresponde a perda dos heterosídeos + o núcleo piperazínico e o íon fragmento em m/z 391 Da $[M - C_{29}H_{48}O+H]^+$ é possível de ser atribuído a perda dos heterosídeos + o núcleo piperidínico. Os espectros ESI-MS no modo positivo (Figura 4C) e MS²-ESI (Figura 4D) representativo para o íon fragmento em m/z 803 exibiram o íon fragmento em m/z 413 Da, possivelmente resultante da perda de uma aglicona triterpênica. O ácido oleanólico é um triterpeno do tipo β -amirina que naturalmente coexiste com seu isômero, o ácido ursólico (triterpeno do tipo α -amirina) (SILVA *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2011). Portanto, vale ressaltar que análises espectroscópicas complementares são necessárias para a confirmação da natureza triterpênica dessa mistura de substâncias, se do tipo oleano ou ursano, bem como para a confirmação da natureza heterosídeo-piperazínico e heterosídeo-piperidínico da estrutura.

Análises de triagem fitoquímica realizadas por Simão *et al.* (2014) indicaram presença positiva para esteroides e triterpenos. No entanto, esta é a primeira abordagem fitoquímica mais aprofundada que suscita fortes evidências da presença e identificação parcial de saponinas triterpênicas em *Tournefortia paniculata*. A partir de *Tournefortia argentea* L. f., sinônimo de *Messerschmidia argentea* (L. f.) I.M. Johnst., foram isolados e identificados quatro triterpenos do tipo oleano: acetato de olean-12-en- β -ol; 3- β -acetiloxi-olean-12-en-28-al; 3- β -acetiloxi-olean-12-en-28-ol; e, ácido 3- β -acetiloxi-olean-12-en-28-óico (OGIHARA *et al.*, 1997).

Entre atividades biológicas comprovadas para derivados triterpênicos encontram-se as atividades antibacterianas, antiparasitárias, antiosteoporótica, antihipertensora, antiliperlipidêmica, diurética, antidiabética, imunomoduladora, anti-inflamatória, gastroprotetora, hepatoprotetora, anti-HIV, inibir a capacidade de iniciar a via do complemento, quimioterápica e quimiopreventiva sob alegação de promover a apoptose e a modulação do microambiente tumoral pela via de sinalização celular. A literatura ainda relata um número crescente de pesquisas comprovando que os derivados triterpênicos apresentam excelentes resultados *in vitro* e *in vivo* no combate ao câncer (ZHANG *et al.*, 2007; POLLIER E GOOSSENS, 2012; PARIKH *et al.*, 2014; BEDNARCZYK-CWYNAR *et al.*, 2016; LACAILLE-DUBOIS E WAGNER, 2017).

Consoante aos resultantes do presente estudo, Lacaille-Dubois e Wagner (2017) relataram haver, nessa classe de compostos, seletividade citotóxica para células cancerígenas, com grande eficiência terapêutica como adjuvante no tratamento do câncer. Essas moléculas quando administradas junto a outros quimioterápicos existentes no mercado oferecem resultados melhores quando comparado ao uso individual do quimioterápico já existente. Os autores supracitados, também reportaram uma redução média de 90% no tamanho dos tumores

de ratos, quando houve a aplicação simultânea de heterosídeos triterpênicos em associação com agentes quimioterápicos, com redução nos efeitos colaterais advindos da quimioterapia convencional.

CONCLUSÃO

O estudo químico e biológico do EB e frações das folhas de *Tournefortia paniculata* apontou dados inéditos da composição química e atividades antioxidantes e quimiopreventivas para a espécie. O fracionamento do EB etanólico de *Tournefortia paniculata* resulta em frações antioxidantes e quimiopreventivas ativas. A fração BuOH, rica em compostos fenólicos, provavelmente devido a presença de um derivado do ácido siríngico, possui proeminente atividade antioxidante. No entanto, essa fração é citotóxica para a linhagem MV3 e não apresenta atividade de indução da QR.

A fração que apresenta menor citotoxicidade para as linhagens celulares ensaiadas e atividade de indução da QR foi a fração HEX que por fracionamento em coluna aberta de sílica gel resultou na subfração quimiopreventiva RH2. Análises fitoquímicas da subfração RH2 permitiram a identificação parcial de uma mistura de derivados heterosídeo-piperazínico e heterosídeo-piperidínico de núcleo triterpênico. Nenhuma preparação de *T. paniculata* apresentou atividade de inibição de NF- κ B.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, M. et al. Dynamic action of carotenoids in cardioprotection and maintenance of cardiac health. **Molecules**, v. 17, n. 4, p. 4755-4769, 2012.
- AHN, M.-R. et al. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1383-1392, 2007.
- ALI, H.; HOUGHTON, P.; SOUMYANATH, A. α -Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 107, n. 3, p. 449-455, 2006.
- ALIGIANNIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 9, p. 4168-4170, 2001.
- ALIMENTARIUS, C. Codex Executive Committee Concludes 71st Session. 2016.
- ALVES DA CONCEIÇÃO, R.; NOGUEIRA DA SILVA, P.; BARBOSA, M. Fármacos para o tratamento do diabetes tipo II: uma vista ao passado e um olhar para o futuro. **Rev Virtual Quim**, v. 9, n. 2, p. 514-34, 2017.
- ANDERS, M.; ROBOTHAM, J. L.; SHEU, S.-S. Mitochondria: new drug targets for oxidative stress-induced diseases. **Expert opinion on drug metabolism & toxicology**, v. 2, n. 1, p. 71-79, 2006.
- ANOOP, M.; BINDU, A. In-vitro Anti-inflammatory Activity Studies on *Syzygium zeylanicum* (L.) DC Leaves. **Int J Pharm Res Rev**, v. 4, n. 8, p. 18-27, 2015.
- ASSOCIATION, A. D. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes care**, v. 37, n. Supplement 1, p. S81-S90, 2014.
- AUSTIN, P.; MOALEM-TAYLOR, G. J. N. P. C. U. P. N. Y. Pathophysiology of neuropathic pain: inflammatory mediators. **Neuropathic Pain. Cambridge University Press: New York**, v. 7, p. 77-89p, 2013.
- BARTIKOVA, H. et al. Effect of oral administration of green tea extract in various dosage schemes on oxidative stress status of mice in vivo. **Acta Pharmaceutica**, v. 65, n. 1, p. 65-73, Mar 2015.
- BATISTA, M. S. H. **O Papel dos Fitoquímicos na Quimioprevenção do Cancro**. 2010. (Dissertação de Mestrado). Universidade do Porto, Porto, Portugal.

BEDNARCZYK-CWYNAR, B. et al. Oleanolic acid A-lactams inhibit the growth of HeLa, KB, MCF-7 and Hep-G2 cancer cell lines at micromolar concentrations. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)**, v. 16, n. 5, p. 579-592, 2016.

BERTOLINI, P. F. R. et al. Antimicrobial capacity of Aloe vera and propolis dentifrice against *Streptococcus mutans* strains in toothbrushes: an in vitro study. **Journal of applied oral science**, v. 20, n. 1, p. 32-37, 2012.

BERTOLUCCI, S. K. et al. Micropropagação de *Tournefortia cf paniculata* Cham. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 3, n. 1, p. 43-49, 2000.

BERTOLUCCI, S. K. V. et al. Micropropogation of *Tournefortia of paniculata* Cham. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 3, n. 1, p. 43-49, 2000.

BHUTKAR, M.; BHISE, S. In vitro assay of alpha amylase inhibitory activity of some indigenous plants. **Int. J. Chem. Sci**, v. 10, n. 1, p. 457-62, 2012.

BOROSKI, M. et al. **Antioxidantes: princípios e métodos analíticos**. 1ed. Curitiba: 2015. 141p ISBN 978-85-8192-730-5.

BOŠKOVIĆ, I. et al. Phytochemical composition and biological activity of *Echium italicum* L. plant extracts. **Bulgarian Chemical Communications**, v. 49, n. 4, p. 836-845, 2017.

BOULANOUAR, B. et al. Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 46, p. 85-96, 2013.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.-E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. John Wiley & Sons, 2015. ISBN 0470714220.

CANTÓN, E. et al. Minimum fungicidal concentrations of amphotericin B for bloodstream *Candida* species. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 45, n. 3, p. 203-206, 2003.

CHEN, M.-L. et al. The caffeic acid in aqueous extract of *Tournefortia sarmentosa* enhances neutrophil phagocytosis of *Escherichia coli*. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v. 36, n. 6, p. 390-396, 2014.

CHEN, Q. et al. Identification and quantification of oleanolic acid and ursolic acid in Chinese herbs by liquid chromatography–ion trap mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, v. 25, n. 12, p. 1381-1388, 2011.

CHIN, Y.-W. et al. Drug discovery from natural sources. **AAPS J**, v. 8, n. 2, p. E239-E253, 2006.

COLLINS, A. R. Assays for oxidative stress and antioxidant status: applications to research into the biological effectiveness of polyphenols. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, n. 1, p. 261S-267S, 2005.

CONNAY, A. H. et al. Inhibitory effect of curcumin and some related dietary compounds on tumor promotion and arachidonic acid metabolism in mouse skin. **Advances in enzyme regulation**, v. 31, p. 385-396, 1991.

CUENDET, M. et al. Quinone reductase induction as a biomarker for cancer chemoprevention. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 3, p. 460-463, Mar 2006.

DA SILVA, E. S. et al. Induction of NAD (P) H: Quinone reductase 1 (QR 1) and antioxidant activities in vitro of ‘Toranja Burarama’(Citrus maxima [Burm.] Merr.). **Phytotherapy research**, v. 32, n. 10, p. 2059-2068, 2018.

DA SILVA OLIVEIRA, D. et al. Vitamina C, carotenoides, fenólicos totais e atividade antioxidante de goiaba, manga e mamão procedentes da Ceasa do Estado de Minas Gerais. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 33, n. 1, p. 89-98, 2011.

DA VEIGA, V. F., JR. Study of the medicinal plants consumption in the Middle-North Region of the Rio de Janeiro State: acceptance by health professionals, way of use of the population. **Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 308-313, Apr-Jun 2008.

DE SOUZA, G. C. et al. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, n. 1, p. 135-143, 2004.

DELAFRONTE, B. **Determinação da atividade das enzimas lipoxigenases (L1 e L3) em oito genótipos de soja desenvolvidos pela Embrapa Soja**. 2014. Universidade Tecnológica Federal do Paraná

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. John Wiley & Sons, 2002. ISBN 0471496413.

DOBRIAN, A. et al. Role of the 12-lipoxygenase pathway in diabetes pathogenesis and complications. **Pharmacology & therapeutics**, v. 195, p. 100-110, 2019.

DOLCET, X. et al. NF- κ B in development and progression of human cancer. **Virchows archiv**, v. 446, n. 5, p. 475-482, 2005.

DOMINGUETI, C. P. et al. Diabetes mellitus: the linkage between oxidative stress, inflammation, hypercoagulability and vascular complications. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 30, n. 4, p. 738-745, 2016.

DUVOIX, A. et al. Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. **Cancer letters**, v. 223, n. 2, p. 181-190, 2005.

ENDRINGER, D. C. **Química e atividades biológicas de *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae):: inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) e efeito na quimioprevenção de câncer**. 2007. (Tese de Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

ERBAS, M. et al. Comparison of the effectivity of oral and intra-articular administration of tenoxicam in patients with knee osteoarthritis. **Revista brasileira de anestesiologia**, v. 65, n. 5, p. 333-337, 2015.

FENALTI, J. M. et al. Diversidade das plantas brasileiras com potencial anti-helmíntico. **VITTALLE-Revista de Ciências da Saúde**, v. 28, n. 1, p. 38-49, 2016.

FERNANDES, P. Antibacterial discovery and development—the failure of success? **Nature biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 1497, 2006.

FERREIRA, A.; MATSUBARA, L. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da associação médica brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FIGUEIRA, T. R. et al. Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health. **Antioxidants & redox signaling**, v. 18, n. 16, p. 2029-2074, 2013.

FLORES-MIRELES, A. L. et al. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. **Nature reviews microbiology**, v. 13, n. 5, p. 269, 2015.

FOGLIO, M. A. et al. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **Construindo a história dos produtos naturais**, v. 7, p. 1-8, 2006.

FRUM, Y.; VILJOEN, A. M. In Vitro 5-Lipoxygenase Activity of Three Indigenous South African Aromatic Plants Used in Traditional Healing and the Stereospecific Activity of Limonene in the 5-Lipoxygenase Assay. **Journal of Essential Oil Research**, v. 18, 2006.

GARZA-JUÁREZ, A. et al. Correlation between chromatographic fingerprint and antioxidant activity of *Turnera diffusa* (Damiana). **Planta medica**, v. 77, n. 09, p. 958-963, 2011.

GERHÄUSER, C. et al. Cancer chemopreventive potential of sulforamate, a novel analogue of sulforaphane that induces phase 2 drug-metabolizing enzymes. **Cancer Research**, v. 57, n. 2, p. 272-278, 1997.

GOMES, J. V. D. et al. TRIAGEM FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES TROMBOLÍTICA E CITOTÓXICA DE *CECROPIA HOLOLEUCA* MIQ.(URTICACEAE), *LIPPIA ALBA* (MILL.) NE BR. EX P. *WILSON* (VERBENACEAE) E *ZANTHOXYLUM RHOIFOLIUM* LAM (RUTACEAE). **Infarma-Ciências Farmacêuticas**, v. 28, n. 1, p. 10-15, 2016.

GOMES, M. D. B.; LERARIO, A. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2009. **Sociedade Brasileira de Diabetes.**, 2009.

GRUENWALD, J.; BRENDLER, T.; JAENICKE, C. **PDR for herbal medicines**. Thomson, Reuters, 2007. ISBN 1563636786.

GUIMARÃES, E. F. et al. FLORA DA GUANABARA: FLACOURTIACEACEAE—OLACACEAE—BORAGINACEAE. **Rodriguésia**, n. 38, p. 143-246, 1971.

GULCHER, J. R. et al. Genes contributing to risk for common forms of stroke. **Trends in molecular medicine**, v. 11, n. 5, p. 217-224, 2005.

HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annual review of nutrition**, v. 16, n. 1, p. 33-50, 1996.

HE, L. et al. Rapid discrimination of raw and sulfur-fumigated *Smilax glabra* based on chemical profiles by UHPLC-QTOF-MS/MS coupled with multivariate statistical analysis. **Food Research International**, v. 108, p. 226-236, 2018.

HEINONEN, O. P. et al. Effect of vitamin-E and beta-carotene on the incidence of lung-cancer and other cancers in male smokers. **New England Journal of Medicine**, v. 330, n. 15, p. 1029-1035, 1994.

HEMALATHA, P. et al. Distribution of phenolic antioxidants in whole and milled fractions of quinoa and their inhibitory effects on α -amylase and α -glucosidase activities. **Food chemistry**, v. 199, p. 330-338, 2016.

HOMHUAL, S. et al. Bioactive Dammarane Triterpenes from the Mangrove Plant *Bruguiera gymnorhiza*. **Journal of natural products**, v. 69, n. 3, p. 421-424, 2006.

HUANG, X.-L. et al. Evaluation of quality of *Salvia miltiorrhiza* Bunge from different provenances by HPLC-DAD fingerprint combined with Chemometrics Method. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2019, IOP Publishing. p.012163.

IBRAHIM, M. H.; OMAR, H.; ZAIN, N. A. M. Salicylic acid enhanced photosynthesis, secondary metabolites, antioxidant and lipoxygenase inhibitory activity (LOX) in *Centella asiatica*. **Annual Research & Review in Biology**, v. 17, n. 4, 2017.

INOUE, M. et al. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. **Current medicinal chemistry**, v. 10, n. 23, p. 2495-2505, 2003.

IOSET, J.-R. et al. Antifungal and larvicidal meroterpenoid naphthoquinones and a naphthoxirene from the roots of *Cordia linnael*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 5, p. 729-734, 1998.

_____. Antifungal and larvicidal cordiaquinones from the roots of *Cordia curassavica*. **Phytochemistry**, v. 53, n. 5, p. 613-617, 2000.

JALALI, F. S. S.; TAJIK, H.; HADIAN, M. Efficacy of topical application of alcoholic extract of yarrow in the healing process of experimental burn wounds in rabbit. **Comparative Clinical Pathology**, v. 21, n. 2, p. 177-181, 2012.

JOHN, J. A.; SHAHIDI, F. Phenolic compounds and antioxidant activity of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). **Journal of Functional Foods**, v. 2, n. 3, p. 196-209, 2010.

JÚNIOR, D. A. et al. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **J Bras Pneumol**, v. 31, n. Suppl 1, p. 60-68, 2005.

KANG, S.-H. et al. Biotransformation of Food-Derived Saponins, Platycosides, into Deglucosylated Saponins Including Deglucosylated Platycodin D and Their Anti-Inflammatory Activities. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 67, n. 5, p. 1470-1477, 2019.

KANG, Y.-H.; PEZZUTO, J. M. Induction of quinone reductase as a primary screen for natural product anticarcinogens. In: (Ed.). **Methods in enzymology**: Elsevier, v.382, 2004. p.380-414. ISBN 0076-6879.

KIM, D.-O.; JEONG, S. W.; LEE, C. Y. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. **Food chemistry**, v. 81, n. 3, p. 321-326, 2003.

KIM, S. et al. Cytotoxic flavaglines and bisamides from *Aglaia edulis*. **Cytotoxic flavaglines and**

bisamides from *Aglaia edulis*, v. 69, n. 12, p. 1769-1775, 2006.

KIM, Y.-M. et al. Inhibitory effect of pine extract on α -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia. **Nutrition**, v. 21, n. 6, p. 756-761, 2005.

KITAMURA, K. J. A.; CHEMISTRY, B. Biochemical characterization of lipoxygenase lacking mutants, L1-less, L-2-less, and L-3-less soybeans. **Agricultural and biological chemistry**, v. 48, n. 9, p. 2339-2346, 1984.

KLICK, S.; HERRMANN, K. Glucosides and glucose esters of hydroxybenzoic acids in plants. **Phytochemistry**, v. 27, n. 7, p. 2177-2180, 1988.

KOURY, J. C.; DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Rev nutr**, v. 16, n. 4, p. 433-41, 2003.

KUMAR, S. et al. α -glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes. **Pharmacognosy reviews**, v. 5, n. 9, p. 19, 2011.

LACAILLE-DUBOIS, M.-A.; WAGNER, H. New perspectives for natural triterpene glycosides as potential adjuvants. **Phytomedicine**, v. 37, p. 49-57, 2017.

LEBOVITZ, H. E. Alpha-glucosidase inhibitors. **Endocrinology and metabolism clinics of North America**, v. 26, n. 3, p. 539-551, 1997.

LEITE, J. P. V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. Atheneu, 2009. ISBN 857379237X.

LEÓN, L.-D. et al. Effect of crude plant extracts from some Oaxacan flora on two deleterious fungal phytopathogens and extract compatibility with a biofertilizer strain. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 383, 2014.

LEVY, C. E. et al. **Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção em serviços de saúde**. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília. 2004

LIN, Y.-L. et al. Anti-Lipid-Peroxidative Principles from *Tournefortia sarmentosa*. **Journal of natural products**, v. 65, n. 5, p. 745-747, 2002.

LIN, Y.-L. et al. Phenolic compounds from *Tournefortia sarmentosa*. **Journal of natural products**, v. 62, n. 11, p. 1500-1503, 1999.

LOIZZO, M. R.; PUGLIESE, A.; MENICHINI, F. Radical scavenging, antioxidant and ferric reducing activities of commercial mineral water enriched with fruit and ready to drink flavoured teas. **Open Nutraceuticals** v. 5, p. 160-8, 2012.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. ISBN 8586714186.

MACIAS, F. A.; GALINDO, J. L.; GALINDO, J. C. Evolution and current status of ecological phytochemistry. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22-24, p. 2917-2936, 2007.

MANACH, C. et al. The complex links between dietary phytochemicals and human health deciphered by metabolomics. **Mol. Nutr. Food Res**, v. 53, n. 10, p. 1303-1315, 2009.

MARMITT, D. J. et al. Plantas com potencial antibacteriano da relação nacional de plantas medicinais de interesse do sistema único de saúde: revisão sistemática. **Revista de Saúde Pública de Santa Catarina**, v. 8, n. 2, p. 135-152, 2015.

MARQUES, T. H. C.; MELO, C. H. S. D.; FREITAS, R. M. D. In vitro evaluation of antioxidant, anxiolytic and antidepressant-like effects of the *Bellis perennis* extract. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 5, p. 1044-1052, 2012.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 3ed. Fortaleza, CE: Edições UFC, 2009. ISBN 85-7282-026-4.

MCDUGALL, G. J.; STEWART, D. The inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes. **Biofactors**, v. 23, n. 4, p. 189-195, 2005.

MONTEIRO, M. R. P. et al. Qualidade protéica de linhagens de soja com ausência do Inibidor de Tripsina Kunitz e das isoenzimas Lipoxigenases. **Revista de Nutrição**, 2004.

MORAES, L. D.; DE SOUSA, O. V.; YAMAMOTO, C. H. Avaliações Qualitativas e Quantitativas da Variação de Metabólitos Secundários em *Tournefortia paniculata* Cham (Boraginaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S2, p. 1032-1034, 2007.

MORIYA, R. et al. Activation of sodium-glucose cotransporter 1 ameliorates hyperglycemia by mediating incretin secretion in mice. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 297, n. 6, p. E1358-E1365, 2009.

MOURE, A. et al. Natural antioxidants from residual sources. **Food chemistry**, v. 72, n. 2, p. 145-171, 2001.

NAIDU, P. B. et al. Ameliorative potential of gingerol: Promising modulation of inflammatory factors and lipid marker enzymes expressions in HFD induced obesity in rats. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 419, p. 139-147, 2016.

NAKANISHI, C.; TOI, M. Nuclear factor- κ B inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 4, p. 297, 2005.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger-7**. Artmed Editora, 2018. ISBN 858271534X.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of natural products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

NITZAN, O. et al. Urinary tract infections in patients with type 2 diabetes mellitus: review of prevalence, diagnosis, and management. **Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy**, v. 8, p. 129, 2015.

NOOR, F. et al. An integrated approach to improved toxicity prediction for the safety assessment during preclinical drug development using Hep G2 cells. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 237, n. 2, p. 221-231, 2009.

O'BRIEN, P. et al. High concordance of drug-induced human hepatotoxicity with in vitro cytotoxicity measured in a novel cell-based model using high content screening. **Archives of toxicology**, v. 80, n. 9, p. 580-604, 2006.

OGIHARA, K. et al. Studies on constituents from the twigs of *Messerschmidia argentea* (2). **Bull Coll Sci Univ Ryukyus**, v. 64, p. 53-59, 1997.

ORGANIZATION, W. H. **WHO monographs on selected medicinal plants**. World Health Organization, 1999. ISBN 9241545372.

OTA, M. et al. Action of α -D-glucosidase from *Aspergillus niger* towards dextrin and starch. **Carbohydrate polymers**, v. 78, n. 2, p. 287-291, 2009.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4619-4626, 2001.

PARIKH, N. R. et al. Oleanane triterpenoids in the prevention and therapy of breast cancer: current evidence and future perspectives. **Phytochemistry reviews**, v. 13, n. 4, p. 793-810, 2014.

PARK, G. Y.; CHRISTMAN, J. W. Nuclear factor kappa B is a promising therapeutic target in inflammatory lung disease. **Current drug targets**, v. 7, n. 6, p. 661-668, 2006.

PATRICK, G. L. **An introduction to medicinal chemistry**. Oxford university press, 2013. ISBN 0199697396.

PATRIDGE, E. et al. An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. **Drug discovery today**, v. 21, n. 2, p. 204-207, 2016.

PERKINS, N. D. The diverse and complex roles of NF- κ B subunits in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 2, p. 121, 2012.

PEZZUTO, J. M. Resveratrol as an inhibitor of carcinogenesis. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, n. 7-8, p. 443-573, 2008.

PIETTA, P.; SIMONETTI, P.; MAURI, P. Antioxidant activity of selected medicinal plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 11, p. 4487-4490, 1998.

PIMENTEL, S. P. et al. Protective effect of topical *Cordia verbenacea* in a rat periodontitis model: immune-inflammatory, antibacterial and morphometric assays. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 12, n. 1, p. 224, 2012.

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química nova**, p. 45-61, 2002.

POLLIER, J.; GOOSSENS, A. Oleanolic acid. **Phytochemistry**, v. 77, p. 10-15, 2012.

POPOVA, M. et al. Antioxidant and α -glucosidase inhibitory properties and chemical profiles of Moroccan propolis. **Natural Product Communications**, v. 10, p. 1961-1964, 2015.

PRABHA, B. et al. Antidiabetic potential of phytochemicals isolated from the stem bark of *Myristica fatua* Houtt. var. *magnifica* (Bedd.) Sinclair. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 12, p. 3461-3467, 2018.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 337-341, 1999.

PROCHASKA, H. J.; SANTAMARIA, A. B. J. A. B. Direct measurement of NAD (P) H: quinone reductase from cells cultured in microtiter wells: a screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers. **Analytical biochemistry**, v. 169, n. 2, p. 328-336, 1988.

RAPOLA, J. M. et al. Randomised trial of α -tocopherol and β -carotene supplements on incidence of major coronary events in men with previous myocardial infarction. **The Lancet**, v. 349, n. 9067, p. 1715-1720, 1997.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de alimentos**. Instituto Mauá de Tecnologia, 2007. ISBN 8521203667.

RICHTER, C.; PARK, J.-W.; AMES, B. N. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 17, p. 6465-6467, 1988.

RUBINSTEIN, L. et al. Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1113-1117, 1990.

RUFINO, M. et al. **Determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução de ferro (FRAP): metodologia científica**. EMBRAPA. Fortaleza. 2006

RUSSO, G. L. Ins and outs of dietary phytochemicals in cancer chemoprevention. **Biochemical pharmacology**, v. 74, n. 4, p. 533-544, 2007.

SCHNARR, J.; SMAILL, F. Asymptomatic bacteriuria and symptomatic urinary tract infections in pregnancy. **European journal of clinical investigation**, v. 38, p. 50-57, 2008.

SCHOLZ, M. et al. Metabolite fingerprinting: detecting biological features by independent component analysis. **Bioinformatics**, v. 20, n. 15, p. 2447-2454, 2004.

SCOTT, A. I. **Interpretation of the Ultraviolet Spectra of Natural Products: International Series of Monographs on Organic Chemistry**. Great Britain: Elsevier, 1964. ISBN 1483137201.

SEIFU, W. D.; GEBISSA, A. D. Prevalence and antibiotic susceptibility of Uropathogens from cases of urinary tract infections (UTI) in Shashemene referral hospital, Ethiopia. **BMC infectious diseases**, v. 18, n. 1, p. 30, 2018.

SEPTANINGSIH, D. A. et al. Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS) Fingerprint Combined with Chemometrics for Identification of Metabolites Content and Biological Activities of *Curcuma aeruginosa*. **Indonesian Journal of Chemistry**, v. 18, n. 1, p. 43-52, 2018.

SHAKYA, A. K. Medicinal plants: future source of new drugs. **International Journal of Herbal Medicine**, v. 4, n. 4, p. 59-64, 2016.

SHUKLA, A.; CHOUDHARY, A. Evaluation of in vitro antidiabetic and anti-inflammatory activities of leaves extract of *Boehmeria rugulosa*. **Asian J Pharm Clin Res**, v. 11, n. 9, 2018.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2017. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 67, n. 1, p. 7-30, 2017.

SILVA, E. et al. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**, v. 101, n. 3, p. 1012-1018, 2007.

SILVA, F. D. O. et al. Constituintes químicos das folhas de *Senna spectabilis* (DC) IRWIN & BARNEBY var. *Excelsa* (Schrad.) IRWIN & BARNEBY. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1874-1876, 2010.

SIMÃO, A. A.; CORRÊA, A. D.; CHAGAS, P. M. B. Inhibition of digestive enzymes by medicinal plant aqueous extracts used to aid the treatment of obesity. **J. Med. Plant. Res**, v. 6, n. 47, p. 5826-5830, 2012.

SIMAO, A. A. et al. Chemical composition of medicinal plants used as auxiliary treatments for obesity. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 37, 2014.

SIMÃO, A. A. et al. Chemical composition of medicinal plants used as auxiliary treatments for obesity. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 37, 2014.

SIMÃO, A. A. et al. Pharmacotoxic evaluation of extracts of medicinal plants used in the treatment of obesity. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 8, n. 43, p. 1103-1109, 2014.

SIMÃO, A. A.; DUARTE, A.; BATISTA, P. M. Inhibition of digestive enzymes by medicinal plant aqueous extracts used to aid the treatment of obesity. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 47, p. 5826-5830, 2012.

SIMÃO, A. A. et al. Antioxidants from medicinal plants used in the treatment of obesity. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 3, n. 3, p. 429, 2013.

SIMÃO, A. A. et al. Anti-obesity Effects of the Administration of *Tournefortia paniculata* Cham Extract on Wistar Rats Subjected to a Hypercaloric Diet. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, n. 4, p. 494-503, 2015.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Artmed Editora, 2016. ISBN 8582713657.

SKEHAN, P. et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.

SMITH, L. B. **Boraginaceae**. In: **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí: R. Reitz, 1970.

SOBEL, J. D. et al. Suppressive antibacterial therapy with 0.75% metronidazole vaginal gel to prevent recurrent bacterial vaginosis. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 194, n. 5, p. 1283-1289, 2006.

SPENCER, S. R. et al. The potency of inducers of NAD (P) H:(quinone-acceptor) oxidoreductase parallels their efficiency as substrates for glutathione transferases. Structural and electronic correlations. **Biochemical journal**, v. 273, n. 3, p. 711-717, 1991.

SPORN, M. B. Approaches to prevention of epithelial cancer during the preneoplastic period. **Cancer research**, v. 36, n. 7 Part 2, p. 2699-2702, 1976.

SRIVASTAVA, K.; BORDIA, A.; VERMA, S. Curcumin, a major component of food spice turmeric (*Curcuma longa*) inhibits aggregation and alters eicosanoid metabolism in human blood platelets. **Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids**, v. 52, n. 4, p. 223-227, 1995.

STADTMAN, E. R.; LEVINE, R. L. Protein oxidation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 899, n. 1, p. 191-208, 2000.

STAUDINGER, T.; PÈNE, F. Current insights into severe sepsis in cancer patients. **Revista Brasileira de terapia intensiva**, v. 26, n. 4, p. 335-338, 2014.

STEWART, B.; WILD, C. P. World cancer report 2014. 2014.

SUN, J. et al. Screening non-colored phenolics in red wines using liquid chromatography/ultraviolet and mass spectrometry/mass spectrometry libraries. **Molecules**, v. 12, n. 3, p. 679-693, 2007.

SUZUKI, H. et al. Arachidonate 12/15-Lipoxygenase-Induced Inflammation and Oxidative Stress Are Involved in the Development of Diabetic Cardiomyopathy. **Diabetes & Metabolic Syndrome-Clinical Research & Reviews**, v. 64, n. 2, p. 618-630, 2015.

TADERA, K. et al. Inhibition of α -glucosidase and α -amylase by flavonoids. **Journal of nutritional science and vitaminology**, v. 52, n. 2, p. 149-153, 2006.

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

TANGVARASITTICHAJ, S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. **World journal of diabetes**, v. 6, n. 3, p. 456, 2015.

TENG, C.-Y. et al. *Tournefortia sarmentosa* extract attenuates acetaminophen-induced hepatotoxicity. **Pharmaceutical biology**, v. 50, n. 3, p. 291-396, 2012.

TERSEY, S. A. et al. Minireview: 12-lipoxygenase and islet β -cell dysfunction in diabetes. **Molecular Endocrinology**, v. 29, n. 6, p. 791-800, 2015.

TRINH, B. T.; STAERK, D.; JÄGER, A. K. Screening for potential α -glucosidase and α -amylase inhibitory constituents from selected Vietnamese plants used to treat type 2 diabetes. **Journal of ethnopharmacology**, v. 186, p. 189-195, 2016.

TUNDIS, R.; LOIZZO, M.; MENICHINI, F. Natural products as α -amylase and α -glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: an update. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 10, n. 4, p. 315-331, 2010.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **The Journal of physiology**, v. 552, n. 2, p. 335-344, 2003.

UPRITCHARD, J. E. et al. Spread supplemented with moderate doses of vitamin E and carotenoids reduces lipid peroxidation in healthy, nonsmoking adults. **The American journal of clinical nutrition**, v. 78, n. 5, p. 985-992, 2003.

VENEREO GUTIÉRREZ, J. R. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. **Revista Cubana de medicina militar**, v. 31, n. 2, p. 126-133, 2002.

VIEILLE, C.; ZEIKUS, G. J. J. M.; REVIEWS, M. B. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 65, n. 1, p. 1-43, 2001.

VILLALBA, C. M. A. **ESTUDOS ESTRUTURAIS DE PROTEÍNAS: INIBIDOR DE ALFA-AMILASE DE Secale cereale, GTPase YchF E ENOLASE DE Trypanosoma cruzi**. 2012. 121p (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR.

VOGIATZI, G.; TOUSOULIS, D.; STEFANADIS, C. The role of oxidative stress in atherosclerosis. **Hellenic J cardiol**, v. 50, n. 5, p. 402-409, 2009.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Springer Science & Business Media, 1996. ISBN 3540586768.

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, v. 16, n. 2-3, p. 97-110, 2009.

WALSH, C. **Antibiotics: actions, origins, resistance**. American Society for Microbiology (ASM), 2003. ISBN 1555812546.

WAYNE, P. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**: National committee for clinical laboratory standards, NCCLS. M100-S9: 120-6 p. 2008.

WEI, M.-C.; YANG, Y.-C. Extraction characteristics and kinetic studies of oleanolic and ursolic acids from *Hedyotis diffusa* under ultrasound-assisted extraction conditions. **Separation and Purification Technology**, v. 130, p. 182-192, 2014.

WIKANINGTYAS, P.; SUKANDAR, E. Y. The antibacterial activity of selected plants towards resistant bacteria isolated from clinical specimens. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 1, p. 16-19, 2016.

WILKE, T. et al. Epidemiology of urinary tract infections in type 2 diabetes mellitus patients: An analysis based on a large sample of 456,586 German T2DM patients. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 29, n. 8, p. 1015-1023, 2015.

WOLFE, K. L.; LIU, R. H. Structure– activity relationships of flavonoids in the cellular antioxidant activity assay. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 18, p. 8404-8411, 2008.

XU, J. J.; DIAZ, D.; O'BRIEN, P. J. Applications of cytotoxicity assays and pre-lethal mechanistic assays for assessment of human hepatotoxicity potential. **Chemico-biological interactions**, v. 150, n. 1, p. 115-128, 2004.

YUE, J. et al. A sesquiterpene and other constituents from *Erigeron breviscapus*. **Phytochemistry**, v. 36, n. 3, p. 717-719, 1994.

ZAGO, L. D. M. S.; DE MOURA, M. E. P. Vinte e dois anos de pesquisa sobre plantas medicinais: uma análise cienciométrica. **Tecnia**, v. 3, n. 1, p. 157-173, 2018.

ZHANG, P. et al. Oleanolic acid induces apoptosis in human leukemia cells through caspase activation and poly (ADP-ribose) polymerase cleavage. **Acta biochimica et biophysica sinica**, v. 39, n. 10, p. 803-809, 2007.

ZHENG, Y.; LEY, S. H.; HU, F. B. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. **J Nature Reviews Endocrinology**, v. 14, n. 2, p. 88, 2018.

ZHU, F. et al. Clustered patterns of species origins of nature-derived drugs and clues for future bioprospecting. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 31, p. 12943, 2011.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho contribuiu com informações químico-biológico de *Tournefortia paniculata* Vent., uma planta medicinal, com relatos superficiais de estudos fitoquímicos e biológicos reportados na literatura.

Neste estudo foram avaliadas frações derivadas do extrato etanólico bruto (EB) das folhas de *Tournefortia paniculata* representadas pelas frações *n*-hexano (HEX), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e *n*-butanol (BuOH).

No primeiro manuscrito foi possível demonstrar que o EB e frações de *Tournefortia paniculata* apresentaram atividades de interesse no controle de complicações decorrentes da diabetes. Atividades inibitórias das enzimas α -amilase e α -glicosidase controlam os níveis de glicose pós-prandial e, da enzima lipoxidase a regulação da resposta inflamatória, que pode causar danos teciduais. O controle de infecções urinárias pode auxiliar na sobrevida saudável do paciente portador da diabetes.

A fração DCM foi a mais promissora para a continuidade dos estudos fitoquímicos e de atividades que controlem complicações da diabetes. Esta fração apresentou promissoras atividades inibitórias *in vitro* das enzimas α -amilase e lipoxidase. No que tange a atividade inibitória da enzima α -glicosidase, a fração AcOEt apresentou atividade mais potente. No entanto, a fração DCM apresentou atividade inibitória da enzima α -glicosidase comparável a atividade da acarbose relatada por Trinh *et al.* (2016).

Nenhuma fração foi capaz de inibir a proliferação das bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiela pneumoniae*. Na avaliação de atividade antifúngica, a fração DCM foi ativa contra as cepas fúngicas *Candida dubliniensis* e *Issatchenkia orientalis/Candida krusei*.

Análises por CLAE-DAD apresentaram expressivas diferenças nos perfis químicos das preparações, o que explicariam as diferenças nas atividades biológicas observadas. Entretanto, não foram realizadas análises de correlação entre a composição química e as atividades biológicas avaliadas. Mas, foi possível apontar que a fração DCM foi a que apresentou perfil químico mais complexo, o que indica o potencial da espécie para o desenvolvimento de um fitoterápico.

No segundo trabalho, nossos estudos mostraram que a fração BuOH de *Tournefortia paniculata* possui elevado potencial antioxidante considerando os ensaios de captura de radicais livres DPPH, ORAC, CAT e poder redutor de íons Fe³⁺. Essa fração apresentou ser a mais rica em compostos fenólicos e flavonas/flavonóis totais, cuja análise por UPLC-MS-ESI sugeriu tratar-se de uma fração enriquecida em um derivado glicosilado do ácido siríngico.

O potencial quimiopreventivo das preparações de *Tournefortia paniculata* por meio da indução da Quinona Redutase (QR); inibição de NF-κB e de citotoxicidade em linhagens celulares de carcinoma hepático humano HepG2 e de melanoma humano MV3 também foram avaliadas nesse trabalho. As frações HEX e DCM apresentaram atividade quimiopreventiva na indução de QR, sem causar danos celulares nas linhagens HepG2 e MV3. Fracionamento em coluna de sílica gel da fração HEX levou a obtenção de uma fração semipurificada (RH2), a qual apresentou a mesma atividade biológica observada para a fração HEX. Análises por CCD da subfração RH2 revelada com o reagente de Liebermann–Burchard apontou a presença de substâncias de natureza triterpênica. Análises por UPLC-DAD e UPLC-MS-ESI levaram a identificação parcial de uma mistura de derivados heterosídeo-piperazínico e heterosídeo-piperidínico de núcleo triterpênico.

Nesse contexto, estudos fitoquímicos e de bioprospecção de novos compostos capazes de ser utilizados como alternativas terapêuticas seguras e eficientes são uma importante ferramenta para a descoberta de moléculas úteis à recuperação da saúde humana e animal. Assim, como sugestões de continuidade a esse trabalho, sugere-se o aprofundamento nos estudos fitoquímicos, bem como a experimentação dessas frações em modelos biológicos animais agudos e crônicos, a fim de determinar com melhor acurácia a dose/efeito das atividades avaliadas nesse trabalho.