

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA
CAMPUS URUGUAIANA**

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E TOXICOLÓGICA DE
CHAPTALIA NUTANS (L.) POLACK.**

TESE DE DOUTORADO

LETIELE BRUCK DE SOUZA

Uruguaiiana

2020

LETIELE BRUCK DE SOUZA

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E TOXICOLÓGICA DE
CHAPTALIA NUTANS (L.) POLACK.**

Tese de doutorado apresentado ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Pampa (Unipampa, RS), como requisito parcial para obtenção do Título de Doutora em Bioquímica.

Orientador: Dr. Elton Luís Gasparotto Denardin

Co-orientador: Dra. Vanusa Manfredini

Uruguaiana

2020

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

S719c Souza, Letiele Bruck de

Composição química, atividade antioxidante e toxicológica
de Chaptalia nutans (L.) Polack. / Letiele Bruck de Souza.
77 p.

Tese(Doutorado)-- Universidade Federal do Pampa, DOUTORADO
EM BIOQUÍMICA, 2020.

"Orientação: Elton Luis Gasparotto Denardin".

1. Compostos fenólicos. 2. Estresse oxidativo. 3.
Drosophila melanogaster. 4. Artemia salina. 5. Allium cepa. I.
Título.

LETIELE BRUCK DE SOUZA

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E TOXICOLÓGICA DE
CHAPTALIA NUTANS (L.) POLACK.**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós
Graduação Stricto Sensu em Bioquímica, da
Universidade Federal do Pampa, como requisito
parcial para obtenção do Título de Doutora em
Bioquímica.

Área de concentração: Bioprospecção molecular

Tese defendida e aprovada em: 27 de março de 2020.

Banca examinadora:



Prof. Dr. Elton Luís Gasparotto Denardin

Presidente/Orientador (UNIPAMPA)



Prof^a. Dr^a. Vanusa Manfredini

Co-orientadora (UNIPAMPA)



Prof^a. Dr^a. Catiúscia Molz de Freitas

(URI - Campus Santiago)



Prof. Dr^a. Daiana Silva de Ávila

(PPG Bioquímica – UNIPAMPA)



Prof^a. Dr^a. Fabiane Moreira Farias

(PPG Ciências Farmacêuticas – UNIPAMPA)



Prof. Dr. Robson Luiz Puntel

(PPG Bioquímica – UNIPAMPA)

Dedico este trabalho a **Deus** por me guiar, proteger, me dar saúde e forças para lutar pelos meus sonhos.

À minha mãe **Dinorá** pela incansável dedicação e incentivo nos meus estudos.

Ao meu pai **Albino** pela incansável dedicação a minha pesquisa, coletando o material nas mais variadas fisionomias campestres.

Ao meu irmão **Luciano** pelo incentivo, apoio e principalmente por sempre acreditar no meu potencial.

Ao meu esposo **Lucas** pela imensa dedicação, apoio e compreensão.

Ao meu orientador professor **Elton** pela confiança depositada em mim e pelos ensinamentos transmitidos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ser o alicerce da minha vida, dando-me coragem para enfrentar mais este desafio e por permitir que eu chegasse até o final dele. Obrigada meu Pai por ter me dado uma família e amigos que me ajudaram em todos os momentos desta jornada.

A UNIPAMPA e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica (PPGBIOQ) pela oportunidade e a URI – Santiago por oferecerem a estrutura e os recursos necessários para o desenvolvimento de meu trabalho.

Aos professores do PPGBIOQ pelos ensinamentos, apoio, disponibilidade e incentivo, principalmente meu orientador Prof. Dr. Elton Denardin pela paciência, dedicação, compreensão, e principalmente pela confiança depositada em mim. A minha co-orientadora prof^a. Dr^a. Vanusa Manfredini que incansavelmente nos apoiou e dedicou-se ao nosso trabalho, abrindo as portas do seu laboratório (Gestox) para o desenvolvimento da pesquisa. A vocês minha gratidão!

Aos colegas do LEFQPN em especial o Jefferson Anderle meu IC favorito, muito obrigada por tudo, sem você eu não teria chegada até aqui. Gratidão Jef! A Mayara pela ajuda nos experimentos, pela companhia e amizade, obrigada May! A Aline sem palavras para agradecer tamanho carinho, dedicação e compreensão, sempre que precisei você estava lá para me auxiliar, e principalmente a amizade construída, que levarei para sempre! Te adoro muito amada! Ao Jeferson Soares pela dedicação em auxiliar sempre que precisei, muito obrigada Jef Dr.!!! Ao Murilo, ao Matheus e a Bruninha, muito obrigado por tudo, vocês são especiais! Enfim galera, sem vocês não poderia desenvolver esse projeto. MUITÍSSIMO obrigada!

Ao Laboratório de Plantas Medicinais (LABPLAM) da URI – Santiago, em nome da Prof^a. Dr^a. Amanda Gindri pela confiança em disponibilizar o seu laboratório para que fossem desenvolvidos os experimentos, diminuindo a distância entre São Chico-Uruguaiana. As bolsistas Kelen, Pâmila, Jéssica e Thainara e a farmacêutica Patrícia, obrigada pelo carinho, dedicação e principalmente pela disponibilidade em me ajudar. A vocês minha gratidão.

Aos meus colegas de trabalho, e aos meus chefes imediatos (Jamile Gonçalves – IFFar, Roseli Martins e Maira Aguiar – IEE Salgado Filho) que sempre compreenderam minha ausência e facilitaram para que eu pudesse conciliar trabalho, estudo e pesquisa. A vocês fico sem palavras, somente agradeço a Deus por tê-las em meu caminho e peço a Ele que retribua vocês com as melhores bênçãos.

Aos meus pais Albino e Dinorá, ao meu irmão Luciano. O final desta jornada significa uma conquista, que sei, também é de vocês. Obrigada por sempre estarem ao meu lado, mesmo eu estando sempre longe e por terem entendido a minha ausência e humor algumas vezes instável. Amo vocês infinitamente.

Ao meu pai, em especial, que com seus quase 80 anos e conhecimento empírico, me ajudou na escolha da planta e principalmente em todas as coletas. Incansavelmente subia e descia barrancos, atravessava córregos e rasgava quase que sempre a roupa pulando as cercas (para o desespero da mãe). Meu velho, muito obrigada!

Ao Lucas, meu amor e meu companheiro de todas as horas. Obrigada por me dar coragem, apoio, incentivo, carinho, tranquilidade e, principalmente, por compreender minha ausência, até mesmo quando eu estava ao seu lado. Sem você tudo teria sido muito mais difícil. Essa conquista é nossa!

A minha cunhada Amanda pela amizade, companhia, confiança e orientação que me prestou durante todo o tempo. Palavras não descrevem o quanto sou grata a você. Só quero que saibas que farei tudo para retribuir o que você fez por mim.

Aos meus sogros Nilson e Analaura muito obrigada pelo apoio, carinho, compreensão e dedicação que sempre tiveram comigo. É mais uma etapa vencida e vocês fazem parte dela.

A Riciele e a Lara, minhas companheiras de apartamento, muito obrigada pelos dois anos de convívio e pela amizade construída. Levarei vocês para sempre no meu coração.

Aos meus familiares, pela compreensão da ausência física em vários momentos que foram importantes. Bel (Isabel Bruck), obrigada por tudo, por sempre me entender e compreender a minha ausência, principalmente no momento mais lindo e marcante que é gestação. Amo vocês (agora uma família)! Fran (Francieli Bruck) e Alaerte, sem palavras para agradecer a acolhida, com certeza vocês foram peças importantíssimas nesta conquista. Sou muito grata por permitir o aumento das minhas horas de sono e a diminuição das horas de estrada. Mandi (Vagner Bruck) obrigado por sempre me socorrer com os horários de ônibus e com os transportes de materiais. Ah, e também pela compreensão da ausência na vida do nosso Davizinho, durante estes anos.

A todas as pessoas que mesmo aqui não sendo mencionadas, mas que colaboraram de alguma forma para a realização deste trabalho, meu muito obrigada!

O final deste curso de Pós-Graduação significa apenas que mais uma etapa foi cumprida, não a última; significa que sentirei saudades de muitas pessoas, coisas, lugares e situações; e se os últimos quatro anos foram os mais difíceis saibam também, que eles foram os mais felizes.

RESUMO

Tese de Doutorado

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Universidade Federal do Pampa

Composição química, atividade antioxidante e toxicológica de *Chaptalia nutans* (L.) Polack.

Autora: Letiele Bruck de Souza

Orientador: Elton Luís Gasparotto Denardin

Local e Data da Defesa: Uruguaiana, 27 de Março de 2020.

Chaptalia nutans é uma espécie amplamente utilizada na medicina popular no sul do Brasil como laxantes, béquico, e especialmente em preparações tópicas para traumatismos, feridas e hemorragias. Neste sentido, objetivou-se avaliar a constituição química do extrato metanólico das folhas e raízes de *C. nutans*, bem como verificar a atividade antioxidante em diferentes métodos, antimicrobiana e a toxicidade dos extratos utilizando diferentes modelos. Para elucidar os compostos presentes no extrato, foi realizada uma triagem fitoquímica, bem como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, acoplada a Detector de Diodos e Espectrometria de Massa (HPLC-DAD-MS). A atividade antimicrobiana, dos extratos brutos e das frações, foi avaliada individualmente contra bactérias e fungos pelo teste de microdiluição em caldo. A capacidade antioxidante foi verificada pelo radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), capacidade de redução de ferro (FRAP), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), proteína carbonil e diacetato de dicloro-di-hidro-fluoresceína (DCFH-DA). Como teste preliminar de toxicidade, foi utilizado o bioensaio de *Artemia salina*. Em seguida, foi avaliada a citotoxicidade e genotoxicidade do extrato através do sistema de teste *Allium cepa* e, por fim, um modelo experimental mais complexo, *Drosophila melanogaster*, foi utilizado para avaliar compostos neurotóxicos. A presença de um grande número de fitoconstituintes ativos, como alcalóides, cumarinas, flavonóides, terpenos e principalmente compostos fenólicos, pode justificar a capacidade antioxidante dos extratos, que em concentrações de 0,1, 1 e 10 mg/mL demonstraram potencial para proteger as células dos danos lipídico e preteico, bem como a neutralização dos radicais peroxilas. O extrato das folhas na concentração de 1000µg/mL e o extrato das raízes nas três concentrações testadas 10, 100 e 1000 µg/mL mostraram-se extremamente promissores na diminuição dos níveis de

malondialdeído (MDA). O extrato bruto das folhas de *C. nutans* não foi eficaz contra os microrganismos testados, somente a fração hexânica, na concentração de 1000µg/mL, inibiu com expressividade os microrganismos: *Staphylococcus. epidermidis*, *Candida tropicalis*, *Candinda glabrata* e *Candida krusei*. Com relação à toxicidade dos extratos, a *C. nutans* não apresentou ser tóxica nas concentrações testadas nos diferentes modelos *in vivo*, não apresentando citotoxicidade, genotoxicidade e neurotoxicidade. As raízes, no modelo *A. cepa*, na maior concentração apresentaram capacidade de proteção de 50% nas anormalidades cromossômicas causadas pelo glifosato, como também protegeu em 80%, no ensaio *D. melanogaster* nas três concentrações testadas, do déficit locomotor causado pelo Paraquat®. As folhas e as raízes de *C. nutans* apresentaram resultados promissores, abrindo caminho para o possível desenvolvimento de antioxidantes naturais após investigações mais específicas, elucidando os mecanismos de ação dos extratos e elucidando a redução de fatores disfuncionais envolvidos no processo de neurodegeneração.

Palavras-chave: *Allium cepa*; *Artemia salina*; Asteraceae; compostos fenólicos; *Drosophila melanogaster*; estresse oxidativo.

ABSTRACT

Doctoral Thesis

Biochemistry Postgraduate Program

Federal University of Pampa

Chemical composition, antioxidant and toxicological activity of *Chaptalia nutans* (L.) Polack.

Author: Letiele Bruck de Souza

Advisor: Elton Luís Gasparotto Denardin

Date and Place of Defense: Uruguaiiana, March, 27, 2020

Chaptalia nutans is a species widely used in popular medicine in southern Brazil as laxatives, antitussive, and especially in topical preparations for trauma, wounds and hemorrhages. The objective was to evaluate the chemical constitution of the methanolic extract of the leaves and roots of *C. nutans*, as well as to verify the antioxidant activity in different methods, antimicrobial and the toxicity of the extracts using different models. To elucidate the compounds present in the extract, a phytochemical screening was performed, as well as High Performance Liquid Chromatography, coupled to Diodes Detector and Mass Spectrometry (HPLC-DAD-MS). The antimicrobial activity of the crude extracts and fractions was individually evaluated against bacteria and fungus by the broth microdilution test. The antioxidant capacity was verified by the radical 2,2-diphenyl-1-picrilhidrazil (DPPH), iron reduction capacity (FRAP), substances reactive to thiobarbituric acid (TBARS), carbonyl protein and dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA). As a preliminary toxicity test, the *Artemia salina* bioassay was used. After that, the cytotoxicity and genotoxicity of the extract was evaluated using the *Allium cepa* test system and, finally, a more complex experimental model, *Drosophila melanogaster*, was used to evaluate neurotoxic compounds. The presence of a large number of active phytochemicals, such as alkaloids, coumarins, flavonoids, terpenes and mainly phenolic compounds, may justify the antioxidant capacity of the extracts, which in concentrations of 0.1, 1 and 10 mg/mL demonstrated the potential to protect the cells from lipid and protein damage, as well as the neutralization of peroxy radicals. Leaf extract at a concentration of 1000 µg/mL and root extract at the three tested concentrations 10, 100 and 1000 µg/mL proved to be extremely promising in decreasing

malondialdehyde (MDA) levels. The crude extract of the leaves of *C. nutans* was not effective against the tested microorganisms, only the hexane fraction, at a concentration of 1000µg/mL, significantly inhibited the microorganisms: *Staphylococcus epidermidis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* and *Candida krusei* and the chloroform fraction of the root at a concentration of 500µg / mL, inhibited only *Eschechiria coli*. Regarding to the toxicity of the extracts, *C. nutans* was not toxic at the concentrations tested in the different models in vivo, with no cytotoxicity, genotoxicity and neurotoxicity. The roots, in the *A. cepa* model, in the highest concentration showed a 50% protection capacity against chromosomal abnormalities caused by glyphosate, as well as 80% protection, in the *D. melanogaster* test in the three tested concentrations, from the locomotor deficit caused by Paraquat®. The leaves and roots of *C. nutans* showed promising results, leading the way for the possible development of natural antioxidants after more specific investigations, elucidating the mechanisms of action of the extracts and elucidating the reduction of dysfunctional factors involved in the neurodegeneration process.

Keywords: *Allium cepa*; *Artemia salina*; Asteraceae; phenolic compounds; *Drosophila melanogaster*; oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

Figura 1 - Planta de <i>Chaptalia nutans</i> . A: folha pilosa no dorso clipsela C: vista geral da espécie; B: flores reunidas em capítulos; D: inflorescência.....	23
Figura 2 - Estrutura química da 7-O-β-D-glucopiranosilnutanocumarina.....	24
Figura 3: Formas radicalar (1) e não radicalar (2).....	29
Figura 4: Reação do FRAP: redução do complexo férrico-tripiridiltriazina ([Fe(III)(TPTZ) ₂] ³⁺) em complexo ferroso ([Fe(II)(TPTZ) ₂] ²⁺) em meio ácido.....	29
Figura 5: Reação entre o ácido 2-tiobarbitúrico e o malondialdeído, formando um composto colorido, medido espectrofotometricamente.....	30
Figura 6: Reação entre a proteína carbonilada e a 2,4-dinitrofenilidrazina (DNPH).....	30
Figura 7: O DCFH-DA é hidrolisado por esterases intracelulares em DCFH e oxidado por EROs na molécula altamente fluorescente DCF.....	31
Figura 8: Estágio do desenvolvimento do microcurstáceo <i>Artemia salina</i> . A: cistos; B: ambiente para eclosão dos cistos com aeração constante, fotoperíodo e temperatura controlada. C: náupilos (fase larval); D: <i>Artemia</i> adulta.....	33
Figura 9: Sistema teste <i>Allium cepa</i> . A: raízes das cebolas em pleno crescimento; B: Bulbos com as raízes em contato com o extrato bruto de <i>C. nutans</i>	35
Figura 10: Imagem ilustrativa da espécie <i>D. melanogaster</i> , demonstrando a morfologia da fêmea e do macho.....	37

Artigo

Figure 1: Evaluation of the antioxidant activity of the crude extract of <i>C. nutans</i> leaves by lipoperoxidation assay (TBARS) (A), Carbonyl protein levels (B), - Chemical deacetylation of DFCH-DA compound (C). Different letters represent statistical differences according to Tukey test (<0.001).	47
Figure 2: NC: Negative Control (buffer solution); PC: Positive Control (FS=Ferrous sulfate) (FS 13.9 µg/mL); Extract control (EC1: Extract Control 10 µg/mL; EC2: Extract Control 100 µg/mL; EC3: Extract Control 1000 µg/mL); Treatment (T1: FS 13.9 µg/mL+ extract 10 µg/mL; T2: FS 13.9 µg/mL + extract 100 µg/mL; T3: FS 13.9 µg/mL + extract 1000 µg/mL). Different letters represent statistical differences according to Tukey test (<0.001).	47
Figure 3: A- Mitotic Index (MI) and B- Percentage of Abnormalities (AN) for <i>C. nutans</i> leaf obtained in the <i>Allium cepa</i> assay. Different letters represent statistical differences according to Tukey test (<0.001).	48
Figure 4: LC ₅₀ (24,83 mg/mL) of the hydromethanolic <i>C.nutans</i> extract leaf response among adult <i>Drosophila melanogaster</i> exposed to PQ in the feed. The results expressed in percentage of survivor flies presented, correspond to the concentrations of the 15, 20, 25, 30, e 35mg/mL. The test was effected quadruplicate. R ² = 0,8997.	48

Figure 5: PQ poisoning control trial represented by mortality (number of dead individuals) per group. NC: Negative Control (1% sucrose); EC: Extract Control (10 mg/mL extract leaf); PC: Positive Control (3 mM PQ); Treatment: (T1 = 3 mM PQ + 1 mg/mL extract; T2 = 3mM PQ + 5 mg/mL extract; T3 = 3 mM PQ + 10 mg/mL extract). Different letters represent statistical differences according to Tukey's test ($p < 0.0001$)..... 48

Figure 6: Effect of *C.nutans* extract on negative geotaxis (10 flies per replicate) in flies exposed to paraquat for 4 days ($n = 3$). NC: Negative Control (1% sucrose); EC: Extract Control (10 mg/mL extract leaf); PC: Positive Control (3 mM PQ); Treatment: (T1 = 3 mM PQ + 1 mg/mL extract; T2 = 3 mM PQ + 5 mg/mL extract; T3 = 3 mM PQ + 10 mg/mL extract). Different letters represent statistical differences according to Tukey's test ($p < 0.0001$). 49

LISTA DE TABELAS

Artigo

Table 1: Compounds identified in extracts of <i>Chaptalia nutans</i> by HPLC-DAD-MS.....	46
Table 2: A- Polyphenols, flavonoids and condensed tannins contents. B- IC ₅₀ results (DPPH) ($\mu\text{g/mL} \pm \text{SD}$). Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay ($\mu\text{M FeSO}_4/\text{mg}$ sample). Results for crude extract (CE) of <i>C. nutans</i> leaf.	46
Table 3 – Results of antimicrobial activity for hexane fraction of <i>C. nutans</i> leaf.	47
Table 4: Lethal concentration for 50% of <i>Artemia salina nauplii</i> (LC ₅₀) and confidence Interval obtained for <i>C. nutans</i> leaf and the positive control.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SUS – Sistema Único de Saúde

RENAPLAM - Relação Nacional de Plantas Medicinais

RENAFITO – Relação Nacional de Fitoterápicos

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CL₅₀ - Concentração Letal de 50%

PQ - Paraquat®

OMS - Organização Mundial da Saúde

ERO - Espécies Reativas de Oxigênio

ERN - Espécies Reativas de Nitrogênio

OH[•] - Radical hidroxila

O₂^{•-} - Ânion superóxido

ROO[•] - Radical peroxila

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

NO[•] - Óxido nítrico

N₂O₃ - Óxido nitroso

HNO₂ - Ácido nitroso

NO₂⁻ - Nitritos

NO₃⁻ - Nitratos

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

FRAP - Poder antioxidante de redução do ferro

TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

MDA – Malondialdeído

TBA - Ácido tiobarbitúrico

DNPH - 2,4-dinitrofenilidrazina

TCA - Ácido tricloroacético

nm – nanômetro

DCFH – DA - Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína

DCF - 2',7'-diclorofluoresceína

PISQ - Programa Internacional de Segurança Química

UNEP - Programa Ambiental das Nações Unidas

µg/mL – Microgramas por mililitros

g/mL – Gramas por mililitros

HPLC-DAD-MS - Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos acoplada a um detector de espectrometria de massa

ABS – Absorbância

IC₅₀ – Concentração inibitória

UV-VIS - Espectrometria de Ultravioleta-Visível

mmol/L – Nanomol por litro

HCl – Ácido clorídrico

µM – Micromol

IM – Índice mitótico

AN – Anormalidades

FS – Sulfato ferroso

EC – Controle negativo

PC – Controle positivo

ROS – Espécies reativas ao oxigênio

CE – Extrato bruto

H₂O – Água

SD – Desvio padrão

ND – Não detectado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
2.1 Uso de plantas medicinais.....	20
2.2 Família Asteraceae.....	21
2.3 Gênero <i>Chaptalia</i>	22
2.4 Espécie <i>Chaptalia nutans</i> (L.) Polack.....	22
2.4.1 Composição química e atividade farmacológica.....	24
2.5 O metabolismo secundário vegetal e sua importância para a fitoterapia...	24
2.6 A busca por compostos com atividade antimicrobiana.....	25
2.7 Atividade antioxidante.....	27
2.8 Toxicidade de compostos naturais.....	31
2.8.1 Detecção de toxicidade utilizando o bioensaio <i>Artemia salina</i>	32
2.8.2 Sistema teste <i>Allium cepa</i>	34
2.8.3 <i>Drosophila melanogaster</i> como organismo modelo.....	36
3 OBJETIVOS.....	39
3.1 Objetivo geral.....	39
3.2 Objetivos específicos.....	39
4 ARTIGO CIENTÍFICO I.....	40
5 ARTIGO CIENTÍFICO II.....	56
6 DISCUSSÃO GERAL.....	59
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	64
REFERÊNCIAS.....	66

APRESENTAÇÃO

A presente Tese foi elaborada com INTRODUÇÃO, REVISÃO DE LITERATURA, OBJETIVOS, DISCUSSÃO GERAL, CONSIDERAÇÕES FINAIS (na qual estão inseridas as principais conclusões da pesquisa) e as REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS correspondentes a estes itens as quais se encontram no final do trabalho. As seções MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO e CONCLUSÕES estão apresentadas sob a forma de dois artigos científicos que estão formatados de acordo com as normas dos periódicos os quais foram publicados.

1 INTRODUÇÃO

A utilização das plantas medicinais, para tratamentos de doenças, é uma prática milenar, sendo encontrada ao longo da história em todas as populações mundiais e em diferentes grupos étnicos conhecidos. Este conhecimento empírico advém do sistema de defesa das plantas, o qual gera inúmeros compostos com estruturas moleculares diversificadas, muito superiores daqueles derivados de produtos sintéticos (PRADDEPA *et al.*, 2014). A partir do uso popular foram encontrados diversos medicamentos utilizados na medicina tradicional, constituindo-se um importante recurso para a descoberta de novos fármacos (BARNES *et al.*, 2012).

No Brasil, a população tem um importante conhecimento etnobotânico e etnofarmacológico decorrente dos colonizadores e escravos vindos do oriente somados ao conhecimento indígena local (FERREIRA, 2002). Tais observações populares em relação ao uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das propriedades terapêuticas dos vegetais, principalmente em virtude dos efeitos medicinais que produzem (MACIEL *et al.*, 2002).

Devido a grande utilização de plantas medicinais e medicamentos a base de plantas pela população, o Ministério da saúde tem criado políticas para o uso de fitoterápicos, como por exemplo, o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2008), além da RENAPLAM - Relação Nacional de Plantas Medicinais e da RENAFITO – Relação Nacional de Fitoterápicos (BRASIL, 2010). Essas iniciativas objetivam resgatar o saber popular, valorizar a biodiversidade e propor uma terapêutica complementar no Sistema Único de Saúde (SUS) (SANTOS *et al.*, 2011). No entanto, a garantia do uso seguro e eficaz de plantas medicinais pelo SUS envolve inúmeras etapas tecnológicas indispensáveis para alcançar um padrão de qualidade necessário para uma formulação medicamentosa. Entre elas, se destacam as análises fitoquímicas, de controle de qualidade, bem como ensaios pré-clínicos e clínicos (MOREIRA *et al.*, 2010).

A família Asteraceae é amplamente conhecida pelas propriedades terapêuticas, cosméticas, aromáticas e alimentícias, sendo a maior família em número de espécies, possuindo cerca de 1500 gêneros e 25.000 espécies (SOUZA e LORENZI, 2012). Inúmeras espécies da família Asteraceae, principalmente do gênero *Chaptalia*, são utilizadas empiricamente para fins medicinais (LORENZI e MATOS, 2002; EMPINOTTI e DUARTE, 2006). Poucas espécies desse gênero vêm sendo estudadas farmacologicamente e têm

apresentado propriedades fitoterápicas (BADILLA *et al.*, 2000; EMPINOTTI e DUARTE, 2006; SOUZA *et al.*, 2004). Dentre estas espécies destaca-se a *Chaptalia nutans*, popularmente conhecida como língua-de-vaca ou arnica-do-campo a qual na medicina popular é indicada para o tratamento de traumatismos, ferimentos, nevralgias, anemias e hemorragias (CABRERA e KLEIN, 1973; BRÜNNING, 2000). Ensaio farmacológico foram conduzidos com folhas de *C. nutans*, a fim de justificar os efeitos que lhe são atribuídos, e foram comprovadas as atividades antiinflamatória, colinérgica e antimicrobiana (BADILLA *et al.*, 2000; SOUZA *et al.*, 2004). Do extrato bruto das raízes, foi isolada uma cumarina, 7-O- β -D-glucopiranosilnutanocumarina, com atividade antibacteriana (TRUITI e SARRAGIOTO, 1998; TRUIT *et al.*, 2003). Segundo os mesmos autores o uso popular em ferimentos contaminados e a cura deles, advêm deste composto.

Embora estes relatos validem o seu uso tradicional, até o momento poucos estudos evidenciam sua composição fitoquímica e nenhum estudo relata sua atividade antioxidante e citotóxica, tornando-se assim, importante novas investigações sobre a espécie. Já que, o interesse na demanda por mais drogas derivadas de plantas, que às vezes são consideradas seguras quando comparadas a fármacos sintéticos, está aumentando gradativamente (OSAFO *et al.*, 2017) e a falta de conhecimento por parte da população sobre possíveis efeitos secundários e tóxicos de diversas plantas pode levar a graves consequências. Além disso, *C. nutans* encontra-se na lista de plantas mais utilizadas pela população do Rio Grande do Sul e das plantas prioritárias para estudos e pesquisas com o financiamento do SUS, pelo fato da mesma não constar na lista das plantas mais estudadas (RIO GRANDE DO SUL, 2017).

Neste sentido, o objetivo deste trabalho visou avaliar a constituição química do extrato das folhas e raízes de *C. nutans*, bem como verificar a atividade antioxidante em diferentes métodos, antimicrobiana e a toxicidade dos extratos utilizando modelos alternativos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Uso de plantas medicinais

Ao longo de toda história da humanidade as plantas são usadas para combater enfermidades e doenças. Desde os primórdios as civilizações perceberam que algumas plantas poderiam auxiliar no combate as doenças e revelaram empiricamente seu poder curativo. Assim, o uso das plantas foi o primeiro recurso farmacológico a ser utilizado pela humanidade. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 80% da população mundial recorrem às plantas medicinais para atender suas necessidades básicas de saúde, uma vez que seu acesso é mais fácil e menos oneroso (WHO, 2011). A utilização de plantas medicinais por grande parte da população se dá em virtude de os medicamentos sintéticos apresentarem elevado custo, tornando-se menos acessível e por serem mais agressivos ao organismo (NÓBREGA *et al.*, 2017).

O Brasil é um dos países que abriga a maior biodiversidade do mundo com estimativas de cerca de 20% do número total de espécies do planeta (CALIXTO, 2003). Com a diversidade da sua flora, detentor da maior floresta equatorial e tropical úmida e de outros biomas únicos no planeta, é de grande relevância o estudo de produtos naturais no território brasileiro. Além de existir uma rica diversidade étnica e cultural, fruto da miscigenação resultante da colonização do País, a riqueza de plantas medicinais nos biomas brasileiros é muito grande (ALMEIDA *et al.*, 2017). No início da colonização, os portugueses diante da falta de produtos medicinais trazido da Europa, viram a necessidade de buscar as plantas medicinais conhecidas da colônia. Detentores do conhecimento a cerca da utilização de plantas, os povos indígenas e os escravos africanos auxiliaram os portugueses na utilização de plantas nativas para fins terapêuticos. Com a chegada dos imigrantes orientais, no início do século XX, houve um enriquecimento do uso de plantas medicinais pela população brasileira, a qual vem sendo transmitida entre sucessivas gerações e que culminou em uma cultura popular sobre plantas medicinais que se mantém presente nas diversas regiões e comunidades brasileiras (CERON *et al.*, 2016).

No Rio Grande do Sul o uso e o conhecimento das plantas medicinais resultam da sua grande diversidade cultural. O conhecimento indígena e a procura dos colonizadores europeus e africanos por plantas medicinais análogas àquelas conhecidas em seus países foram sendo acumulados como resultado da interação das pessoas, com base no saber popular, com a biodiversidade local. Desta forma proporcionando subsídios para um maior conhecimento da flora medicinal regional, visto que o estado do Rio Grande do Sul contempla dois grandes

biomas, sendo o Bioma Pampa correspondente à metade sul do estado com extensão territorial de cerca de 17,64 milhões de hectares, representando cerca de 63% de toda a área do estado e 2% do território nacional (OVERBECK *et al.*, 2009). Apesar dos avanços tecnológicos, da grande diversidade da flora e do incentivo aos estudos do Bioma Pampa, o conhecimento minucioso sobre a etnobotânica na região ainda são escassos.

2.2 Família Asteraceae

A família Asteraceae apresenta uma distribuição cosmopolita e está presente em todos os continentes, podendo ser encontrada principalmente nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas, com exceção da Antártida (FUNK *et al.*, 2009). É considerada como a família de maior importância entre as fanerógamas, representando dez por cento do total da flora de angiospermas (JUDD *et al.*, 2009). Constitui a maior família em número de espécies, possuindo em torno de 25.000, reunidas em 1.500 gêneros, ocorrendo no Brasil cerca de 2.000 espécies e 278 gêneros distribuídos em todo o território nacional sendo que destas, cerca de 1.310 spp. e 76 gêneros, são endêmicos de nossa flora, ou seja, restritas a determinadas regiões ou localidades do Brasil (SOUZA e LORENZI, 2012; NAKAJIMA *et al.*, 2015).

Esta família é caracterizada por ervas, arbustos, subarbustos, de ciclo anuais, bianuais ou perenes, raramente arbórea, geralmente terrestres, raro epífitas e aquáticas (ROQUE, 2008). A maioria das espécies apresenta grande diversidade, não apenas quanto ao hábitat e forma de vida, mas principalmente pelos métodos de polinização e de dispersão das sementes (CRONQUIST, 1981). Plantas dessa família podem ser encontradas nos mais diversos ecossistemas e variações climáticas, desde regiões tropicais, subtropicais até temperadas, devido a sua capacidade de adaptação ambiental (CANCELLI *et al.*, 2007), ocorrendo praticamente em todos os biomas brasileiros (NAKAJIMA *et al.*, 2015).

Cronquist (1988) sugeriu que o sucesso evolutivo desta família possa ser atribuído em parte ao desenvolvimento de um sistema químico de defesa que inclui a produção combinada de metabólitos secundários derivados dos tipos poliacetilenos, lactonas sesquiterpênicas, carboidratos como os oligossacarídeos, alcaloides, terpenoides, flavonoides, além de ácidos fenólicos, benzofuranos e cumarinas (EMERENCIANO *et al.*, 2001). Lactonas sesquiterpênicas constituintes característicos de óleos essenciais e resinas de Asteraceae (SPRING, 2000) são um dos produtos naturais responsáveis pelas atividades anti-inflamatória, analgésica, antimicrobiana e antitumoral de uma variedade de plantas

medicinais, sendo essas ações investigada e comprovada por meio de ensaios farmacológicos (LORENZI e MATOS, 2002; SIEDLE *et al.*, 2003). Talvez essas características sejam a principal responsável pela importância econômica da família na medicina tradicional. Por isso, são muito estudadas quanto a sua composição química e atividade biológica, sendo alguns dos seus compostos utilizados na produção de fármacos, inseticidas, entre outros (VERDI *et al.*, 2005). Além dos propósitos medicinais, várias espécies são utilizadas como produtos alimentícios, na produção cosmética ou, ainda, como plantas ornamentais (ROQUE, 2008).

2.3 Gênero *Chaptalia*

O gênero *Chaptalia* é o maior do Complexo-*Gerbera* compreendendo cerca de 70 espécies, distribuídas desde o norte dos Estados Unidos até o centro da Argentina, sendo que 17 espécies ocorrem no Brasil, um gênero estritamente americano (BURKART, 1944; MONGE e ROQUE 2012; PASINI e RITTER, 2012).

No Brasil as espécies deste gênero distribuem-se em todos os Biomas, entretanto com maior distribuição nas Regiões Sul e Sudeste. O gênero ocorre em todo o estado do Rio Grande do Sul, principalmente nas diferentes fisionomias campestres e florestais do Bioma Pampa e nos campos do Planalto e florestas com araucária pertencentes ao Bioma Mata Atlântica (PASINI *et al.*, 2014).

É reconhecido por tratar-se de plantas com porte herbáceo, de ciclo perene com folhas rosuladas e capítulos heteromorfos, solitários no extremo de escapos relativamente compridos. As flores são femininas ou masculinas como também podem ser hermafroditas, de cor branca ou rosada (CABRERA e KLEIN, 1973; MONGE e ROQUE 2012; PASINI *et al.*, 2014).

2.4 Espécie *Chaptalia nutans* (L.) Polack

Chaptalia nutans (L.) Polack é uma erva perene que floresce nos meses de julho a março, cujo caule muito reduzido apresenta folhas sésseis, papiráceas, liras, rosuladas e pilosas no dorso, longos escapos delgados de até 79 cm de comprimento (Figura 1), que sustentam as inflorescências (CABRERA e KLEIN, 1973; CORRÊA, 1984; PASINI *et al.*, 2014). Distribui-se amplamente em toda a América tropical, desde o sul dos Estados Unidos até a região do Rio de La Plata na Argentina e Uruguai, não ocorrendo no Chile (BURKART, 1944; CABRERA e KLEIN, 1973; NESOM 1995).



Figura 1 - Planta de *Chaptalia nutans*. A: folha pilosa no dorso clípsela C: vista geral da espécie; B: flores reunidas em capítulos; D: inflorescência.

Fonte: <https://sites.google.com/site/biodiversidadecatarinense/plantae/magnoliophyta/asteraceae/chaptalia-nutans-lingua-de-vaca>

A espécie distribui-se amplamente em todas as regiões fisiográficas do Rio Grande do Sul, podendo ser encontrada em vegetação campestre de solos secos ou rochosos, bordas e interior de matas em solos úmidos e sombreados, áreas com intensa influência antrópica. Ocorre nos mais variados habitats como beira de caminhos, barrancos das estradas, caminho das matas, gramados, roças abandonadas, capoeiras, campos e submatas abertas e alteradas pelo homem, pelo gado ou pelas tempestades (CABRERA e KLEIN, 1973). Trata-se da espécie mais conhecida e coletada do gênero no estado, apresentando ampla gama de registros nos herbários visitados (PASINI *et al.*, 2014).

Popularmente a espécie é conhecida por língua-de-vaca, costa-branca e arnica-do-campo, este último por apresentar as mesmas utilidades etnobotânicas que a arnica-verdadeira *Arnica montana* L. (CABRERA e KLEIN 1973; EMPINOTTI e DUARTE, 2006). Pela mesma razão, outras espécies de Asteraceae recebem denominações semelhantes, a exemplo de *Solidago microglossa* DC., conhecida como arnica-silvestre, cujas folhas e sumidades floridas são empregadas para os mesmos fins (EMPINOTTI e DUARTE, 2006).

Na medicina popular as folhas de *C. nutans* são utilizadas, aquecidas sobre contusões, traumatismos, ferimentos, hemorragias ou sobre as têmporas a fim de aliviar dores de cabeça e enxaqueca. A infusão das folhas e raízes é utilizada internamente para febres, problemas pulmonares, doenças de pele e sífilis (CABRERA e KLEIN 1973; PASINI *et al.*, 2014).

2.4.1 Composição química e atividade farmacológica

Ensaio farmacológicos foram conduzidos com as folhas e raízes de *C. nutans*, a fim de justificar os efeitos que lhe são atribuídos, tendo sido comprovadas as atividades anti-inflamatória, colinérgica (BADILLA *et al.*, 2000) e antimicrobiana (TRUTTI *et al.*, 2003; SOUZA *et al.* 2004). Apenas um único ensaio de toxicidade foi descrito para as folhas de *C. nuntans* sendo estas consideradas fortemente cianogênica (FIKENSCHER-HEGNAUER,1977). Investigações químicas anteriores relataram o isolamento e identificação de prunasina, ácido parasórbico, 5-metil-3 α -hidroxivalerolactona e 4-O- β -gluco-piranosil-5-metilcoumarina a partir das partes aéreas (FIKENSCHER-HEGNAUER, 1977; HEINRICH, 1991) e de 7-O- β -D-glucopiranosilnutanocumarina (Figura 2) nas raízes de *C. nutans* (TRUTTI e SARRAGIOTTO, 1998). A atividade antimicrobiana pode estar relacionada à presença de 7-O- β -D-glucopiranosilnutanocumarina, que demonstrou ação inibitória contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* (TRUTTI *et al.*, 2003).

Pelo fato de existirem poucos estudos sobre *C. nuntans* e a mesma constar na lista de plantas mais utilizadas pela população do Rio Grande do Sul e das plantas prioritárias para estudos e pesquisas com o financiamento do SUS, torna-se importante maiores investigações sobre a espécie, ainda mais pelo fato da mesma não constar na lista das plantas mais estudadas no estado (RIO GRANDE DO SUL, 2017).

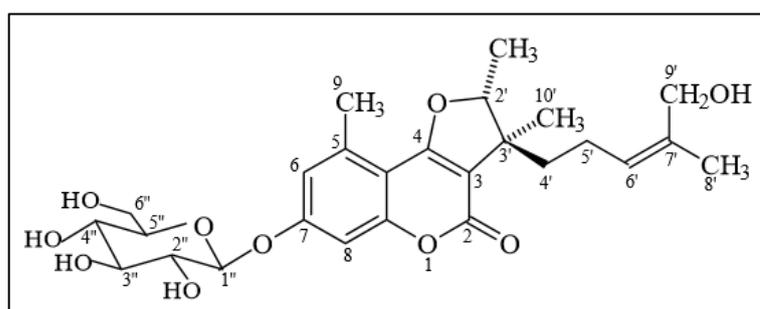


Figura 2 - Estrutura química da 7-O- β -D-glucopiranosilnutanocumarina. Fonte: Trutti e Sarragiotto (1998).

2.5 O metabolismo secundário vegetal e sua importância para a fitoterapia

O metabolismo vegetal é dividido didaticamente em metabolismo primário e secundário, no primário ocorre à produção de lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, que são comuns a todos os seres vivos e essenciais para a manutenção das células. No metabolismo secundário há a produção de substâncias não essenciais, porém com grande

utilidade para a planta por serem responsáveis pela sua sobrevivência e adaptação aos diversos habitats (OLIVEIRA *et al.*, 2011; YUNES e CECHINEL FILHO, 2012).

As substâncias produzidas pelo metabolismo secundário dos vegetais apresentam um importante papel ecológico, pois produzem atrativos voláteis que são responsáveis pela atração de animais polinizadores e dispersores de sementes, substâncias tóxicas que atuam na defesa contra agentes patogênicos, substâncias que dão coloração para atrair ou repelir certas espécies de animais, como também compostos responsáveis pela defesa do vegetal contra estresse ambiental (DEWICK, 2002; FILHO, 2010). A interação desses metabólitos secundários desperta o interesse de pesquisadores de diversas áreas da ciência, como a farmacêutica, alimentar e agrônômica entre outras, que veem neles uma fonte promissora de novas moléculas bioativas (CUNHA, 2010).

As principais classes de compostos derivados do metabolismo secundário das plantas são os polifenóis, os taninos, os flavonoides, os alcaloides, as cumarinas, as antraquinonas, os óleos essenciais e as saponinas (SIMÕES *et al.*, 2010). Esses metabólitos variam de acordo com a espécie vegetal, alguns sendo restrito à determinada família, gênero ou espécie, possibilitando o emprego como marcador taxonômico (BENETT e WALLSGROVE, 1994).

Estudos químicos são necessários para a identificação da presença de diferentes classes dos metabólitos secundários. A análise fitoquímica preliminar ou *screening* fitoquímico é normalmente realizado para indicar os grupos de metabólitos secundários relevantes através de ensaios qualitativos e quantitativos, que indicarão a possível presença ou ausência de classe de compostos presente na espécie vegetal utilizada na medicina popular, a fim de nortear outros estudos como isolamento de tais compostos, atividade farmacológica, biológica, como também a toxicidade dos mesmos (COSTA, 2002; SIMÕES *et al.*, 2010). Portanto, o estudo fitoquímico de plantas medicinais de uso popular ou tradicional é de grande importância, pois fornece embasamento para estudos de fitoterápicos que venham a ser produzidos através das plantas, além de verificar potenciais substâncias nocivas à saúde humana e animal.

2.6 A busca por compostos com atividade antimicrobiana

Apesar do grande avanço na pesquisa científica por novos compostos com atividade antimicrobiana, as doenças infecciosas continuam sendo a principal causa de morbidade e mortalidade no mundo todo. Uma explicação para este fato é a capacidade que os microorganismos possuem para a aquisição de resistência aos antimicrobianos (MADDILA e

HEMALATHA, 2017). Geralmente bactérias, fungos e vírus têm uma grande capacidade genética de adquirir e de transmitir resistência aos fármacos utilizados como agentes terapêuticos (MEHRGANA *et al.*, 2008; MADDILA e HEMALATHA, 2017). Uma das explicações para esta resistência é o uso indiscriminado, sem orientação médica ou farmacêutica, de antibióticos pela população.

A necessidade permanente de pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos a serem utilizados no combate e/ou controle dos micro-organismos levam à busca de novos compostos antimicrobianos. Assim, as plantas surgem como alternativa terapêutica promissora para inúmeras doenças, uma vez que apresentam grande diversidade de compostos biologicamente ativos, muito superiores àqueles derivados de sínteses químicas, além disso, moléculas bioativas isoladas dos produtos naturais servem de modelo para a síntese de compostos (NOVAIS *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2006). Devido a este fato, ultimamente muitos trabalhos têm sido realizados em busca de novas espécies vegetais com atividade antimicrobiana.

As espécies vegetais apresentam atividades antimicrobianas devido às propriedades apresentadas pelos compostos sintetizados no metabolismo secundário. Estes compostos são produzidos pelos vegetais como forma de defesa contra o ataque de herbívoros, fungos, insetos, parasitas, bactérias e vírus (YUNES e CALIXTO, 2001). Em resposta a estas infecções microbianas as plantas sintetizam compostos como flavonoides, alcaloides, ácidos fenólicos, terpenos, taninos e cumarinas, os quais representam os principais grupos de compostos extraídos de plantas com propriedades antimicrobianas descritas na literatura (AIRES *et al.*, 2016; JANOVIK *et al.*, 2009; KUPSKA, *et al.*, 2014; PENG *et al.*, 2008).

A resistência microbiana aos fármacos utilizados atualmente se tornou um problema crescente de saúde pública (MADDILA e HEMALATHA, 2017). De acordo os autores, a indústria farmacêutica e as novas empresas de biotecnologia estão intensificando esforços para descobrir novos compostos bioativos na tentativa de superar este problema. Substâncias obtidas de espécies nativas do Brasil, que apresentem atividade antimicrobiana e baixa toxicidade, podem vir a ser uma alternativa viável para a obtenção de antibióticos naturais, com baixo custo e de fácil acesso para população carente da região onde estas espécies habitam (COSTA *et al.*, 2005), além disso deve-se intensificar o estudo na caracterização farmacológica e toxicológica de tais espécies, para o desenvolvimento de moléculas sintéticas apropriadas para a produção de antimicrobianos específicos.

2.7 Atividade antioxidante

Radical livre é todo átomo ou molécula que possui um elétron não pareado em sua camada mais externa, tornando-se desta forma uma substância instável, altamente reativa e de meia vida curta (PEREIRA e CARDOSO, 2012). Por serem estruturas altamente instáveis e reativas, tendem a se ligar a outras moléculas para tornarem-se estáveis, e assim atuarem como mediadores nas reações químicas de transferência de elétrons (KRISHNAMURTHY *et al.*, 2012). O sistema de transferência de elétrons é um processo químico importante para a sobrevivência celular, uma vez que, constitui um processo contínuo e fisiológico necessário para funções de defesa contra microrganismos, sinalização e regulação de crescimento celular, produção de energia e síntese de substâncias biológicas importantes (VALKO *et al.*, 2007). Esses radicais livres cujo elétron encontra-se centrado nos átomos de oxigênio são denominado de espécies reativas de oxigênio (ERO) e centrado nos átomos de nitrogênio denomina-se de espécies reativas de nitrogênio (ERN). As EROs inclui o radical hidroxila (OH^\bullet), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), radical peroxila (ROO^\bullet) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e as ERNs inclui o óxido nítrico (NO^\bullet), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2), nitratos (NO_3^-) (PEREIRA e CARDOSO, 2012, VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Os radicais livres são produzidos continuamente durante os processos metabólicos celulares, os quais ocorrem normalmente nas mitocôndrias (através da cadeia transportadora de elétrons); no citoplasma (através da produção de energia proveniente da glicose e das reações de oxi-redução do oxigênio); e nas membranas celulares (através do NADPH) (KRISHNAMURTHY *et al.*, 2012). Porém, diversas circunstâncias podem levar ao aumento destes radicais no organismo podendo ser de origem endógena (reações enzimáticas, a partir da fosforilação oxidativa na mitocôndria) ou exógena (radiação, tabagismo, poluição, drogas e dieta), entretanto, fisiologicamente, o organismo está regulado para conter os efeitos danosos dos radicais livres através de um eficiente sistema antioxidante (PHAM-HUY *et al.*, 2008). Porém, sob certas condições patológicas, fatores endógenos e exógenos podem ocorrer uma superprodução de moléculas pró-oxidantes, as quais acarretarão em um desequilíbrio no sistema de defesa antioxidante do organismo, levando a um complexo sistema regulado por diversas vias de ativação enzimática, denominado estresse oxidativo (PHAM-HUY *et al.*, 2008).

O estresse oxidativo resultante do desequilíbrio entre a produção de EROs e a atividade das defesas antioxidantes, leva a uma condição celular ou fisiológica de elevada concentração dessas espécies reativas que causam danos moleculares à estrutura celular. Ao reagir com lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos estas espécies reativas, levam à

peroxidação lipídica das membranas, modificações oxidativas das proteínas e lesões no ácido desoxirribonucléico (DNA), como consequência ocorrendo a alterações funcionais e prejuízo das funções vitais em diversos tecidos ou órgão (OLSZEWER, 2008; VELLOSA *et al.*, 2007). Nos últimos anos, uma quantidade substancial de evidências tem indicado que os danos celulares causados por estresse oxidativo têm sido considerados um importante fator no envelhecimento e no desenvolvimento de uma ampla variedade de patologias, como doenças autoimunes e doenças infecciosas e/ou inflamatórias e pelas doenças degenerativas, como câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, declínio do sistema imune e doenças neurodegenerativas como Doença de Parkinson e Mal de Alzheimer (AYRES e CHAVES, 2009; ULEWICZ-MAGULSKA e WESOLOWSKI, 2019). Um dos fatores importante no processo de mutagênese e carcinogênese são os danos causados à molécula de DNA pelo estresse oxidativo (ABRAHÃO *et al.*, 2010).

O sistema de defesa antioxidante possui a capacidade de contrabalançar o estresse oxidativo, inibindo ou reduzindo os danos causados pela ação deletéria das espécies reativas. Os antioxidantes são capazes de prevenir, impedir, estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células (DNA, proteínas e lipídios) (VASCONCELOS *et al.*, 2007). Para isso, atuam como sequestradores de radicais livres, que são os causadores da iniciação ou da propagação de doenças, como também são frequentemente encontrados em excesso em casos de doenças cardíacas, arteriosclerose, alguns tipos de câncer, Alzheimer e diabetes (ATOUI *et al.*, 2005). De maneira a complementar os sistemas de defesas do organismo, produtos naturais com atividade antioxidante são importantes para atenuar o dano oxidativo. A forma mais eficaz para a complementação é a ingestão de antioxidantes naturais, oriundos de nossa dieta ou como suplementos alimentares como a vitamina C, vitamina E, carotenoides e compostos fenólicos, encontrados em frutas, legumes, verduras e também em plantas de uso medicinal ou de uso popular (BARBOSA *et al.*, 2010). Assim, ressalta-se a importância da dieta balanceada na prevenção de enfermidades, como também a procura por produtos naturais com efeito antioxidante. Somente nas duas últimas décadas, os estudos focados em compostos com atividades antioxidantes vêm apresentando um enorme crescimento (TALWAR *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2011).

Diversas são as metodologias existentes para avaliar a atividade antioxidante de substâncias biologicamente ativas. Uma delas baseia-se no sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), o qual é cromóforo, extremamente estável e que apresenta pico de absorção no comprimento de onda de 515nm. Este ensaio se baseia na medida da capacidade

antioxidante de uma determinada substância agir como doador de hidrogênio, sequestrando o radical DPPH (Figura 3) e reduzindo-o a hidrazina. Quando acontece este sequestro do radical a solução irá sofrer uma mudança de coloração de violeta para amarelo pálido (ALVES *et al.*, 2010).

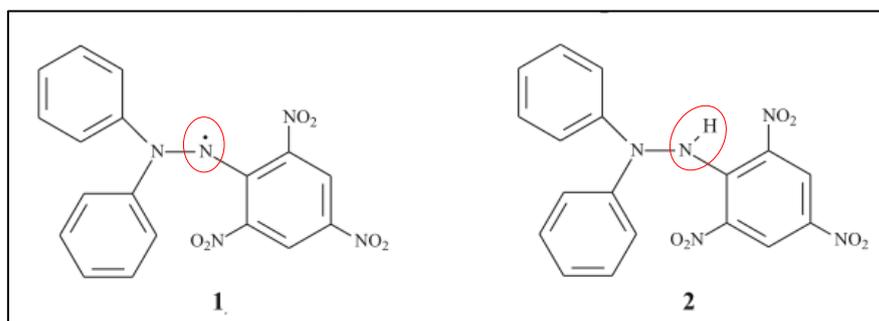


Figura 3: Formas radicalar (1) e não radicalar (2). Fonte: Alves *et al.* (2010)

Outro método utilizado é o FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) poder antioxidante de redução do ferro em fluidos biológicos e soluções aquosas de compostos puros. Neste método, mede-se a redução férrica de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) a complexo ferroso em meio ácido (Figura 4), ocorrendo mudança em sua coloração para azul escuro na presença de substâncias antioxidantes (MORGADO *et al.*, 2010).

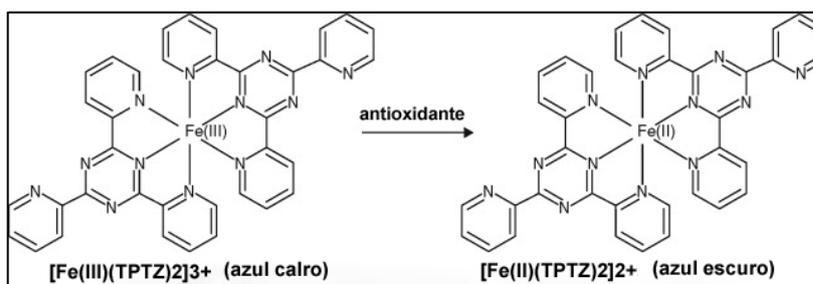


Figura 4: Reação do FRAP: redução do complexo férrico-tripiridil-triazina ($[\text{Fe}(\text{III})(\text{TPTZ})_2]^{3+}$) em complexo ferroso ($[\text{Fe}(\text{II})(\text{TPTZ})_2]^{2+}$) em meio ácido. Fonte: Nunes *et al.* (2013)

O método colorimétrico de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*), tem sido amplamente utilizado para medir os níveis de malondialdeído (MDA) produzido pelas reações de peroxidação lipídica, sob influência de um fator oxidante específico oriundo de um determinado processo patológico. Trata-se de um teste baseado na reação do ácido tiobarbitúrico (TBA) com o MDA, um dos principais produtos formados no processo oxidativo, ou seja, a formação do MDA ocorre através da decomposição de hidroperóxidos, produtos primários da oxidação lipídica. O

método consiste na medida de um cromógeno róseo formado pela reação do MDA com duas moléculas de TBA (Figura 5), o qual ocorre em meio ácido e absorve em comprimento de onda de 532-535 nm (LIMA e ABDALLA, 2001; OSAWA, *et al.*, 2005).

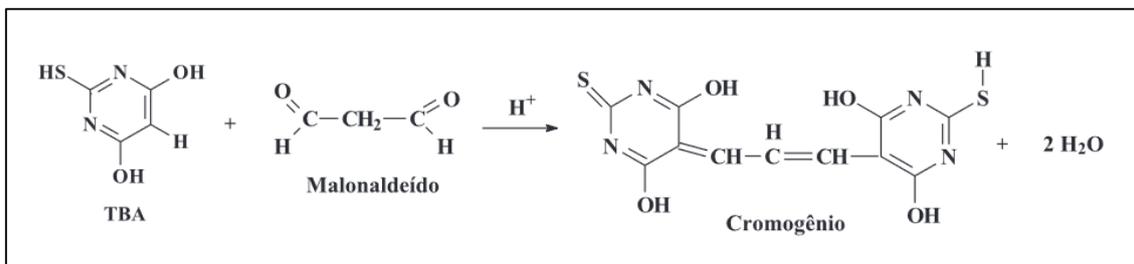


Figura 5: Reação entre o ácido 2-tiobarbitúrico e o malondialdeído, formando um composto colorido, medido espectrofotometricamente. Fonte: Osawa, *et al.* (2005).

A determinação de proteína carbonilada é um marcador de dano oxidativo proteico comumente usado para detecção de grupos carbonila, ou seja, indicador de oxidação proteica severa, tanto *in vitro* como *in vivo* (VALKO *et al.*, 2007). A oxidação de proteína por EROs leva à formação de derivados carbonílicos. Estes podem ser mensurados, baseando-se na reação com 2,4-dinitrofenilidrazina (DNPH), o qual reage com grupos carbonílicos, em meio ácido (ex: ácido tricloroacético – TCA), gerando a hidrazona (Figura 6), a qual pode ser analisada espectrofotometricamente a 370 nm (LEVINE *et al.*, 1994). A principal consequência da oxidação proteica é a geração de proteína carbonilada e possível formação de agregados proteicos resultando no acúmulo de proteínas oxidadas e consequentemente aumento de disfunção celular. O acúmulo de proteína carbonilada foi observado em várias doenças humanas, incluindo a doença de Alzheimer, diabetes, artrite e outras (VALKO *et al.*, 2007). A formação de resíduos carbonilados em proteínas pode ocorrer em resposta a produtos da lipoperoxidação lipídica ou outros mecanismos como a oxidação de aminoácidos (WONG *et al.*, 2010).

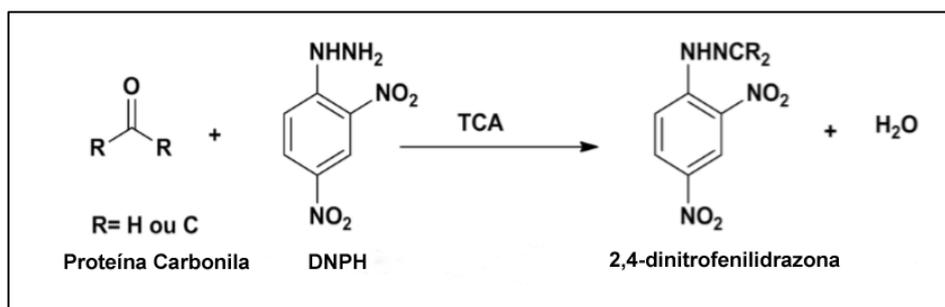


Figura 6: Reação entre a proteína carbonilada e a 2,4-dinitrofenilidrazina (DNPH). Fonte: Andrade (2017).

O DCFH-DA (diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína) é comumente usado para detecção de EROs no interior da célula. Quando adicionado às células ela se difunde através da membrana celular e é hidrolisado pela esterase intracelular para liberar a DCFH, que reage com espécies oxidantes (particularmente H_2O_2 , radical hidroxila e em menor grau O_2), formando o composto fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) (Figura 7). Assim, quanto maior for a fluorescência detectada, maior é a quantidade de EROs produzida pela célula. O princípio deste ensaio é avaliar a capacidade de compostos antioxidantes presentes no extrato vegetal, de eliminar as EROs produzidas pelo metabolismo normal pelas células e, em seguida, inibir a oxidação de DCFH a DCF, observada pela diminuição na intensidade da fluorescência (DIKALOV *et al.*, 2007; ZADRA *et al.*, 2012).

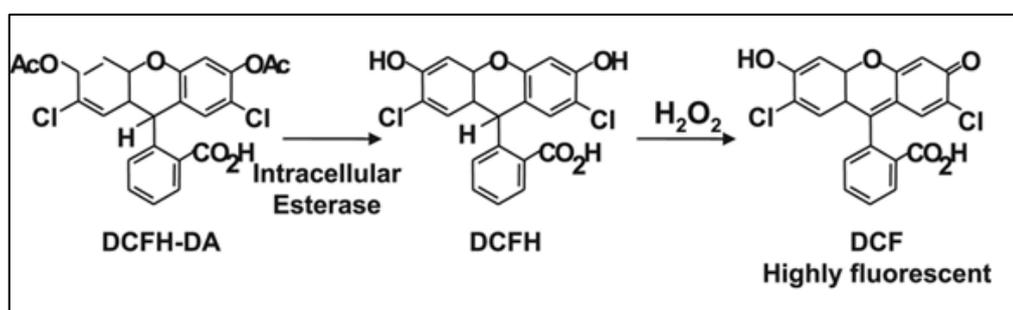


Figura 7: O DCFH-DA é hidrolisado por esterases intracelulares em DCFH e oxidado por EROs na molécula altamente fluorescente DCF. Fonte: Dikalov *et al.* (2007).

2.8 Toxicidade de compostos naturais

No Brasil, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com raríssimas comprovações de suas propriedades farmacológicas e toxicológicas. Apesar da ampla utilização de plantas para tratar ou prevenir males por parte da população, o ser humano desconhece o fato de que elas podem apresentar toxicidade tanto para o homem quanto para os animais (RODRIGUES *et al.*, 2010).

A toxicidade de plantas medicinais é problema sério de saúde pública, pois a procura pela terapia com produtos naturais aumentou significativamente, no entanto não se fornecem informações sobre possíveis efeitos colaterais ou risco toxicológico que a mesma possa apresentar. Várias pesquisas mostram que muitas plantas medicinais apresentam componentes potencialmente agressivos e o uso indiscriminado leva a riscos toxicológicos, por esta razão, devem ser utilizadas com cautela (RODRIGUES *et al.*, 2011).

Um dos fatores que leva a população a utilizar plantas tóxicas é o fato de que muitas plantas possuem o mesmo nome popular em regiões diferentes, levando o usuário a utilizar plantas que não possuem as substâncias benéficas esperadas (RITTER *et al.*, 2002). Outro fator importante é o uso indiscriminado com outros compostos sintéticos sem orientação médica, com outras plantas e até mesmo com alguns alimentos, levando ao aparecimento de diversos efeitos colaterais pelo sinergismo dos diferentes compostos. Tais efeitos adversos podem aparecer em longo prazo e de forma assintomática, podendo desencadear o desenvolvimento de patologia em diversos órgãos, como rins, fígado e até mesmo o câncer (MINCIS, 1985).

Um dos principais problemas da utilização de produtos naturais é a crença de que produtos de origem vegetal são isentos de reações adversas e efeitos tóxicos (CLARKE, 2007). Por muitas vezes, as pessoas usam plantas para tratar diversas doenças, sem conhecimento do seu potencial tóxico, o que pode ser prejudicial à saúde humana. Diante disto, a detecção da toxicidade de um extrato de planta medicinal pode alertar para que mais estudos sejam realizados com a planta, no intuito de proteger ou orientar a população que faz uso medicinal das mesmas. Assim, estudos acerca da toxicidade de plantas medicinais são importantes, a fim de definir o risco associado à fitoterapia, como também a detecção (ou não) de toxicidade em extratos vegetais poderá nortear pesquisas para o isolamento de certos compostos até ao desenvolvimento de novos fármacos.

2.8.1 Detecção de toxicidade utilizando o bioensaio *Artemia salina*

O primeiro teste toxicológico a que são submetidos os compostos de interesse é de agudo-letal, que consiste de uma análise de curta exposição (24 horas) do composto com o organismo bioindicador. Dentre os bioensaios, o organismo mais utilizado em testes de toxicidade aguda é o microcústacio *Artemia salina* Leach, pois apresenta vantagens devido à sua capacidade para formar cistos dormentes, sua praticidade de manuseio e cultivo, ser um método rápido e menos oneroso, além de ser um bioindicador capaz em uma avaliação toxicológica pré-clínica, sendo um dos testes mais utilizados em laboratórios de produtos naturais como bioensaio para o monitoramento de estudos fitoquímicos e de toxicidade de extratos vegetais (ALBUQUERQUE e AMORIN, 2008; ARAÚJO *et al.*, 2010). Este bioensaio é considerado referência por apresentar correlação com substâncias tóxicas sobre *Artemia* e as mesmas apresentarem atividade antitumoral em ensaios específicos (HARADA, 2009).

Artemia salina é um microcrustáceo filtrador não-seletivo da ordem Anostraca que vive em água salgada, alimentando-se basicamente de bactérias, algas unicelulares, pequenos protozoários e detritos dissolvidos no meio, servindo de alimento para espécies maiores, como a diversidade de peixes. Esta espécie tem a habilidade de produzir cistos dormentes que podem manter-se inativos por muito tempo e náuplios que é fase larval logo após a eclosão dos cistos (Figura 8). O fato de ser filtrador não-seletivo obrigatório torna a *A. salina* um importante modelo de estudo para o teste da toxicidade de produtos naturais como, por exemplo, extratos de plantas (SALGUEIRO *et al.*, 2016).

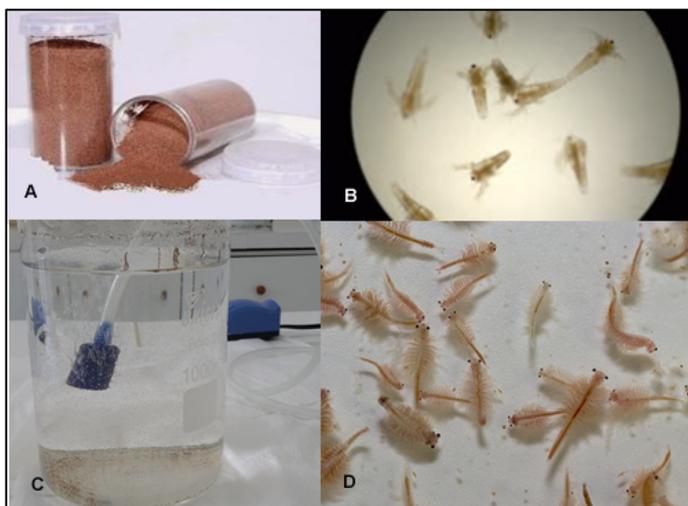


Figura 8: Estágio do desenvolvimento do microcrustáceo *Artemia salina*. A: cistos; B: ambiente para eclosão dos cistos com aeração constante, fotoperíodo e temperatura controlada. C: náuplios (fase larval); D: *Artemia* adulta. Fonte: Souza, L.B. (2018).

Uma das principais metodologias empregadas nos testes de *Artemia salina* para avaliação de extratos e frações de produtos naturais é a que foi proposta por Meyer em 1982. Esta metodologia é avaliada tanto como uma das mais citadas e usadas quanto a mais utilizada para adaptações. Neste bioensaio são definidos valores da dose letal média (DL50), em $\mu\text{g/mL}$ de compostos ou extratos, sendo que dezenas de substâncias ativas conhecidas apresentam toxicidade ao realizar este teste (MEYER *et al.*, 1982), pois existe uma relação entre a toxicidade e a concentração letal mediana (CL50) de extratos vegetais sobre a *A. salina*, sendo que, quando são encontrados valores de CL50 maiores que $1000 \mu\text{g/mL}$ e não é observada a morte de mais de 50% de uma população, estes extratos não considerados tóxicos. De acordo com NGUTA *et al.*, (2011), tanto extratos orgânicos, quanto extratos aquosos com valores de CL50 menores que $100 \mu\text{g/ml}$ apresentam alta toxicidade, CL50 entre 100 e $500 \mu\text{g/ml}$

apresentam toxicidade moderada, CL50 entre de 500 e 1000 µg/mL apresentam fraca toxicidade e CL50 acima de 1000 µg/mL são considerados atóxicos.

Ao longo de muitos anos vários laboratórios de produtos naturais utilizaram este bioensaio em suas rotinas como técnica inicial de triagem biológica, a fim de selecionar e monitorar o estudo fitoquímico de extratos de plantas na busca de substâncias bioativas ou tóxicas (AMARANTE *et al.*, 2011; ANDERSON *et al.*, 1991; COSTA *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2010; OHIKHENA *et al.*, 2016). Há na literatura diversos trabalhos que apresentam uma boa correlação entre os ensaios de toxicidade com *A. salina* e distintas atividades biológicas, tais como, anti Tripanossoma (AMARANTE *et al.*, 2011), antiparasitário (NGUTA *et al.*, 2013), antimicrobiano e antitumoral (MAYROGA *et al.*, 2010; NAYEEM *et al.*, 2011; NURTJAHJA *et al.*, 2013; PAULA *et al.*, 2014) e atividade antioxidante (COSTA *et al.*, 2020; MERINO *et al.*, 2015; SALGUEIRO *et al.*, 2016).

2.8.2 Sistema teste *Allium cepa*

Além da toxicidade, muitas substâncias presentes na composição química dos metabólitos secundários de plantas podem ser genotóxicos, mutagênicos e até carcinogênicos (VICENTINI *et al.*, 2001). O desequilíbrio nos processos de divisões celulares leva a uma proliferação celular desordenada e descontrolada de algumas células levando ao aparecimento de aberrações cromossômicas e mutações, favorecendo o desenvolvimento de algumas doenças, dentre elas o câncer (SOUZA, 2011).

Informações a respeito de possíveis alterações celulares que possam ocorrer a partir da presença de substâncias mutagênicas presentes nos metabólitos secundários das plantas são essenciais, pois muitas substâncias presentes na composição química dos vegetais utilizados como fitoterapia podem causar mais danos à saúde do que benefícios (FRESCURA *et al.*, 2012). Para obter tais informações, são utilizados estudos citogenéticos em núcleos eucarióticos como o sistema teste vegetal *Allium cepa* (cebola), o qual tem sido utilizado para estudos preliminares dos efeitos de extratos vegetais, servindo como primeira triagem na detecção do potencial antiproliferativo e de genotoxicidade de substâncias presentes nestes extratos (AKWU *et al.*, 2019; FRESCURA *et al.*, 2012; LIMAN *et al.*, 2018; SHARMA *et al.*, 2018).

O sistema teste *Allium cepa* é considerado um dos bioensaios mais eficientes e rotineiramente usado para determinar os efeitos tóxicos de produtos químicos, extratos de plantas, misturas complexas, entre outros (KHAN *et al.*, 2020; SABEEN *et al.*, 2019). É um

método validado como um eficiente bioteste pelo Programa Internacional de Segurança Química (PISQ, OMS) e pelo Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) por apresentar elevada sensibilidade e correspondência com testes animais (AKWU *et al.*, 2019; BAGATINI *et al.*, 2007; BONCIU *et al.*, 2018; TÜRKOĞLU, 2015).

O método consiste em deixar os bulbos (caules que acumulam energia) com as raízes, em pleno crescimento, em contato com o extrato vegetal a ser testado (Figura 9) por um período de 24h e após coletar as raízes para análise. A proliferação celular é determinada através do índice mitótico o qual é obtido a partir do número de células em prófase, metáfase, anáfase e telófase, dividido pelo número total de células observadas e as alterações cromossômicas podem ser visualizadas durante o ciclo celular através das principais anormalidades cromossômicas observadas em metáfases irregulares, micronúcleo, células binucleadas e células aderentes, quebras cromossômicas, pontes e cromossomos perdidos ou retardatários (TEDESCO e LAUGHINGHOUSE, 2012). Comumente utiliza-se como agente indutor de anormalidades cromossômicas e impedimento da divisão celular herbicidas de amplo espectro, sendo o glifosato o mais encontrado na literatura, pois comprovadamente induz alterações cromossômicas e inibe a divisão celular em células meristemática de *A. cepa* (SOUZA *et al.*, 2010).



Figura 9: Sistema teste *Allium cepa*. A: raízes das cebolas em pleno crescimento; B: Bulbos com as raízes em contato com o extrato bruto de *C. nutans*. Fonte: Souza, L. B. (2018)

O glifosato [N-(fosfometil) glicina] é um herbicida de amplo espectro, sistêmico e não seletivo que inibe o crescimento de plantas ao interferir na produção de aminoácidos aromáticos, como fenilalanina, tirosina e triptofano, o que leva a uma redução na síntese proteica (FAUS *et al.*, 2015). Faz parte dos organofosfatos, que são agentes altamente tóxicos, ligantes potentes da acetilcolinesterase (SULUKAN *et al.*, 2017). Estudos têm descoberto que vários agrotóxicos possuem propriedades genotóxica ou mutagênica os quais são fatores de risco iniciais na indução cancerígena e efeitos reprodutivos em longo prazo (ZANCANARO *et al.*, 2019). Nos últimos anos, o potencial carcinogênico do glifosato foi tema de debate por

múltiplos órgãos reguladores e autorizados. Em 2015, a Agência Internacional de Pesquisa do Câncer classificou o glifosato como um "provável agente cancerígeno humano" (MERCADO e CALEÑO, 2019).

Portanto, o sistema teste *A. cepa* é considerado um método eficiente, de alta sensibilidade e de baixo custo para análise de citotoxicidade e genotoxicidade, pois não requer instalações laboratoriais elaboradas, além de apresentar seu sistema radicular em constante divisão mitótica e possuir o número de cromossomos bem definido e reduzido ($2n=16$) com tamanho e morfologia suficiente para facilitar a visualização (KHAN *et al.*, 2020).

2.8.3 *Drosophila melanogaster* como organismo modelo

A *Drosophila melanogaster* (Drosophilidae) é uma espécie de mosca, conhecida popularmente como mosca das frutas. Apresenta tamanho entre 1 a 2 mm (figura 10), coloração acinzentada/amarelada, possui olhos vermelhos e o corpo dividido em cabeça, responsável pela percepção sensorial, tórax, onde asas e pernas estão inseridas com função locomotora, e abdômen onde se localizam as vísceras incluindo, componentes do sistema digestivo, excretor e reprodutor (APIDIANAKIS e RAHME, 2011). O ciclo de vida da *D. melanogaster*, dependendo das condições ambientais, dura em média de 25 a 40 dias passando pelos quatro estágios do ciclo: ovo, larva, pupa e mosca adulta. Cada fêmea pode colocar aproximadamente 100 ovos por dia, demorando cerca de dez dias para um embrião se desenvolver em uma mosca adulta fértil (JENNINGS, 2011).

Na última década *D. melanogaster* vem sendo utilizada como modelo para avaliação da toxicidade de extratos vegetais ou de compostos isolados, bem como de diversas substâncias (drogas, pesticidas, poluentes, entre outros), além da pesquisa toxicológica este modelo é muito utilizado em estudos de doenças humanas (MISRA *et al.*, 2011), principalmente como modelo experimental no estudo de diversas doenças neurodegenerativas, pelo fato de ter seu genoma sequenciado com 4 pares de cromossomos que podem ser geneticamente manipulados (KIM *et al.*, 2011) e conter 77% dos *locus* relacionados com as doenças neurológicas em seres humanos e mais de 85% genes associados com déficit cognitivos (PANCHAL e TIWARI, 2017). Além disso, vem sendo utilizada como modelo biológico em diversos laboratórios de pesquisas pelo fato de apresentar tamanho reduzido, fácil dimorfismo sexual, ciclo de vida curto, elevada fecundidade, facilidade de manuseio,

com poucas exigências nutricionais e baixo custo de manutenção (SOARES *et al.*, 2017; SUDATI *et al.*, 2013).

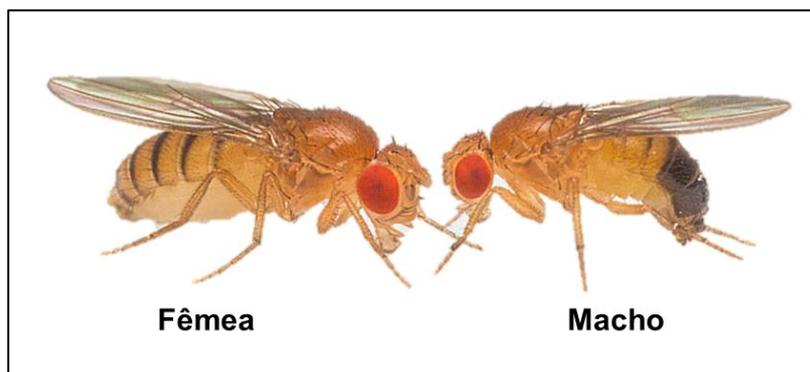


Figura 10: Imagem ilustrativa da espécie *D. melanogaster*, demonstrando a morfologia da fêmea e do macho. Fonte: Adaptado da Nature Picture Library (www.naturepl.com).

Embora estes invertebrados pareçam ser diferentes do homem, por estarem muito distantes na linha de evolução, possuem os processos celulares, muitos genes e vias de sinalização compartilhadas entre os seres humanos, além de ritmos circadianos, aprendizagem, memória e sono (BAGATINI *et al.*, 2011; PAULA *et al.*, 2012), tornando-os um ótimo modelo para estudos comportamentais, avaliação de toxicidades de extratos vegetais, neurotoxicidade e doenças neurodegenerativas.

Como agente indutor de doenças neurodegenerativas em *D. melanogaster*, utiliza-se o Paraquat®, pois é amplamente encontrado na literatura o seu uso para modelo *in vivo* de Doença de Parkinson (DP), uma vez que tem sido relatado que atravessa a barreira hematoencefálica e causa redução no número de neurônios dopaminérgicos (MICHEL *et al.*, 2016; MORETTO e COLOSIO, 2011) semelhante ao observado em pacientes com DP, além de induzir sinais de parkinsonismo em modelos experimentais, incluindo *Drosophila*, camundongos e ratos (NIVEDITHA *et al.*, 2017). O PQ por ser um composto neurotóxico de ciclo redox reproduz uma importante característica patológica de DP em *Drosophila melanogaster*, através do estresse oxidativo, causando degeneração seletiva de neurônios dopaminérgicos nas moscas (GUO *et al.*, 2018; NAVARRO *et al.* 2014).

O paraquat® (PQ) (dicloreto de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridínio) é um herbicida de contato não seletivo, que atua direta e rapidamente no tecido vegetal de uma ampla gama de espécies vegetais (LOCK e WILKS, 2001), além disso, é muito tóxico para mamíferos (SANTOS *et al.*, 2012), incluindo humanos (BERRY *et al.*, 2010; SERRA *et al.*, 2003). Estudos experimentais com o Paraquat® avaliaram seus efeitos tóxicos sobre pulmão, fígado e rins, pelo fato da toxicidade por este herbicida nesses órgãos ser a responsável pela morte

após exposição aguda. No entanto, danos significativos ao cérebro também foram observados em indivíduos que morreram de intoxicação por Paraquat® (BOVÉ *et al.*, 2005; CHAO e FANG, 2016; MORETTO e COLOSIO, 2011, SINGH e RAMASSAMY, 2012). Evidências encontradas na literatura indicam que o PQ induz danos oxidativos, possivelmente via estresse oxidativo mediado por radicais livres no cérebro (McCORMACK *et al.*, 2005), gerando excesso de radical ânion superóxido, levando à alteração de processos bioquímicos e consequentemente morte neuronal (CHOI *et al.*, 2011; KRUMOVA *et al.*, 2013).

Através da revisão da literatura foi possível observar a diversidade da flora medicinal brasileira, bem como a importância da espécie *C. nutans* para população gaúcha, pois é muito utilizada na medicina tradicional para diversas enfermidades e sintomatologia e, no entanto, foram raríssimos os trabalhos encontrados que relatam a composição química da *C. nutans* (FIKENSCHER-HEGNAUER, 1977; HEINRICH, 1991; TRUTTI e SARRAGIOTTO, 1998) e sua ação farmacológica (BADILLA *et al.*, 2000; SOUZA *et al.*, 2004; TRUITI *et al.*, 2003), não havendo relatos sobre a toxicidade da mesma, nem sua ação como antioxidante. Desta forma, tendo em vista o crescente interesse da pesquisa com plantas medicinais, especialmente aquelas espécies ainda não estudadas e a necessidade do desenvolvimento de novos agentes com potencial terapêutico para o tratamento das mais diversas doenças, motivou-se a realização deste trabalho. Assim, considerando o uso popular das folhas e raízes de *C. nutans* na região e o fato da mesma ser nativa do bioma Pampa, se faz necessário investigar a toxicidade da planta, para definir a possibilidade ou não de uso medicinal, como também é importante ser avaliado os principais compostos presentes na planta e as ações farmacológicas da mesma, principalmente o potencial antioxidante, a fim de nortear pesquisas para o isolamento de certos compostos até o desenvolvimento de novos fármacos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a toxicidade do extrato bruto das folhas e raízes de *C. nutans in vivo*, bem como elucidar a constituição fitoquímica dos extratos e o potencial antioxidante e antimicrobiano *in vitro*.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar as principais classes de metabólitos secundários presentes no extrato bruto das folhas e raízes de *C. nutans*, através das técnicas de *screening* fitoquímico e cromatográficas (HPLC-DAD-MS);
- Quantificar os polifenóis, flavonoides, e taninos condensados presentes no extrato bruto das folhas e raízes de *C. nutans*;
- Avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* do extrato bruto das folhas e raízes de *C. nutans* através dos métodos DPPH, Frap, DCFH, Proteína Carbonil e TBARS;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato bruto e frações das folhas e raízes de *C. nutans* frente a diferentes linhagens fúngicas e bacterianas;
- Verificar o potencial citotóxico do extrato bruto das folhas e raízes de *C. nutans* frente ao modelo *Artemia salina*;
- Verificar o potencial genotóxico e antiproliferativo do extrato bruto das folhas e raízes de *C. nutans* através do sistema-teste *Allim cepa*;
- Determinar a Concentração Letal de 50% (CL₅₀) do extrato bruto das folhas e raízes de *C. nutans* em *D. melanogaster* expostas durante 7 dias ao tratamento com os extratos;
- Avaliar o efeito do extrato bruto das folhas e raízes de *C. nutans* sobre a taxa de sobrevivência de *Drosophila melanogaster* expostas ao Paraquat® (PQ);
- Investigar os possíveis efeitos de proteção do extrato bruto das folhas e raízes de *C. nutans* sobre alterações motoras em *D. melanogaster* causadas pela exposição ao PQ;

4 ARTIGO CIENTÍFICO I

Os resultados desta Tese, referente às folhas de *C. nutans*, estão apresentados sob a forma de um artigo científico (<https://doi.org/10.1155/2020/3260745>), publicado no Periódico *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences* (ID 3260745), Qualis Capes B2 na área CBII. As seções Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão e Referências encontram-se no artigo a seguir.

Research Article

Phytochemical Analysis, Antioxidant Activity, Antimicrobial Activity, and Cytotoxicity of *Chaptalia nutans* Leaves

Letiele Bruck de Souza,¹ Amanda Leitão Gindri,² Thainara de Andrade Fortes,² Thais Felli Kubiça,² Jefferson Enderle,¹ Rafael Roehrs,¹ Sidnei Moura e Silva ,³ Vanusa Manfredini,⁴ and Elton Luís Gasparotto Denardin ¹

¹Laboratório Estudos Físico–Químico e Produtos Naturais (LEFQPN), Federal University of Pampa (UNIPAMPA), P. Box 118, Uruguaiana, RS 97501-970, Brazil

²Laboratório de Plantas Mediciniais, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Das Missões, Santiago, RS, Brazil

³Universidade de Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, RS, Brazil

⁴Grupo de Estudos em Estresse Oxidativo (GESTOX), Federal University of Pampa (UNIPAMPA), Uruguaiana, RS, Brazil

Correspondence should be addressed to Elton Luís Gasparotto Denardin; eltondenardin@gmail.com

Received 14 October 2019; Accepted 9 March 2020; Published 1 May 2020

Academic Editor: Srinivas Mutalik

Copyright © 2020 Letiele Bruck de Souza et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Context. *Chaptalia nutans* (L.) Pol. (family: Asteraceae) is widely used in traditional medicine as laxative and anticough medications and especially in the traumatism, wounds, and hemorrhages in topical preparations. **Objective.** This work was to evaluate the chemical constitution of the hydromethanolic (30/70 methanol-water) macerating extract obtained from the leaves of *C. nutans*, as well as to study the antioxidant, antimicrobial, cytotoxic, and genotoxic activity of the species. **Materials and methods.** Phytochemical screening, antioxidant activity (total phenolic, total flavonoid, condensed tannins content, DPPH radical, and FRAP), antibacterial activity (*P. aeruginosa*, *B. cereus*, *E. epidermidis*, *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. mirabilis*, *Candida glabrata* (clinical isolate), *Candida tropicalis* (clinical isolate), *C. krusei* (clinical isolate), and *C. albicans* (clinical isolate)), and oxidative stress parameters (TBARS, carbonyl protein, and DCFH) were analyzed according to the literature. Toxicity of *C. nutans* was evaluated using an alternative method, *D. melanogaster*, as well as a locomotor assay. **Results.** The phytochemical screening test of methanolic leaves extract revealed the presence of alkaloids, coumarins, quaternary bases, phenolics, flavonoids, tannins, and free steroids. A quantitative phytochemical study indicated the total phenol (30.17 ± 1.44 mg/g), flavonoid (21.64 ± 0.66 mg/g), and condensed tannins (9.58 ± 0.99 mg/g). DPPH (345.41 ± 5.35 µg/mL) and FRAP (379.98 ± 39.25 µM FeSO₄/mg sample) show to extract of *C. nutans* leaves an intermediate value, indicating moderate antioxidant activity of the extract. Antibacterial results revealed only a positive result (antimicrobial activity) for the hexane fraction which significantly inhibited the microorganisms *E. epidermidis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, and *C. krusei* at a concentration of 1000 µg/mL. TBARS, carbonyl protein, and DCFH demonstrate that the extract has the ability to protect the cell from protein and lipid damage, as well as the inhibition of oxygen-derived radicals at the three concentrations tested: 0.1, 1, and 10 mg/mL. Regarding the toxicity of *C. nutans* extract against *D. melanogaster*, it was found that until the concentration of 15 mg/mL, the extract showed no toxicity and that the LC₅₀ obtained was 24 mg/mL. Results show that the *C. nutans* extract leaves used to prevent PQ damage were effective in reducing flies' mortality and improving locomotor capacity. **Conclusion.** Our studies demonstrated for the first time that *C. nutans* crude leaf extract has high antioxidant capacity both in vitro and in vivo through different analysis techniques. These results make it possible to infer future applications in the pharmacological area, evidenced by the low toxicity observed in *D. melanogaster*, as well as the ability to neutralize different sources of RONS.

1. Introduction

The interest of the scientific class in the study of compounds of plant origin is increasing worldwide, especially in developing countries where the use of herbal medicines is widely used for their basic health needs [1].

It is known that medicinal plants have been used worldwide since ancient times for the treatment of various diseases, including asthma, abdominal disorders, skin diseases, respiratory and urinary complications, and liver and cardiovascular disease [2, 3]. This empirical knowledge comes from the plant defense system, which generates numerous compounds with diverse molecular structures, far superior to those derived from synthetic products [4], so the great interest in the elucidation of new active principles.

Only in the last two decades, studies focused on natural compounds with antioxidant activities have shown enormous growth, since a substantial amount of evidence has indicated that cell damage caused by oxidative stress has been considered an important factor in aging and in the development of a wide variety of pathologies, such as autoimmune diseases, infectious and/or inflammatory diseases, and degenerative and neurodegenerative diseases [5, 6]. Thus, the importance of the search for natural products with antioxidant effect is emphasized, as they are able to prevent,

stabilize, or disable free radicals before they attack biological targets in cells (DNA, proteins, and lipids) [7].

Often, people use plants to treat a variety of diseases, without knowing their toxic potential, which can be harmful to human health. One of the main problems in the use of natural products is the belief that products of plant origin are free from adverse reactions and toxic effects [8]. Thus, studies on the toxicity of medicinal plants are important, in order to define the risk associated with phytotherapy, as well as guide research for the isolation of certain compounds until the development of new drugs.

The species *Chaptalia nutans* (L.) Pol. (*C. nutans*), belonging to the family Asteraceae, known as "língua-de-vaca" or "arnica-do-campo," is an annual herbaceous species native to the Americas and can be found from Mexico to Argentina [9, 10, 11]. The species is easily distinguished by having herbaceous size, blackened roots, very small stem from which sessile, papery, lyrical, rosy, and hairy leaves emerge on the back, and long thin floral scents of up to 79 cm (length), which support the inflorescences [12, 13, 14]. The leaf has a unistratified epidermis covered by a clearly streaked cuticle and numerous trichomes on the back, these characteristics being used for taxonomic purposes and also in drug morphodiagnosis [15].

Widely used in folk medicine, its leaves are indicated internally as laxative and anticough medications, especially in the traumatism, wounds, and hemorrhages in topical preparations [12]. Pharmacological assays were conducted with leaves of *C. nutans*, in order to justify the effects attributed to them, and the anti-inflammatory, cholinergic, and antimicrobial activities were proven [16, 17]. From the crude extract of the roots of this plant, a

coumarin, 7-O- β -D-glucopyranosylnutanocoumarin, with antibacterial activity for *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* was found [18, 19]. According to the same authors, the healing of contaminated wounds comes from this compound.

Although these reports validate its folk use, to date, no studies of its phytochemical composition, antioxidant activity, and cytotoxicity have been evidenced, thus making important new investigations. Interest in the demand for more plant-derived drugs is gradually increasing, which are sometimes considered safe when compared to synthetic drugs [20].

The objective of this work was to evaluate the chemical constitution of the hydromethanolic (30/70 methanol-water) macerating extract obtained from the leaves and roots of *C. nutans*, as well as to study the antioxidant, antimicrobial, cytotoxic, and genotoxic activity of the species.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material. *C. nutans* species were collected manually from São Francisco de Assis-Rio Grande do Sul (Brazil) (Lat.: 29°33'01"S e Long. 55°07'52"W). The plant material was identified by Patricia de Oliveira Neves (Biologist), Federal University of Pampa (Campus São Gabriel), Brazil. A voucher specimen was deposited in the Herbarium of Federal University of Pampa (HBEI 203).

Leaf (18.19 g) material was dried, powered, and extracted using hydromethanolic (30/70 methanol-water) macerating (30 g/100 mL) over four weeks. After that, the crude extract was concentrated using a rotary evaporator. For antibacterial assay, the crude extract was subjected to partitioning by sequential extraction using increasing polarity solvents: hexane (Hex), chloroform (CHCl₃), ethyl acetate (EtOAc), and n-butanol (BuOH). The fractions were concentrated in a rotary evaporator.

2.2. Phytochemical Analysis. The plant extract was assessed for the existence of cyanogenic glycosides, phenols, tannins, anthocyanins, proanthocyanidins, flavonoids, catechins, steroids, triterpenoids, saponins, resins, alkaloids, and quaternary bases by the phytochemical analysis (screening) using typical standard methods [21].

2.2.1. Total Polyphenols, Flavonoids, and Condensed Tannins Assay. The total phenolic compounds in the leaf extract were determined according to the Folin-Ciocalteu method [22]. Results of total phenolic contents were expressed as milligrams of gallic acid equivalents (GAE) per mL extract.

Total flavonoid compound was measured by the aluminum chloride colorimetric assay based on the work by Woisky and Salatino [23]. Total flavonoid compound of the extract was expressed as mg quercetin equivalent/mL extract (mg QUE/mL EXT).

Condensed Tannins were determined by Morrison et al. [24]. Briefly, 0.1 mL of the leaf sample was added to aliquots (25 mg/mL) to 0.9 mL of methanol and 5.0 mL of vanillin

reagent. Then, it was heated in a water bath at 40°C for 20 minutes, and absorbance was read at 500 nm. The analysis was performed in triplicate using catechin as standard (0.0025–0.2 mg·mL⁻¹) ($Y = 0.0015x - 0.0005$, $r = 0.9968$). The results were expressed in milligram equivalents of catechin per milliliter of extract/fraction (mg CAT/mL EXT).

2.2.2. Determination of Chemical Composition by HPLC-DAD-MS. The identification and quantification of the secondary metabolites of *C. nutans* crude extract followed the methodology proposed by Vieira et al. [25], with minor modifications. High-performance liquid chromatography coupled with a mass spectrometry detector (HPLC-DAD-MS) corresponded to a Shimadzu Prominence UFLC (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with an Auto-Sampler (SIL-20AHT), two Shimadzu LC-20ADT reciprocating pumps connected to the degasser DGU20A3R, integrator CBM20A, UV-VIS detector DAD SPD-M20A, and oven CTO-20A.

The HPLC system was coupled to the compact quadrupole time-of-flight (Q-TOF) mass analyzer (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany), which was controlled using Ot of Control Software. The parameters for analysis were set using negative ion modes with spectra acquired over a large range from 50 to 1200 *m/z*. The optimum values of the ESI-MS parameters were a capillary voltage of 4500 V, drying gas temperature of 215°C, drying gas flow of 10.0 L/min, nebulizing gas pressure of 5.0 Bar, collision RF of 150 Vpp, transfer time of 70 ls, and a prepulse storage of 5 ls. Additionally, automatic MS/MS experiments were performed using nitrogen as collision gas and by adjusting the collision energy values as follows: *m/z* 100, 20 eV; *m/z* 500, 30 eV; and *m/z* 1000, 35 eV. The MS data were analyzed using Data Analysis 4.0 software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

Analyses were carried out within the C-18 column (4.6 mm × 250 mm, Merck, Germany) packed with 5 μm diameter particles and within the C-18 precolumn (RP 18 5 μm, Merck, Germany). The first mobile phase, phase A, was two percent acetic acid at a pH of 4.2. The second mobile phase, phase B, used methanol, acetic acid, and distilled water at a ratio of 18:1:1, respectively. The gradient elution was 0 min: 20% of B, 0–25 min: 50% of B, 25 min: 20% of B, and 30 min: 20% of B (end of run), at the flow rate of 0.8 mL·min⁻¹. The peaks were identified by comparing the present results with the retention times and mass spectrums from the software library and external standards. The external standards included a 40% isoflavone pool (Daidzin: 3.1%, Glycitin: 1.56%, Genistin: 0.98%, Daidzein: 35.49%, Glycitein: 0.1%, and Genistein: 0.03% - Dongming Huiren Biological Products, Shandong, China) between 0.156 and 2.34 mg/mL of glycitin, 3.5–53.2 mg/mL of daidzein, 3–4.5 μg/mL of genistein, and levels of caffeic acid, gallic acid, chlorogenic acid, catequin, luteolin, cumarin, quercetin, and rutin (all standards by Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) between 1.5 and 24 μg/mL. The samples and standards were tested in triplicate. The results are presented as mean ± standard deviation.

2.3. In Vitro Antioxidant Activity

2.3.1. DPPH Radical Scavenging Activity. The percentage antioxidant activity (AA%) of the leaf extract was obtained using the DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) radical absorbance assay, according to the procedure described by Choi et al. [26] with some changes. The reaction mixture contained sample and DPPH in ethanol at different concentrations (250, 125, 62.5, 31.25, 15.62 e 7.81 μg/mL). When DPPH reacts with an antioxidant compound, which can donate hydrogen, it is reduced. The positive control was ascorbic acid at the same sample concentration. The changes in color (from deep violet to light yellow) were read (Absorbance (Abs)) at 518 nm after 30 min of reaction using a UV-VIS spectrophotometer (Spectrophotometer Pharo 100 Spectroquant®-Merck KGaA, Darmstadt, Germany). The reaction occurred in 30 minutes, and soon after that the absorbance was read in the spectrophotometer at 518 nm. The whole test was performed in triplicate. The percent DPPH scavenging effect was calculated from the following equation:

$$\text{DPPH (scavenging effect \%)} = 100 - \frac{\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{blank}}}{\text{Abs}_{\text{control}}} \times 100, \quad (1)$$

where Abs_{sample}, Abs_{blank}, and Abs_{control} are the absorbance of the sample, blank, and negative control. The inhibitory concentration IC₅₀ was calculated by interpolation from linear regression analysis.

2.3.2. Ferric Reducing Antioxidant Power Assay (FRAP). The antioxidant power activity of *C. nutans* performed by the iron reduction ability (FRAP) was performed according to the methodology described by Rufino et al. [27], with minor modifications. The samples were prepared at the concentration of 1000 μg/mL and diluted in distilled water. The test was performed in triplicate, from the addition of 200 μL of the sample and 1800 μL of the FRAP reagent. Subsequently, the samples were stored in an oven (37°C) for four minutes. The reading was performed on an Ultraviolet-Visible (UV-VIS) spectrometer at 593 nm. A standard curve of ferrous sulfate at concentrations of 1000 mmol/L to 62.5 mmol/L ($y = 0.000049x + 0.036181$, $R^2 = 0.9922$) was used to perform the calculations.

2.3.3. Lipid Peroxidation Assay (TBARS). Thiobarbituric acid reactive substances were used as a measure of oxidative stress according to Okhawa et al. [28]. In summary, the samples were mixed with 1 mL of 10% trichloroacetic acid and 1 mL of 0.67% thiobarbituric acid and then heated in a boiling water bath for 30 minutes. TBARS was determined by absorption of 535 nm. The results were expressed as malondialdehyde equivalent per milligram of protein (Eq MDA/mg protein).

2.3.4. TBARS Induced by Ferrous Sulphate (FS). Another method used for lipid peroxidation analysis was TBARS (thiobarbituric acid reactive species), according to the

methodology described by VYNCKE [29], with some modifications. In this method (with damage inducer), 1% diluted egg yolk (v/v) was used in 100 mM TRIS HCl pH 7.4 buffer, using ferrous sulfate aqueous at a concentration of 13.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ as a damage inducer. The concentrations of *C. nutans* extract used were 10, 100, and 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ (p/v). Buffer solution was used as negative control. Absorbance was read on a 532 nanometer wavelength spectrophotometer. Analysis was performed in quadruplicate.

2.3.5. Determination of the Protein Content of Carbonyl Groups. The determination of oxidized protein content (carbonyl grouping) was performed by the reaction of carbonyl groups with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH), as previously described by Levine et al. [30]. Briefly, heparinized whole blood was precipitated with 10% TCA and, after centrifugation, the pellet was treated with 1 mL of 0.2% DNPH in HCl (2 mol/L) or 1 mL HCl (2 mol/L) as a white. The samples were incubated for one hour at room temperature with shaking for 5 minutes. 200 μL of TCA was then added, and the precipitated proteins were subsequently washed three times with 10% TCA, three times with ethanol/ethyl acetate 1:1 (v/v) and three times again with 10% TCA. The final precipitate was dissolved in 6 mol/L guanidine hydrochloride with TCA: the insoluble debris was removed by centrifugation. The concentration of carbonyl groups was calculated from the absorbance at 370 nm using 21.5 mmol/L/cm as the extinction coefficient for aliphatic hydrazones, and the results were expressed as carbonyl mmol per mg protein (mmol Carbonyl/mg Protein).

2.3.6. Assessment of DCFH Oxidation. The evaluation of the oxidation of the 2,7-dichlorofluorescein (DCFH) of the crude extracts of the leaf of *C. nutans* was carried out to determine the level of intracellular generation of reactive oxygen and nitrogen species (RONS), a general index of stress oxidative according to Myrhe et al. [31]. The assay reaction mixture consisted of 150 μL of 0.1 μM potassium phosphate buffer (pH 7.4), 40 μL of distilled water, 5 μL of DCFH-DA (200 μM , final concentration 5 μM), and 5 μL of the sample (1:10 dilution). The emission of DCF fluorescence resulting from the oxidation of DCFH was monitored for 10 min (30 s intervals) at 488 and 525 nm, excitation and emission wavelengths, respectively, using a SpectraMax plate reader (Molecular Devices, CA, USA). The rate of DCF formation was expressed as a percentage (% of control group).

2.4. Antimicrobial Activity Assay. Crude extracts and fractions were individually evaluated against *P. aeruginosa* (ATCC 9027), *B. cereus* (ATCC 33019), *E. epidermidis* (ATCC 1228), *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 33019), *E. faecalis* (ATCC 29212), *P. mirabilis* (ATCC 25933), *Candida glabrata* (clinical isolate), *Candida tropicalis* (clinical isolate), *C. krusei* (clinical isolate), and *C. albicans* (clinical isolate). Antibacterial susceptibility testing

was performed as recommended by CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) document M07-A9 [32] and antifungal was in accordance with protocol M27-A3 for yeast fungi of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [33]. Bacterial strains were grown overnight at 35°C for 24 h on Mueller–Hinton agar and fungal strains at 35°C for 48 h or 72 h on Sabouraud Dextrose agar. Successive dilutions from 2000 to 15.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of the extracts were prepared in 96-well microplates. For this, 200 mg/mL stock solutions in 1% DMSO were used. 90 μL of this solution was transferred to the microplates, which already contained 100 μL of the culture medium. To complete the final volume of 200 μL , 10 μL of inoculum was added (the optical density of the suspension was adjusted between 0.5 and 2.5×10^3 Colony Forming Units (CFU)/mL according to the turbidimetric scale McFarland Standard). The plates were incubated at 37°C for 24 h for bacteria and at 35°C for 48 h for fungi. The MIC was calculated as the lowest dilution that showed complete inhibition of growth of the tested microorganism. For the bacteria, the 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride developer was added and for the fungi it was visualized by turbidity assessment in the naked eye wells. All tests were performed in triplicate.

2.5. Toxicity Assay

2.5.1. Toxicity to the Nauplii of *Artemia Salina*. The toxicity test with *Artemia salina* (Leach) nauplii was performed according to the methodology adapted by Silva et al [34]. The saline cysts were incubated at 30°C in artificial saline (23 g/L of sea salt and 0.7 g/L of sodium bicarbonate in distilled water). The culture was maintained under constant aeration and stirring 48 hours for hatching. Afterwards, ten nauplii were transferred to tubes containing artificial sea water, with three different concentrations of the extract of *C. nutans*: 0.1, 0.5, and 1.5 mg/mL. The test was performed in triplicate. The count of live and dead nauplii was performed after 24 hours. As a negative control, only artificial saline was used and as a positive control, and sodium lauryl sulfate was used. After counting live and dead nauplii, the LC₅₀ and the confidence interval were calculated.

2.5.2. Genotoxic Evaluation in *Allium Cepa*. For the toxicity test in *A. strain*, the methodology of Tedesco and Laughinghouse [35] with some modifications was used. Eight groups of 5 bulbs were placed to root in distilled water for 48–72 h. After that, the bulbs were treated with different concentrations of the crude extracts (0.1, 0.5, and 1.5 mg/mL) for 48 h, with a negative control of distilled water and positive Glyphosate 2%. Subsequently, the radicles were collected and fixed in ethanol-acetic acid (3:1) for another 24 hours. After this period, the radicles were removed from the fixative, packed in amber glass bottles containing 70% alcohol, and stored in the refrigerator until use.

To evaluate the antiproliferative potential, radicles were collected, which were hydrolyzed in 1 M hydrochloric acid for 5 minutes, after washing in distilled water and stained with 2% acetic orcein. The lamina were made by the crushing

technique [36] and examined by observing the phases of the cell cycle (interphase, prophase, metaphase, anaphase and telophase) with the aid of an optical microscope with a 40X objective. 1000 cells were analyzed per bulb, totaling 5000

cells per treatment, and the mean cell number values of each of the cell cycle phases of *A. cepa* were calculated. The determination of the Mitotic Index (MI) was performed according to the following equation:

$$MI = \frac{\text{total of cells observed (cells in interphase + dividing cell number)}}{\text{number of cells in interphase}} \times 100. \quad (2)$$

Determination of the percentage of Abnormalities (AN) was performed according to equation (2):

$$\% \text{ abnormalities} = \frac{\text{abnormalities}}{\text{total cells}} \times 100. \quad (3)$$

2.6. Fly Behavior Assay

2.6.1. *Drosophila* Stock. Wild-type *Drosophila melanogaster* was obtained from the National Species Stock Center, Bowling Green, OH, USA. Flies were reared on a standard corn flour diet with yeast granules as the protein source at constant temperature and humidity ($22 \pm 1^\circ\text{C}$; 60% relative humidity, respectively) and under a 12-h dark/12-h light cycle.

2.6.2. Survival Rates. To determine the survival rate, the flies were exposed for 7 days to different extract concentrations (15, 20, 25, 30, and 35 mg/mL) mixed to the diet and evaluated by counting the number of live flies daily until the end of the trial period. For each group, 80 flies were tested. At the end of the treatments, the number of dead flies was recorded and expressed as a percentage of surviving flies compared to the control (considered 100%).

2.6.3. Paraquat Exposure and *C. nutans* Extract Treatment. Adult flies, 1–4-day-old, were divided into the following groups: NC: Negative Control (1% sucrose); EC: Extract Control (10 mg/mL extract leaf); and PC: Positive Control (3 mM PQ); Treatments: T1: 3 mM PQ + 1 mg/mL extract; T2: 3 mM PQ + 5 mg/mL extract; T3: 3 mM PQ + 10 mg/mL extract. Flies were exposed to treatments for 4 days, and vials containing flies were maintained in an incubator at $22 \pm 1^\circ\text{C}$ with 60% relative humidity and a 12-h dark/12-h light cycle before use in assays [37]. Exposure to PQ concentration (3 mM) and different *C. nutans* extract concentrations were based on survival curves and corresponded to minimum time and concentration required to induce significant locomotor deficits and toxicity in flies.

2.6.4. Negative Geotaxis Assay. Traditional adult flies climbing assays were effected using a negative geotaxis assay [37]. Flies were submitted under brief ice anesthesia and were placed in a vertical empty plastic jar (length 15 cm, diameter 2 cm/10 flies each). After recovery from cold exposure (approximately 10 min), flies were gently tapped to the bottom of the column. The number of flies that climbed from the bottom to 15 cm mark in 8 s was counted. The assay

was repeated six times, and data were expressed as the means of six trials per replicate. Similar steps were followed to score for controls also.

2.7. Statistical Analysis. Phytochemical analyses and *in vitro* antioxidant activity results are reported as means \pm SD. *In vivo* and *ex vivo* results are expressed as means \pm SEM. All experiments were performed in triplicate. Multiple comparisons were performed using one-way ANOVA followed by Bonferroni's Multiple Comparison Test, and differences were considered significant when $p < 0.05$, 0.01, and 0.001. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism5 software.

3. Results

3.1. Phytochemical Analysis. The qualitative phytochemical analysis of the *C. nutans* species exhibited the presence of alkaloids, coumarins, quaternary bases, phenolics, flavonoids, tannins, and free steroids. The presence of these active phytoconstituents clearly demonstrated that leaf *C. nutans* have prominent antioxidant properties and a source for further exploration in pharmacological activity.

3.1.1. HPLC-DAD-MS Assay. Results obtained by HPLC-DAD-MS analysis show six possible compounds present in the crude extract of *C. nutans* leaf (Table 1). The peaks were identified by comparing the results obtained with retention times and mass spectra of the software library and external standards.

3.1.2. Polyphenols, Flavonoids, and Condensed Tannin Contents. Table 2A show the results obtained to polyphenols (30.17 mg/g), flavonoids (21.64 mg/g), and condensed tannins (9.58 mg/g) in methanolic extract of *C. nutans* leaves. The presence of these compounds suggests a use as an antioxidant material.

3.2. In Vitro Antioxidant Activity

3.2.1. DPPH and FRAP Analysis. The results obtained for antioxidant activity using DPPH and FRAP analyses are show in Table 2B. The low IC_{50} observed in *C. nutans* leaf ($345.41 \pm 5.35 \mu\text{g/mL}$) means that this species has a high inhibition capacity of the DPPH radical with a small amount of sample. The same behavior was observed for ferric reducing antioxidant power assay (FRAP) ($379.98 \pm 39.25 \mu\text{g/mL}$).

TABLE 1: Compounds identified in extracts of *Chaptalia nutans* by HPLC-DAD-MS.

Sample	Compound	Rt (min)	(M-H) (m/z)	Fragment ions in MS/MS (m/z)	Reference
LV	Quinic acid	2.4–2.9	191	103, 133	Bouhafsoun et al., 2018
	4-Phenylbutyric acid	3.0–3.4	147		Kato-Noguchi, 2008
	Isoferulic acid	14.2–15.5	193	134	Aghraz et al., 2018; Bakr, 2014; Yang, 2011
	5-Hydroxyanthranilic acid	3.5–4.0	107	—	Magee et al., 2007
	3-Hydroxybenzoic acid	2.6	93	—	Gruz et al., 2008
	Arbutin	14.4–14.6	108	—	Ekiert et al., 2012; Urbanska et al., 2014

Rt = retention time; (M-H)⁻ (m/z) = molecular ion peak in negative mode.

TABLE 2: A: Polyphenols, flavonoids, and condensed tannins contents. B: IC₅₀ results (DPPH) ($\mu\text{g}/\text{mL} \pm \text{SD}$). Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay ($\mu\text{M FeSO}_4/\text{mg}$ sample). Results for crude extract (CE) of *C. nutans* leaf.

	CE \pm SD	<i>C. nutans</i> leaf
A		
Polyphenols (mg/g \pm SD)		30.17 \pm 1.44
Flavonoids (mg/g \pm SD)		21.64 \pm 0.66
Condensed tannins (mg/g \pm SD)		9.58 \pm 0.99
B		
DPPH IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL} \pm \text{SD}$)		345.41 \pm 5.35
FRAP assay ($\mu\text{M FeSO}_4/\text{mg}$ sample)		379.98 \pm 39.25

CE: crude extract; SD: standard deviation.

3.2.2. *TBARS, Protein Carbonyl, and DCFH Assay.* Three different concentrations of *C. nutans* extract leaf were subjected to the thiobarbituric (TBARS), protein carbonyl, and DCFH assay.

As seen in Figure 1, the extract reduced the concentration of TBARS and carbonyl, as well as neutralized peroxy radicals at the three concentrations tested (Figure 1). TBARS assay demonstrated significant differences between the results obtained for all three samples where the extract concentrations show values lower than the positive and negative controls (Figure 1(a)). It can be inferred that the *C. nutans* leaf has antioxidant activity, preventing lipid oxidation.

According to statistic results, the three extract concentrations present significant changes in protein carbonyl content as show in Figure 1(b). The leaf extract prevented the natural oxidative damage of the cells, i.e, protected the tissue from protein and lipid damage. The concentrations of 1 mg/mL and 10 mg/mL present similar results and a maximum protection of the protein tissue.

The ability to neutralize oxygen radicals was determined using DCFH assay (Figure 1(c)). Results obtained demonstrated that leaf extract have the ability to decrease activity of oxygen radical species. The three extract concentrations tested present values lower than the control, principally to the concentration of 0.1 mg/mL.

3.2.3. *TBARS Induced by Ferrous Sulphate (FS).* In order to verify the potential of the species under study to protect lipid peroxidation induced by ferrous sulfate, egg yolk was used as lipid source. In this way, it can be observed that there was no

increase in the concentration of malondialdehyde (MDA) in the sample (Figure 2), indicating that the extract does not generate lipid peroxidation at the three concentrations analyzed, not differing statistically with the negative control and between them. Regarding the treatments with induction of damage (ferrous sulfate), it was found that the extract in the lowest concentrations was not able to protect lipid peroxidation, not differing statistically from the positive control. However, for the concentration of 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, it was observed a decrease in MDA (promising result), demonstrating that at this concentration *C. nutans* leaf extract was able to decrease the lipid peroxidation caused by ferrous sulfate.

3.3. *Antimicrobial Activity.* Evaluation of antimicrobial activity of *C. nutans* leaf was carried out in crude extract and for hexane, chloroform, ethyl acetate, and butanol fractions. However, only positive result (antimicrobial activity) was observed for the hexane fraction (Table 3). The hexane fraction significantly inhibited the microorganisms *E. epidermidis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, and *C. krusei* at a concentration of 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

3.4. *Toxicity and Genotoxicity.* The toxicity of *C. nutans* was evaluated by the *Artemia salina* (*A. salina*) assay, analyzing the lethal concentration for 50% of the nauplii (LC₅₀) (Table 4). After that, the *Allium cepa* (*A. cepa*) test was performed with previously standardized concentrations in *Artemia salina*.

The *A. salina* test demonstrated that *C. nutans* leaf presented moderate toxicity (342.89 $\mu\text{g}/\text{mL}$) indicating a LC₅₀ almost 6 times higher than the positive control sodium lauryl sulphate (57.80 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

The genotoxicity test (Figure 3) did not indicate significant difference in MI of leaf concentrations tested (Figure 3(a)) in relation to the negative control, demonstrating that the extract did not interfere with the MI. Statistical analysis of the abnormalities showed that, in the three concentrations in which extracts (0.1, 0.5, 1.5 mg/mL) were tested, there was a significant difference from the glyphosate positive control (Figure 3(b)), demonstrating that the sample did not show genotoxicity to *A. cepa* roots. However, in the analysis of damage prevention, it is possible to observe in the three leaf concentrations that are statistically equal to the positive control, indicating, for these

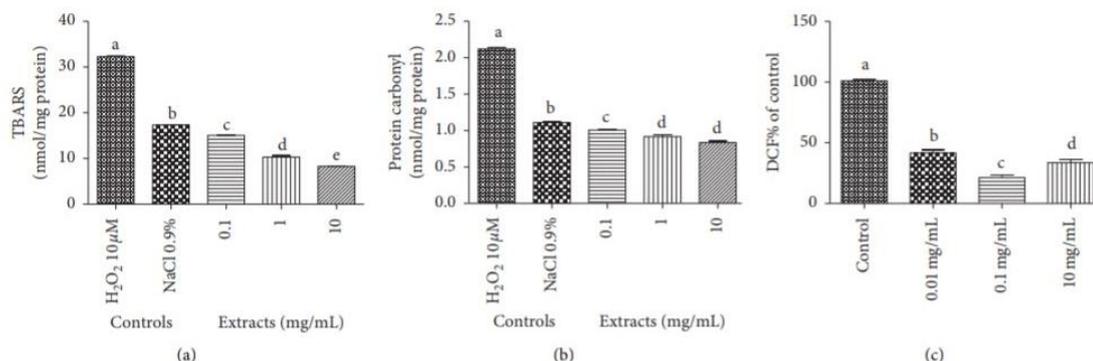


FIGURE 1: Evaluation of the antioxidant activity of the crude extract of *C. nutans* leaves by lipoperoxidation assay (TBARS) (a), carbonyl protein levels (b), and chemical deacetylation of DFCH-DA compound (c). Different letters represent statistical differences according to the Tukey test ($p < 0.001$).

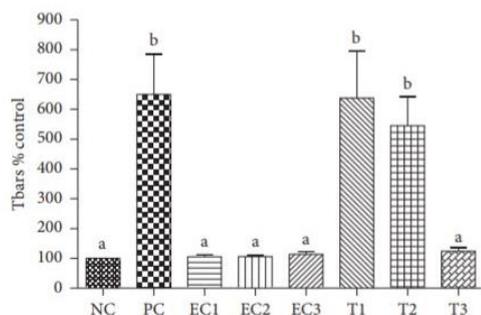


FIGURE 2: NC: Negative Control (buffer solution); PC: Positive Control (FS = Ferrous sulfate) (FS 13.9 µg/mL); Extract control (EC1: Extract Control 10 µg/mL; EC2: Extract Control 100 µg/mL; EC3: Extract Control 1000 µg/mL); and treatment (T1: FS 13.9 µg/mL + extract 10 µg/mL; T2: FS 13.9 µg/mL + extract 100 µg/mL; T3: FS 13.9 µg/mL + extract 1000 µg/mL). Different letters represent statistical differences according to the Tukey test ($p < 0.0001$).

TABLE 3: Results of antimicrobial activity for hexane fraction of *C. nutans* leaf.

Bacterium/fungi	Leaf
<i>E.coli</i>	>2000 µg/mL
<i>S. epidermidis</i>	1000 µg/mL
<i>C. tropicalis</i>	1000 µg/mL
<i>C. glabrata</i>	1000 µg/mL
<i>C.krusei</i>	1000 µg.mL ⁻¹

TABLE 4: Lethal concentration for 50% of *Artemia salina* nauplii (LC₅₀) and confidence interval obtained for *C. nutans* leaf and the positive control.

	LC ₅₀ (µg/mL)	Confidence interval (µg/mL)
Leaf	342.89	207.06–478.75
Sodium lauryl sulfate	57.80	56.10–59.40

concentrations, that the extract was not able to prevent glyphosate damage.

3.5. *Drosophila melanogaster* Assays

3.5.1. Survival. The determination of the lethal concentration of *C. nutans* leaf extract, that kills 50% (LC₅₀) of a test population of the common fruit fly, *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*), which is the benchmark concentration for toxicity studies. In this study, the LC₅₀ of *C. nutans* leaf extract obtained was 24.83 mg/mL five days after exposure at the concentrations tested (Figure 4). This result demonstrated that the extract leaf has a low degree of toxicity and suggest that can be used in pharmacological studies future.

3.5.2. Paraquat Exposure and *C. nutans* Leaf Extract Treatment. Paraquat (PQ, 1,10-dimethyl-4,40-bipyridinium dichloride) is commonly used in the laboratory to generate oxidative stress. *In vivo*, PQ radical reacts with oxygen to generate superoxide anion, a reactive oxygen species (ROS). Posteriorly, excess of ROS and depletion of reducing agents lead to oxidative stress, resulting in ROS damages of lipids, proteins, and DNA, potentially leading to cell death [38]. In the present study, flies were exposed to treatments for 4 days exposure to PQ (3 mM) and *C. nutans* extract leaf at the three concentrations (1, 5, and 10 mg/mL). Results demonstrated that the extract leaf tested show a reduced fly mortality by approximately 40% in relation to PQ (Figure 5), demonstrating that the extract is able to prevent PQ damage.

3.5.3. Negative Geotaxis Assay. The use of *C. nutans* leaf extract to remedy the effect caused to the locomotor system (neurotoxic effect) by the use of the herbicide PQ was evaluated using *D. melanogaster* as a model. The use of PQ as a stressor is well-documented in the literature, affecting the nervous system and, consequently, the locomotor system [39].

8

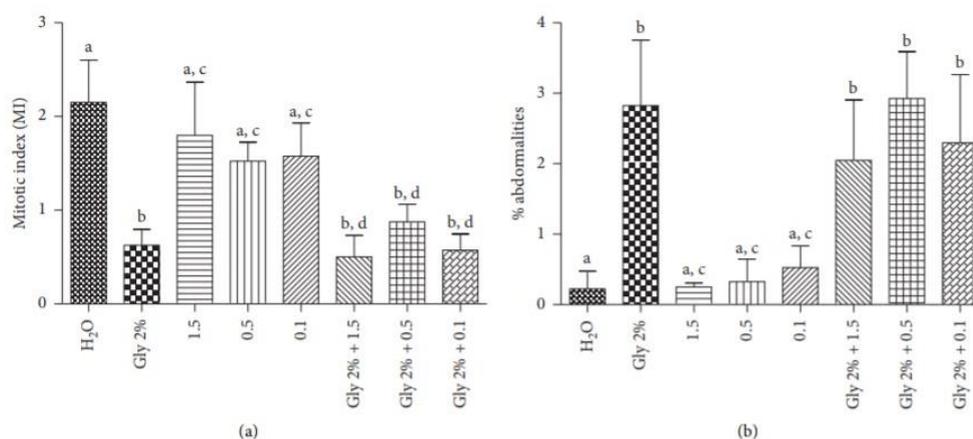


FIGURE 3: (a) Mitotic Index (MI) and (b) Percentage of Abnormalities (AN) for *C. nutans* leaf obtained in the *Allium cepa* assay. Different letters represent statistical differences according to the Tukey test ($p < 0.001$).

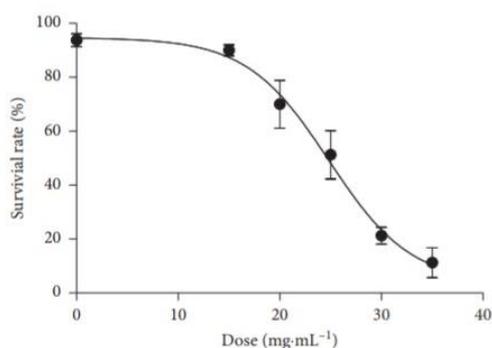


FIGURE 4: LC₅₀ (24.83 mg/mL) of the hydromethanolic *C. nutans* extract leaf response among adult *Drosophila melanogaster* exposed to PQ in the feed. The results expressed in percentage of survivor flies presented correspond to the concentrations of the 15, 20, 25, 30, e 35 mg/mL. The test was effected in quadruplicate. $R^2 = 0.8997$.

Three concentrations of *C. nutans* leaf extract (1, 5 and 10 mg mL⁻¹) and their effects on the PQ neurostressor (3 mM) were used. Negative geotaxis assay result (Figure 6) indicates a dose-dependent behavior on *C. nutans* extract on locomotor activity. An increased neuroprotective effect is observed with increasing concentration of the extract. This behavior is first observed in *C. nutans* species. A similar effect was observed by our research group [40] using *Bougainvillea* leaf extract and PQ.

4. Discussion

Phytochemical screening for *C. nutans* leaves revealed the presence of polyphenols, flavonoids, alkaloids, coumarins, condensed tannins, quaternary bases, and free steroids. No studies have been observed in the literature to prove the presence of all these phytoconstituents, neither at genus, and

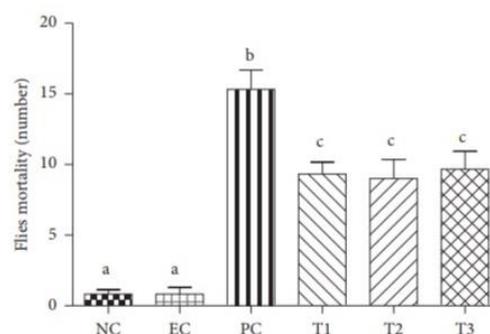


FIGURE 5: PQ poisoning control trial represented by mortality (number of dead individuals) per group. NC: Negative Control (1% sucrose); EC: Extract Control (10 mg/mL extract leaf); PC: Positive Control (3 mM PQ); and treatment: (T1 = 3 mM PQ + 1 mg/mL extract; T2 = 3 mM PQ + 5 mg/mL extract; T3 = 3 mM PQ + 10 mg/mL extract). Different letters represent statistical differences according to Tukey's test ($p < 0.0001$).

only coumarins was described by Truitti and Sarragioto [18] for the species. Positive results for the presence of flavonoids, coumarins, tannins, and steroids were found for the crude extract of *Tithonia diversifolia* leaves and negative for saponins [41], similar to the results obtained by us as *C. nutans* belong to the same family.

Chromatographic analysis (HPLC-DAD-MS) shows that the composition of the methanolic extract of *C. nutans* leaves contains phenolic compounds, a large number of substances, from single molecules to others with a high degree of polymerization [42] and present in vegetables in free form or linked to sugars (glycosides) and proteins [43]. Phenolic compounds are divided into three major groups: flavonoids and derivatives, phenolic acids (benzoic acids, cinnamic acids, and their derivatives), and coumarins [44]. They have a wide variety of substances characterized by the

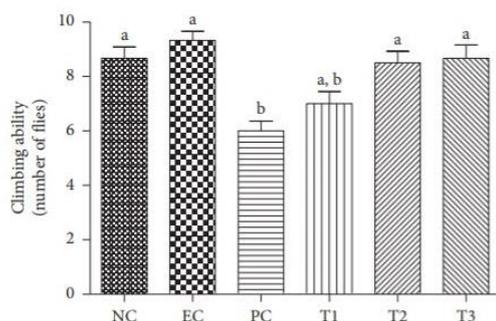


FIGURE 6: Effect of *C. nutans* extract on negative geotaxis (10 flies per replicate) in flies exposed to paraquat for 4 days ($n = 3$). NC: Negative Control (1% sucrose); EC: Extract Control (10 mg/mL extract leaf); PC: Positive Control (3 mM PQ); and treatment: (T1 = 3 mM PQ + 1 mg/mL extract; T2 = 3 mM PQ + 5 mg/mL extract; T3 = 3 mM PQ + 10 mg/mL extract). Different letters represent statistical differences according to Tukey's test ($p < 0.0001$).

presence of one or more aromatic rings attached to at least one hydroxyl radical and/or other substitutes. It can be divided according to the number of phenolic rings and the structures to which they are attached [45]. Results (Table 1) revealed that phenolic acids were the most abundant polyphenols detected for *C. nutans* leaf extract as quinic acid, 4-phenylbutyric acid, isoferulic acid, 5-hydroxyanthranilic acid, 3-hydroxybenzoic acid, and arbutin. According to the literature, quinic acid is a potent antioxidant [46], hepatoprotective [47], and can be used to combat prostate cancer [48]. Studies have shown that the use of 4-phenylbutyric acid in the regulation of oxidative stress attenuated cell damage and acted as a cytoprotector and may be related to inhibition of oxidative stress [49]. Yang et al. [50] claim that the ability of ethanolic propolis extracts to act as antioxidants and to eliminate free radicals is due to the presence of phenolic acids, including isofeluric acid. Bakr [51], studying *Artemisia judaica*, observed a powerful free radical scavenging activity compared to ascorbic acid justifying this activity to the high content of phenolic and flavonoid acids, among the phenolic acids is the presence of isofeluric acid. Arbutin is a phenolic glycoside of plants, well known for medicinal value and widely used in cosmetics. Studies have proven its antifungal and antioxidant activity [52] and effectively used to treat urinary tract infections [53]. 3-hydroxybenzoic acid, not a secondary plant metabolite, was found in small quantities in green tea samples by Gruz et al. [54], suggesting that possible contamination may have occurred by microorganisms found in soil and/or animal excreta. Similar result may have occurred in our study. 5-hydroxyanthranilic acid is an acid that contains portions of coumaric, caffeic, and ferulic acid, being found in avenanthramides organic molecules extracted from oats, widely used in cosmetics [55]. The qualitative analysis of the main compounds present in the extract of *C. nutans* leaves may be useful to clarify the relationships between the content of phenolic compounds and total flavonoids and their antioxidant capacity.

Flavonoids, tannins, and phenolic substances are constituents of plants with potential antioxidant activity, mainly because they act as free radical scavengers [56]. Regarding the presence of these metabolites, no quantification studies were found in the literature, neither for species nor for *Chaptalia* genus. The results obtained for tannins, flavonoids, and polyphenols in *C. nutans* species (Table 2A) may justify their popular use as a laxative and bicheal internally and in topical preparations under injury, trauma, and hemorrhage [12, 14], due to the pharmacological potential of many species of the Asteraceae family to be related to the high tannin and flavonoid concentrations [57], since many of their medicinal properties are often attributed to these secondary metabolites.

Pretti et al. [41] found values for the flavonoids and polyphenols content for *T. diversifolia* leaves, as verified in our study, differing only in the tannin content, which was found in greater quantity. Nalewajko-Sieliwoniuk et al. [58] observed a high content of phenolic compounds in the methanolic extracts of the shoots, mainly in the *Erigeron acris* leaves, a species belonging to the Asteraceae family. Additionally, Johari and Khong [59] observed for *P. bleo* methanolic extract a content of phenolic compounds (40.82 mg GAE/g) close to that found for *C. nutans* leaves (30.17 mg GAE/g). The authors justify the high antioxidant capacity of the species for having a high content of phenolic compounds.

Flavonoids are a class of polyphenols that are abundantly present among plant secondary metabolites. These compounds have great pharmacological importance, resulting from some properties of this class as anticarcinogenic, anti-inflammatory, antiulcerogenic, antiviral [60], anti-mutagenic, antioxidant and antimicrobial action [61], antiallergic, antihepatotoxic, antiosteoporotic, and even antitumor [62].

Nowadays, there is much interest in tracking the antioxidant activity of plant or food extracts to investigate possible medicinal properties [63]. For the evaluation of antioxidant activity, one of the methods used was the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) method, one of the most effective, simple, and reliable *in vitro* methods that has the ability to sequester free radicals. DPPH is stable violet organic nitrogen radical and has a maximum absorption in the range of 515–520 nm [64], where the lower the IC_{50} , the higher the antioxidant activity of the material. For the DPPH method, the extract of *C. nutans* leaves presented an intermediate value (Table 2B), indicating moderately antioxidant activity of the extract. For the *U. baccifera* species, a moderate intensity activity has been described in this [65] due to the high IC_{50} reported (118.31 $\mu\text{g/mL}$). Choi et al. [26] reinforce that due to the complexity of the chemicals present in crude extracts, it is necessary to evaluate the antioxidant capacity of the plant by at least two methods.

In this sense, another method for evaluating antioxidant activity used was the Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) method; it is being widely used among antioxidant analyses as it is an analysis that involves the reduction of Fe^{3+} to Fe^{2+} , changing its coloration to blue in the presence of antioxidant substances [27]. The reducing power obtained

for the species under study was $379.98 \pm 39.25 \mu\text{g/mL}$ (Table 2B), demonstrating a promising antioxidant capacity, since for studies with species of the same family were found similar values for the leaves of *T. diversifolia* ($334 \mu\text{g/mL}$), using the same methodology, exhibiting antioxidant activity [41]. The same authors state that the reducing activity of the extract may occur due to the high content of polyphenols, flavonoids, and tannins.

To evaluate the oxidative stress parameters, the effect of the crude extract of *C. nutans* leaves on lipoperoxidation, protein oxidation, and the neutralizing capacity of oxygen radicals was measured through the levels of TBARS, carbonyl protein, and DCFH. Results demonstrate that the extract has the ability to protect the cell from protein and lipid damage, as well as the inhibition of oxygen-derived radicals at the three concentrations tested, 0.1, 1, and 10 mg/mL (Figures 1(a)–1(c)). Bahramikia et al. [66] observed in the crude (ethanol) extracts of *T. polium* and *C. rotundus* the significant effect of the extracts on protein oxidation inhibition and lipid peroxidation levels compared with the control. Esteves and Cava [67] affirm that there is evidence that protein oxidation may be associated with lipid oxidation.

Figure 1(a) shows the effect of *C. nutans* extract on lipid peroxidation level according to TBARS assay without the presence of an inducing agent. The presence of this agent generates reactive oxygen and nitrogen species (RONS), which among free radicals are the main oxidizing agents. In this sense, another TBARS test was performed using ferrous sulfate as an inducing agent. Result indicates the great effect of the extract to $1000 \mu\text{g/mL}$, reversing the induced damage (Figure 5) and thus avoiding lipid peroxidation, which can be defined as a set of biochemical events resulting from the action of radicals on cell membrane unsaturated lipids, leading to destruction of their structure, failure of metabolite exchange mechanisms, and cell death [68, 69]. Oxidative stress results from an imbalance between the generation of oxidizing compounds and the action of antioxidant defense systems. Antioxidant defense mechanisms aim to limit RONS levels and control the occurrence of cell damage [70, 71].

Budni et al. [72], using a similar methodology, verified for the crude extract of *Tabebuia heptaphylla* leaves a reduction in ferrous sulphate-induced lipid peroxidation in three different concentrations tested. The same behavior was observed to ethanolic extract of *Mikania glomerata* leaves, where it was able to reduce induced lipid peroxidation [73]. Both studies cited confirm the antioxidant capacity of the species, which corroborates our studies. The high *in vitro* antioxidant capacity of the crude extract of *C. nutans* leaves is due to the presence of active substances such as phenolic compounds and the presence of coumarins [73], which are antioxidant compounds. These results are in agreement with the literature that among the several classes of naturally occurring antioxidant substances, phenolic compounds in plants have received attention in recent years, as it covers a range of substances, from simple molecules to those with a high degree of polymerization, proving the antioxidant activity of phenolic acids in inhibiting lipid peroxidation [74, 75].

The crude extract of the species studied was able to significantly reduce the oxidation of DCFH compared to the basal group (Figure 1(c)), demonstrating pronounced antioxidant activity in the three concentrations tested, which indicates that the extract of *C. nutans* leaves has the ability to neutralize different sources of RONS.

Similar results were observed by de Brum et al. [76] for the crude extract of *V. Megapota mica* leaves, which is considered an antioxidant species. The effect of reduction on oxidative stress observed in *C. nutans* can be attributed to the phytochemical composition of the extract. It is suggested that this effect is due to the presence of polyphenols, flavonoids, and tannins found, contributing to the antioxidant activity and also due to the demonstrated ability to eliminate RONS. Fabri et al. [64] and Paula et al. [77] also observed antioxidant activities in other Asteraceae species confirming the widespread popular use of this family in pathologies related to RONS production.

The ability of phenolic compounds to act as antioxidants depends on intrinsic factors, such as their own chemical structure and the intensity of oxidative reactions [78]. The significant antioxidant activity demonstrated by methanolic extract of *C. nutans* leaves has a positive relationship with the presence of phenolic compounds. Studies have shown that the antioxidant capacity of crude *P. bleo* leaf extract is highly associated with the total flavonoid content and total phenolic compounds present in the plant [59]. Corroborating our results for *C. nutans*, Taskin et al. [79] demonstrated that *A. grandifolia* is rich in flavonoids and phenolic acids and can be a good natural source of antioxidant.

In the last two decades, studies have been conducted with medicinal plants in different countries to prove their effectiveness as antimicrobial agents. Maddila and Hemalatha [80] report that global antibacterial resistance is becoming a growing public health problem, as bacterial resistance to most available antibacterial has been reported. The pharmaceutical industry and new biotechnology companies are intensifying efforts to discover new antibacterial in attempts to overcome bacterial resistance [80]. In this sense, the crude extract of *C. nutans* leaves and their fractions (hexane, chloroform, ethyl acetate, and butanol) was tested, but only the hexane extract of the leaves was promising against the microorganisms (Table 3). Truiti et al. [19] tested the crude extract and root fractions of *C. nutans* against *S. aureus*, *E. coli*, and *P. aeruginosa* being the extract considered susceptible to *S. aureus* and resistant to *E. coli* and *P. aeruginosa*. Antimicrobial activity for extracts of *C. nutans* leaves was previously reported by Heinrich et al. [81] where they observed action on *E. coli*, *B. subtilis*, and *M. luteus* and by Souza et al. [17] who reported action only for *B. subtilis* being resistant to the other microorganisms tested, including *E. coli*. Our results are in agreement with those of Truiti et al. [19] and Souza et al. [17] which show resistance of *E. coli* on leaf extract differing from the results of Heinrich et al. [81]. Such differences in the action of the extract on the same microorganism may be related to the different extraction techniques. The ability of leaf extract to inhibit the growth of microorganisms is caused by the presence of secondary metabolites in plant cells [82]. According to Janovik et al.

[83], tannin-rich plants are used in folk medicine as anti-septic because the basis of their mechanism of action is the ability to precipitate proteins, forming a tannin-protein complex on damaged tissues preventing the development of microorganisms. Thus, we can infer that the low tannin content in the extracts of *C. nutans* leaves is not sufficient for it to have a good antimicrobial potential.

The *Artemia salina* (*A. Salina*) toxicity test is a biological assay considered as one of the most widely used tools for preliminary toxicity assessment of plant extracts [84]. Extracts of plants with high toxicity against *A. salina* suggest high potential for biological activities, so it is very useful to use this bioassay in the direction of phytochemical studies in the search for bioactive substances [85]. In this sense, the LC_{50} (342.89 $\mu\text{g}/\text{mL}$) found for the extract of *C. nutans* leaves (Table 4) suggests that it has moderate toxicity. According to NGUTA et al. [86], both organic extracts and aqueous extracts with LC_{50} values lower than 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ have high toxicity, LC_{50} between 100 and 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ have moderate toxicity, LC_{50} between 500 and 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ have low toxicity, and LC_{50} above 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ are considered nontoxic. Similar results were found for the methanolic extract of *Callicarpa candicans* (Verbenaceae) leaves with LC_{50} 383.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ which also antimicrobial activity [82] for the ethanolic extracts of the stem and leaves of *Dasyphyllun tomentosum* [87], *Neurolaena lobata* leaves [81], and *Mikania cordata* leaves [88] where they presented moderate toxicity and absence of toxicity using the *A. salina* model, which belong to the Asteraceae family and have antimicrobial and antitumor potential.

Due to its reliability and agreement with other genotoxicity assays, the *Allium cepa* (*A. cepa*) test system is generally employed for the preliminary evaluation of the genotoxicity of medicinal plants [35, 89]. The effects of medicinal plant infusions on the *A. cepa* cell cycle have been reported by several authors [90, 91, 92], which showed that the main effects that occur are mutagenicity and antimutagenicity, as well as increase and decrease of cell proliferation of root tips treated with different species of medicinal plants. The extract of the leaves of *C. nutans* did not inhibit the mitotic index and did not cause abnormalities in the concentrations were tested (Figure 2), thus showing no antiproliferative effect or genotoxic to *A. cepa* cells. Using the same methodology, Frescura et al. [93] found no genotoxic and antiproliferative action for the leaves and bark of *Luehea divaricata*, and the same behavior was observed for extract of *Euphorbia hirta* [94], *Icacia trichantha* leaf extracts [95], and *Amaranthus spinosus* aqueous extracts [91]. Regarding the ability to prevent glyphosate damage, the species under study was not promising, but did not cause chromosomal anomalies, demonstrating that its popular use will not cause cellular damage. Thus, it can be said that the *A. salina* toxicity bioassay and the *A. cepa* genotoxicity assay were effective to obtain preliminary results regarding the toxic potential of *C. nutans*. Additionally, the fractionation of these extracts can help in their safety evaluation in order to confirm the safety of the use of this plant by the population.

As the first model to evaluate the toxicity of the extract was the LC_{50} assay with *A. salina*, it is a simple, fast, and less expensive model. It was demonstrated that the concentration required to kill half of the individuals was 6 times in relation to positive control concentration, demonstrating that the extract has low toxicity against this model. Thus, searching a more complex experimental model, *D. melanogaster* was used, which is an *in vivo* organism widely used as an experimental model, presenting a range of advantages such as short life cycle, low maintenance cost, and ease of handling. In addition to having its genome sequenced [96] and its well-studied CNS, it is composed of about 1000 neurons, making it a great model for evaluating plant extract toxicities, neurotoxicity, and neurodegenerative diseases [40, 97, 98].

Regarding the toxicity of *C. nutans* extract against *D. melanogaster*, it was found that until the concentration of 15 mg/mL the extract showed no toxicity and that the LC_{50} obtained was 24 mg/mL (Figure 4), distant values of the concentrations were used in the defense tests against oxidative stress. Brito Junior et al. [99] verified for crude extract of *Croton campestris* leaves a LC_{50} of 26.51 mg/mL after 4 days of treatment, approximately as found for *C. nutans* in 5 days of treatment, showing that the species under study is safe because it needs a very high concentration to be toxic, indicating that it may have pharmacological application of the extract in the future.

In this way, the effect of methanolic extract of *C. nutans* leaves on *D. melanogaster* poisoning and locomotor damage caused by PQ herbicide was tested, being widely used as stressor agent in behavioral and intoxication tests. In the last decade, the toxicity of PQ has been described after this herbicide is responsible for significant brain damage and death of individuals following acute exposure [100] being very useful for evaluating neuroprotective compounds against movement disorders and PQ-induced neurodegeneration [101]. The extract of *C. nutans* leaves proved to be effective in reversing the action of herbicide on fly intoxication (Figure 5), reducing mortality by 40% and the ability to reverse locomotor damage (Figure 6) induced by PQ, since a better fly performance was observed in climbing at higher concentrations, indicating that the extract has the ability to protect against mortality and brain damage induced by PQ. Soares et al. [40] observed similar results where the action of *Bougainvillea glabra* extract was able to reduce the mortality rate and neurotoxicity of flies when used concomitantly with PQ. Also, it was found that *Decalepis hamiltonii* root extracts were able to protect flies from mortality and PQ-induced locomotor impairment [39]. Different results for *Croton campestris* hydroalcoholic extract were observed and it was toxic when administered concomitantly with PQ, increasing the mortality rate, as well as changing the locomotor behavior of flies [99].

Exposure to PQ herbicide is recognized as a major risk factor for the manifestation of neurodegenerative diseases. PQ neurotoxicity is attributed to its cyclic redox effect that generates a significant amount of reactive oxygen species (ROS) leading to oxidative stress [40]. Results show that the three concentrations used to prevent PQ damage were

effective in reducing fly mortality (Figure 5) and improving locomotor capacity (Figure 6), as it is known that these effects caused by PQ come from oxidative stress, several studies that consider oxidative stress as the main mechanism of PQ-induced toxicity [96]. These results show that the good *in vitro* antioxidant activity may be related to this protective effect of PQ damage in *in vivo* models. This is justified by the presence of antioxidant compounds identified in the extract, since phenolic compounds present in plants have redox properties, which act as antioxidants [59], and their protective effects against PQ alone have been proven [39].

According to the results of cytotoxic, neurotoxic, antioxidant capacity, and HPLC-DAD-MS assays, methanolic extract of *C. nutans* leaves can be used as a source of natural antioxidant, however, additional *in vitro* studies, as cell cuttings and *in vivo* with rodent and aquatic species. In addition, further investigation is needed to reveal whether the extract can reduce other dysfunctional factors involved in the neurodegeneration process.

5. Conclusion

This study demonstrates in an unprecedented way that the crude extract of *C. nutans* leaves is rich in phenolic compounds and flavonoids and has the capacity to neutralize different sources of ROS, as well as presents low toxicity and absence of cyto- and genotoxicity. Thus, it is suggested that there is a synergism between the chemical composition of the extract, especially phenolic compounds, with the high antioxidant capacity demonstrated through different analysis techniques and the neuroprotective action of the extract where it was able to protect against oxidative damage and locomotor in *D. melanogaster* caused by PQ. Therefore, our results open the way for the possible development of natural antioxidants after further studies for the isolation of compounds and more specific investigations to elucidate the mechanisms of action of the extract at more complex cellular and organism levels, as well as its pharmacological evaluation.

Data Availability

The data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

Conflicts of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of this paper.

Authors' Contributions

All authors contributed equally to this work.

Acknowledgments

The authors are grateful to CNPq, CAPES, and FINEP agencies.

References

- [1] V. K. Yadav, "Phytochemical and pharmacognostical studies of *Blumea lacera*," *International Journal of Green Pharmacy*, vol. 12, no. 1, 2018.
- [2] X.-R. Tian, J.-T. Feng, Z.-Q. Ma et al., "Three new glycosides from the whole plant of *Clematis lasiantha* Maxim and their cytotoxicity," *Phytochemistry Letters*, vol. 10, pp. 168–172, 2014.
- [3] D. Egamberdieva, N. Mamedov, E. Ovidi, A. Tiezzi, and L. Craker, "Phytochemical and pharmacological properties of medicinal plants from Uzbekistan: a review," *Journal of Medicinally Active Plants*, vol. 5, no. 2, pp. 59–75, 2016.
- [4] S. Pradeepa, S. Subramanian, and V. Kaviyaranan, "Evaluation of antimicrobial activity of *Pithecellobium Dulce* pod pulp extract," *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, vol. 7, pp. 32–37, 2014.
- [5] M. C. C. Ayres, M. H. Chaves, D. Rinaldo, W. Vilegas, and G. M. Vieira Júnior, "Constituintes químicos e atividade antioxidante de extratos das folhas de *Terminalia fagifolia* Mart. et Zucc.," *Química Nova*, vol. 32, no. 6, pp. 1509–1512, 2009.
- [6] B. Ulewicz-Magulska and M. Wesolowski, "Total phenolic contents and antioxidant potential of herbs used for medical and culinary purposes," *Plant Foods for Human Nutrition*, vol. 74, no. 1, pp. 61–67, 2019.
- [7] S. M. L. Vasconcelos, M. O. F. Goulart, J. B. F. Moura, V. Manfredini, M. S. Benfato, and L. T. Kubota, "Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano," *Química Nova*, vol. 30, pp. 1323–1338, 2007.
- [8] J. H. R. Clarke, S. M. K. Rates, and R. Bridi, "Um alerta sobre o uso de produtos de origem vegetal na gravidez," *Infarma*, vol. 19, no. 1-2, pp. 41–48, 2007.
- [9] G. L. Nesom, "Revision of *Chaptalia* (Asteraceae: mutisieae) from North America and continental Central America," *Phytologia*, vol. 78, no. 3, pp. 153–188, 1995.
- [10] K. G. Kissmann and D. Groth, *Plantas Infestantes e Nocivas*, BASF, São Paulo, Brazil, 2nd edition, 1997.
- [11] H. Lorenzi and F. J. A. Matos, *Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas Cultivadas*, Institute Plantarum, Nova Odessa, Brazil, 2002.
- [12] A. L. Cabrera and R. M. Klein, "Compostas—tribo mutisieae," in *Flora Ilustrada Catarinense*, R. Reitz, Ed., Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí, Brazil, 1973.
- [13] M. P. Corrêa, "Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas," Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, Brazil, 1984.
- [14] E. Pasini, L. Katinas, and M. R. Ritter, "O gênero *chaptalia* (Asteraceae, mutisieae) no Rio Grande do Sul, Brasil," *Rodriguésia*, vol. 65, no. 1, pp. 141–158, 2014.
- [15] C. B. Empinotti and M. R. Duarte, "Caracteres anatômicos de arnica-do-campo: *Chaptalia nutans*," *Acta Farmacêutica Bonaerense*, vol. 25, pp. 333–338, 2006.
- [16] B. Badilla, G. Mora, and L. J. Poveda, "Anti-inflammatory activity of aqueous extracts of five Costa Rican medicinal plants in Sprague-Dawley rats," *Revista de Biología Tropical*, vol. 47, pp. 723–727, 2000.
- [17] G. C. Souza, A. P. S. Haas, G. L. von Poser, E. E. S. Schapoval, and E. Elisabetsky, "Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 90, pp. 135–143, 2004.

- [18] M. D. C. T. Truiti and M. H. Sarragiotto, "Three 5-methylcoumarins from *Chaptalia nutans*," *Phytochemistry*, vol. 47, no. 1, pp. 97–99, 1998.
- [19] M. C. T. Truiti, M. H. Sarragiotto, B. A. Abreu Filho, C. V. Nakamura, and B. P. Dias Filho, "In vitro antibacterial activity of a 7-O-beta-Dglucopyranosyl- nutanocoumarin from *Chaptalia nutans* (Asteraceae)," *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 98, no. 2, Article ID 283286, 2003.
- [20] N. Osafo, K. Mensah, and O. Kofi Yeboah, "Phytochemical and pharmacological review of *Cryptolepis sanguinolenta* (lindl.) schlechter," *Advances in Pharmacological Sciences*, vol. 2017, Article ID 3026370, 13 pages, 2017.
- [21] F. J. A. Matos, *Introdução a Fitoquímica Experimental*, Edições UFC, Fortaleza, Brazil, 3rd edition, 2009.
- [22] S. Chandraratne and E. Gonzalez de Mejia, "Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of ardisia compressa comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (Camellia sinensis) teas," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 52, no. 11, pp. 3583–3589, 2004.
- [23] R. G. Woisky and A. Salatino, "Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control," *Journal of Apicultural Research*, vol. 37, no. 2, pp. 99–105, 1998.
- [24] I. Morrison, E. A. Asiedu, T. Stuchbury, and A. A. Powell, "Determination of lignin and tannin contents of Cowpea seed coats," *Annals of Botany*, vol. 76, no. 3, pp. 287–290, 1995.
- [25] R. F. Vieira, R. J. Grayer, A. Paton, and J. E. Simon, "Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers," *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 29, no. 3, pp. 287–304, 2001.
- [26] C. W. Choi, S. C. Kim, S. S. Hwang et al., "Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison," *Plant Science*, vol. 163, no. 6, pp. 1161–1168, 2002.
- [27] M. S. M. Rufino, R. E. Alves, E. S. Brito et al., *Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas Pelo Método de Redução do Ferro (FRAP)*, Comunicado Técnico. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasília, Brazil, 2006.
- [28] H. Ohkawa, N. Ohishi, and K. Yagi, "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction," *Analytical Biochemistry*, vol. 95, no. 2, pp. 351–358, 1979.
- [29] W. Vyncke, "Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity," *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, vol. 72, no. 12, pp. 1084–1087, 1970.
- [30] R. L. Levine, D. Garland, C. N. Oliver et al., "Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins," *Oxygen Radicals in Biological Systems Part B: Oxygen Radicals and Antioxidants*, vol. 186, pp. 464–478, 1990.
- [31] O. Myrhe, J. M. Andersen, H. Aarnes, and F. Fonnum, "Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation," *Biochemical Pharmacology*, vol. 65, no. 10, pp. 1575–1582, 2003.
- [32] CLSI—Clinical Laboratory Standards Institute, *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, USA, 2012.
- [33] CLSI—Clinical and Laboratory Standards Institute, *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing Yeasts*, CLSI, Wayne, PA, USA, 3rd edition, 2008.
- [34] L. L. Silva, C. G. Heldwein, L. G. B. Reetz, R. Hörner, C. A. Mallmann, and B. M. Heinzmann, "Composição química, atividade antibacteriana in vitro e toxicidade em *Artemia salina* do óleo essencial das inflorescências de *Ocimum gratissimum* L., Lamiaceae," *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 20, no. 5, pp. 700–705, 2010.
- [35] S. B. Tedesco and H. D. Laughinghouse IV, "Bioindicator of genotoxicity: the *Allium cepa* test," in *Environmental Contamination*, J. K. Srivastava, Ed., InTech, Rijeka, Croatia, 2012.
- [36] M. Guerra and M. J. Souza, *Como Observar Cromossomos: um Guia de Técnica em Citogenética Vegetal, Animal e Humana*, FUNPEC, São Paulo, Brazil, 2002.
- [37] J. J. Soares, M. B. Gonçalves, M. C. Gayer et al., "Continuous liquid feeding: new method to study pesticides toxicity in *Drosophila melanogaster*," *Analytical Biochemistry*, vol. 537, pp. 60–62, 2017.
- [38] T. Z. Rzezniczak, L. A. Douglas, J. H. Watterson, and T. J. S. Merritt, "Paraquat administration in *Drosophila* for use in metabolic studies of oxidative stress," *Analytical Biochemistry*, vol. 419, no. 2, pp. 345–347, 2011.
- [39] S. R. Jahromi, M. Haddadi, T. Shivanandappa, and S. R. Ramesh, "Neuroprotective effect of *Decalepis hamiltonii* in paraquat-induced neurotoxicity in *Drosophila melanogaster*: biochemical and behavioral evidences," *Neurochemical Research*, vol. 38, no. 12, pp. 2616–2624, 2013.
- [40] J. J. Soares, D. T. Rodrigues, M. B. Gonçalves et al., "Paraquat exposure-induced Parkinson's disease-like symptoms and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*: neuroprotective effect of *Bougainvillea glabra* Choisy," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 95, pp. 245–251, 2017.
- [41] I. R. Pretti, A. C. D. Luz, C. M. Jamal, and M. D. C. P. Batitucci, "Variation of biochemical and antioxidant activity with respect to the phenological stage of *Tithonia diversifolia* Hemsl. (Asteraceae) populations," *Industrial Crops and Products*, vol. 121, pp. 241–249, 2018.
- [42] L. Bravo, "Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance," *Nutrition Reviews*, vol. 56, no. 11, pp. 317–333, 1998.
- [43] K. D. Croft, "The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 854, pp. 435–442, 1998.
- [44] S. E. Soares, "Ácidos fenólicos como antioxidantes," *Revista de Nutrição*, vol. 15, no. 1, pp. 71–81, 2002.
- [45] D. M. D. Oliveira and D. H. M. Bastos, "Biodisponibilidade de ácidos fenólicos," *Química Nova*, vol. 34, no. 6, pp. 1051–1056, 2011.
- [46] R. W. Pero, H. Lund, and T. Leanderson, "Antioxidant metabolism induced by quinic acid increased urinary excretion of tryptophan and nicotinamide," *Phytotherapy Research*, vol. 23, no. 3, pp. 335–346, 2009.
- [47] T. Xiang, Q.-B. Xiong, A. I. Ketut et al., "Studies on the hepatocyte protective activity and the structure-activity relationships of quinic acid and caffeic acid derivatives from the flower buds of *Lonicera bournei*," *Planta Medica*, vol. 67, no. 4, pp. 322–325, 2001.
- [48] L. Inbathamizh and E. Padmini, "Quinic acid as a potent drug candidate for prostate cancer—a comparative pharmacokinetic approach," *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, vol. 6, pp. 106–112, 2013.
- [49] H. Wei, S.-J. Kim, Z. Zhang et al., "ER and oxidative stresses are common mediators of apoptosis in both neurodegenerative and non-neurodegenerative lysosomal storage

- disorders and are alleviated by chemical chaperones," *Human Molecular Genetics*, vol. 17, no. 4, pp. 469–477, 2008.
- [50] H. Yang, Y. Dong, H. Du, H. Shi, Y. Peng, and X. Li, "Antioxidant compounds from propolis collected in Anhui, China," *Molecules*, vol. 16, no. 4, pp. 3444–3455, 2011.
- [51] R. O. Bakr, "Microscopical and phytochemical investigation of Egyptian *Artemisia judaica* L. var. *sinaitica* tackholm and its free radical scavenging activity," *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, vol. 6, no. 4, pp. 698–703, 2015.
- [52] M. Azadbakht, A. Marston, K. Hostettmann, M. Ramezani, and M. Jahromi Maghddam, "Biological activity of leaf extract and phenologlycoside arbutin of *Pyrus boissieriana* Buhse," *Journal of Medicinal Plants*, vol. 3, no. 10, pp. 9–14, 2004.
- [53] J. Quintus, K.-A. Kovar, P. Link, and H. Hamacher, "Urinary excretion of arbutin metabolites after oral administration of bearberry leaf extracts," *Planta Medica*, vol. 71, no. 2, pp. 147–152, 2005.
- [54] J. Gruz, O. Novák, and M. Strnad, "Rapid analysis of phenolic acids in beverages by UPLC-MS/MS," *Food Chemistry*, vol. 111, no. 3, pp. 789–794, 2008.
- [55] L. Magee, F. Liebel, and M. Southall, "Compositions for inhibiting or reducing inflammation of skin," Patent Application Publication, 2007.
- [56] C. M. O. Simões, E. P. Schenkel, G. Gosmann, J. C. P. Mello, L. A. Mentz, and P. R. Petrovick, *Farmacognosia da Planta ao Medicamento*, Editora da UFSC, Florianópolis, Brazil, 6th edition, 2010.
- [57] S. C. Santos, W. F. Costa, J. P. Ribeiro et al., "Tannin composition of barbatimão species," *Fitoterapia*, vol. 73, no. 4, pp. 292–299, 2002.
- [58] E. Nalewajko-Sieliwoniuk, A. Pliszko, J. Nazaruk, E. Barszczewska, and W. Puksza, "Comparative analysis of phenolic compounds in four taxa of *Erigeron acris* s. l. (Asteraceae)," *Biologia*, vol. 74, no. 12, pp. 1569–1577, 2019.
- [59] M. A. Johari and H. Y. Khong, "Total phenolic content and antioxidant and antibacterial activities of *Pereskia bleo*," *Advances in Pharmacological Sciences*, vol. 2019, Article ID 7428593, 4 pages, 2019.
- [60] E. M. Granato, M. M. Granato, M. M. Gerenutti, G. Silva, H. O. Ferraz, and M. M. D. C. Vila, "Prospecção fitoquímica da espécie vegetal *Trixis antimenorrhoea* (Schrank) Kuntze," *Revista Brasileira de Farmácia*, vol. 94, no. 2, pp. 130–135, 2013.
- [61] L. Valdés, A. Cuervo, N. Salazar, P. Ruas-Madiedo, M. Gueimonde, and S. González, "The relationship between phenolic compounds from diet and microbiota: impact on human health," *Food & Function*, vol. 6, no. 8, pp. 2424–2439, 2015.
- [62] S. V. F. Omes, P. C. L. Nogueira, and S. V. R. S. Moraes, "Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer," *Eclética Química Journal*, vol. 36, no. 1, pp. 64–77, 2011.
- [63] M. A. Ghani, C. Barril, D. R. Bedgood, and P. D. Prenzler, "Development of a method suitable for high-throughput screening to measure antioxidant activity in a linoleic acid emulsion," *Antioxidants*, vol. 8, no. 9, p. 366, 2019.
- [64] R. L. Fabri, M. S. Nogueira, L. B. Dutra, M. L. M. Bouzada, and E. Scio, "Potencial antioxidante e antimicrobiano de espécies da família Asteraceae," *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, vol. 13, no. 2, pp. 183–189, 2011.
- [65] A. L. Gindri, L. B. de Souza, R. C. Cruz, A. A. Boligon, M. M. Machado, and M. L. Athayde, "Genotoxic evaluation, secondary metabolites and antioxidant capacity of leaves and roots of *Urera baccifera* Gaudich (Urticaceae)," *Natural Product Research*, vol. 28, no. 23, pp. 2214–2216, 2014.
- [66] S. Bahramikia, A. Ardestani, and R. Yazdanparast, "Protective effects of four Iranian medicinal plants against free radical-mediated protein oxidation," *Food Chemistry*, vol. 115, no. 1, pp. 37–42, 2009.
- [67] M. Estévez and R. Cava, "Effectiveness of rosemary essential oil as an inhibitor of lipid and protein oxidation: contradictory effects in different types of frankfurters," *Meat Science*, vol. 72, no. 2, pp. 348–355, 2006.
- [68] I. F. F. Benzie, "Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences," *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, vol. 47, no. 3, pp. 233–261, 1996.
- [69] É. S. Lima and D. S. P. Abdalla, "Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas," *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 37, no. 3, 2001.
- [70] K. B. F. Barbosa, N. M. B. Costa, R. D. C. G. Alfenas, S. O. de Paula, V. P. R. Minim, and J. Bressan, "Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios," *Revista de Nutrição*, vol. 23, no. 4, pp. 629–643, 2010.
- [71] V. Dias, E. Junn, and M. M. Mouradian, "The role of oxidative stress in Parkinson's disease," *Journal of Parkinson's Disease*, vol. 3, no. 4, pp. 461–491, 2013.
- [72] P. Budni, F. C. Petronilho, V. Citadini-Zanette et al., "Estudos preliminares da atividade antioxidante do extrato hidroetanólico de folhas jovens e adultas de *Tabebuia heptaphylla* (Vell.) Toledo (ipê-roxo)," *Latin American Journal of Pharmacy*, vol. 26, no. 3, pp. 394–398, 2007.
- [73] L. C. L. R. Santana, O. A. Silva, M. R. M. Brito et al., "Avaliação do potencial antioxidante, atividade antimicrobiana e antihelmíntica do extrato etanólico padronizado das folhas de *Mikania glomerata* Sprengel," *Revista Brasileira de Farmácia*, vol. 94, no. 2, pp. 120–129, 2013.
- [74] R. R. D. S. Azevedo, V. G. A. Almeida, E. M. F. Silva et al., "Potencial antioxidante e antibacteriano do extrato etanólico de plantas usadas como chás," *Revista Semente*, vol. 6, no. 6, pp. 240–249, 2011.
- [75] M. M. Santi, F. S. Sanches, J. F. M. Silva, and P. M. L. Santos, "Determinação do perfil fitoquímico de extrato com atividade antioxidante da espécie medicinal *Cordia verbenacea* DC. por HPLC-DAD," *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, vol. 16, no. 2, pp. 256–261, 2014.
- [76] T. de Brum, M. Zadra, M. Piana et al., "HPLC analysis of phenolics compounds and antioxidant capacity of leaves of *Vitex megapotamica* (Sprengel) Moldenke," *Molecules*, vol. 18, no. 7, pp. 8342–8357, 2013.
- [77] C. S. Paula, V. C. D. Canteli, M. C. S. Verdam et al., "Atividade antioxidante e toxicidade preliminar do extrato e frações obtidas das folhas e cascas do caule de *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.) Cabrera," *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, vol. 16, no. 2, pp. 189–195, 2014.
- [78] M. N. Lund, M. Heinonen, C. P. Baron, and M. Estévez, "Protein oxidation in muscle foods: a review," *Molecular Nutrition & Food Research*, vol. 55, no. 1, pp. 83–95, 2011.
- [79] D. Taşkin, D. B. Alkaya, and E. Dölen, "Evaluation of antioxidant capacity and analysis of major phenolic compounds in *Achillea grandifolia* by HPLC-DAD with Q-TOF LC/MS confirmation," *Chiang Mai Journal of Science*, vol. 45, no. 1, pp. 287–298, 2018.
- [80] S. Maddila and K. P. J. Hemalatha, "Phytochemical screening and *in vitro* antimicrobial properties of crude leaf extracts of *Wrightia tinctoria* R.Br.," *International Journal of Current*

- Microbiology and Applied Sciences*, vol. 6, no. 1, pp. 707–720, 2017.
- [81] M. Heinrich, M. Kunhnt, C. W. Wright, H. Rimpler, J. D. Phillipson, and A. Schandelmaier, "Lowland mixe Indian medicinal plants: parasitological and microbiological evaluation and initial phytochemical study of *Chaptalia nutans*," *Planta Medica*, vol. 57, 1991.
- [82] K. Nurtjahja, T. B. Kelana, D. Suryanto et al., "Antimicrobial activity of endemic herbs from tangkahan conservation forest north sumatera to bacteria and yeast," *HAYATI Journal of Biosciences*, vol. 20, no. 4, pp. 177–181, 2013.
- [83] V. Janovik, A. A. Boligon, A. C. Feltrin, D. F. Pereira, J. K. Frohlich, and M. L. Athayde, "Doseamento de polifenóis, flavonóides e taninos no extrato bruto e frações de *Cariniana domestica* (Mart.) Miers," *Saúde (Santa Maria)*, vol. 35, no. 2, pp. 25–28, 2009.
- [84] P. D. A. Sarmiento, T. D. R. Ataíde, A. P. F. Barbosa, J. X. D. Araújo-Júnior, I. M. L. Lúcio, and M. L. D. A. Bastos, "Evaluation of the extract of *Zeyheria tuberculosa* with a view to products for wound healing," *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, vol. 22, no. 1, pp. 165–172, 2014.
- [85] C. B. D. Amarante, A. H. Müller, M. M. Póvoa, and M. F. Dolabela, "Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*)," *Acta Amazonica*, vol. 41, no. 3, pp. 431–434, 2011.
- [86] J. M. Nguta, J. M. Mbaria, D. W. Gakuya, P. K. Gathumbi, J. D. Kabasa, and S. G. Kiama, "Biological screening of Kenyan medicinal plants using *Artemia salina* (Artemiidae)," *Pharmacologyonline*, vol. 2, pp. 458–478, 2011.
- [87] P. Mayorga, K. R. Pérez, S. M. Cruz, A. Cáceres, and A. Cáceres, "Comparison of bioassays using the anostracan crustaceans *Artemia salina* and *Thamnocephalus platyurus* for plant extract toxicity screening," *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 20, no. 6, pp. 897–903, 2010.
- [88] A. A. Nayeem, A. Khatun, M. S. Rahman, and M. Rahman, "Evaluation of phytochemical and pharmacological properties of *Mikania cordata* (Asteraceae) leaves," *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, vol. 3, no. 8, pp. 118–123, 2011.
- [89] M. D. Bagatini, A. C. F. D. Silva, and S. B. Tedesco, "Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais," *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 17, no. 3, pp. 444–447, 2007.
- [90] J. C. Chukwujekwu and J. Van Staden, "Cytotoxic and genotoxic effects of water extract of *Distephanus angulifolius* on *Allium cepa* Linn," *South African Journal of Botany*, vol. 92, pp. 147–150, 2014.
- [91] V. Prajitha and J. E. Thoppil, "Genotoxic and antigenotoxic potential of the aqueous leaf extracts of *Amaranthus spinosus* Linn. using *Allium cepa* assay," *South African Journal of Botany*, vol. 102, pp. 18–25, 2016.
- [92] C. A. L. Hister, M. Pasqualli, K. C. Trapp et al., "Atividade antiproliferativa e determinação dos compostos fenólicos de extratos aquosos de amoreira-preta (*Rubus sp.*) pelo sistema teste in vivo de *Allium cepa* L." *Revista Brasileira de Biociências*, vol. 15, no. 1, pp. 43–48, 2017.
- [93] V. D.-S. Frescura, H. D. Laughinghouse, and S. B. Tedesco, "Antiproliferative effect of the tree and medicinal species *Luehea divaricata* on the *Allium Cepa* cell cycle," *Caryologia*, vol. 65, no. 1, pp. 27–33, 2012.
- [94] K. Yuet Ping, I. Darah, U. K. Yusuf, C. Yeng, and S. Sasidharan, "Genotoxicity of *Euphorbia hirta*: an *Allium cepa* assay," *Molecules*, vol. 17, no. 7, pp. 7782–7791, 2012.
- [95] O. Timothy, M. Idu, D. I. Olorunfemi, and O. Ovuakporie-Uvo, "Cytotoxic and genotoxic properties of leaf extract of *Icacina trichantha* Oliv.," *South African Journal of Botany*, vol. 91, pp. 71–74, 2014.
- [96] S.-I. Kim, J.-W. Jung, Y.-J. Ahn, L. L. Restifo, and H.-W. Kwon, "Drosophila as a model system for studying lifespan and neuroprotective activities of plant-derived compounds," *Journal of Asia-Pacific Entomology*, vol. 14, no. 4, pp. 509–517, 2011.
- [97] J. H. Sudati, F. A. Vieira, S. S. Pavin et al., "*Valeriana officinalis* attenuates the rotenone-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*," *Neurotoxicology*, vol. 37, pp. 118–126, 2013.
- [98] K. Panchal and A. K. Tiwari, "*Drosophila melanogaster*" a potential model organism" for identification of pharmacological properties of plants/plant-derived components," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 89, pp. 1331–1345, 2017.
- [99] F. E. B. Júnior, G. E. Macedo, A. P. Zemolin et al., "Oxidant effects and toxicity of croton campestris *Drosophila melanogaster*," *Pharmaceutical Biology*, vol. 54, no. 12, pp. 3068–3077, 2016.
- [100] T. Blanco-Ayala, A. C. Andérica-Romero, and J. Pedraza-Chaverri, "New insights into antioxidant strategies against paraquat toxicity," *Free Radical Research*, vol. 48, no. 6, pp. 623–640, 2014.
- [101] S. Niveditha, S. R. Ramesh, and T. Shivanandappa, "Paraquat-induced movement disorder in relation to oxidative stress-mediated neurodegeneration in the brain of *Drosophila melanogaster*," *Neurochemical Research*, vol. 42, no. 11, pp. 3310–3320, 2017.

5 ARTIGO CIENTÍFICO II

Os resultados desta Tese, referente às raízes de *C. nutans*, estão apresentados sob a forma de um artigo científico (<https://doi.org/10.1089/jmf.2019.0309>), publicado no Periódico *Journal of Medicinal Food*, Qualis Capes B2 na área CBII. As seções Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão e Referências encontram-se no artigo a seguir.

Chaptalia nutans* Polak: Root Extract Has High *In Vitro* Antioxidant Activity and Low Cytotoxicity *In Vivo

Letiele Bruck de Souza,¹ Amanda Leitão Gindri,² Thainara de Andrade Fortes,²
 Jefferson Enderle,¹ Rafael Roehrs,¹ Vanusa Manfredini,³ and Elton Luís Gasparotto Denardin¹

¹*Physico-Chemical Studies and Natural Products Laboratory (LEFQPN),
 Federal University of Pampa (UNIPAMPA), Uruguaiiana, Brazil.*

²*Medicinal Plants Laboratory, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Santiago, Brazil.*

³*Oxidative Stress Studies Group (GESTOX), Federal University of Pampa (UNIPAMPA), Uruguaiiana, Brazil.*

ABSTRACT The Asteraceae family is widely known for its therapeutic, aromatic, and nutritional properties. *Chaptalia nutans* (*C. nutans*), a member of the family, is widely used in folk medicine in southern Brazil. In this study, we aim to assess compounds present in root extracts of *C. nutans*, and evaluate their antioxidant capacity and toxicity. To determine the chemical composition of the extract, was performed through Liquid Chromatography coupled with Mass Spectroscopy. Antioxidant capacity, toxicity (*Artemia salina* bioassay), cytotoxicity, genotoxicity (*Allium cepa* test), and neurotoxicity (*Drosophila melanogaster* model) were evaluated. A large number of bioactive phytoconstituents were determined to be present, such as alkaloids, coumarins, flavonoids, terpenes, and especially phenolic compounds, which may explain the antioxidant capacity of the extract. Extracts had the capacity to protect cells from protein and lipid damage, and inhibit the formation of oxygen radicals. The *A. salina* bioassay revealed that extracts were only slightly toxic. In *A. cepa*, cells exposed to 1.5 mg/mL extract were protected against chromosomal damage caused by glyphosate, and had mitotic index values that were reduced by 49%. A concentration of 10 mg/mL extract did not kill flies, and when coadministered with paraquat (PQ) (52.5%) produced a mortality rate of only 18.75%. These findings indicated that the extract had the potential to protect against PQ-induced neurotoxicity. Taken together, these data reveal for the first time that the root extract of *C. nutans* is a rich source of natural antioxidants. The extract may be useful in the food and pharmaceutical industries.

KEYWORDS: • *Allium cepa* • Asteraceae • *Drosophila melanogaster* • oxidative stress • phenolic compounds
 • *Artemia salina*

INTRODUCTION

THE ASTERACEAE FAMILY is widely known for its therapeutic, cosmetic, aromatic, and nutritional properties. It is the largest family in terms of the number of species, and contains nearly 1500 genera and 25,000 species.¹ Among these, *Chaptalia nutans* is popularly known as Língua-de-vaca or Arnica-do-campo. The species is widely distributed throughout Latin America, with the exception of Chile and can be found in grassland, forest, and wet soil habitats, along with areas with intense anthropic influence.^{2,3} Folk medicine of southern Brazil has used its leaves for creating topical (heated) preparations to treat bruising, injuries, bleeding, and headaches. Leaves of the plant have also been used to

make as tea. Roots of the species have been used to treat fevers, lung problems, constipation, skin diseases, and syphilis.^{3–5}

Few studies exist in the literature that have assessed the effects of the species with respect to its nutritional and therapeutic properties. Pharmacological trials have confirmed the anti-inflammatory, cholinergic, and antimicrobial activities of its leaf extracts.^{6,7} Coumarin (7-O- β -D-glucopyranosyl)nutranocoumarin) was isolated from crude root extract, and was responsible for antibacterial activity against *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*.^{8,9} The authors of the study suggested that the effectiveness of the treating of contaminated wounds could be attributed to coumarins.

Although studies have confirmed the antibacterial and anti-inflammatory activity of *C. nutans* extracts, there are no reports that have assessed its antioxidant activity and toxicity. The assessment of its toxicity is especially important since the plant is consumed as tea. However, it has been well established that most of the pharmacological properties of

Manuscript received 27 December 2019. Revision accepted 13 April 2020.

Address correspondence to: Elton Luís Gasparotto Denardin, PhD, Physico-Chemical Studies and Natural Products Laboratory (LEFQPN), Federal University of Pampa (UNIPAMPA), P.Box 118, Uruguaiiana 97500-970, Brazil, E-mail: eltondenardin@unipampa.edu.br; eltondenardin@gmail.com

29. Tedesco SB, Laughinghouse HD: Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test. In: Environmental Contamination (Srivastava, JK, ed.). InTech, Rijeka, 2012, p. 232.
30. Guerra M, Souza MJ: *How to Observe the Chromosomes: A Guide to Technique in Plant, Animal and Human Cytogenetics [in Portuguese]*. Funpec, São Paulo, 2002, p. 131.
31. Paula MT, Zemolin AP, Vargas AP, et al.: Effects of Hg (II) exposure on MAPK phosphorylation and antioxidant system in *D. melanogaster*. *Environ Toxicol* 2012;29:621–630.
32. Soares JJ, Gonçalves MB, Gayer MC, et al.: Continuous liquid feeding: New method to study pesticides toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Anal Biochem* 2017;537:60–62.
33. Jahromi SR, Haddadi M, Shivanandappa T, Ramesh S R: Neuroprotective effect of *Decalepis hamiltonii* in paraquat-induced neurotoxicity in *Drosophila melanogaster*: Biochemical and behavioral evidences. *Neurochem Res* 2013;38:2616–2624.
34. Aghraz A, Gonçalves S, Rodríguez-Solana R, et al.: Antioxidant activity and enzymes inhibitory properties of several extracts from two Moroccan Asteraceae species. *S Afr J Bot* 2018;118:58–64.
35. Bakr RO: Microscopical and phytochemical investigation of Egyptian Artemisia judaica L. var. Sinaitica tackholm and its free radical scavenging activity. *Int J Pharmacogn Phytochem Res* 2014;6:698–703.
36. Yang H, Dong Y, Du H, Shi H, Peng Y, Li X: Antioxidant Compounds from Propolis Collected in Anhui, China. *Molecules* 2011;16:3444–3455.
37. Petersen M: Rosmarinic acid: New aspects. *Phytochem Rev* 2013;12:207–227.
38. Englmaier P: Identification and quantitative estimation of plant cyclitols and polyols by gas chromatography. *Fresenius' J Anal Chem* 1986;324:338–339.
39. Ekiert H, Kwiecień I, Szopa A, Muszyńska B: Possibilities of arbutin production using plant biotechnology methods. *Pol J Cosmetol* 2012;15:151–162.
40. Urbanska M, Nawrot J, Dawid-Pac R, et al.: Detection of pharmacological active compounds of the Asteraceae family and their chemotaxonomical implications. *J Plant Sci* 2014;2:187–191.
41. Fabri RL, Nogueira MS, Dutra LB, Bouzada MLM: Scio, E. Antioxidant and antimicrobial potential of Asteraceae species. *Braz J Med Plants* 2011;13:183–189.
42. Paula CS, Canteli VCD, Verdam MCS, et al.: Antioxidant activity and preliminary toxicity of the extract and fractions obtained from the leaves and bark of *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.) Cabrera. *Rev Bras Pl Med Campinas* 2014;16:189–195.
43. Polya G: *Biochemical Targets of Plant Bioactive Compounds: A Pharmacological Reference Guide to Sites of Action and Biological Effects*. CRC Press, Taylor & Francis Group, London and New York, 2013, p. 860.
44. Havsteen BH: The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther* 2002;96:67–202.
45. Martín-Aragón S, Benedí J, Villar A: Oxygen active species-scavenger properties of coumarins. *Phytother Res* 1996;10:S75–S78.
46. Wang X, Li X, Chen D: Evaluation of antioxidant activity of isoferulic acid in vitro. *Nat Prod Commun* 2011;6:1285–1288.
47. Li X, Lin J, Gao Y, Han W, Chen D: Antioxidant activity and mechanism of *Rhizoma cimicifugae*. *Chem Cen J* 2012;6:140.
48. Parisi OI, Puoci F, Restuccia D, Farina G, Iemma F, Picci N: Polyphenols and Their Formulations: Different strategies to overcome the drawbacks associated with their poor stability and bioavailability. *Polyphenols Hum Health Dis* 2014;1:29–45.
49. Kenny O, Smyth TJ, Walsh D, Kelleher CT, Hewage CM, Brunton NP: Investigating the potential of under-utilised plants from the Asteraceae family as a source of natural antimicrobial and antioxidant extracts. *Food Chem* 2014;161:79–86.
50. Quintus J, Kovar KA, Link P, Hamacher H: Urinary excretion of arbutin metabolites after oral administration of bearberry leaf extracts. *Plant Med* 2005;71:147–152.
51. Knox KW, Wicken AJ: Immunological properties of teichoic acids. *Bacteriol Rev* 1973;37:215–257.
52. Araújo MGF, Cunha WR, Veneziani RCS: Preliminary phytochemical study and toxicological bioassay against *Artemia salina* Leach larvae. extract obtained from *Solanum lycocarpum* A. St.-Hill (*Solanaceae*) fruits. *Rev Ciênc Farm Básica Apl* 2010; 31:205–209.
53. Albuquerque MRJR, Santos HS, Souza EB, et al.: Composição química volátil e não-volátil de *Eupatorium ballotifolium* Kunth, Asteraceae. *Rev Bras Farmacogn* 2010;20:615–662.
54. Nguta JM, Mbaria JM, Gakuya DW, Gathumbi PK, Kabasa JD, Kiama SG: Biological screening of Kenyan medicinal plants using *Artemia salina* (Artemiidae). *Pharmacol* 2011;2:458–478.
55. Merino FJZ, Oliveira VB, Paula CS, et al.: Phytochemical analysis, antioxidant potential and toxicity of ethanolic crude extract and fractions of the species *Senecio westermanii* Dusén against *Artemia salina*. *Rev Bras Plan Med* 2015;17:1031–1040.
56. Bagatini MD, Silva ACF, Tedesco SB: Use of the *Allium cepa* test system as a bioindicator of genotoxicity of herbal infusions. *Rev Bras Farmac* 2007;17:444–447.
57. Dalla Nora G, Pastori T, Laughinhouse HD, Canto-Dorow TS, Tedesco SB: Antiproliferative and genotoxic effects of *Mikania glomerata* (Asteraceae). *Biocell* 2010;34:85–101.
58. Yuet Ping K, Darah I, Yusuf UK, Yeng C, Sasidharan S: Genotoxicity of *Euphorbia hirta*: an *Allium cepa* assay. *Molecules* 2012;17:7782–7791.
59. Soares JJ, Rodrigues DT, Gonçalves MB, et al.: Paraquat exposure-induced Parkinson's disease-like symptoms and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*: Neuroprotective effect of *Bougainvillea glabra* Choisy. *Biomed Pharmacother* 2017;95: 245–251.
60. Kim SI, Jung JW, Ahn YJ, Restifo LL, Kwon HW: *Drosophila* as a model system for studying lifespan and neuroprotective activities of plant-derived compounds. *J Asia Pacific Entomol* 2011;14: 509–517.
61. Sudati JH, Vieira FAV, Pavin SS, et al.: *Valeriana officinalis* attenuates the rotenone-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Neurotoxicology* 2013;37:118–126.
62. Panchal K, Tiwari A: *Drosophila melanogaster* "a potential model organism" for identification of pharmacological properties of plants/plant-derived components. *Biomed Pharmacother* 2017;89:1331–1345.
63. Niveditha S, Ramesh SR, Shivanandappa T: Paraquat-induced movement disorder in relation to oxidative stress-mediated neurodegeneration in the brain of *Drosophila melanogaster*. *Neurochem Res* 2017;42:3310–3320.
64. Brito Júnior FE, Macedo GE, Zemolin AP, et al.: Oxidant effects and toxicity of *Croton campestris* in *Drosophila melanogaster*. *Pharm Biol* 2016;54:3068–3077.
65. Rzezniczak TZ, Douglas LA, Watterson JH, Merritt TJS: Paraquat administration in *Drosophila* for use in metabolic studies of oxidative stress. *Anal Biochem* 2011;419:345–347.

6 DISCUSSÃO GERAL

Os produtos naturais estão contribuindo cada vez mais para o desenvolvimento da terapia moderna, e os investimentos das indústrias brasileiras e mundiais em pesquisas de novos medicamentos obtidos de plantas está aumentando gradativamente, principalmente em países em desenvolvimento onde o uso de medicamentos a base de plantas é muito utilizado para suas necessidades básicas de saúde.

A seleção de plantas com base em dados da medicina tradicional surge como alternativa para o descobrimento de novos agentes terapêuticos, principalmente nos países que possuem uma grande diversidade vegetal, como o Brasil. A flora nativa brasileira é rica em plantas medicinais e há um número muito reduzido de espécies nativas que foram submetidas a estudos que validem seu uso na terapia tradicional. Assim, há um grande interesse na confirmação do uso tradicional, como também na busca por novos compostos advindos de nossas plantas.

A inexistência de estudos químicos e farmacológicos relacionados com *C. nutans* aliado ao uso para fins terapêuticos na medicina popular do sul do Brasil e o fato da mesma ser nativa do Bioma Pampa, motivaram a realização deste trabalho que descreve o estudo fitoquímico, atividades biológicas e toxicidade de *Chaptalia nuntans* (L.) Polak.

Inicialmente, é importante destacar a excelente atividade antioxidante do extrato bruto das folhas e raízes de *C. nutans* demonstrado pelos vários métodos aos quais foram avaliados. Nos métodos de DPPH e FRAP, os extratos dos órgãos vegetais estudados, não apresentaram resultados satisfatório, já nos ensaios de TBARS, Proteína Carbonil e DCF apresentaram potencial promissor. Os extratos nas três concentrações testadas (0,01, 0,1 e 10 mg/mL) demonstraram capacidade de proteger as células do dano lipídico e protéico, como também, neutralizar diferentes fontes de ERO. No ensaio de TBARS utilizando um agente indutor de estresse oxidativo, os resultados foram mais promissores, revelando o grande potencial dos extratos na concentração de 1000µg/mL, de proteger as células do dano, evitando a peroxidação lipídica, que pode ser definida como um conjunto de eventos bioquímicos resultante da ação dos radicais livres sobre os lípideos insaturados das membranas celulares, levando à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e à morte celular (BENZIE, 1996; LIMA e ABDALLA, 2001). Estudos reforçam que é crucial a implementação de mais de um método antioxidante para avaliar a capacidade antioxidante de um produto natural, uma vez que extratos bruto de plantas possuem uma gama de substâncias químicas complexas (CHOI *et al.*, 2002; TALWAR *et al.*, 2013). Vários estudos demonstram

atividades antioxidantes, de extratos de plantas, utilizando estas metodologias: raízes de *Scorzonera undulate* (ATHMOUNI *et al.*, 2015); raízes e folhas de *Hypochaeris radicata* (SENGUTTUVAN *et al.*, 2012); folhas de *Dasyphyllum tomentosum* (PAULA *et al.*, 2014); folhas de *T. polium* e *C. rotunduns* (BAHRAMIKIA *et al.*, 2009); folhas de *V. megapotamica* (DE BRUM *et al.*, 2013), corroborando com nossos resultados, haja vista a inexistência de estudos semelhantes para *C. nutans*.

A expressiva atividade antioxidante observada para ambos os órgãos vegetais pode ser atribuída à composição química dos extratos que é à base de compostos fenólicos. Estudos mostraram que a capacidade antioxidante do extrato de *P. bleo* (JOHARI e KHONG, 2019) e de *A. grandifolia* (TASKIN *et al.*, 2018) é altamente associada ao conteúdo total de flavonóides e ácidos fenólicos presente na planta, onde os autores recomendam estas espécies como uma boa fonte natural de antioxidante. Dentre os compostos revelados pela análise cromatográfica os ácidos fenólicos estavam entre os polifenóis mais abundantes detectados para ambos os extratos. O ácido isofelúrico e o arbutin estavam presentes tanto nas folhas quanto nas raízes, sendo estes responsáveis pela alta capacidade antioxidante de diversas plantas onde foram encontrados. Wang *et al.* (2011) afirmam que a presença de ácido isofelurico, um composto fenólico, possui poder capacidade antioxidante em meios lipídico e aquoso. Wang *et al.* (2011) e Li *et al.* (2012) estudando rhizoma *Cimicifugae* afirmam que sua alta capacidade de proteger a célula do dano oxidativo se deve a presença do ácido isofelúrico. O Arbutin é um glicosídeo fenólico de origem vegetal, muito conhecido pelo valor medicinal e amplamente utilizado em cosméticos. Estudos comprovaram sua atividade antifúngica e antioxidante (AZADBAKHT *et al.*, 2004) e a sua eficaz no tratamento de infecções do trato urinário (QUINTUS *et al.*, 2005).

Nas folhas de *C. nutans*, além dos compostos citados acima, foi verificado a presença de mais ácidos fenólicos: o ácido quínico, um potente antioxidante de amplo espectro (PERO *et al.*, 2009) que pode ser usado no combate ao câncer de próstata (INBATHAMIZH e PADMINI, 2013) e o ácido 4-fenilbutírico, que atua na regulação do estresse oxidativo atenuando danos celulares e agindo como citoprotetor (WEI *et al.*, 2008). Nas raízes ainda foi revelado a presença do ácido rosmarínico, o qual é um ácido fenólico antioxidante encontrado em muitas plantas medicinais e alimentícias (Parisi *et al.*, 2014) com uma potente capacidade de eliminar os radicais livres (KENNY, 2014). Estudos relataram a presença do ácido rosmarínico no extrato etanólico das raízes de *Arctium minus* (KENNY, 2014) e nas raízes de *Ocimum basilicum* (BAIS *et al.*, 2012) sendo que ambas as espécies com propriedades antioxidantes e antimicrobiana. A capacidade antioxidante está diretamente relacionada ao

conteúdo de compostos fenólicos (CASSOL *et al.*, 2019). Os compostos fenólicos de plantas têm sido extensivamente estudados devido às suas atividades bioativas, com poder de reduzir doenças crônicas, incluindo diabetes, câncer e doenças cardiovasculares (CHANDRASEKARA e SHAHIDI, 2011; MOLLICA *et al.*, 2017) como também pelos benefícios que proporcionam para os seres humanos, por exemplo, antioxidantes naturais utilizados para prolongar a vida útil dos alimentos (LLORENT-MARTINEZ *et al.*, 2017; DERAKHSHAN *et al.*, 2018; ARUWA *et al.*, 2019; QIN *et al.*, 2019; BELHAOUES *et al.*, 2020).

A partir da caracterização química e dos excelentes resultados de pontencial antioxidante das folhas e raízes de *C. nutans*, ambos os órgãos foram submetidos a diferentes ensaios de toxicidade, a fim de verificar a segurança do uso desta planta como medicinal. Como teste preliminar de toxicidade utilizou-se o modelo *A. salina*, o qual é muito utilizado em laboratórios de produtos naturais como bioensaio para o monitoramento de toxicidade de extratos vegetais (ALBUQUERQUE *et al.*, 2014; ARAÚJO *et al.*, 2010). Observou-se que o extrato das folhas ($CL_{50} = 342, 89\mu\text{g/mL}$) é mais tóxico do que das raízes ($CL_{50} = 642,91\mu\text{g/mL}$), o que leva a crer que apesar de ambos os órgãos vegetais possuírem compostos fenólicos, há diferença na composição química de cada um. Resultados semelhantes foram encontrados para *S. westermanii*, espécie da mesma família da *C. nutans*, apresentando excelente atividade antioxidante através de diferentes mecanismos, como também a ausência de toxicidade do extrato bruto frente ao modelo *A. salina* (MERINO *et al.*, 2015).

Da mesma forma que no bioensaio *A. salina*, o extrato das raízes apresentou-se mais satisfatório do que o extrato das folhas no sistema teste *A. cepa*. Sendo este, geralmente empregado para uma avaliação preliminar de efeitos antiproliferativos e genotóxicos de extratos de plantas medicinais, por apresentar elevada sensibilidade e correspondência com testes em mamíferos (AKWU *et al.*, 2019; KHAN *et al.*, 2020; LIMAN *et al.*, 2018; TEDESCO e LAUGHINGHOUSE, 2012). Ambos os extratos não apresentaram genotoxicidade, porém o extrato das raízes, na concentração de 1,5 mg/mL, apresentou potencial antiproliferativo, reduzindo em 49% o índice mitótico e potencial de 50% de proteção do núcleo celular contra o dano causado pelo glifosato, efeitos estes não observado nas folhas. Prajitha & Thoppil, (2016) sugerem que extratos de plantas com ação antiproliferativa têm grande potencial na ação anticarcinogênica. Tais efeitos podem ser atribuídos aos constituintes fitoquímicos do extrato, já que o mesmo apresenta excelente capacidade antioxidante e que os compostos fenólicos, com estas propriedades, geralmente são atóxicos. Dalla Nora *et al.*, (2010) também verificou ausência de genotoxicidade para

Mikania glomerata, sugerindo que a composição química do extrato pode estar relacionada com a preservação das estruturas nucleares.

Importante destacar que os ensaios de *A. salina* e *A. cepa* trouxeram resultados consideráveis acerca da citotoxicidade e genotoxicidade dos extratos de *C. nutans*. Neste sentido, buscou-se um modelo experimental mais complexo para testar a toxicidade e neurotoxicidade dos extratos de *C. nutans*, assim utilizou-se o modelo *Drosophila melanogaster* conhecida como moscas das frutas, a qual é um modelo animal atraente para testar as propriedades biológicas de extratos vegetais, bem como na avaliação da toxicidade de substâncias (MISHRA *et al.*, 2011). É um modelo que vem sendo utilizado há quase um século, por apresentar uma gama de vantagens, tornando-a um ótimo modelo para doenças neurodegenerativas e ensaios de neurotoxicidade (PANCHAL e TIWARI, 2017; SUDATI *et al.*, 2013). Com base nos resultados, verificou-se que ambos os extratos não apresentaram toxicidade, necessitando de uma concentração muito elevada para atingir a dose letal de 50% dos indivíduos, ou seja, o extrato das folhas precisou de 5 dias para chegar a $CL_{50} = 24$ mg/mL e o das raízes levou 6 dias para alcançar a $CL_{50} = 26,05$ mg/mL. Brito Junior *et al.* (2016) verificaram para o extrato bruto das folhas de *Croton campestris* uma CL_{50} de 26.51 mg/mL após 3 dias de tratamento, valores aproximados com os encontrados para *C. nutans* em 5-6 dias de tratamento. Estes resultados vêm a somar com os anteriores, demonstrando que a espécie em estudo não apresenta toxicidade, pois necessita de uma concentração muito elevada para ser tóxica indicando que poderá futuramente ter um uso farmacológico dos extratos de ambos os órgãos estudados.

Adicionalmente, foi testado o efeito dos extratos sobre a intoxicação e o dano locomotor de *D. melanogaster* causado pelo herbicida Paraquat[®] (PQ), sendo este muito utilizado para testes comportamentais e de intoxicação. Na última década, a toxicidade do PQ tem sido descrita após este herbicida ser responsável por danos significativos ao cérebro e pela morte de indivíduos após exposição aguda (BLANCO-AYALA *et al.*, 2014), sendo muito útil para avaliar compostos neuroprotetores contra distúrbios do movimento e neurodegeneração induzidos por PQ (NIVEDITHA *et al.*, 2017). Os extratos das folhas e das raízes na concentração de 10 mg/mL não ocasionou a morte das moscas, sendo estatisticamente igual ao controle negativo, quando co-administrado com o PQ, ambos os extratos demonstraram-se eficazes na proteção contra os danos causados pelo herbicida, o extrato das folhas em 46,6% e das raízes em 64,2%.

O PQ tem sido amplamente utilizado como modelo de estresse oxidativo em *D. Melanogaster* por causar a morte de neurônios dopaminérgicos, pela produção excessiva de

ERO, o que diminui os níveis de dopamina, levando a distúrbios do movimento semelhantes aos de pacientes com Doença de Parkinson (RZEZNICZAK *et al.*, 2011; JAHROMI *et al.*, 2013). Assim, foi avaliado o desempenho locomotor das moscas expostas ao PQ e aos extratos das folhas e raízes da espécie em estudo, através do ensaio de geotaxia negativa que é uma medida comum de comportamento locomotor na qual as moscas se movem verticalmente quando estimuladas (JAHROMI *et al.*, 2013). Os resultados mostraram que nas concentrações mais elevadas (5 e 10 mg/mL) ambos os extratos, co-administrado com o PQ, apresentaram-se eficazes na proteção aos danos cerebrais induzidos pelo PQ, fazendo com que 80% das moscas atingissem o topo do frasco. Soares e colaboradores (2017) observaram resultados semelhantes, onde a ação do extrato de *Bougainvillea glabra* foi capaz de reduzir a taxa de mortalidade e a neurotoxicidade das moscas, quando usado concomitantemente com o PQ. Também, verificou-se que o extrato da raiz de *Decalepis hamiltonii* foi capaz de proteger as moscas da mortalidade e do comprometimento locomotor induzido por PQ (JAHROMI *et al.*, 2013).

Notavelmente, estes resultados reforçam o potencial antioxidante dos extratos das folhas e raízes de *C. nutans* os quais foram efetivos em diminuir a mortalidade das moscas e melhorar sua capacidade locomotora, já que é de conhecimento que estes efeitos causados pelo PQ advêm do estresse oxidativo, pois vários estudos consideram o estresse oxidativo como principal mecanismo de toxicidade induzida pelo PQ (BLANCO-AYALA *et al.*, 2014). A excelente atividade antioxidante dos extratos *in vitro*, pode estar relacionada com este efeito protetor dos danos causados pelo PQ no modelo *in vivo*. Isto é justificado pela presença de compostos antioxidantes identificados nos extratos, já que compostos fenólicos presente nas plantas têm propriedades redox, as quais atuam como antioxidantes (JOHARI e KHONG, 2019), e já foram comprovados seus efeitos protetivos, isoladamente, contra o PQ (JAHROMI *et al.*, 2013).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que:

- as raízes e as folhas de *C. nutans* apresentam maior teor de polifenóis. As folhas com maior teor de polifenóis e flavonoides e as raízes com maior teor de taninos;
- a análise por HPLC-DAD-MS revelou a presença de diferentes compostos fenólicos no extrato bruto das raízes e folhas de *C. nutans*;
- o extrato bruto das folhas de *C. nutans* não foi eficaz contra os microrganismos testados, somente a fração hexânica da folha inibiu com expressividade os microrganismos: *S. epidermidis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*;
- as raízes e as folhas de *C. nutans* apresentaram alto potencial antioxidante. No ensaio de DPPH e FRAP as folhas foram mais promissoras do que as raízes, nos demais ensaios ambos os órgãos vegetais apresentaram potencial de neutralização de diferentes fontes de EROs;
- nos ensaios de toxicidade, os extratos das folhas e as raízes de *C. nutans* não apresentaram ser tóxicas, sendo que para o ensaio da *A. salina* os referidos órgãos vegetais apresentaram uma toxicidade moderada, sendo as folhas mais tóxicas do que as raízes;
- ambos os extratos não impediram a divisão celular e não causaram anormalidades nos cromossomos das células de *A. cepa*, não apresentando citotoxicidade nem genotoxicidade;
- quanto ao potencial de reversão do dano causado pelo glifosato, no índice mitótico, as folhas e as raízes não foram promissoras, já na reversão do dano (anormalidades cromossômicas) as raízes na maior concentração apresentaram capacidade de proteção de 50% dos cromossomos;
- o extrato das folhas de *C. nutans* apresentou baixo grau de toxicidade frente a *D. melanogaster* enquanto o extrato das raízes foi considerado atóxico;
- ambos os extratos foram capaz de proteger as moscas do dano causado pelo Paraquat®, evitando a mortalidade das mesmas, como também evitando o déficit locomotor.

Com base nos resultados, demonstramos pela primeira vez que a constituição química das folhas e raízes de *C. nutans* é à base de compostos fenólicos e que estes possam ser os responsáveis pela alta capacidade antioxidante, efeito neuroprotetor e ausência de toxicidade dos extratos, pois os mesmos apresentaram potencial na prevenção de danos induzidos pelo estresse oxidativo, eliminando os radicais livres *in vitro* e protegendo os organismos dos

efeitos toxicológicos causados pelo glifosato e Paraquat®, *in vivo*. Assim, nossos resultados abrem caminho para o possível desenvolvimento de antioxidantes naturais após estudos adicionais para isolamento de compostos e investigações mais específicas, elucidando os mecanismos de ação dos extratos na redução de fatores disfuncionais envolvidos no processo de neurodegeneração e de futuras aplicações na área farmacológica.

REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO, S. A. *et al.* Compostos bioativos e atividade antioxidante do café. **Ciência e Agrotecnologia**, 34, p.414-420, 2010.
- AIRES, A.; CARVALHO, R.; SAAVEDRA, M. J. Valorization of solid wastes from chestnut industry processing: Extraction and optimization of polyphenols, tannins and ellagitannins and its potential for adhesives, cosmetic and pharmaceutical industry. **Waste Management**, v. 48, p. 457-464, 2016.
- AKWU, N. A.; NAIDOO, Y.; SINGH, M. Cytogenotoxic and biological evaluation of the aqueous extracts of *Grewia lasiocarpa*: An *Allium cepa* assay. **South African Journal of Botany**, v. 125, p. 371-380, 2019.
- ALBUQUERQUE, U.P.; AMORIM, E.L.C. Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae). **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 29, n.2, p. 143-148, 2008.
- ALMEIDA, C. *et al.* O que são plantas medicinais? In: PLANTAS MEDICINAIS DO BIOMA PAMPA NO CUIDADO EM SAÚDE. Brasília, DF: **Embrapa**, 156p. 2017.
- ALVES, C. Q. *et al.* Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- AMARANTE, C. B. *et al.* Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de *Aninga* (*Montrichardia linifera*). **Acta Amazônica** v. 41, n. 3, p. 431 – 434, 2011.
- ANDERSON, J. E *et al.* A blind comparison of simple bench-top bioassay and human tumour cell cytotoxicities as antitumor prescreens. **Phytochem Analysis**, vol. 2, p. 107-111, 1991.
- APIDIANAKIS, Y.; RAHME, L.G. *Drosophila melanogaster* as a model for human intestinal infection and pathology. **Disease Models & Mechanisms**, v.4, p.21-30, 2011.
- ARAÚJO, M.G.F.; CUNHA, W.R.; VENEZIANI, R.C.S. Preliminary phytochemical study and toxicological bioassay against *Artemia salina* Leach larvae. extract obtained from *Solanum lycocarpum* A. St.-Hill (*Solanaceae*) fruits. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.31, n.2, p.205-209, 2010.
- ARUWA, C. E.; AMOO, S.; KUDANGA, T. Phenolic compound profile and biological activities of Southern African *Opuntia ficus-indica* fruit pulp and peels. **LWT**, v. 111, p. 337-344, 2019.
- ATHMOUNI, K. *et al.* Effect of extraction solvents on the biomolecules and antioxidant properties of *Scorzonera undulata* (Asteraceae): application of factorial design optimization phenolic extraction. **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, v. 14, n. 4, p. 313-330, 2015.
- ATOUI, A. K. *et al.* Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, v.89, p. 27, 2005.

- AYRES, M. C. C.; CHAVES, M. H. Constituintes químicos e atividade antioxidante de extratos das folhas de *Terminalia fagifolia* Mart. Et Zucc. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p.1509-1512, 2009.
- AZADBAKHT, M. *et al.* Biological activity of leaf extract and phenolglycoside arbutin of *Pyrus boissieriana* Buhse. **Journal of Medicinal Plants**, v. 2, n. 10, p. 9-14, 2004.
- BADILLA, B.; MORA, G.; POVEDA, L.J. Anti-inflammatory activity of aqueous extracts of five Costa Rican medicinal plants in Sprague-Dawley rats. **Rev Biol Trop**; 47:723-7, 2000.
- BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.3, p.444-447, 2007.
- BAGATINI, P. B. *et al.* The role of calcium channel blockers and resveratrol in the prevention of paraquat-induced parkinsonism in *Drosophila melanogaster*: a locomotor analysis. **Invert.Neurosci.**, v. 11, p. 43-50, 2011.
- BAHRAMIKIA, S.; ARDESTANI, A.; YAZDANPARAST, R. Protective effects of four Iranian medicinal plants against free radical-mediated protein oxidation. **Food Chemistry**, v. 115, n. 1, p. 37-42, 2009.
- BAIS, H. P. *et al.* Root specific elicitation and antimicrobial activity of rosmarinic acid in hairy root cultures of *Ocimum basilicum*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 11, p. 983-995, 2002.
- BARBOSA, K. B. F.; *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BARNES, J.; ANDERSON, L. A.; PHILLIPSON, J. D. (Fitoterápicos. Porto Alegre: **Artmed**. 2012.
- BELHAOUES, S.; AMRI, S.; BENSOUILAH, M. Major phenolic compounds, antioxidant and antibacterial activities of *Anthemis praecox* Link aerial parts. **South African Journal of Botany**, v. 131, p. 200-205, 2020.
- BENNETT, R. N.; WALSGROVE, R. M. Secondary metabolites in plant defense mechanisms. **New Phytologist**, v.127, p. 617-633, 1994.
- BENZIE, I.F.F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **Int. J. Food Sci. Nut**, v.47, p.233-261, 1996.
- BERRY, C.; LA VECCHIA, C.; NICOTERA, P. Paraquat and Parkinson's disease. **Cell Death & Differentiation**, v. 17, n. 7, p. 1115-1125, 2010.
- BLANCO-AYALA, T.; ANDÉRICA-ROMERO, A. C.; PEDRAZA-CHAVERRI, J. New insights into antioxidant strategies against paraquat toxicity. **Free Radical Research**, June; 48(6): 623–640, 2014.
- BONCIU, E. *et al.* An evaluation for the standardization of the *Allium cepa* test as cytotoxicity and genotoxicity assay. **Caryologia**, v. 71, n. 3, p. 191-209, 2018.
- BOVÉ, J. *et al.* Toxin-induced models of Parkinson's disease. **NeuroRx**, v. 2, n. 3, p. 484-494, 2005.

BRASIL. Portaria Interministerial nº 2.960, de 9 de dezembro de 2008. Aprova o Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos e cria o Comitê Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 9 dez. 2008. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2008/pri296009122008.html> Acesso em: 20 mar. 2017.

BRASIL. Portaria nº 1.102, de 12 de maio de 2010. Constitui Comissão Técnica e Multidisciplinar de Elaboração e Atualização da Relação Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos – COMAFITO. **Diário Oficial da União**, Brasília, 12 mai. 2010. Disponível em: <http://www.brasilsus.com.br/legislacoes/gm/104037-1102> Acesso em: 20 mar. 2017.

BRÜNNING, J. “A saúde brota da natureza”, 18ª ed., **Expoente**, Curitiba, pág. 90, 2000.

BURKART, A. Estudio del género de Compuestas Chaptalia con especial referencia a las especies argentinas. **Darwiniana** 6: 505-594 & pl. i-x. 1944.

CABRERA, A.L.; KLEIN, R.M. Compostas - Tribo Mutisieae. In: Reitz R, editor. Flora ilustrada catarinense. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues. 1973.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, vol. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.

CANCELLI, R. R.; EVALDT, A. C. P.; BAUERMAN, S. G. Contribuição à morfologia polínica da família Asteraceae Martinov. no Rio Grande do Sul-Parte I. Pesquisas, Botânicanº58: 347-374. São Leopoldo: **Instituto Anchieta de Pesquisas**, 2007

CASSOL, L.; RODRIGUES, E.; NOREÑA, C. P. Z. Extracting phenolic compounds from Hibiscus sabdariffa L. calyx using microwave assisted extraction. **Industrial crops and products**, v. 133, p. 168-177, 2019.

CERON, K. *et al.* Potencial medicinal e alimentício da vegetação herbácea terrícola ciliar no sul do Brasil. **Interciencia**, 41(6), 393-400, 2016.

CHANDRASEKARA, A.; SHAHIDI, F. Determination of antioxidant activity in free and hydrolyzed fractions of millet grains and characterization of their phenolic profiles by HPLC-DAD-ESI-MSn. **Journal of Functional Foods**, v. 3, n. 3, p. 144-158, 2011.

CHAO, Li-Keng; FANG, Te-Chao. Dialysis catheter-related pulmonary embolism in a patient with paraquat intoxication. **Tzu chi medical journal**, v. 28, n. 4, p. 166-169, 2016.

CHOI, C. W. *et al.* Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant science**, v. 163, n. 6, p. 1161-1168, 2002.

CHOI, S. *et al.* Melatonin protects against oxidative stress in granular corneal dystrophy type 2 corneal fibroblasts by mechanisms that involve membrane melatonin receptors. **Journal of pineal research**, v. 51, n. 1, p. 94-103, 2011.

CLARKE, J.H.R.; RATES, S.M.K.; BRIDI, R. Um alerta sobre o uso de produtos de origem vegetal na gravidez. **Infarma**, v.19, n.1/2, p.41-8, 2007

CORRÊA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: **Imprensa Nacional**, v. 4, p. 55, 662, 1984.

- COSTA, A. F. Farmacognosia. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1031p, 2002.
- COSTA, J. G. M. *et al.* Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Rev Bras Farmacogn**, v.15, n.4, p.304-309, 2005.
- COSTA, M. T. *et al.* Antioxidant and toxicological potential of the Golden trumpet hydroalcoholic stem bark extract. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 4, p. 122942936, 2020.
- CRONQUIST, A. An integrate system of classification of flowering plants. New York: **Columbia University**, p. 1020-1028, 1981.
- CRONQUIST, A. The evolution and classification of flowering plants. 2. ed. New York: **New York Botanical Garden**, p. 417, 446, 514, 1988.
- CUNHA, A. P.da.(coord.)Farmacognosia e fitoquímica. 3 Ed.Lisboa: Editora daFundação Calouste Gulbenkian, p. 38-58,2010.
- DALLA NORA, G. *et al.* Antiproliferative and genotoxic effects of *Mikania glomerata* (Asteraceae). **Biocell**, v. 34, n. 3, p. 95-101, 2010.
- DE BRUM, T. F. *et al.* HPLC analysis of phenolics compounds and antioxidant capacity of leaves of *Vitex megapotamica* (Sprengel) Moldenke. **Molecules**, v. 18, n. 7, p. 8342-8357, 2013.
- DERAKHSHAN, Z. *et al.* Antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic extract of pomegranate peels, juice and seeds. **Food and chemical toxicology**, v. 114, p. 108-111, 2018.
- DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. 2. ed. Chichester: Wiley, 2002.
- DIKALOV, S.; GRIENDLING, K. K.; HARRISON, D. G. Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. **Hypertension**, v.49, n.4, p.717-727, 2007.
- EMERENCIANO, V. P.; *et al.* Flavonoids as chemotaxonomic markers for Asteraceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, n. 9, p. 947-957, 2001.
- EMPINOTTI, C.B.; DUARTE, M.R. Caracteres Anatômicos de arnica-do-campo: *Chaptalia nutans*. **Acta Farmacéutica Bonaerense** 25: p.333-338, 2006.
- FACHINETTO, J.M. *et al.* Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v.17, n.1, p.49-54, 2007.
- FAUS, I. *et al.* Proteinkinase GCN2 mediates responses toglyphosate in Arabidopsis. **BMC Plant Biol.** 15, 1 e12, 2015.
- FERREIRA, S.H. 2002. Academia Brasileira de Ciências: medicamentos a base de plantas medicinais. <http://www.abc.org.br/arquivos/medicamentos/pdf> Acesso em: maio 2016.
- FIKENSCHER, L. H.; HEGNAUER, R. Cyanogenese in Cormophytes. 12. *Chaptalia nutans* a strong cyanogenic plant of Brazil. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 31, n. 3, p. 266-269, 1977.

- FILHO, R. B. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, 2010.
- FRESCURA, V. D.; LAUGHINGHOUSE, H. D.; TEDESCO, S. B. Antiproliferative effect of the tree and medicinal species *Luehea divaricata* on the *Allium Cepa* cell cycle. **Caryologia**, v. 65, n.1, p. 27-33, 2012.
- FUNK, V. A. *et al.* Classification of Compositae. In: Systematics, evolution and biogeography of Compositae. **IAPT, Austria**. p. 171-176, 2009.
- GUO, Ji-D. *et al.* Damage to dopaminergic neurons by oxidative stress in Parkinson's disease. **International journal of molecular medicine**, v. 41, n. 4, p. 1817-1825, 2018.
- HARADA, T.N. Correlação entre os ensaios de citotoxicidade em *Artemia salina* Leach e atividade antineoplásica sobre linhagens de células tumorais para algumas classes de produtos naturais. Dissertação (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 92p., 2009.
- HEINRICH, M. *et al.* Lowland mixe indian medicinal plants: parasitological and microbiological evaluation and initial phytochemical study of *Chaptalia nutans*. **Planta Medica**, v. 57, n. S 2, p. A5-A6, 1991.
- INBATHAMIZH, L.; PADMINI, E. Quinic acid as a potent drug candidate for prostate cancer—a comparative pharmacokinetic approach. **Asian J Pharm Clin Res**, v. 6, n. 4, p. 106-112, 2013.
- JAHROMI, S. R., HADDADI, M., SHIVANANDAPPA, T., & RAMESH, S. R. Neuroprotective effect of *Decalepis hamiltonii* in paraquat-induced neurotoxicity in *Drosophila melanogaster*: biochemical and behavioral evidences. **Neurochemical research**, v.38, n.12, p. 2616-2624, 2013.
- JANOVIK, V. *et al.* Doseamento de polifenóis, flavonóides e taninos no extrato bruto e frações de *Cariniana domestica* (Mart.) Miers. **Saúde (Santa Maria)**, v.35, n.2, 25-28, 2009.
- JENNINGS, B. H. *Drosophila* – a versatile model in biology and medicine. **Materials Today**, 14:5, p. 190-195, 2011.
- JOHARI, M. A.; KHONG, H. Y. Total Phenolic Content and Antioxidant and Antibacterial Activities of *Pereskia bleo*. **Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences**, v. 2019, 2019.
- JUDD, W.S. *et al.* Sistemática vegetal: um enfoque filogenético. 3.ed. Porto Alegre: **Artmed**, 612p. 2009
- JÚNIOR, Francisco EB *et al.* Oxidant effects and toxicity of *Croton campestris* in *Drosophila melanogaster*. **Pharmaceutical biology**, v. 54, n. 12, p. 3068-3077, 2016.
- KENNY, O. *et al.* Investigating the potential of under-utilised plants from the Asteraceae family as a source of natural antimicrobial and antioxidant extracts. **Food Chemistry**, v. 161, p. 79-86, 2014.
- KHAN, I. S. *et al.* Genotoxic effect of two commonly used food dyes metanil yellow and carmoisine using *Allium cepa* L. as indicator. **Toxicology reports**, v. 7, p. 370-375, 2020.

- KIM, S. I. *et al.* *Drosophila* as a model system for studying lifespan and neuroprotective activities of plant-derived compounds. **Asia Pacific Entomology Journal**, v.14, p. 509-517, 2011.
- KRISHNAMURTHY, P.; WADHWANI, A. Antioxidant Enzymes and Human Health. In: El-Missiry MA, editor. Antioxidant Enzyme. Rijeka: InTech; 2012. p. Ch. 01.
- KRUMOVA, K.; GREENE, L. E.; COSA, G. Fluorogenic α -tocopherol analogue for monitoring the antioxidant status within the inner mitochondrial membrane of live cells. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, n. 45, p. 17135-17143, 2013.
- KUPSKA, M. *et al.* Comprehensive two-dimensional gas chromatography for determination of the terpenes profile of blue honeysuckle berries. **Food Chemistry**, v. 152, p. 88-93, 2014.
- LEVINE, R. L. *et al.* Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol**, v. 233, p. 346-357, 1994.
- LI, X. *et al.* Antioxidant activity and mechanism of Rhizoma Cimicifugae. **Chemistry Central Journal**, v. 6, n. 1, p. 140, 2012.
- LIMA, E.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.
- LIMAN, R.; CIĞERCI, İ. H.; GÖKÇE, S.. Cytogenetic and genotoxic effects of Rosmaniric Acid on *Allium cepa* L. root meristem cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 121, p. 444-449, 2018.
- LLORENT-MARTÍNEZ, E. J. *et al.* Evaluation of antioxidant potential, enzyme inhibition activity and phenolic profile of *Lathyrus cicera* and *Lathyrus digitatus*: potential sources of bioactive compounds for the food industry. **Food and Chemical Toxicology**, v. 107, p. 609-619, 2017.
- LOCK, E.A., WILKS, M.F. Handbook of Pesticide Toxicology, 2nd ed. Academic Press, Paraquat, San Diego, p. 1559–1603, 2001.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. Nova Odessa: São Paulo: **Plantarum**, p. 544p, 2002.
- MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VIGA J.R. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova** 25(3): p.429-438, 2002.
- MADDILA, S.; HEMALATHA, K. P. J. Phytochemical Screening and In vitro Antimicrobial Properties of Crude Leaf Extracts of *Wrightia tinctoria* R. Br. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, 6(1), 707-720, 2017.
- MAYROGA, P. *et al.* Comparison of bioassays using the anostracan crustaceans *Artemia salina* and *Thamnocephalus platyurus* for plant extract toxicity screening. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.20, n.6, p.897-903, 2010.
- MCCORMACK, A. L. *et al.* Role of oxidative stress in paraquat-induced dopaminergic cell degeneration. **Journal of neurochemistry**, v. 93, n. 4, p. 1030-1037, 2005.
- MEHRGANA, H. *et al.* Antibacterial activity of *Thymus pubescens* methanolic extract. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 4, p. 291-295, 2008.

- MERCADO, S. A. S.; CALEÑO, J. D. Q. Cytotoxic evaluation of glyphosate, using *Allium cepa* L. as bioindicator. **Science of The Total Environment**, v. 700, p. 134452, 2020.
- MERINO, F. J. Z. *et al.* Phytochemical analysis, antioxidant potential and toxicity of crude ethanol extract and fractions of the species *Senecio westermanii* Dusén against *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 17, n. 4, p. 1031-1040, 2015.
- MEYER, B.N. *et al.* Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 5, p.31-34, 1982.
- MICHEL, P. P.; HIRSCH, E. C.; HUNOT, S. Understanding dopaminergic cell death pathways in Parkinson disease. **Neuron**, v. 90, n. 4, p. 675-691, 2016.
- MINCIS, M. Doença hepática induzida por drogas: aspectos de interesse clínico. **Gastroenterol Endosc Dig.** v. 4, p.102-108, 1985.
- MISRA, J.R. *et al.* Transcriptional regulation of xenobiotic detoxification in *Drosophila*. **Genes Dev.** v. 25, n.17, p.1796-806, 2011.
- MOLLICA, A. *et al.* Anti-diabetic and anti-hyperlipidemic properties of *Capparis spinosa* L.: in vivo and in vitro evaluation of its nutraceutical potential. **Journal of functional foods**, v. 35, p. 32-42, 2017.
- MONGE, M.; ROQUE, N. 2012. Chaptalia. In: Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB16048>>. Acesso em: 18 dez. 2016
- MOREIRA, T.M.S.; SALGADO, H.R.N.; PIETRO, R.C.L.R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Rev. Bras. Farmacogn.** 20: 435-440, 2010.
- MORETTO, A.; COLOSIO, C. Biochemical and toxicological evidence of neurological effects of pesticides: the example of Parkinson's disease. **Neurotoxicology**, v. 32, n. 4, p. 383-391, 2011.
- MORGADO, C. M. A. *et al.* Conservação pós-colheita de goiabas 'kumagai': efeito do estágio de maturação e da temperatura de armazenamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 4, p. 1001-1008, 2010
- NAKAJIMA, J.N. *et al.* (2015). Asteraceae. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB55>>. Acesso em 04 outubro 2017
- NAVARRO, J. A. *et al.* Analysis of dopaminergic neuronal dysfunction in genetic and toxin-induced models of Parkinson's disease in *Drosophila*. **Journal of neurochemistry**, v. 131, n. 3, p. 369-382, 2014.
- NAYEEM, A. A. *et al.* Evaluation of phytochemical and pharmacological properties of *Mikania cordata* (Asteraceae) leaves. **J Pharmacogn Phytother**, v. 3, n.8, p. 118-123, 2011.
- NESOM, G.L. Revision of *Chaptalia* (Asteraceae: Mutisieae) from North America and continental Central America. **Phytologia**, v.78, n.3, p.153-188, 1995.
- NGUTA, J. M. *et al.* Biological screening of Kenyan medicinal plants using *Artemia salina* (Artemiidae). **Pharmacologyonline**, 2, 458-478, 2011.

- NGUTA, J. M. *et al.* Brine shrimp toxicity and in vitro antimicrobial activity of *Piliostigma thonningii* (Schum.) Milne-Redh.[Leguminosae-Caesalpinioideae] from Kenya and Malawi against some pathogens of human and veterinary importance. **Journal of Veterinary Medicine and Animal Health**, v. 5, n. 9, p. 251-256, 2013.
- NIVEDITHA, S.; RAMESH, S. R.; SHIVANANDAPPA, T. Paraquat-induced movement disorder in relation to oxidative stress-mediated neurodegeneration in the brain of *Drosophila melanogaster*. **Neurochemical research**, v. 42, n. 11, p. 3310-3320, 2017.
- NÓBREGA, J. S. *et al.* Avaliação do conhecimento Etnobotânico e popular sobre o uso de plantas medicinais junto a alunos de graduação. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental**, 11(1), p.07-13, 2017.
- NOVAIS, T. S. *et al.* Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, supl. 2, p. 8-11, 2003.
- NURTJAHJA, K. *et al.* Antimicrobial Activity of Endemic Herbs from Tangkahan Conservation Forest North Sumatera to Bacteria and Yeast. HAYATI **Journal of Biosciences** December. v. 20 n. 4, p 177-181, 2013.
- OHIKHENA, F. U.; WINTOLA, O. A.; AFOLAYAN, A. J. Research article toxicity assessment of different solvent extracts of the medicinal plant, *phragmanthera capitata* (Sprenkel) Balle on Brine Shrimp (*Artemia salina*). **International Journal of Pharmacology**, v. 12, p. 701-710, 2016.
- OLIVEIRA, F. P. *et al.* Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. **Rev Bras Farmacogn**, 16: p.510-516, 2006.
- OLIVEIRA, L. S. *et al.* Plantas Medicinais como Recurso Terapêutico em Comunidade do Entorno da Reserva Biológica do Tinguá, RJ, Brasil – Metabólitos Secundários e Aspectos Farmacológicos. **Revista Científica Internacional**, v. 4, n. 17, 2011.
- OLSZEWER, E. Clínica Ortomolecular. 2.Ed. São Paulo: Rocca, 544p. 2008.
- OSAFO, N.; MENSAH, K. B.; YEBOAH, O. K. Phytochemical and pharmacological review of *Cryptolepis sanguinolenta* (Lindl.) Schlechter. **Advances in pharmacological sciences**. Hindawi. Article ID 3026370, 2017.
- OSAWA, C. C.; FELICIO, P. E. D.; GONÇALVES, L. A. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Quim. Nova**, v. 28, n. 4, p.655-663, 2005.
- OVERBECK, G.E. *et al.* Os Campos Sulinos: um bioma negligenciado. In: Campos sulinos conservação e uso sustentável da biodiversidade. **Ministério do Meio Ambiente**, p.63-77, 2009.
- PANCHAL, K.; TIWARI, A. *Drosophila melanogaster* “a potential model organism” for identification of pharmacological properties of plants / plant-derived components. **Biomedicine et Pharmacotherapy**, v.89, p. 1331-1345, 2017.
- PARISI, O. I. *et al.* Polyphenols and their formulations: different strategies to overcome the drawbacks associated with their poor stability and bioavailability. In: **Polyphenols in human health and disease**. Academic Press, 2014. p. 29-45.

- PASINI, E.; KATINAS, L.; RITTER, M. R. The genus *Chaptalia* (Asteraceae, Mutisieae) in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Rodriguésia**, 65(1), 141-158, 2014.
- PASINI, E.; RITTER, M.R. *Trichocline cisplatina* (Asteraceae, Mutisieae), a new species from Southern Brazil and Uruguay. **Phytotaxa** 42: p.19-25, 2012.
- PAULA, C.S. *et al.* Atividade antioxidante e toxicidade preliminar do extrato e frações obtidas das folhas e cascas do caule de *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.) Cabrera. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Campinas, v.16, n.2, p.189-195, 2014.
- PAULA, M. T. *et al.* Effects of Hg(II) Exposure on MAPK Phosphorylation and Antioxidant System in *D. melanogaster*. **Environ Toxicol.**, v. 29, n.6, p. 621-630, 2012.
- PENG, S. C. *et al.* The antimicrobial activity of heyneanol A extracted from the root of Taiwanese wild grape. **J Appl Microbiol** 105: p.485–491, 2008.
- PEREIRA, R.J.; CARDOSO, M.G. Plant Secondary Metabolites and Antioxidant Benefits. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.3, n.4, p.146-152, 2012.
- PERO, Ronald W.; LUND, Harald; LEANDERSON, Tomas. Antioxidant metabolism induced by quinic acid. Increased urinary excretion of tryptophan and nicotinamide. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 23, n. 3, p. 335-346, 2009.
- PHAM-HUY, L. A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. **Int J Biomed Sci.** v.4, n.2, p.89-96, 2008.
- PRADEEPA, S.; SUBRAMANIAN, S.; KAVIYARASAN, V. Evaluation of antimicrobial activity of *Pithecellobium Dulce* pod pulp extract. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v.7, p.32-37, 2014.
- PRAJITHA, V.; THOPPIL, J. E. Genotoxic and antigenotoxic potential of the aqueous leaf extracts of *Amaranthus spinosus* Linn. using *Allium cepa* assay. **South African Journal of Botany**, v. 102, p. 18-25, 2016.
- QIN, F. *et al.* Phenolic composition, antioxidant and antibacterial properties, and in vitro anti-HepG2 cell activities of wild apricot (*Armeniaca Sibirica* L. Lam) kernel skins. **Food and Chemical Toxicology**, v. 129, p. 354-364, 2019.
- QUINTUS, J. *et al.* Urinary excretion of arbutin metabolites after oral administration of bearberry leaf extracts. **Planta medica**, v. 71, n. 02, p. 147-152, 2005.
- RIO GRANDE DO SUL. Portaria SES/RS 588/2017. Institui a Relação Estadual de Plantas Medicinais de interesse do Sistema Único de Saúde no Rio Grande do Sul e listas complementares. Disponível em: <https://saude.rs.gov.br/publicada-portaria-que-institui-relacao-estadual-de-plantas-medicinais> Acesso em: 04 jan. 2018
- RITTER, M. R. *et al.* Plantas usadas como medicinais no município de Ipê, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v.12, n. 2, p. 51-62, jul./dec. 2002.
- RODRIGUES, E.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; PIRES, J. M. Perfil farmacológico e fitoquímico de plantas indicadas pelos caboclos do Parque Nacional do Jaú (AM) como potenciais analgésicas. Parte I. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v. 20, n. 6, p. 981-991, dez. 2010.

RODRIGUES, H.G. *et al.* Efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.13, n.3, p.359-366, 2011

ROQUE, N. Asteraceae : caracterização e morfologia floral / Nádia Roque & Hortensia Bautista ; Ilustração : Natanael Santos & Maria Daniela Guimarães. - Salvador : EDUFBA, p.73, 2008.

RZEZNICZAK, T. Z. *et al.* Paraquat administration in *Drosophila* for use in metabolic studies of oxidative stress. **Anal. Biochem.** v, 419, p. 345-347, 2011.

SABEEN, M. *et al.* Allium cepa assay based comparative study of selected vegetables and the chromosomal aberrations due to heavy metal accumulation. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2019.

SALGUEIRO, A. C. F. *et al.* In vitro and in silico antioxidant and toxicological activities of *Achyrocline satureioides*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 194, p. 6-14, 2016.

SANTOS, Ana *et al.* Aspetos gerais da intoxicação por paraquat em animais domésticos. **Revista Lusófona de Ciência e Medicina Veterinária**, v. 5, 2012.

SANTOS, R.L.; GUIMARÃES, G.P.; NOBRE, M.S.C.; Portela, A.S. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Rev. Bras. Pl. Med** 13: p.486-491, 2011.

SENGUTTUVAN, J.; PAULSAMY, S.; KARTHIKA, K. Phytochemical analysis and evaluation of leaf and root parts of the medicinal herb, *Hypochoeris radicata* L. for in vitro antioxidant activities. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 4, p. S359-S367, 2014.

SERRA, A. DOMINGOS, F.; PRATA, M. M. Paraquat intoxication. **Acta medica portuguesa**, v. 16, n. 1, p. 25-32, 2003.

SHARMA, S.; SHARMA, S.; VIG, A. P. Antigenotoxic potential of plant leaf extracts of *Parkinsonia aculeata* L. using *Allium cepa* assay. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 130, p. 314-323, 2018.

SIEDLE, B. *et al.* The effect of sesquiterpene lactones on the release of human neutrophil elastase. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 65, n. 5, p. 897-903, 2003.

SILVA, L. L. *et al.* Composição química, atividade antibacteriana *in vitro* e toxicidade em *Artemia salina* do óleo essencial das inflorescências de *Ocimum gratissimum* L., Lamiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.5, p.700-705, Out./Nov., 2010.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G. *et al.* Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. UFRGS/Ed. UFSC, p. 229-615, 2010.

SINGH, M.; RAMASSAMY, C. Environmental exposure to pesticides and neurodegenerative diseases. **J Alzheimers Dis Parkinsonism**, v. 2, n. 3, p. e116, 2012.

SOARES, J. J. *et al.* Paraquat exposure-induced Parkinson's disease-like symptoms and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*: Neuroprotective effect of *Bougainvillea glabra* Choisy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.95, p.245-251, 2017.

- SOUTO, F.J.B. - Influência de parâmetros ambientais sobre *Artemia* sp (Branchiopoda: Artemiidae) em uma salina artesanal no estado do Rio Grande do Norte. Dissertação do Curso de Pós Graduação em Ciências Biológicas– Zoologia, Universidade Federal da Paraíba, 137p., 1991.
- SOUZA, F. C. Generation and characterization of isogenic cell lines harboring p53 mutants: A model for the evaluation of p53 and p16INK4A replacement in the presence of p53R175H and p53R248Q. Dissertação (Mestrado em Ciências) –Universidade de São Paulo, São Paulo, 40p., 2011.
- SOUZA, G.C. *et al.* Ethnopharmacological studies on antimicrobial remedies in the South of Brazil. **J. Ethnopharmacol.** 90: p.135-43, 2004.
- SOUZA, L.F. *et al.* Genotoxic potential of aqueous extracts of *Artemisia verlotorum* on the cell cycle of *Allium cepa*. **International Journal of Environmental Studies**, v.67, p. 871-877, 2010.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2012.
- SPRING, O. Chemotaxonomy based on metabolites from glandular trichomes. *Advances in Botanical Research*, London, v. 31, p.153-174, 2000.
- SUDATI, J. H. *et al.* *Valeriana officinalis* attenuates the rotenone-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. **Neurotoxicology**. v. 37, p.118-126, 2013.
- SULUKAN, E. *et al.* An approach to clarify the effect mechanism of glyphosate on body malformations during embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 180, p. 77-85, 2017.
- TALWAR, S. *et al.* Evaluation of in vitro antioxidant and in vivo analgesic potential of *Terminalia paniculata* aqueous bark extract. **Journal of medicinal food**, 2013: v.16, n.12, p.1153-1161, 2013.
- TAŞKIN, D.; ALKAYA, D. B.; DÖLEN, E. Evaluation of Antioxidant Capacity and Analysis of Major Phenolic Compounds in *Achillea grandifolia* by HPLC-DAD with Q-TOF LC/MS Confirmation. **Chiang Mai J. Sci.** v. 45, n. 1, p. 287-298, 2018.
- TEDESCO, S.B.; LAUGHINGHOUSE, H.D. Bioindicator of Genotoxicity : The *Allium cepa* Test. In: Srivastava, J.K. (ed.) *Environmental Contamination*. Rijeka: InTech: p. 232, 2012.
- TRUITI, M.C.T. *et al.* In Vitro antibacterial activity of a 7-O-beta-Dglucopyranosyl-nutanocoumarin from *Chaptalia nutans* (Asteraceae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.98, n.2, p.283-286, 2003.
- TRUITI, M.C.T.; SARRAGIOTTO, M.H. Three 5-methylcoumarins from *Chaptalia nutans*. **Phytochemistry**, v.47, n.1, p.97-99, 1998.
- TÜRKOĞLU, Ş. Evaluation of genotoxic effects of five flavour enhancers (glutamates) on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Toxicology and industrial health**, v. 31, n. 9, p. 792-801, 2015.

- ULEWICZ-MAGULSKA, B.; WESOŁOWSKI, M. Total Phenolic Contents and Antioxidant Potential of Herbs Used for Medical and Culinary Purposes. **Plant Foods for Human Nutrition**. 74: p.61–67, 2019.
- VALKO, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.
- VASCONCELOS, S. M. L. *et al.* Espécies Reativas de Oxigênio e de Nitrogênio, Antioxidantes e Marcadores de Dano. **Química Nova**, v. 30, p.1323-1338, 2007.
- VELLOSA, J. C. R. *et al.* Profile of Maytenus aquifolium action over free radicals and reactive oxygen species. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 43, n. 3, 2007.
- VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero Baccharis (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.
- VICENTINI, V.E.P. *et al.* *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissus sicyoides* L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and test systems. **Acta Scientiarum**, v.23, n.2, p.593-598, 2001.
- WANG, X.; LI, X.; CHEN, D. Evaluation of antioxidant activity of isoferulic acid in vitro. **Natural product communications**, v. 6, n. 9, p. 1934578X1100600919, 2011.
- WEI, H. *et al.* ER and oxidative stresses are common mediators of apoptosis in both neurodegenerative and non-neurodegenerative lysosomal storage disorders and are alleviated by chemical chaperones. **Human molecular genetics**, v. 17, n. 4, p. 469-477, 2008.
- WHO. The World Medicines Situation 2011: Traditional Medicines: Global Situation, Issues and Challenges. **World Health Organization**. Genova, Suíça. 14p. 2011
- WONG, C. M. *et al.* Cell signaling by protein carbonylation and decarbonylation. **Antioxidants & redox signaling**, v. 12, n. 3, p. 393-404, 2010.
- YANG, H. *et al.* Antioxidant Compounds from Propolis Collected in Anhui, China. **Molecules**, 16, 3444-3455, 2011.
- YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó: **Argos**, p. 481-502, 2001.
- YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Química de produtos naturais: novos fármacos e a moderna farmacognosia. 3 ed. Itajaí: Univali, 2012.
- ZADRA, M. *et al.* Antioxidant activity and phytochemical composition of the leaves of *Solanum guaraniticum* A. St.-Hil. **Molecules**, v.17, n.11, p.12560-12574, 2012.
- ZANCANARO, V. *et al.* ação protetora do trolox frente ao dano oxidativo induzido pelo Glifosato e TROP® em modelo animal. **Revista Interdisciplinar de Estudos em Saúde**, v. 8, n. 1, p. 56-70, 2019.