

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROBIOLOGIA**

**Julia de Senna Pereira**

**POTENCIAL GENOTÓXICO, CITOTÓXICO E COMPOSTOS  
FENÓLICOS DE EXTRATOS AQUOSOS DE *Phyllanthus tenellus*  
Roxb. CULTIVADA SOB DUAS CONDIÇÕES DE LUMINOSIDADE**

**Santa Maria, RS  
2020**

**Julia de Senna Pereira**

**POTENCIAL GENOTÓXICO, CITOTÓXICO E COMPOSTOS FENÓLICOS DE  
EXTRATOS AQUOSOS DE *Phyllanthus tenellus* Roxb. CULTIVADA SOB  
DUAS CONDIÇÕES DE LUMINOSIDADE**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Agrobiologia.**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra Solange Bosio Tedesco**

**Santa Maria, RS  
2020**

Pereira , Julia de Senna  
POTENCIAL GENOTÓXICO, CITOTÓXICO E COMPOSTOS FENÓLICOS  
DE EXTRATOS AQUOSOS DE *Phyllanthus tenellus* Roxb.  
CULTIVADA SOB DUAS CONDIÇÕES DE LUMINOSIDADE / Julia de  
Senna Pereira .- 2020.  
76 p.; 30 cm

Orientadora: Solange Bosio Tedesco  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de  
Pós-Graduação em Agrobiologia, RS, 2020

1. Teste Allium cepa 2. Quebra-pedra 3. Sombreamento  
4. Compostos fenólicos 5. Análise preliminar I. Bosio  
Tedesco, Solange II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, JULIA DE SENNA PEREIRA , para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de  
Mestrado**

**POTENCIAL GENOTÓXICO, CITOTÓXICO E COMPOSTOS FENÓLICOS DE  
EXTRATOS AQUOSOS DE *Phyllanthus tenellus* Roxb. CULTIVADA SOB  
DUAS CONDIÇÕES DE LUMINOSIDADE**

elaborada por  
**Julia de Senna Pereira**

como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Mestre em Agrobiologia**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Solange Bosio Tedesco, Dra. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

---

**Viviane Dal-Souto Frescura, Dra. (UFSM)**

---

**Thaís Scotti do Canto Dorow, Dra. (UFN)**

**Santa Maria, 09 de março de 2020**

## **Agradecimentos**

Agradeço aos meus pais pela oportunidade de sempre poder me dedicar aos estudos e por todo o apoio durante a minha vida. Amo vocês.

Ao meu namorado, Douglas, por todo o amor, carinho, apoio, paciência e compreensão nesse período. Te amo.

À minha amiga, Shaiane, por todos esses anos de amizade e apoio. Obrigada por estar sempre ao meu lado.

À minha orientadora, Solange, pela oportunidade de estágio no Laboratório de Citogenética Vegetal. Por toda a orientação e amizade durante estes anos. Muito obrigada.

Às minhas colegas de laboratório, muito obrigada pelas conversas intermináveis, que, por vezes, tomavam conta do dia e deixávamos de estudar e trabalhar mas que rendiam ótimos temas. Obrigada por todos os conselhos durante estes anos.

Obrigada especialmente à Carmine por toda ajuda com o projeto, correção e presença nas apresentações e também, pela ajuda na estufa. Agradeço também à Cassiane, pela ajuda com os dados estatísticos e com a correção da dissertação. E à Kássia, por me orientar no primeiro ano de estágio no laboratório. Obrigada.

À Vanessa, técnica no laboratório de Investigação de Análise Fitoquímica do Departamento de Farmácia Industrial, muito obrigada pela ajuda nas análises.

Ao professor Jerônimo Luiz Andriolo, do Departamento de Fitotecnia, por disponibilizar as bancadas da casa de vegetação.

Ao professor Renato Záchia, pela ajuda com as exsiccatas para o herbário e à professora Thaís Dorow pela identificação da espécie.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós- Graduação em Agrobiologia, pela oportunidade de realização do mestrado.

Ninguém chega a lugar algum sozinho. Muito obrigada!

## RESUMO

### POTENCIAL GENOTÓXICO, CITOTÓXICO E COMPOSTOS FENÓLICOS DE EXTRATOS AQUOSOS DE *Phyllanthus tenellus* Roxb. CULTIVADA SOB DUAS CONDIÇÕES DE LUMINOSIDADE

AUTORA: Julia de Senna Pereira  
ORIENTADORA: Solange Bosio Tedesco

O uso de plantas medicinais como prevenção e tratamento de doenças é uma das maneiras mais antigas de prática medicinal. Uma das plantas de grande interesse medicinal é a *Phyllanthus tenellus* Roxb., conhecida popularmente por quebra-pedra ou quebra-pedra-roxo. É uma planta de pequeno porte, pertencente à família Phyllanthaceae. Suas propriedades medicinais estão relacionadas à ação diurética, hipoglicêmica, analgésica, tratamento das infecções do fígado e, principalmente, em problemas do trato urinário, além de ação antimicrobiana. Estudos relacionados a composição química das plantas e sobre a ação genotóxica são de extrema importância, pois, embora algumas substâncias apresentem efeitos benéficos associados ao efeito terapêutico da planta, algumas dessas substâncias podem causar danos a saúde. Dentre as substâncias encontradas nas plantas, podem-se destacar os compostos fenólicos, que também estão relacionados à ação medicinal de *P. tenellus*. Uma das maneiras de se avaliar a genotoxicidade e citotoxicidade de plantas medicinais é através do teste *Allium cepa*, que avalia o índice de proliferação celular e as alterações cromossômicas encontradas nas raízes de *A. cepa*. O objetivo desta pesquisa foi analisar a ação genotóxica e citotóxica dos extratos aquosos de *P. tenellus* cultivada sob duas condições de luminosidade, realizar análise preliminar dos grupos de compostos e avaliar a concentração de polifenóis totais, flavonoides e taninos totais por espectrofotometria. O experimento ocorreu em ambiente controlado e as plantas foram divididas em dois grupos: com e sem sombreamento, cada um contendo 40 plantas, cultivadas nessas condições por 30 dias. Para o teste *A. cepa* foram preparados extratos da parte aérea de *P. tenellus* em três concentrações de 5 g L<sup>-1</sup>, 10 g L<sup>-1</sup> e 15 g L<sup>-1</sup> para ambos os tratamentos, como controle negativo a água destilada e controle positivo o glifosato 1,5%, foi analisado o índice mitótico e o índice de alterações celulares. Utilizando-se a espectrofotometria, avaliou-se a presença de polifenóis totais, flavonoides e taninos totais para os extratos de 15 g L<sup>-1</sup>. E na análise preliminar dos extratos de 15 g L<sup>-1</sup>, verificou-se a presença de heterosídeos saponínicos, antociânicos, cianogenéticos, taninos condensáveis e hidrolisáveis e a presença de aminogrupos. Conclui-se que, os extratos de *P. tenellus* apresentam atividade citotóxica, inibindo a divisão celular e não possui ação genotóxica. Foi observado que o grupo sem sombreamento apresentou uma maior concentração de polifenóis totais, taninos totais e flavonoides. Na análise preliminar, a presença de heterosídeos antociânicos, saponínicos, taninos condensáveis e hidrolisáveis, aminogrupos.

**Palavras-chave:** Quebra-pedra. Teste *Allium cepa*. Compostos secundários. Sombreamento.

## ABSTRACT

### POTENTIAL GENOTOXIC, CYTOTOXIC AND PHENOLIC COMPOUNDS OF AQUEOUS EXTRACTS FROM *Phyllanthus tenellus* ROXB. CULTIVATED UNDER TWO LUMINOSITY CONDITIONS

AUTHOR: Julia de Senna Pereira  
ADVISOR: Solange Bosio Tedesco

The use of medicinal plants as disease prevention and treatment is one of the oldest forms of medical practice. One of the plants of great medicinal interest is *Phyllanthus tenellus* Roxb., Popularly known as leafflower. It is a small plant, belonging to the Phyllanthaceae family. Its medicinal properties are related to the diuretic, hypoglycemic, analgesic action, treatment of liver infections and, mainly, urinary tract problems, in addition to antimicrobial action. Studies related to the chemical composition of plants and the genotoxic action are extremely important, because, although some substances have beneficial effects associated with the therapeutic effect of the plant, some of these substances can cause damage to health. Among the substances found in plants, phenolic compounds can be highlighted, which are also related to the medicinal action of *P. tenellus*. One of the ways to evaluate the genotoxicity and cytotoxicity of medicinal plants is through the *Allium cepa* test, which assesses the cell proliferation index and the chromosomal aberrations found in the roots of *A. cepa*. The objective of this research was to analyze the genotoxic and cytotoxic action of aqueous extracts of *P. tenellus* grown under two light conditions, to carry out a preliminary analysis of the groups of compounds and to evaluate the concentration of total polyphenols, flavonoids and total tannins by spectrophotometry. The experiment took place in a controlled environment and the plants were divided into two groups: with and without shading, each containing 40 plants, grown under these conditions for 30 days. For the *A. cepa* test, extracts of the aerial part of *P. tenellus* were prepared in three concentrations of 5 g L<sup>-1</sup>, 10 g L<sup>-1</sup> and 15 g L<sup>-1</sup> for both treatments, as negative control to distilled water and control positive the glyphosate 1.5%, the mitotic index and the index of cellular alterations were analyzed. Using spectrophotometry, the presence of total polyphenols, flavonoids and total tannins was evaluated for extracts of 15 g L<sup>-1</sup>. And in the preliminary analysis of extracts of 15 g L<sup>-1</sup>, the presence of saponin, anthocyanin, cyanogenetics, condensable and hydrolyzable tannins and the presence of aminogroups were found. We conclude that *P. tenellus* extracts have cytotoxic activity, inhibiting cell division and have no genotoxic action. It was observed that the group without shading had a higher concentration of total polyphenols, total tannins and flavonoids. In the preliminary analysis, the presence of anthocyanin, saponin heterosides, condensable and hydrolyzable tannins, aminogroups.

**Keywords:** Leafflower. *Allium cepa* test. Secondary compounds. Shading.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Cultivo do material: tratamento com sombreamento (sombrite 70%); Primeiro dia de tratamento ..... 19
- Figura 2-** Cultivo do material: tratamento sem sombreamento; Primeiro dia de tratamento ..... 19
- Figura 3-** Cultivo do material: tratamento com sombreamento; Primeira semana de tratamento ..... 20
- Figura 4-** Cultivo do material: tratamento sem sombreamento; Primeira semana de tratamento ..... 20
- Figura 5-** Cultivo do material: tratamento com sombreamento; Segunda semana de tratamento ..... 21
- Figura 6-** Cultivo do material: tratamento sem sombreamento; Segunda semana de tratamento ..... 21
- Figura 7-** Cultivo do material: tratamento com sombreamento; Terceira semana de tratamento ..... 22
- Figura 8-** Cultivo do material: tratamento sem sombreamento; Terceira semana de tratamento ..... 22
- Figura 9-** Cultivo do material: tratamento com sombreamento; Quarta semana de tratamento ..... 23
- Figura 10-** Cultivo do material: tratamento sem sombreamento; Quarta semana de tratamento ..... 23



<b>Figura 11-</b> Material fresco coletado após 30 dias em ambiente protegido sob os tratamentos; Com sombreamento: 180 gramas de material fresco (à esquerda da foto); Sem sombreamento: 60 gramas de material fresco (à direita da foto) .....	24
<b>Figura 12-</b> Exemplar de <i>Phyllanthus tenellus</i> Roxb .....	24
<b>Figura 13-</b> Extratos nas concentrações de: 5 g L <sup>-1</sup> , 10 g L <sup>-1</sup> e 15 g L <sup>-1</sup> para o tratamento com sombreamento (béqueres da direita); 5 g L <sup>-1</sup> , 10 g L <sup>-1</sup> e 15 g L <sup>-1</sup> para o tratamento sem sombreamento (béqueres da esquerda) .....	25
<b>Figura 14-</b> Alterações encontradas nas células de <i>Allium cepa</i> submetidas às diferentes concentrações do extrato de <i>Phyllanthus tenellus</i> Roxb., indicadas pelas setas: A: anáfase com ponte e quebra cromossômica (T3). B: anáfase irregular. (T4). C: célula com duas prófases (T5). D: metáfase com cromossomos não organizados na placa equatorial (T5). E: duas células com metáfase irregular (T6). F: metáfase irregular (T6).....	37
<b>Figura 15-</b> Determinação dos heterosídeos antociânicos pela alteração do pH (da direita para a esquerda): amostra pura, neutra, básica e ácida para o grupo de tratamento com sombreamento.....	49
<b>Figura 16-</b> Determinação dos heterosídeos antociânicos pela alteração do pH (da direita para a esquerda): amostra pura, neutra, básica e ácida para o grupo de tratamento sem sombreamento.....	50
<b>Figura 17-</b> Determinação dos heterosídeos saponínicos pela formação de espuma (da esquerda para a direita): amostra pura, neutra, ácida e básica para o grupo de tratamento com sombreamento.....	50
<b>Figura 18-</b> Determinação dos heterosídeos saponínicos pela formação de espuma (da direita para a esquerda): amostra pura, ácida, neutra e básica para o grupo de tratamento sem sombreamento.....	50

**Figura 19-** Determinação de heterosídeos cianogénicos pela alteração da coloração do papel picro-sódico.....51

**Figura 20-** Determinação de taninos pela alteração na coloração da amostra com adição de cloreto férrico 1% (da esquerda para a direita): amostra pura do extrato com cloreto férrico 1% em duplicata do tratamento com sombreamento e amostra pura do extrato com cloreto férrico 1% em duplicata do tratamento sem sombreamento .....52

**Figura 21-** Determinação de taninos condensados pela adição de algumas gotas de potássio 5% sobre o insolúvel do tratamento com sombreamento .....52

**Figura 22-** Determinação de taninos condensados pela adição de algumas gotas de potássio 5% sobre o insolúvel do tratamento sem sombreamento .....53

**Figura 23-** Determinação de taninos hidrolisáveis pela adição de acetato de sódio e 10 gotas de solução de cloreto férrico 1% no extrato do tratamento com sombreamento .....53

**Figura 24-** Determinação de taninos hidrolisáveis pela adição de acetato de sódio e 10 gotas de solução de cloreto férrico 1% no extrato do tratamento sem sombreamento .....54

**Figura 25-** Determinação de aminogrupos após nebulização de ninidrina e período de secagem na estufa à temperatura de 100 °C (da esquerda para a direita): placa cromatográfica com extrato do tratamento com sombreamento e placa cromatográfica com extrato do tratamento sem sombreamento .....54

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1-** Tratamentos utilizados no teste *Allium cepa*..... 32

**Tabela 2-** Número de células de *Allium cepa* analisadas em diferentes concentrações do extrato de *Phyllanthus tenellus* Roxb. com seus respectivos índices mitóticos (IM), incluindo células em interfase, em divisão celular (prófase, metáfase, anáfase e telófase) e as alterações encontradas em cada tratamento.  
.....36

**Tabela 3-** Número de células irregulares encontradas em cada tratamento no teste *Allium cepa*..... 37

**Tabela 4-** Teor de polifenóis totais, flavonoides e taninos totais nos extratos aquosos de *Phyllanthus tenellus* Roxb..... 38

**Tabela 5-** Caracterização química da parte aérea de *Phyllanthus tenellus* Roxb.  
.....56

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>13</b>
<b>1.1. METODOLOGIA GERAL .....</b>	<b>18</b>
1.1.1. Cultivo e coleta do material vegetal .....	18
1.1.2. Preparo dos extratos .....	25
<b>CAPÍTULO 2: PRODUÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS, GENOTOXICIDADE E CITOTOXICIDADE DE EXTRATOS AQUOSOS DE <i>Phyllanthus tenellus</i> Roxb. CULTIVADA SOB CONDIÇÕES DISTINTAS DE LUMINOSIDADE.....</b>	<b>26</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>26</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>27</b>
<b>2.1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>28</b>
<b>2.2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
2.2.1. Cultivo.....	30
2.2.2. Coleta e armazenamento do material vegetal .....	31
2.2.3. Teste de genotoxicidade e citotoxicidade .....	31
2.2.4. Preparo das lâminas.....	32
2.2.5. Análise fitoquímica.....	33
2.2.5.1. Determinação dos compostos fenólicos .....	33
2.2.5.2. <b>Determinação de polifenóis totais .....</b>	<b>33</b>
2.2.5.3. Determinação do teor de flavonóides.....	33
2.2.5.4. Determinação do teor de taninos totais .....	34
2.2.6. Análise estatística.....	34
<b>2.3. RESULTADOS .....</b>	<b>35</b>
2.3.1. Teste <i>Allium cepa</i> .....	35
2.3.2. Determinação dos compostos fenólicos .....	38
<b>2.4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>39</b>
<b>2.5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>43</b>

<b>CAPÍTULO 3: ESTUDO FITOQUÍMICO PRELIMINAR DE EXTRATOS AQUOSOS DE <i>Phyllanthus tenellus</i> Roxb. CULTIVADA SOB CONDIÇÕES DISTINTAS DE LUMINOSIDADE .....</b>	<b>44</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>44</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>45</b>
<b>3.1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>46</b>
<b>3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>48</b>
3.2.1. Cultivo e coleta das plantas.....	48
3.2.2. Coleta e armazenamento do material vegetal.....	48
3.2.3. Preparo dos extratos aquosos.....	48
3.2.4. Análise química qualitativa .....	49
3.2.4.1. Determinação de heterosídeos antociânicos e saponínicos .....	49
3.2.4.2. Determinação de heterosídeos cianogenéticos.....	51
3.2.4.3. Determinação de taninos condensáveis e hidrolisáveis .....	51
3.2.4.4. Determinação de aminogrupos .....	54
<b>3.3. RESULTADOS.....</b>	<b>55</b>
3.3.1. Perfil fitoquímico preliminar .....	55
<b>3.4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>56</b>
<b>3.5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>CAPÍTULO 4: DISCUSSÃO GERAL .....</b>	<b>58</b>
<b>CAPÍTULO 5: CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>60</b>
<b>6. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>62</b>

## **CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL**

O uso de plantas como método de prevenção, cura e tratamento de doenças é uma das maneiras mais antigas de prática medicinal utilizada pela humanidade, principalmente através de chás (JUNIOR et al., 2005). Na maioria das vezes, esses chás são utilizados como tratamento alternativo para vários sintomas e enfermidades por pessoas que não possuem acesso aos tratamentos convencionais. Esses tratamentos alternativos são, geralmente, derivados de produtos a base de plantas (CORDELIA, 2012).

Ainda, as plantas medicinais são importantes para a pesquisa farmacológica e o desenvolvimento de fármacos, não somente quando seus constituintes são usados diretamente como agentes terapêuticos, mas também como matérias-primas para a síntese ou modelos para compostos farmacologicamente ativos (WHO, 2003). Porém, o desenvolvimento de novos fármacos requer a investigação de sua eficácia e segurança (VARANDA, 2006).

Muitos estudos sobre plantas medicinais revelam suas qualidades e demonstram cientificamente sua eficiência, caracterizando um aumento na credibilidade do uso dessas plantas, sendo que, esse fator reflete na expansão mundial do mercado de produtos derivados de plantas, como fitoterápicos, suplementos alimentares, cosméticos, entre outros (FUNARI e FERRO, 2005).

Entretanto, autores como Vicentini et al. (2001) e Peron et al. (2008) alertam sobre a presença de substâncias que podem ser mutagênicas e carcinogênicas em chás e infusões de plantas medicinais, sendo necessários ainda mais estudos sobre os efeitos dos usos destas ervas. E, também, Martins et al. (2000), sugerem que os efeitos tóxicos de muitas plantas são ignorados e, desta forma, devem-se utilizar apenas aquelas plantas cujos efeitos sejam bem conhecidos.

O Ministério da Saúde possui uma Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PPNPMF) que incentiva e monitora o uso desses tratamentos alternativos nas unidades básicas de saúde, juntamente ao Sistema Único de Saúde (SUS). E, entre os anos de 2013 e 2015, a busca por tratamentos a base de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos pelo SUS teve um crescimento de 161% (BRASIL, 2016).

Dentre as plantas utilizadas na medicina popular, merecem destaque as espécies do gênero *Phyllanthus*, citadas em livros já no começo do século, como o de Hoehne (1920), que menciona o uso dos ramos e folhas de várias espécies do gênero por possuir “*virtudes diuréticas e dissolvedoras dos cálculos renais...*”.

O gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae) compreende cerca de 800 espécies e no Brasil está representado por mais de 100 espécies, é reconhecido como um dos maiores e mais complexos gêneros de Phyllanthaceae devido à ampla diversidade de caracteres vegetativos e florais (SILVA e SALES, 2004).

As espécies mais utilizadas na medicina popular, do gênero *Phyllanthus* são *Phyllanthus tenellus* Roxb., *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn. e *Phyllanthus niruri* L., conhecidas popularmente por quebra-pedra ou erva-pombinha, que estão presentes na lista de plantas medicinais de interesse ao SUS e a recomendação da concentração do chá de quebra-pedra é de 10 g L<sup>-1</sup> (BRASIL, 2019).

Segundo a literatura, as plantas do gênero *Phyllanthus* podem ser utilizadas para o tratamento de diabetes, em que o extrato das folhas de *Phyllanthus niruri* L. demonstrou ação e eficiência, reduzindo o nível de açúcar no sangue de ratos diabéticos (OKOLI et al., 2010), no tratamento da hepatite B (HARISH e SHIVANANDAPPA, 2006), malária (MUSTOFA et al., 2007) e hiperglicemia (RAPHAEL et al., 2002). Entretanto, o uso mais frequente e conhecido do gênero é no tratamento de cálculo renal ou urolitíase (FREITAS et al., 2002).

Os trabalhos mais comuns em relação ao uso medicinal do gênero *Phyllanthus* são com a espécie *P. niruri*, que apresenta grande semelhança morfológica com a espécie *P. tenellus*, bem como na composição química e na ação terapêutica. Barros et al. (2003; 2006) analisaram extratos de *P. niruri* e observaram que havia ação na inibição da formação de cristais de cálcio e também na internalização desses cálculos pelas células renais, sugerindo que o chá de *P. niruri* tem ação no estágio inicial da formação da pedra nos rins e pode ser utilizada como uma alternativa na prevenção e/ou tratamento de cálculo renal.

A espécie *Phyllanthus tenellus* Roxb. pertencente a família Phyllanthaceae, é uma erva de pequeno porte, com ocorrência confirmada em várias regiões tropicais e subtropicais do mundo (KHANNA et al., 2002; FLORA DO BRASIL, 2020).

*P. tenellus* apresenta diversos sinônimos, tais como: *Phyllanthus tenellus* var. *arabicus* (Müll. Arg.), *Phyllanthus tenellus* var. *garipensis* (Müll. Arg.), *Phyllanthus tenellus* var. *roxburghii* (Müll. Arg.) e *Phyllanthus tenellus* var. *tenellus* (THE PLANTLIST, 2018). *P. tenellus* caracteriza-se por ser uma planta herbácea, com até 60 cm de altura, caracterizada morfológicamente por apresentar, caule simples ou ramificado, folhas simples, alternas, elípticas, pecioladas, glabras, com bordo inteiro e base atenuada, no floema, parênquima cortical. No clorênquima apresenta cristais de oxalato de cálcio (BRASIL, 2010).

As propriedades medicinais da *Phyllanthus tenellus* estão relacionadas com a ação na atividade diurética, hipoglicêmica, atividade analgésica, tratamento das infecções do fígado e, principalmente, em cálculos renais (SILVA; SALES, 2007). Também, no tratamento de úlcera gástrica devido à presença de grande quantidade de compostos secundários (BORRELI e IZZO, 2000; HUANG et al., 2003). Além disso, foi atribuída a essa espécie a ação antimicrobiana (OLIVEIRA et al., 2007). A semelhança morfológica que existe entre *P. tenellus* e *P. niruri* dificulta a identificação, podendo explicar, em parte, o uso destas duas espécies para os mesmos fins na medicina popular (GARCIA et al., 2003).

O levantamento bibliográfico e o conhecimento popular servem de base para identificação dos princípios ativos das plantas medicinais, sendo que, a fitoquímica tem como papel fundamental para o esclarecimento e registro dos constituintes resultantes do metabolismo secundário dos vegetais, através do isolamento e identificação de suas estruturas moleculares (SIMÕES e SPITZER, 2007).

Conforme descrito na literatura, as espécies vegetais podem sintetizar uma variedade de metabólitos que, por sua vez, são classificadas em grupos de acordo com sua função. Os metabólitos primários são essenciais para crescimento, desenvolvimento e garantia da sobrevivência da planta em seu habitat e os metabólitos secundários são usados para sua defesa (MIRANDA et al., 2013).

Os metabólitos secundários representam uma resposta química a interação entre as plantas e o ambiente. Os estímulos gerados no ambiente no qual a planta se encontra, podem redirecionar a rota metabólica, ocasionando a síntese de diferentes compostos. Dentre estes fatores, podem-se ressaltar as interações planta/microrganismos, planta/insetos e planta/planta; idade e estágio de



desenvolvimento, fatores abióticos como luminosidade, temperatura, pluviosidade, nutrição, época e horário de coleta, bem como técnicas de colheita e pós-colheita, segundo Moraes (2009).

E sazonalidade, ritmo circadiano, desenvolvimento vegetal, temperatura, disponibilidade hídrica, incidência de radiação ultravioleta, disponibilidade de nutrientes, altitude e índice de poluição apontados por Gobbo-Neto e Lopes (2007) como fatores que influenciam na produção dos metabólitos secundários das plantas. Sendo que, a temperatura e a luminosidade apresentam papel relevante no desenvolvimento e metabolismo das plantas (SOUZA et al., 2009).

O metabolismo secundário das plantas é responsável pela síntese de diversos compostos, entre eles os compostos fenólicos, que são sintetizados durante o processo de desenvolvimento natural das plantas, sendo essencial para o crescimento e reprodução, entretanto, também podem ser sintetizados devido à presença de alguma condição estressante à planta, como, ferimentos, infecções, radiações UV, dentre outros (NACZK e SHAHIDI, 2004).

Alguns compostos sintetizados pelas plantas podem conter ação genotóxica ou citotóxica e possuem relação com a incidência de tumores, como por exemplo, o efeito tóxico renal causado por espécies que possuem terpenos e saponinas (VOLPATO et al., 2005).

Um exemplo de alteração na síntese de metabólitos secundários nas espécies do gênero *Phyllanthus* é o observado no estudo realizado por Nascimento et al. (2008), quando estudaram três espécies: *Phyllanthus niruri* L., *Phyllanthus tenellus* Roxb. e *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn. Os testes demonstraram a presença de antraquinonas, flavonoides, taninos e terpenoides, e a ausência de antocianinas e cumarinas nas três espécies estudadas, independente do local de coleta. Entretanto, foi possível analisar a variação da composição em outras classes de metabólitos, sendo que, *P. tenellus* apresentou alcaloides, taninos condensáveis e ocorreu variação da presença ou não de saponinas na espécie, de acordo com o local de coleta.

Outra variação de *P. tenellus* neste estudo foi a variação da toxicidade da espécie, sendo que, em uma localidade não apresentou atividade tóxica e nas demais apresentou atividade tóxica.

O número de células em divisão no ciclo celular de um organismo teste, seja pelo aumento ou pelo decréscimo no número de divisões (índice mitótico- IM), pode determinar o nível de toxicidade de uma substância (LEME et al., 2008), bem como a incidência de mutações cromossômicas, como quebras cromatídicas, perda de cromossomos inteiros ou o aparecimento de micronúcleos (SOUZA et al., 2005).

Para determinar o potencial genotóxico e citotóxico de extratos de plantas, pode-se utilizar o teste *Allium cepa* que é um excelente bioindicador vegetal (TEDESCO e LAUGHINGHOUSE, 2012). Este teste está validado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e estudos demonstram que existe correlação positiva do teste *A. cepa* com outros tipos celulares, bem como células animais (HERRERO et al., 2012).

Os efeitos dos extratos aquosos de plantas medicinais sobre o ciclo celular de *A. cepa* têm sido relatados por vários autores (VICENTINI et al., 2001; CAMPAROTO et al., 2002; TEIXEIRA et al., 2003; KNOLL et al., 2006; FACHINETO et al., 2007), sendo que, os principais efeitos observados foram mutagenicidade, antimutagenicidade, assim como, aumento ou diminuição da proliferação celular nas raízes de *A. cepa* tratadas em diferentes concentrações e com diferentes espécies medicinais.

Alguns extratos aquosos de plantas medicinais, tais como *Artemisia verlotorum* Lam., *Mikania glomerata* Spreng. e *Mikania cordifolia* (L. f.) Willd., estudadas por Souza et al. (2010), Dalla Nora et al. (2010) e Dias et al. (2014), respectivamente, apresentaram efeito genotóxico através do teste de *A. cepa*.

O método de avaliação de alterações cromossômicas em raízes de *A. cepa* é um bioindicador primário para testes em infusões de plantas medicinais devido ao seu baixo custo, confiabilidade e concordância com outros testes de genotoxicidade, auxiliando os estudos de prevenção de danos à saúde humana e possíveis indicações para o consumo de chás (UBESSI et al., 2019).

Além disso, é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) como um eficiente teste para análise e monitoramento *in situ* da genotoxicidade de substâncias ambientais (CABRERA e RODRIGUES, 1999).

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivos investigar a presença de efeito genotóxico e citotóxico do extrato aquoso da parte aérea de *Phyllanthus tenellus* Roxb., cultivada sob duas condições de luminosidade, com sombreamento e sem sombreamento. Analisar a concentração de compostos fenólicos presentes nos extratos aquosos das folhas de *P. tenellus* e realizar uma análise preliminar dos grupos de compostos presentes nos extratos aquosos das folhas de *P. tenellus*.

## **1.1. METODOLOGIA GERAL**

### **1.1.1. Cultivo e coleta do material vegetal**

As mudas foram feitas a partir de sementes, adquiridas no estado do Paraná, cultivadas em badejas de germinação e, após o período aproximado de 60 dias, com tamanho de 5 cm, foram transplantadas para vasos de 1 litro com substrato composto de casca de pinus, cinzas, vermiculita, serragem e bioestimulantes. O experimento ocorreu em local protegido no Departamento de Fitotecnia, localizado na Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do sul.

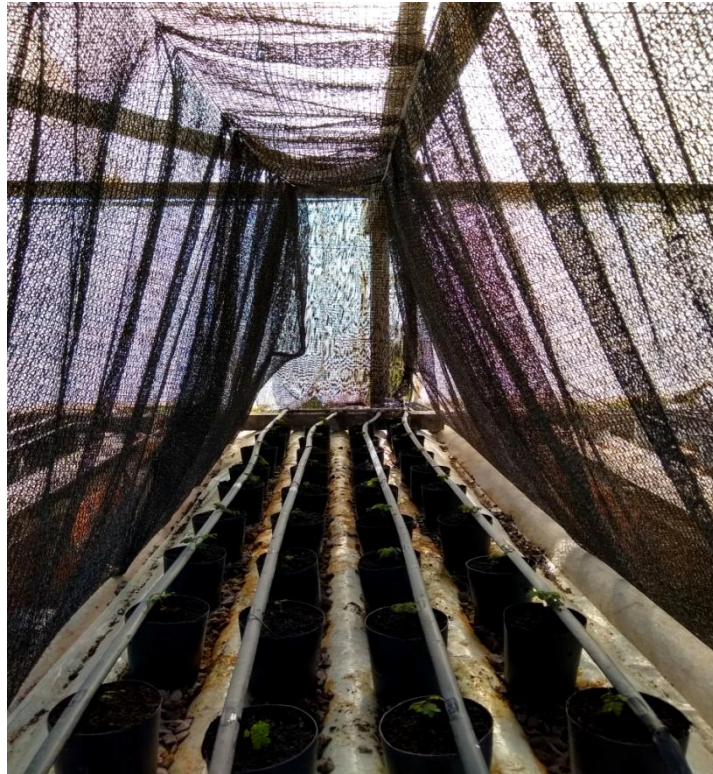
A irrigação ocorreu por meio de mangueira gotejadora, disposta sobre os vasos e acionada seis vezes ao dia, por um período de 15 minutos. O experimento ocorreu em fevereiro a março de 2019, período em que as temperaturas estavam próximas aos 40 °C, o que justifica as seis irrigações por dia e o período de exposição das plantas ao tratamento.

No total, foram 80 mudas dispostas em dois grupos: com sombreamento e sem sombreamento, sendo cada grupo compostos por 40 plantas. O sombreamento foi feito com tela de polipropileno do tipo sombrite 70%. As plantas foram cultivadas nessas condições por um período de 30 dias e após, foram coletadas a parte aérea com tesoura de poda Durante o experimento, as unidades experimentais (vasos) foram trocadas de lugar aleatoriamente.

Durante o cultivo em ambiente protegido, foi possível observar diferenças conforme o decorrer do período de experimento (Figuras 1 a 10) e, após a coleta, foi possível observar a diferença na quantidade de material fresco coletado dos dois grupos de tratamento (Figura 11). Duas exsiccatas foram depositadas no

Herbário SMDB- JBSM, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Santa Maria, RS, com números de acesso 18.321 e 18.322 (Figura 12).

**Figura 1-** Cultivo do material: tratamento com sombreamento (sombrite 70%); Primeiro dia de tratamento.



**Figura 2-** Cultivo do material: tratamento sem sombreamento; Primeiro dia de tratamento.



**Figura 3-** Cultivo do material: tratamento com sombreamento; Primeira semana de tratamento.



**Figura 4-** Cultivo do material: tratamento sem sombreamento; Primeira semana de tratamento.



**Figura 5-** Cultivo do material: tratamento com sombreamento; Segunda semana de tratamento.



**Figura 6-** Cultivo do material: tratamento sem sombreamento; Segunda semana de tratamento.



**Figura 7-** Cultivo do material: tratamento com sombreamento; Terceira semana de tratamento.



**Figura 8-** Cultivo do material: tratamento sem sombreamento; Terceira semana de tratamento.



**Figura 9-** Cultivo do material: tratamento com sombreamento; Quarta semana de tratamento.



**Figura 10-** Cultivo do material: tratamento sem sombreamento; Quarta semana de tratamento.





**Figura 11-** Material fresco coletado após 30 dias em ambiente protegido sob os tratamentos; Com sombreamento: 180 gramas de material fresco (à esquerda); Sem sombreamento: 60 gramas de material fresco (à direita).



**Figura 12-** Exemplar de *Phyllanthus tenellus*.



### 1.1.2. Preparo dos extratos

Após a coleta do material vegetal, a parte aérea foi pesada em 5 g , 10 g e 15 g para os dois grupos de tratamento, com e sem sombreamento e foram armazenadas no congelador, a fim de preservar as propriedades químicas da planta até a preparação dos extratos. As plantas permaneceram por um período de 30 dias no congelador.

Os extratos foram preparados a partir deste material vegetal, com água destilada por infusão de 10 minutos nas concentrações de 5 g L<sup>-1</sup>, 10 g L<sup>-1</sup> e 15 g L<sup>-1</sup> (Figura 13). Importante salientar que recomendação da concentração do chá de quebra-pedra é de 10 g L<sup>-1</sup>.

Os extratos nas três concentrações foram utilizados para o teste *Allium cepa* e apenas na concentração de 15 g L<sup>-1</sup> para a espectrofotometria e para a análise preliminar, visto que, nas demais não foi possível detectar os compostos secundários por serem concentrações muito baixas.

**Figura 13-** Extratos nas concentrações de: 5 g L<sup>-1</sup>, 10 g L<sup>-1</sup> e 15 g L<sup>-1</sup> para o tratamento com sombreamento (béqueres da direita); 5 g L<sup>-1</sup>, 10 g L<sup>-1</sup> e 15 g L<sup>-1</sup> para o tratamento sem sombreamento (béqueres da esquerda).



## **CAPÍTULO 2: PRODUÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS, GENOTOXICIDADE E CITOTOXICIDADE DE EXTRATOS AQUOSOS DE *Phyllanthus tenellus* Roxb. CULTIVADA SOB CONDIÇÕES DISTINTAS DE LUMINOSIDADE**

### **RESUMO**

#### **PRODUÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS, GENOTOXICIDADE E CITOTOXICIDADE DE EXTRATOS AQUOSOS DE *Phyllanthus tenellus* Roxb. CULTIVADA SOB CONDIÇÕES DISTINTAS DE LUMINOSIDADE**

AUTORA: Julia de Senna Pereira  
ORIENTADORA: Solange Bosio Tedesco

*Phyllanthus tenellus* Roxb., é uma planta medicinal utilizada para diversos fins, principalmente, para doenças do trato urinário, cálculo renal, infecções e como diurética. As plantas possuem o metabolismo secundário que é capaz de sintetizar diversos compostos para que possa sobreviver às adversidades do meio em que se encontram. Os compostos fenólicos são oriundos deste metabolismo secundário e a eles estão atribuídos o valor medicinal da espécie. O objetivo deste trabalho é investigar a ação genotóxica e citotóxica dos extratos de *P. tenellus*, bem como realizar uma análise fitoquímica dos compostos fenólicos presentes no extrato. Para o experimento, as mudas de *P. tenellus* foram cultivadas sob duas condições de luminosidade, sem e com sombreamento (70%), por 30 dias em ambiente protegido. Após esse período as plantas foram coletadas e a parte aérea foi utilizada para os extratos aquosos nas concentrações de 5 g L<sup>-1</sup>, 10 g L<sup>-1</sup> e 15 g L<sup>-1</sup>. Para o teste *Allium cepa*, foram utilizados dois controles, o negativo com água destilada e o positivo com glifosato 1,5%. As raízes de *A. cepa* foram expostas aos tratamentos por um período de 24 horas e após, coletadas e fixadas em etanol:ácido acético por 72 horas e armazenadas em etanol 70% sob refrigeração. As células de raízes de *A. cepa* foram analisadas sob microscopia óptica com aumento de 40x. A análise fitoquímica deu-se por meio de espectrofotometria e foram analisados os polifenóis totais, flavonoides e taninos totais para os extratos de 15 g L<sup>-1</sup>. Os padrões utilizados foram: ácido gálico para polifenóis totais, rutina para flavonoides e catequina para taninos, os resultados foram expressos em miligrama de padrão por grama de extrato. Conclui-se que os extratos apresentam atividade citotóxica, inibindo a divisão celular, entretanto não apresentam ação genotóxica, causando alterações cromossômicas nas células de *A. cepa*. Ambos os extratos apresentaram quantidades de polifenóis totais, flavonoides e taninos totais, entretanto o grupo que permaneceu sem a condição de sombreamento apresentou uma maior concentração destes compostos, indicando que a incidência de luz altera a produção destes metabólitos.

**Palavras-chave:** Quebra-pedra. Teste *Allium cepa*. Espectrofotometria. Compostos secundários.

## ABSTRACT

### PRODUCTION OF PHENOLIC COMPOUNDS, GENOTOXICITY AND CITOTOXICITY OF AQUEOUS EXTRACTS OF *Phyllanthus tenellus* Roxb. CULTIVATED UNDER DIFFERENT LUMINOSITY CONDITIONS

AUTHOR: Julia de Senna Pereira  
ADVISOR: Solange Bosio Tedesco

*Phyllanthus tenellus* Roxb., Is a medicinal plant used for several purposes, mainly for diseases of the urinary tract, kidney stones, infections and as a diuretic. Plants have secondary metabolism that is capable of synthesizing various compounds so that it can survive the adversities of the environment in which they find themselves. The phenolic compounds come from this secondary metabolism and they are attributed the medicinal value of the species. The objective of this work is to investigate the genotoxic and cytotoxic action of *P. tenellus* extracts, as well as to perform a phytochemical analysis of the phenolic compounds present in the extract. For the experiment, *P. tenellus* seedlings were grown under two light conditions, without and with shading (70%), for 30 days in a protected environment. After this period, the plants were collected and the aerial part was used for aqueous extracts in concentrations of 5 g L<sup>-1</sup>, 10 g L<sup>-1</sup> and 15 g L<sup>-1</sup>. For the *Allium cepa* test, two controls were used, the negative with distilled water and the positive with 1.5% glyphosate. The roots of *A. cepa* were exposed to treatments for a period of 24 hours and afterwards, collected and fixed in ethanol: acetic acid for 72 hours and stored in 70% ethanol under refrigeration. Root cells of *A. cepa* were analyzed under optical microscopy with 40x magnification. The phytochemical analysis was performed by means of spectrophotometry and the total polyphenols, flavonoids and total tannins were analyzed for extracts of 15 g L<sup>-1</sup>. The standards used were: gallic acid for total polyphenols, rutin for flavonoids and catechin for tannins, the results were expressed in milligrams of standard per gram of extract. It is concluded that the extracts have cytotoxic activity, inhibiting cell division, however they do not have genotoxic action, causing chromosomal aberrations in *A. cepa* cells. Both extracts showed amounts of total polyphenols, flavonoids and total tannins, however the group that remained without the shading condition showed a higher concentration of these compounds, indicating that the incidence of light alters the production of these metabolites.

**Keywords:** Leafflower. *Allium cepa* test. Spectrophotometry. Secondary compounds.

## 2.1. INTRODUÇÃO

Desde muito tempo os seres humanos buscam na natureza recursos para melhorar as suas condições de vida e a relação entre homens e plantas é de extrema importância sendo evidenciada pelo uso de recursos vegetais, como por exemplo, na alimentação e na utilização de plantas com finalidades medicinais (BALICK e COX, 1997; GIRALDI e HANAZAKI, 2010).

O uso de plantas medicinais como método de prevenção e cura de doenças é uma prática muito antiga e, na grande maioria, essas plantas são utilizadas na forma de chá (JÚNIOR et al., 2005). Além disso, as plantas servem como base para a fabricação de diversos medicamentos e outros produtos, tais como cosméticos e suplementos alimentares (WHO, 2003). Entretanto, embora seja amplo o uso de plantas com fins curativos, principalmente em regiões em desenvolvimento, ainda são necessários estudos detalhados para se obter mais informações precisas acerca dos efeitos dessas plantas no organismo humano (SOUZA-MOREIRA et al., 2010).

Dentre as plantas utilizadas na medicina popular podemos citar *Phyllanthus tenellus* Roxb., pertencente à família Phyllanthaceae, antes pertencia à família Euphorbiaceae, porém foi separada por Chase et al. (2002) a partir de dados moleculares e estudos filogenéticos. O gênero *Phyllanthus* é o principal representante da família, com aproximadamente 800 espécies, tornando-se o maior e mais diversificado gênero dessa família (WEBSTER, 1958; 2002a; 2002b; WEBSTER e CARPENTER, 2002). Suas espécies ocorrem em todas as regiões do mundo, sendo 200 delas encontradas nas Américas, 100 na África e 70 em Madagascar e as demais distribuídas pela Ásia e Austrália (MARTINS, 2014).

As espécies do gênero *Phyllanthus* podem ser utilizadas para o tratamento de problemas renais, distúrbios urinários, infecções intestinais, diabetes e hepatite B (OTT et al., 1997; BARROS et al., 2003; FARIAS, 2004). As propriedades medicinais de *Phyllanthus tenellus* Roxb. também chamada popularmente de arrebenta-pedra, erva pombinha, quebra-pedra ou quebra-pedra-roxo (SILVA e SALES 2007), estão relacionadas à atividade dos extratos aquosos das folhas de *P. tenellus*, principalmente em problemas renais.

Nishiura (2004) sugere que a atividade dos extratos de *Phyllanthus tenellus* Roxb. está ligada à ação relaxante do ureter e à ação analgésica, fazendo com que os cálculos renais sejam expelidos mais facilmente, na maioria das vezes sem sangramento ou dor. Além disso, também têm ação medicinal associada à atividade diurética, hipoglicemiante e no tratamento das infecções do fígado (SANDINI et al., 2011).

Segundo Metlen et al. (2008), as plantas, ao responderem a estímulos ambientais alteram a produção de compostos químicos rapidamente. Estes compostos são produzidos a partir do metabolismo secundário das plantas e, esta mudança na produção dos metabólitos secundários, beneficia a defesa ao estresse que a planta está sofrendo e favorece o seu desenvolvimento. Esses metabólitos secundários podem ser exclusivos de determinada espécie ou pertencentes a um grupo de espécies relacionadas (ROCKENBACH et al., 2018).

Alguns compostos oriundos do metabolismo secundário das plantas, como por exemplo, alcaloides, flavonoides, lignanas, fenóis, terpenos e taninos foram isolados das plantas do gênero *Phyllanthus* (CALIXTO et al., 1998), entre esses compostos, a estrutura química do fenol está muito presente, o que caracteriza muitos desses metabólitos como compostos fenólicos (SANDINI, 2011).

Os flavonoides estão relacionados a ação anticarcinogênica, anti-úlceras, antitrombótica, antiinflamatória, antialérgica, moduladora do sistema imunológico, antimicrobiana, vasodilatadora e analgésica e os taninos (condensados e hidrolisáveis), considerados bons marcadores químicos e com ação relacionada à atividade antioxidante e a habilidade de complexarem-se com outras moléculas, incluindo macromoléculas, entre elas proteínas e polissacarídeos (SANDINI, 2011).

Uma das maneiras de se testar a atividade tóxica de determinado extrato ou composto é o teste *Allium cepa*, desenvolvido por Levan (1938). O teste avalia os efeitos dos extratos aquosos de plantas medicinais sobre o ciclo celular de *A. cepa* e tem sido relatado por vários autores (VICENTINI et al., 2001; CAMPAROTO et al., 2002; TEIXEIRA et al., 2003; KNOLL et al., 2006; FACHINETO et al., 2007; FRESCURA et al., 2013; KUHN et al., 2015; PEREIRA et al., 2019). Os principais efeitos observados por esses autores foram mutagenicidade, antimutagenicidade,

assim como o aumento e diminuição da proliferação celular (citotoxicidade) da ponta das raízes de *A. cepa* tratadas em diferentes concentrações.

O método de avaliação de alterações cromossômicas em raízes de *Allium cepa* é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (PISQ, OMS) e pelo Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) como um eficiente teste para análise e monitoramento *in situ* da genotoxicidade e citotoxicidade de substâncias ambientais (CABRERA e RODRIGUEZ, 1999). Além de sua grande utilização nos testes de citotoxicidade e genotoxicidade de plantas medicinais, o sistema teste de *A. cepa* pode ser utilizado para o monitoramento da poluição ambiental e avaliação do potencial mutagênico de muitos compostos químicos (BAGATINI et al., 2007).

Diante disto, esta pesquisa teve como objetivo analisar o efeito genotóxico e citotóxico, através do teste *Allium cepa*, dos extratos aquosos da parte aérea de *Phyllanthus tenellus* Roxb. cultivada sob duas condições de luminosidade, com e sem sombreamento e também, analisar os compostos fenólicos encontrados nos dois tratamentos através da espectrofotometria.

## **2.2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.2.1. Cultivo**

As mudas de *Phyllanthus tenellus* Roxb. foram produzidas a partir de sementes da marca Naturals<sup>®</sup>, adquiridas no estado do Paraná, cultivadas em bandejas de germinação e, após atingirem o tamanho aproximado de 5 cm (cerca de 60 dias), foram transplantadas para os vasos de 1 litro preenchido com substrato Maxfertil<sup>®</sup>, o qual apresenta na formulação casca de pinus, cinzas, vermiculita, serragem e bioestabilizados.

O cultivo foi realizado em ambiente protegido no Departamento de Fitotecnia, localizada na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul (S: 29° 42' 23"; W: 53° 43' 15" e 95 metros de altitude ao nível do mar). A irrigação foi por meio de mangueira gotejadora disposta sobre os vasos e acionada automaticamente por seis vezes durante o dia e as plantas receberam apenas água durante o experimento.

No total, foram 80 mudas divididas em dois grupos: 40 mudas cultivadas com sombreamento e 40 mudas cultivadas sem sombreamento. O sombreamento foi feito com tela de sombreamento do tipo sombrite 70% e as plantas permaneceram por um período de 30 dias em ambiente protegido. O experimento ocorreu no período de fevereiro a março de 2019. As unidades experimentais (vasos) foram trocadas de lugar aleatoriamente na bancada durante o período de cultivo, mantendo sempre a divisão dos dois grupos.

### **2.2.2. Coleta e armazenamento do material vegetal**

Após 30 dias de cultivo em sistema protegido, em condição de sombreamento e sem sombreamento foi realizada a coleta da parte aérea. O material foi pesado e armazenado no congelador por 30 dias.

O material foi pesado em três concentrações: 5 gramas, 10 gramas e 15 gramas, para os grupos com e sem sombreamento. A parte aérea de *Phyllanthus tenellus* Roxb. foi utilizada para a preparação dos extratos aquosos por infusão durante 10 minutos, com água destilada e, após o preparo, foram resfriados a temperatura ambiente para a realização do teste *Allium cepa*.

Duas exsiccatas foram depositadas no Herbário SMDB- JBSM, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, com número de acesso 18.321 e 18.322.

### **2.2.3. Teste de genotoxicidade e citotoxicidade**

A análise do potencial genotóxico e citotóxico dos extratos de *Phyllanthus tenellus* Roxb. foi realizada no Laboratório de Citogenética Vegetal e Genotoxicidade da UFSM por meio do sistema teste *Allium cepa*.

Foram analisadas as células da região meristemática do bioindicador vegetal, a fim de observar possíveis alterações cromossômicas e no número de divisões celulares. Os tratamentos foram divididos conforme a Tabela 1. Cada tratamento contou com cinco repetições de bulbos de *Allium cepa*. Os bulbos foram previamente testados para a obtenção de um material com o mínimo de alterações cromossômicas em ambiente natural.

Os bulbos, primeiramente tiveram suas raízes antigas raspadas e depois foram colocadas para enraizamento em água destilada por quatro dias. Após esse



período, os bulbos foram transferidos para os extratos aquosos de cada tratamento de *Phyllanthus tenellus* Roxb. (com e sem sombreamento).

Para o teste de genotoxicidade e citotoxicidade os extratos aquosos da parte aérea de *P. tenellus* foram preparados por infusão de 5 g L<sup>-1</sup>, 10 g L<sup>-1</sup> e 15 g L<sup>-1</sup>. Sendo a água destilada utilizada como controle negativo do experimento e glifosato 1,5% como controle positivo, conforme Souza et. al. (2010).

Os bulbos permaneceram em contato com os tratamentos por um período de 24 horas. Posteriormente, as raízes foram coletadas e fixadas em etanol:ácido acético (3:1) por 24 horas. O material, após ser coletado e fixado, foi armazenado em frascos contendo etanol 70% e armazenado sob refrigeração até ser utilizado para análise.

**Tabela 1-** Tratamentos utilizados no teste *Allium cepa*.

<b>Tratamentos</b>	
<b>Controles</b>	T1- Água destilada
	T2- Glifosato 1,5%
<b>Extrato de <i>Phyllanthus tenellus</i> Roxb. com sombreamento</b>	T3- 5 g L <sup>-1</sup>
	T4- 10 g L <sup>-1</sup>
	T5- 15 g L <sup>-1</sup>
<b>Extrato dc <i>Phyllanthus tenellus</i> Roxb. sem sombreamento</b>	T6- 5 g L <sup>-1</sup>
	T7- 10 g L <sup>-1</sup>
	T8- 15 g L <sup>-1</sup>

#### 2.2.4. Preparo das lâminas

Para análise e contagem das células foram confeccionadas duas lâminas por bulbo e contadas 500 células por lâmina. As lâminas foram preparadas utilizando a metodologia adaptada de Guerra e Souza (2002), onde as raízes foram hidrolisadas em HCl 1N por 5 minutos, em seguida lavadas em água destilada e tiveram a região meristemática retirada e corada com orceína acética 2%.

A região meristemática foi esmagada e sobre este material foi aplicado um lamínula de vidro. Com auxílio de microscopia óptica em aumento de 40X foram analisadas 500 células por lâmina, levando em consideração as fases da divisão celular e alterações cromossômicas encontradas. Posteriormente foi calculado o

índice mitótico (IM) dos tratamentos, baseando-se na porcentagem de células em divisão e a quantidade de alterações cromossômicas encontradas.

## **2.2.5. Análise fitoquímica**

### **2.2.5.1. Determinação dos compostos fenólicos**

A determinação dos compostos fenólicos nos extratos aquosos da parte aérea de *Phyllanthus tenellus* Roxb. foram realizadas no Departamento de Farmácia Industrial, no laboratório de Investigação de Análise Fitoquímica, pertencente ao Centro de Ciências da Saúde, localizado na Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria- RS. Todas as análises foram realizadas em triplicata e apenas na concentração do extrato aquoso de 15 g L<sup>-1</sup> de parte aérea de *P. tenellus*.

### **2.2.5.2. Determinação de polifenóis totais**

O teor de polifenóis totais foi baseado no método do Folin-Ciocalteu com modificações (RUSAK et al., 1993; CHANDRA et al., 2004). Primeiramente, os extratos de *Phyllanthus tenellus* Roxb. foram preparados em uma concentração de 2% (v/v) em água. Na mesma, acrescentou reativo de Folin-Ciocalteu, sendo incubada no escuro por cinco minutos. Ao final desse tempo, foi adicionado carbonato de sódio 10% e a mesma foi novamente incubada por dez minutos. Em seguida, foi realizada a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro no comprimento de onda 730 nm.

Os teores de polifenóis totais nos extratos foram calculados através de uma curva padrão utilizando o padrão de ácido gálico nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 µg mL<sup>-1</sup>, obtendo-se uma equação da reta do ácido gálico,  $y=0,029x + 0,022$  ( $R^2 = 0,991$ ). Os resultados foram expressos em miligrama de ácido gálico por grama de extrato.

### **2.2.5.3. Determinação do teor de flavonoides**

A dosagem dos flavonoides foi realizada de acordo com Rio (1996) e Rusak et al. (1993) com modificações. Em 1 mL de extrato de *Phyllanthus tenellus* Roxb. foi adicionado uma solução de cloreto de alumínio 5% em metanol e metanol 70%,

sendo incubada por dez minutos. Ao final desse tempo foi realizada a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro no comprimento de onda 425 nm.

Os teores de flavonoides nos extratos foram calculados através de uma curva padrão utilizando o padrão de rutina nas concentrações de 10, 20, 40, 50, 60 e 80  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , obtendo-se uma equação da reta da rutina,  $y=0,011x + 0,042$  ( $R^2 = 0,997$ ). Os resultados foram expressos em miligrama de rutina por grama de extrato.

#### **2.2.5.4. Determinação do teor de taninos totais**

O teor de taninos foi obtido pelo método da vanilina, seguindo a metodologia proposta por Agostini Costa et al. (1999). Nessa técnica, foi necessário um preparo prévio da amostra. Foi preparada uma solução de extrato de *Phyllanthus tenellus* Roxb. com concentração de 1%, utilizando como solventes: metanol 20% e ácido clorídrico 1%. Em seguida, a mesma foi incubada a temperatura ambiente (25 °C) e sob proteção da luz, por oito horas. Ao final desse tempo, foi adicionado o reagente de vanilina 4% e a mesma foi novamente incubada por quinze minutos. Em seguida, foi realizada a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro no comprimento de onda 490 nm.

Os teores de taninos nos extratos foram calculados através de uma curva padrão utilizando o padrão de catequina nas concentrações de 50, 150, 300, 500, 700 e 800  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , obtendo-se uma equação da reta da catequina,  $y=0,009x + 0,071$  ( $R^2 = 0,989$ ). Os resultados foram expressos em miligrama de catequina por grama de extrato.

#### **2.2.6. Análise estatística**

O delineamento experimental utilizado foi o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC). Os dados referentes à genotoxicidade e citotoxicidade foram submetidos ao teste Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ) a 5% de probabilidade de erro, com auxílio do programa BioEstat 5.3 (AYRES et al., 2007).

Nos dados da análise fitoquímica foi realizado a análise de variância ( $p<0,05$ ) e o teste de comparação de médias por Scott e Knott em nível de 5% de probabilidade de erro, com o auxílio do programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

## 2.3. RESULTADOS

### 2.3.1. Teste *Allium cepa*

Na Tabela 2 são apresentados os resultados da análise do efeito antiproliferativo, ou seja, o efeito citotóxico dos extratos aquosos de *Phyllanthus tenellus* Roxb.

A atividade antiproliferativa (Tabela 2) dos extratos aquosos de *P. tenellus* pode ser observada pela diminuição no número de divisões celulares quando comparados ao controle de água destilada. Houve diferença significativa dos tratamentos 10 g L<sup>-1</sup> com sombreamento (T4), 15 g L<sup>-1</sup> com sombreamento (T5), 5 g L<sup>-1</sup> sem sombreamento (T6), 10 g L<sup>-1</sup> sem sombreamento (T7) e 15 g L<sup>-1</sup> sem sombreamento (T8) quando comparados a água, demonstrando que os extratos possuem ação antiproliferativa, isto é, diminuem o número de divisões celulares da raiz de *Allium cepa*. Apenas o tratamento de 5 g L<sup>-1</sup> com sombreamento (T3) não diferiu do controle água destilada.

Os tratamentos sem sombreamento T7 (10 g L<sup>-1</sup>) e T8 (15 g L<sup>-1</sup>) apresentaram os menores índices mitóticos (IM), sendo inferiores até mesmo em relação ao controle positivo de glifosato 1,5% (T2) que normalmente expressa índice mitótico menor que a água, isso pode indicar que o fato das plantas serem cultivadas com maior disponibilidade de luz, além do aumento da concentração dos extratos, interfere no ciclo celular das raízes de *Allium cepa cepa* e aumentam ação antiproliferativa dos extratos.

A Tabela 3 apresenta os resultados do teste genotóxico, ou seja, as alterações encontradas nos tratamentos com o extrato aquoso de *Phyllanthus tenellus* Roxb. Foi possível observar que, quando comparados os tratamentos com o controle positivo em glifosato 1,5% (T2), apenas os tratamentos T3 (5 g L<sup>-1</sup> com sombreamento), T7 (10 g L<sup>-1</sup> sem sombreamento) e T8 (15 g L<sup>-1</sup> sem sombreamento) diferiram significativamente.

Entretanto, os tratamentos T7 e T8 apresentaram uma alteração e nenhuma alteração, respectivamente. Já o extrato de 5 g L<sup>-1</sup> com sombreamento (T3) apresentou 14 alterações cromossômicas, diferindo significativamente do controle positivo de glifosato 1,5%.

Com isso, podemos inferir que apenas o extrato T3 apresenta ação genotóxica, aumentando o número de alterações cromossômicas nas células de raiz de *Allium cepa*. Os demais tratamentos não foram considerados genotóxicos. Foram observadas alterações cromossômicas que estão apresentadas na Figura 14. Destaca-se que a maioria das alterações foram encontradas na fase de metáfase.

**Tabela 2-** Número de células de *Allium cepa* analisadas em diferentes concentrações do extrato de *Phyllanthus tenellus* Roxb. com seus respectivos índices mitóticos (IM), incluindo células em interfase, em divisão celular (prófase, metáfase, anáfase e telófase) e as alterações encontradas em cada tratamento.

Tratamentos	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<b>Células analisadas</b>	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000
<b>Interfase</b>	4809	4958	4826	4921	4945	4952	4995	4998
<b>Prófase</b>	113	23	90	33	18	26	4	2
<b>Metáfase</b>	31	2	35	11	7	8	0	0
<b>Anáfase</b>	28	0	10	9	9	3	0	0
<b>Telófase</b>	18	12	25	17	13	6	0	0
<b>Células irregulares</b>	1	5	14	9	8	5	1	0

**IM (%)** 3,82 a\* 0,84 bcde 3,48 a 1,58 bcde 1,10 bcde 0,96 bcde 0,10 fg 0,04 g

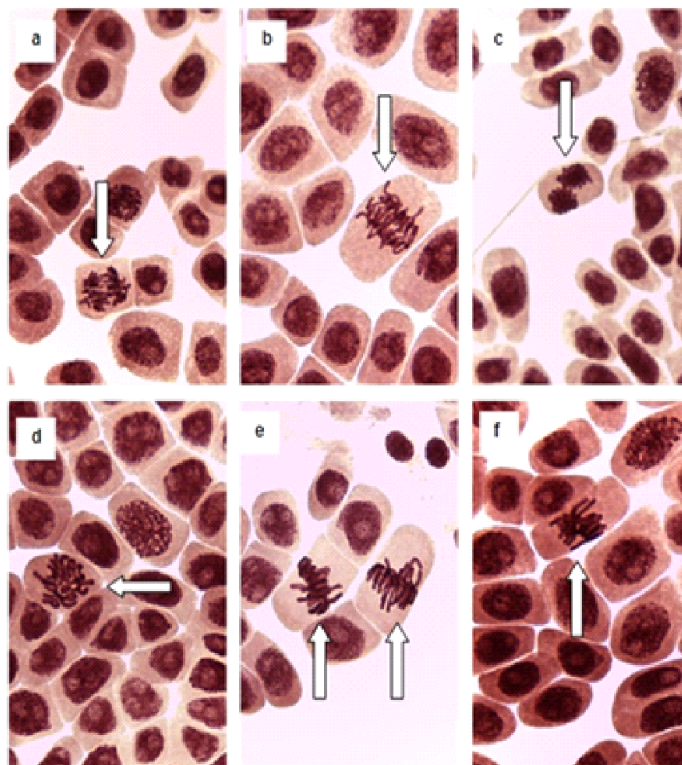
**T1=** controle negativo (água destilada); **T2=** controle positivo (glifosato 1,5%). **Tratamento com sombreamento: T3=** extrato aquoso de *Phyllanthus tenellus* Roxb. 5 g L<sup>-1</sup>; **T4=** extrato aquoso de *P. tenellus* 10 g L<sup>-1</sup>; **T5=** extrato aquoso de *P. tenellus* 15 g L<sup>-1</sup>. **Tratamento sem sombreamento: T6=** extrato aquoso de *P. tenellus* 5 g L<sup>-1</sup>; **T7=** extrato aquoso de *P. tenellus* 10 g L<sup>-1</sup>; **T8=** extrato aquoso de *P. tenellus* 15 g L<sup>-1</sup>. \*Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste  $\chi^2$  em nível de 5% de probabilidade de erro.

**Tabela 3-** Número de células irregulares encontradas em cada tratamento no teste *Allium cepa*.

Tratamentos	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<b>Células analisadas</b>	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000
<b>Células em divisão</b>	190	37	160	70	47	43	4	2
<b>Células irregulares*</b>	1 ef	5bcd	14 a	9bcd	8bcd	5bcd	1ef	0 f

**T1**= controle negativo (água destilada); **T2**= controle positivo (glifosato 1,5%). Tratamento com sombreamento: **T3**= extrato aquoso de *Phyllanthus tenellus* Roxb. 5 g L<sup>-1</sup>; **T4**= extrato aquoso de *P. tenellus* 10 g L<sup>-1</sup>; **T5**= extrato aquoso de *P. tenellus* 15 g L<sup>-1</sup>. **Tratamento sem sombreamento: T6**= extrato aquoso de *P. tenellus* 5 g L<sup>-1</sup>; **T7**= extrato aquoso de *P. tenellus* 10 g L<sup>-1</sup>; **T8**= extrato aquoso de *P. tenellus* 15 g L<sup>-1</sup>. \*Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste  $\chi^2$  em nível de 5% de probabilidade de erro.

**Figura 14-** Alterações encontradas nas células de *Allium cepa* submetidas às diferentes concentrações do extrato de *Phyllanthus tenellus* Roxb., indicadas pelas setas: A: anáfase com ponte e quebra cromossômica (T3). B: anáfase irregular. (T4). C: célula com duas prófases (T5). D: metáfase com cromossomos não organizados na placa equatorial (T5). E: duas células com metáfase irregular (T6). F: metáfase irregular (T6).



### 2.3.2. Determinação dos compostos fenólicos

Na análise fitoquímica realizada por espectrofotometria nos extratos aquosos da parte aérea de *Phyllanthus tenellus* Roxb., foi possível analisar as concentrações dos compostos que estão apresentados na Tabela 4. Compreendem os resultados para polifenóis totais, flavonoides e taninos totais dos extratos aquosos da parte aérea de *P. tenellus* na concentração de 15 g L<sup>-1</sup> cultivada com e sem sombreamento.

O tratamento sem sombreamento obteve as maiores concentrações de polifenóis totais, flavonoides e taninos totais quando comparado ao tratamento com sombreamento. A presença de polifenóis totais, flavonoides e taninos totais pode ser observada em maiores concentrações quando as plantas foram cultivadas sem sombreamento, sendo as médias de 198,44 de polifenóis totais, 140,47 de flavonoides e 43,78 de taninos totais.

Esse resultado pode indicar que o cultivo de *Phyllanthus tenellus* Roxb. com maior incidência de luz proporcionou um aumento na temperatura, e conseqüentemente causou um estresse na planta que, em resposta ao meio em que se encontrava, produziu uma maior quantidade de polifenóis totais, taninos totais e flavonóides para compensar às adversidades do meio.

**Tabela 4-** Teor de polifenóis totais, flavonoides e taninos totais nos extratos aquosos de *Phyllanthus tenellus* Roxb.

Tratamentos	Polifenóis Totais mg g <sup>-1</sup>	Flavonoides mg g <sup>-1</sup>	Taninos Totais mg g <sup>-1</sup>
<b>Com Sombreamento</b> 15 g L <sup>-1</sup>	114,78 b	81,66 b	30,32 b
<b>Sem Sombreamento</b> 15 g L <sup>-1</sup>	198,44 a	140,47 a	43,78 a
<b>Média Geral</b>	156,61	111,07	37,05
<b>CV (%)</b>	0,83	3,62	4,55

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott e Knott em nível de 5% de probabilidade de erro. CV: Coeficiente de Variação.

## 2.4. DISCUSSÃO

A partir dos dados apresentados na Tabela 2, referente à ação citotóxica dos extratos, é possível observar que com o aumento da concentração do extrato o índice mitótico teve um decréscimo nos dois grupos de tratamentos, com exceção do tratamento com sombreamento T3 que não obteve diferença significativa quando comparado ao tratamento água destilada (T1).

A ação antiproliferativa dos extratos de *Phyllanthus tenellus* Roxb. ficou mais evidenciada no grupo de tratamentos sem sombreamento (T7 e T8), apresentando índices mitóticos (IM) menores até mesmo que o controle positivo de glifosato 1,5%.

Esta diferença de índice mitótico, evidenciada no grupo de tratamento sem sombreamento, pode estar relacionada ao fato de que houve maior incidência de luz direta, fazendo com que as plantas sofressem um estresse maior por conta das altas temperaturas da época do ano (de fevereiro a março de 2019) e pela maior incidência de raios UV, e acabassem produzindo mais polifenóis totais, flavonóides e taninos totais interferindo no ciclo celular das raízes de *Allium cepa*.

Os compostos fenólicos são substâncias essenciais para o crescimento e a reprodução dos vegetais, além disso, são responsáveis pela pigmentação e pela proteção contra raios ultravioleta (ALVES et al., 2013), o que justifica a maior concentração destes compostos estar presente no grupo de tratamentos sem sombreamento.

Ao analisar as alterações cromossômicas, a ação genotóxica (Tabela 3), pode-se observar que o extrato de 5 g L<sup>-1</sup> com sombreamento apresentou diferença significativa (com 14 alterações cromossômicas) quando comparado com o controle positivo de glifosato 1,5%. Já os demais extratos aquosos não foram considerados genotóxicos. Os tratamentos sem sombreamento de 10 g L<sup>-1</sup> (T7) e 15 g L<sup>-1</sup> (T8) apresentaram o menor número de alterações cromossômicas, apresentando uma irregularidade e nenhuma irregularidade, respectivamente.

Este resultado está relacionado com o índice mitótico apresentado na Tabela 2, em que estes tratamentos também obtiveram o menor número de divisões celulares.



A ação antiproliferativa analisada neste trabalho está de acordo com a pesquisa realizada por Neves et al. (2013), em que foram estudados o efeito de quatro concentrações dos extratos de *Phyllanthus niruri* L., pertencente ao mesmo gênero de *Phyllanthus tenellus* Roxb., que também apresentou ação antiproliferativa dos extratos sob o ciclo celular de *Allium cepa*, diminuindo consideravelmente o número de divisões celulares. E também, os extratos apresentaram ação genotóxica, causando diversas alterações cromossômicas nas células, como metáfases irregulares e anáfases com ponte.

Outra planta do gênero *Phyllanthus* também foi analisada em relação à ação genotóxica, *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn., e o efeito causado também foi considerado tóxico devido a presença dos alcaloides pirrolizidínicos (Matos, 2000). E, ainda sobre a espécie *P. amarus*, na pesquisa realizada por Amorim et al. (2018), nos quatro extratos de folhas frescas estudados no teste de *Allium cepa*, foi possível observar que houve ação citotóxica em relação a diminuição do número de divisões celulares das pontas das raízes, portanto os extratos apresentaram efeito citotóxico, diminuindo o número de divisões celulares e também, efeito genotóxico, com diversas alterações cromossômicas encontradas nas células.

Além destes trabalhos, Silva et al. (2008) analisaram os extratos alcoólicos de *Phyllanthus tenellus* Roxb. em camundongos e, foi possível observar durante o processo que os camundongos apresentaram mudanças comportamentais para as duas doses estabelecidas, sendo que, o grupo que recebeu a maior dose sofreu maiores alterações, sendo as mais importantes: diminuição da frequência respiratória, prostração, piloereção, edema de focinho, hidrocele e óbito. Entretanto, a maioria dos extratos aquosos de *P. tenellus* não apresentaram ação genotóxica estando de acordo com a pesquisa de Ignácio et al. (2001), que menciona a baixa toxicidade dos extratos de *P. tenellus*.

Segundo Gobbo-Neto e Lopes (2007) há vários fatores que influenciam a composição dos metabólitos secundários das plantas, variações temporais e espaciais, como índice pluviométrico e temperatura, bem como as proporções relativas de metabólitos secundários em plantas, que podem ocorrer em diferentes níveis (sazonais e diários; intraplanta, inter e intraespecífica) e, mesmo com o

controle da expressão gênica, podem ocorrer modificações que são resultados da interação da planta com o ambiente.

Os metabólitos secundários produzidos pelas plantas, geralmente, apresentam estrutura complexa, baixo peso molecular, atividade biológica marcante e, se diferenciam dos metabólitos primários, por encontrar-se em baixas concentrações e em determinados grupos de plantas (BERG e LUBERT, 2008).

Além disso, os produtos secundários são de interesse não só pelas atividades biológicas exercidas pelas plantas em resposta aos estímulos do meio ambiente, mas também pela imensa atividade farmacológica que possuem (PEREIRA e CARDOSO, 2012).

Na análise fitoquímica realizada dos extratos aquosos de *Phyllanthus tenellus* Roxb. (Tabela 4), a presença de polifenóis totais, flavonoides e taninos, pode ser notada em maiores concentrações no grupo de tratamento sem sombreamento. Os polifenóis são compostos fenólicos com mais de dois grupos hidroxila presentes em seus anéis e são altamente distribuídos nas plantas, produtos do metabolismo secundário (CARVALHO, 2010).

Os flavonoides compõem uma classe bastante importante de polifenóis de relativa abundância entre os metabólitos secundários originados das plantas. São compostos fenólicos ou polifenólicos, com substituintes hidroxilados em seus anéis aromáticos. Pela sua ampla distribuição no reino vegetal, acredita-se que desempenham importantes funções nas plantas superiores (ZUANAZZI et al., 2010).

Vegetais contendo flavonoides são bastante empregados para fins terapêuticos e alguns estudos sugerem que os flavonoides são responsáveis por ação antitumoral, antiviral, anti-hemorrágica, antiinflamatórias e antioxidantes (CARVALHO et al., 2010; ZUANAZZI et al., 2010).

Já os taninos ocorrem em uma ampla variedade de plantas, sendo este composto secundário como um dos meios de defesa da planta contra fungos patogênicos, bactérias, vírus (TAKECHI et al., 1985) e contra ataques de insetos e herbívoros (KATOH et al., 1989) e, são considerados bons marcadores químicos e com ação relacionada à atividade antioxidante e a habilidade de complexarem-se com outras moléculas, incluindo macromoléculas, entre elas proteínas e

polissacarídeos (SANDINI, 2011). De maneira geral, aos compostos fenólicos são atribuídos as principais funções medicinais do quebra-pedra (SOBREIRA, 2016)

Os dois grupos de tratamentos, com e sem sombreamento, apresentaram diferença significativa quando comparados um com o outro, demonstrando que a variação da luz interferiu na concentração dos compostos secundários analisados.

De acordo com o trabalho de Nascimento et al. (2008) as plantas do gênero *Phyllanthus* (*Phyllanthus niruri* L., *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn e *Phyllanthus tenellus* Roxb.) coletadas em diferentes localidades do estado de Pernambuco apresentaram diferenças quanto à composição dos extratos e, também, quanto a toxicidade dependendo do local de coleta.

Os testes fitoquímicos demonstraram a presença de antraquinonas, flavonoides, taninos, terpenoides e a ausência de cumarinas e antocianinas nas três espécies estudadas, entretanto, em *Phyllanthus tenellus* Roxb. ocorreram alcaloides, taninos condensáveis e isso variou quanto à localidade para saponinas e naftoquinonas.

Em relação à ação tóxica dos extratos, testados em larvas de *Artemia salina* Leach., teve atividade atóxica apenas para um local de coleta, sendo que nas demais localidades foi encontrada atividade tóxica dos extratos. E pode também, ocorrer variação na concentração dos compostos encontrados nas plantas.

Estes resultados indicam que nas condições estudadas neste trabalho, os extratos aquosos da parte aérea de *Phyllanthus tenellus* Roxb. cultivada sob duas condições de luminosidade, com e sem sombreamento, apresentaram atividade citotóxica, caracterizada pela ação antiproliferativa na maioria das concentrações analisadas, estando de acordo com outros resultados encontrados e apresentou atividade genotóxica em apenas uma concentração avaliada, no extrato com sombreamento de 5 g L<sup>-1</sup>.

Outro fator relevante é de que, houve diferença significativa da concentração dos compostos analisados nos dois grupos de tratamentos, com e sem sombreamento, sendo que, as plantas que foram cultivadas sem a condição de sombreamento, apresentaram maior concentração de polifenóis totais, flavonoides e taninos totais. É possível analisar que as plantas sofrem influência direta do meio em que vivem e alteram o metabolismo secundário para tentar

diminuir os danos causados pelo estresse proporcionado pelo habitat em que se encontram.

## **2.5. CONCLUSÃO**

Os extratos aquosos de *Phyllanthus tenellus* Roxb, apresentaram ação antiproliferativa (citotóxica) nas concentrações de 10 g L<sup>-1</sup>, 15 gL<sup>-1</sup> do tratamento com sombreamento, 5 g L<sup>-1</sup>, 10 g L<sup>-1</sup> e 15 g L<sup>-1</sup> do tratamento sem sombreamento. Também apresentou ação genotóxica na concentração de 5 g L<sup>-1</sup> do tratamento com sombreamento.

A incidência de luz influenciou na concentração de polifenóis totais, taninos totais e flavonoides, sendo que, o grupo sem sombreamento apresentou as maiores médias.

### **CAPÍTULO 3: ESTUDO FITOQUÍMICO PRELIMINAR DE EXTRATOS AQUOSOS DE *Phyllanthus tenellus* Roxb. CULTIVADA SOB CONDIÇÕES DISTINTAS DE LUMINOSIDADE**

#### **RESUMO**

#### **ESTUDO FITOQUÍMICO PRELIMINAR DE EXTRATOS AQUOSOS DE *Phyllanthus tenellus* Roxb. CULTIVADA SOB CONDIÇÕES DISTINTAS DE LUMINOSIDADE**

AUTORA: Julia de Senna Pereira  
ORIENTADORA: Solange Bosio Tedesco

Estudos toxicológicos e estudos prévios da composição química das plantas medicinais são importantes para a elucidação da ação da espécie, seja a ação benéfica ou ação maléfica das substâncias presentes nas plantas medicinais. A espécie *Phyllanthus tenellus* Roxb., conhecida popularmente como quebra-pedra-roxo, é comumente utilizada na forma de chá para o tratamento de diversas doenças, principalmente relacionadas ao trato urinário. Quanto à composição química, *P. tenellus* apresenta compostos fenólicos, taninos flavonoides, glicosídeos antraquinônicos, antocianinas, saponinas e lignanas. Dentre estes compostos, destacam-se os compostos fenólicos, incluindo taninos e flavonoides, produtos do metabolismo secundários das plantas, que estão associados ao valor terapêutico da espécie. O objetivo do trabalho foi realizar uma análise preliminar dos grupos de compostos presentes nos extratos de *P. tenellus*. Para o experimento, foram cultivadas 80 plantas, divididas em dois grupos com 40 plantas cada, sendo um grupo cultivado com sombreamento e o outro sem sombreamento. Com a parte aérea foram feitos extratos de 15 g L<sup>-1</sup> para ambos os tratamentos. A análise foi feita através da técnica de *screening* fitoquímico para determinar a presença de heterosídeos antociânicos, saponínicos e cianogenéticos, taninos hidrolisáveis e condensáveis, bem como, a presença de aminogrupos. Concluiu-se que os extratos de *Phyllanthus tenellus* Roxb. dos dois grupos de tratamentos não diferiram entre si quanto à composição e apresentaram heterosídeos antociânicos, saponínicos, taninos hidrolisáveis e condensáveis, aminogrupos.

**Palavras-chave:** Quebra-pedra. *Screening*. Análise preliminar.

## ABSTRACT

### PRELIMINARY PHYTOCHEMICAL STUDY OF AQUEOUS EXTRACTS OF *Phyllanthus tenellus* Roxb. CULTIVATED UNDER DIFFERENT LUMINOSITY CONDITIONS

AUTHOR: Julia de Senna Pereira  
ADVISOR: Solange Bosio Tedesco

Toxicological studies and previous studies of the chemical composition of medicinal plants are important for elucidating the action of the species, whether the beneficial action or the harmful action of the substances present in medicinal plants. The species *Phyllanthus tenellus* Roxb., Popularly known as leafflower, is commonly used in the form of tea for the treatment of several diseases, mainly related to the urinary tract. As for the chemical composition, *Phyllanthus tenellus* Roxb. presents phenolic compounds, flavonoid tannins, anthraquinone glycosides, anthocyanins, saponins and lignans. Among these compounds, phenolic compounds stand out, including tannins and flavonoids, products of secondary metabolism of plants, which are associated with the therapeutic value of the species. The objective of the work was to carry out a preliminary analysis of the groups of compounds present in the extracts of *P. tenellus*. For the experiment, 80 plants were grown, divided into two groups with 40 plants each, with one group cultivated with shading and the other without shading. With the aerial part, extracts of 15 g L<sup>-1</sup> were made for both treatments. The analysis was performed using the phytochemical screening technique to determine the presence of anthocyanin, saponin and cyanogenetic heterosides, hydrolyzable and condensable tannins, as well as the presence of aminogroups. It was concluded that the extracts of the two treatment groups did not differ in composition and showed anthocyanin, saponin heterosides, hydrolyzable and condensable tannins, aminogroups.

**Keywords:** Leafflower. *Screening*. Preliminary analysis.

### 3.1. INTRODUÇÃO

Diversas enfermidades são tratadas por meio da utilização de plantas medicinais, entretanto, o uso popular dessas plantas não é suficiente para validá-las como um recurso eficaz e seguro (BASTOS et al., 2011). Para essa validação tanto estudos toxicológicos, como estudos prévios da composição química são importantes (VENDRUSCOLO et al., 2005; SILVEIRA et al., 2008).

Nesse sentido, a aplicação de métodos qualitativos, como análise fitoquímica preliminar, é relevante por possibilitar um *screening* inicial de mais baixo custo (MATTOS, 1997), contribuindo para o conhecimento do perfil fitoquímico de espécies medicinais potenciais pouco estudadas regionalmente e presentes em biomas de relevante interesse para conservação da biodiversidade (BESSA, 2013).

Dentre as plantas utilizadas na medicina popular, podemos citar *Phyllanthus tenellus* Roxb., conhecida popularmente como quebra-pedra-roxo. O gênero *Phyllanthus* compreende cerca de 800 espécies e, no Brasil está representado por mais de 100 espécies, sendo conhecido como um dos maiores e mais complexos gêneros de Phyllanthaceae, isso é devido à ampla diversidade de caracteres vegetativos e florais (SILVA e SALES, 2004).

O interesse por plantas do gênero *Phyllanthus* aumentou consideravelmente, devido ao seu potencial terapêutico em relação a diversas doenças, incluindo infecções intestinais, diabetes e Hepatite B (CALIXTO et al., 1998). Dentre as espécies do gênero, *Phyllanthus tenellus* Roxb. é mais utilizada para doenças relacionadas ao trato urinário, para bexiga e como diurético (GARLET et al., 2000; SEBOLD et al., 2003; AITA et al., 2009), também é bastante utilizada em casos de cálculo renal, cistite, corrimento, em problemas dos rins e dos ovários, frio da bexiga, inflamações na bexiga e pedra nos rins (VENDRUSCOLO et al., 2004; AITA et al., 2009).

*Phyllanthus tenellus* Roxb. é uma planta herbácea, com até 60 cm de altura, caracterizada morfológicamente por apresentar, caule simples ou ramificado, folhas simples, alternas, elípticas, pecioladas, glabras, com bordo inteiro e base atenuada, no floema, parênquima cortical e no clorênquima apresenta cristais de oxalato de cálcio (BRASIL, 2010).

Quanto à composição química, *Phyllanthus tenellus* Roxb apresenta compostos fenólicos (BRASIL, 2010), taninos (CALIXTO, 1998), flavonoides (HUANG et al., 2003; VICTORIO et al., 2010), glicosídeos antraquinônicos (NARASUMHUDU et al., 2012; SPRENGER e CASS, 2013), alcaloides (SPRENGER e CASS, 2013), antocianinas, saponinas (NARASUMHUDU e RAJU, 2012) e lignanas (HUANG et al., 2003; NARASUMHUDU e RAJU, 2012). Dentre estes compostos, destacam-se os compostos fenólicos, incluindo taninos e flavonoides, produtos do metabolismo secundários das plantas, que estão associados ao valor terapêutico da espécie (HUANG et al., 2003; SOBREIRA, 2016).

Os compostos fenólicos são amplamente encontrados em plantas e têm ação relacionada à atividade antioxidante, devida às suas propriedades redox, que podem desempenhar importante papel na adsorção e neutralização de radicais livres (SOBREIRA, 2016). Os flavonoides possuem atividade antioxidantes e hepatoprotetora (HARISH et al., 2006), atividade antiinflamatória (KASSUYA et al., 2006), analgésica (SANTOS et al., 2012) e atividade contra o vírus da hepatite B (HUANG et al., 2003).

E os taninos, condensáveis e hidrolisáveis, considerados bons marcadores químicos e com ação relacionada à atividade antioxidante e a habilidade de complexarem-se com outras moléculas, incluindo macromoléculas, entre elas proteínas e polissacarídeos (SANDINI, 2011).

Além disso, no estudo realizado por Nascimento et al. (2008), que avaliaram a composição química de três espécies do gênero *Phyllanthus*, coletadas em diferentes locais, foi possível observar variações dos metabólitos, sendo que *Phyllanthus tenellus* Roxb apresentou alcalóides e taninos condensáveis com uma variação na presença ou não de saponinas na espécie, de acordo com o local de coleta, indicando que o local e o modo de cultivo de *P. tenellus* alteram o metabolismo da espécie.

Com isso, esta pesquisa teve como objetivo analisar preliminarmente os extratos aquosos da parte aérea de *Phyllanthus tenellus* Roxb., cultivada sob duas condições de luminosidade, com e sem sombreamento, através da técnica de *screening* fitoquímico utilizado por Moreira (1979) para extratos aquosos obtidos por aquecimento, a fim de contribuir para o conhecimento fitoquímico da espécie.



## **3.2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.2.1. Cultivo e coleta das plantas**

As mudas de *Phyllanthus tenellus* Roxb. foram produzidas a partir de sementes da marca Naturals<sup>®</sup>, adquiridas no estado do Paraná, cultivadas em bandejas de germinação e, após atingirem o tamanho aproximado de 5 cm (cerca de 60 dias), foram transplantadas para os vasos de 1 litro preenchidos com substrato Maxfertil<sup>®</sup>, o qual apresenta na formulação casca de pinus, cinzas, vermiculita, serragem e bioestabilizados.

O cultivo foi realizado em ambiente protegido no Departamento de Fitotecnia, localizada na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul (S: 29° 42' 23"; W: 53° 43' 15" e 95 metros de altitude ao nível do mar). A irrigação foi por meio de mangueira gotejadora disposta sobre os vasos e acionada automaticamente por seis vezes durante o dia.

No total, foram 80 mudas divididas em dois grupos: 40 mudas cultivadas com sombreamento e 40 mudas cultivadas sem sombreamento. O sombreamento foi feito com tela de sombreamento do tipo sombrite 70% e as plantas permaneceram por um período de 30 dias em ambiente protegido.

O experimento ocorreu no período de fevereiro a março de 2019. As unidades experimentais (vasos) foram trocadas de lugar aleatoriamente na bancada durante o período de cultivo, mantendo sempre a divisão dos dois grupos.

### **3.2.2. Coleta e armazenamento do material vegetal**

A coleta da parte aérea foi realizada após o período de 30 dias em ambiente protegido e, em seguida o material foi pesado e armazenado no congelador por 30 dias a fim de preservar as propriedades das folhas para a preparação dos extratos. O material foi pesado em 15 gramas, para ambos os grupos, com e sem sombreamento.

### **3.2.3. Preparo dos extratos aquosos**

A parte aérea de *Phyllanthus tenellus* Roxb. foram utilizadas para a preparação dos extratos aquosos por infusão de 10 minutos, com água destilada

na concentração de 15 g L<sup>-1</sup>. Duas exsiccatas foram depositadas no Herbário SMDB- JBSM, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, com número de acesso 18.321 e 18.322.

### 3.2.4. Análise química qualitativa

O estudo preliminar da composição química presente nos extratos de *Phyllanthus tenellus* Roxb. foi realizado seguindo a metodologia de Moreira (1979) com extratos aquosos obtidos por infusão.

A identificação da presença de metabólitos secundários foi realizada de forma qualitativa através da complexação química, com reagentes específicos a cada grupo de metabólitos. Foram analisados os extratos aquosos da parte aérea de *Phyllanthus tenellus* Roxb. de concentração 15 g L<sup>-1</sup>, cultivada com e sem sombreamento, para investigação da presença de heterosídeos antociânicos, heterosídeos saponínicos, heterosídeos cianogenéticos, taninos condensáveis, taninos hidrolisáveis e aminos grupos. As análises foram realizadas em triplicata.

#### 3.2.4.1. Determinação de heterosídeos antociânicos e saponínicos

Três porções de 5 ml do extrato de *Phyllanthus tenellus* Roxb. foram separadas e alterados o pH para neutro, ácido e alcalino. Observaram-se as colorações. Cores diferentes indicavam a presença de heterosídeos antociânicos (Figura 15 e 16). Após agitação constante dos três tubos durante 5 minutos e repouso durante 30 minutos, foi analisado se a espuma formada foi persistente. Se a espuma permanecia indicava a presença de heterosídeos saponínicos (Figura 17 e 18).

**Figura 15-** Determinação dos heterosídeos antociânicos pela alteração do pH (da direita para a esquerda): amostra pura, neutra, básica e ácida para o grupo de tratamento com sombreamento.



**Figura 16-** Determinação dos heterosídeos antociânicos pela alteração do pH (da direita para a esquerda): amostra pura, neutra, básica e ácida para o grupo de tratamento sem sombreamento.



**Figura 17-** Determinação dos heterosídeos saponínicos pela formação de espuma (da esquerda para a direita): amostra pura, neutra, ácida e básica para o grupo de tratamento com sombreamento.



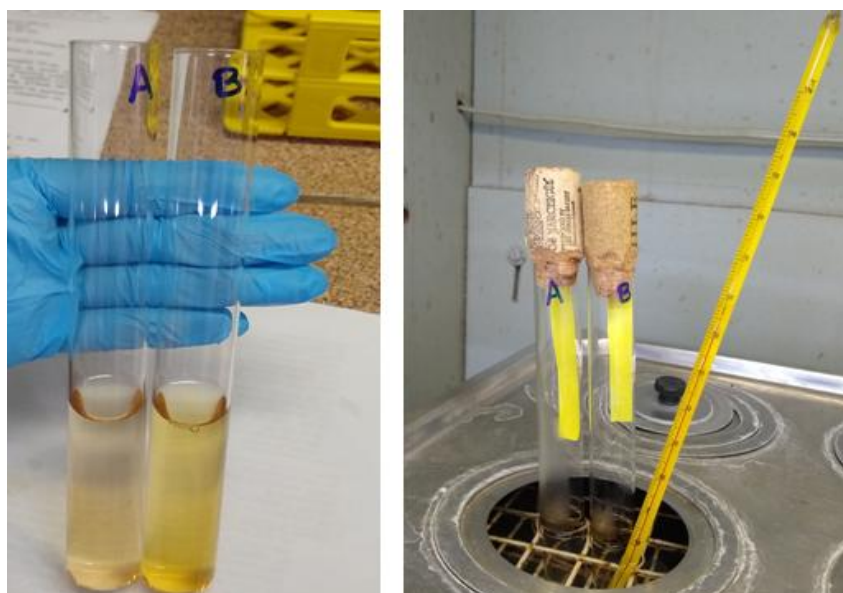
**Figura 18-** Determinação dos heterosídeos saponínicos pela formação de espuma (da direita para a esquerda): amostra pura, ácida, neutra e básica para o grupo de tratamento sem sombreamento.



### 3.2.4.2. Determinação de heterosídeos cianogénicos

Transferiu-se para o tubo de ensaio 15 mL do extrato aquoso de modo a não umedecer as paredes superiores do tubo, foi adicionado 1 mL de solução de ácido sulfúrico 1N. Após, suspendeu-se uma tira de papel picro-sódico com auxílio de uma rolha de cortiça, de maneira que o papel não toque no extrato. O tubo de ensaio foi transferido para o banho-maria a 60 °C, durante 30 minutos. O papel adquirindo uma coloração vermelha indicava a presença de heterosídeos cianogénicos (Figura 19).

**Figura 19-** Determinação de heterosídeos cianogénicos pela alteração da coloração do papel picro-sódico (A= amostra do extrato sem sombreamento; B= amostra de extrato com sombreamento).



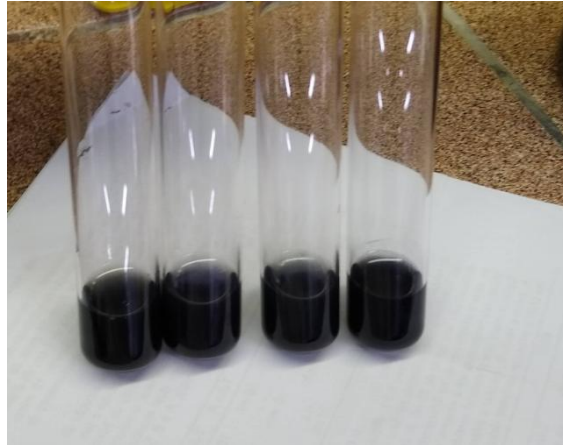
### 3.2.4.3. Determinação de taninos condensáveis e hidrolisáveis

Adicionou-se 5 mL do extrato aquoso em tubos de ensaios, 5 gotas de solução de cloreto férrico 1%. Ocorrendo o desenvolvimento de coloração ou precipitado escuro, indica a presença de taninos (Figura 20) e deve-se prosseguir com a técnica. Foi transferido para um balão de 100 mL de capacidade, 20 mL de extrato aquoso, acrescentou-se 6 mL de formaldeído 37% e 4 mL de ácido clorídrico fumegante.

A mistura foi levada à fervura sob refluxo, durante 1 hora. Após a fervura, foi deixado esfriar para realizar a filtração. O insolúvel foi lavado com água e

álcool. Adicionaram-se algumas gotas de potássio 5% e, ocorrendo formação de coloração indica a presença de taninos condensados (Figura 21 e 22). Ao filtrado, foi adicionado excesso de acetato de sódio e 10 gotas de solução de cloreto férrico 1%. O surgimento de coloração azul ou formação de precipitado escuro indicava a presença de taninos hidrolisáveis (Figura 23 e 24).

**Figura 20-** Determinação de taninos pela alteração na coloração da amostra com adição de cloreto férrico 1% (da esquerda para a direita): amostra pura do extrato com cloreto férrico 1% em duplicata do tratamento com sombreamento e amostra pura do extrato com cloreto férrico 1% em duplicata do tratamento sem sombreamento.



**Figura 21-** Determinação de taninos condensados pela adição de algumas gotas de potássio 5% sobre o insolúvel do tratamento com sombreamento.



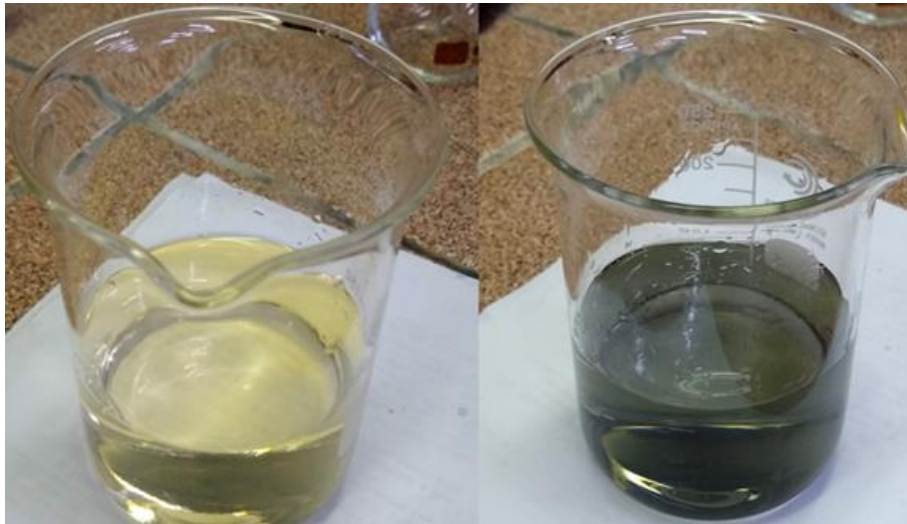
**Figura 22-** Determinação de taninos condensados pela adição de algumas gotas de potássio 5% sobre o insolúvel do tratamento sem sombreamento.



**Figura 23-** Determinação de taninos hidrolisáveis pela adição de acetato de sódio e 10 gotas de solução de cloreto férrico 1% no extrato do tratamento com sombreamento.



**Figura 24-** Determinação de taninos hidrolisáveis pela adição de acetato de sódio e 10 gotas de solução de cloreto férrico 1% no extrato do tratamento sem sombreamento.

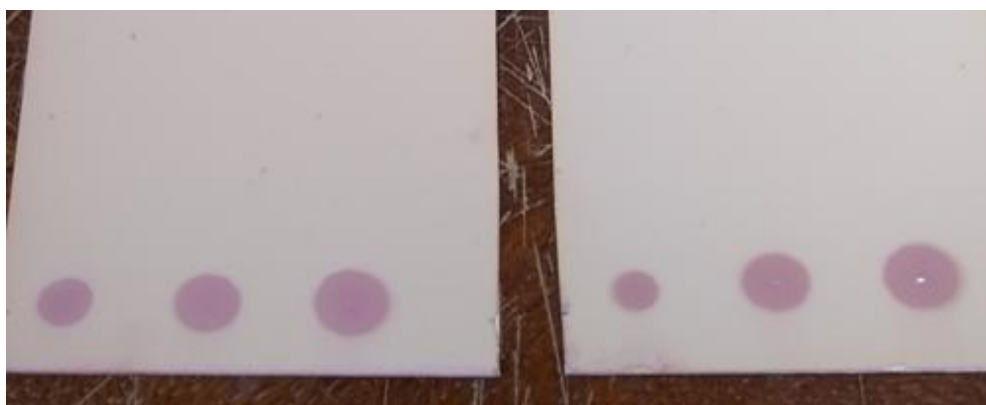


#### 3.2.4.4. Determinação de aminogrupos

Foi concentrado 10 mL de extrato aquoso até aproximadamente 5 mL à temperatura de 50 °C. Após, foi depositado em papel de filtro ou microplaca cromatográfica (cromatografia em camada delgada), em pontos previamente determinados, 5, 10 e 15 gotas (da esquerda para a direita) do extrato concentrado. Quando as gotas ficaram secas foi nebulizado ninidrina.

Em seguida, a microplaca foi levada a estufa à temperatura de 90 °C à 100 °C durante 15 minutos. Havendo desenvolvimento de coloração azul-violácea, indicará a presença de aminogrupos (Figura 25).

**Figura 25-** Determinação de aminogrupos após nebulização de ninidrina e período de secagem na estufa à temperatura de 100 °C: placa cromatográfica com extrato do tratamento com sombreamento (esquerda) e placa cromatográfica com extrato do tratamento sem sombreamento (direita).



### 3.3. RESULTADOS

#### 3.3.1. Perfil fitoquímico preliminar

No estudo qualitativo preliminar da composição química dos extratos aquosos de *Phyllanthus tenellus* Roxb., cultivada sob duas condições de sombreamento, indicou a presença de vários compostos secundários, apresentados na Tabela 5, evidenciando a presença de compostos com grupos fenólicos. Essas substâncias são metabólitos secundários que abrangem uma variedade de compostos como fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, ligninas, tocoferóis, taninos condensáveis e hidrolisáveis (ÂNGELO e JORGE, 2007).

Nos extratos analisados observou-se a presença de heterosídeos antociânicos pela alteração na coloração, quando o pH foi alterado de 5,0 para neutro (pH 7,0), básico (12,0) e ácido (pH 1,0). Bem como, a presença de heterosídeos saponínicos, observado após a agitação dos tubos de ensaio e ocorrência de espuma persistente no extrato de *Phyllanthus tenellus* Roxb. cultivada na condição sem sombreamento.

Quanto aos taninos, hidrolisáveis e condensáveis, ambos foram encontrados nos tratamentos com e sem sombreamento, ao adicionar-se hidróxido de potássio às amostras, houve mudança na coloração para azul escuro, indicando a presença de taninos condensados e, ao filtrado foi adicionado acetato de sódio e solução de cloreto férrico 1%, alterando a cor do papel filtro também, indicando a presença de taninos hidrolisáveis

A presença de aminogrupos foi observada ao analisar-se a microplaca cromatográfica nebulizada com ninidrina, que após 15 minutos na estufa a 100 °C apresentou mudança na coloração, de amarelo para azul-violácea nos extratos aquosos dos dois grupos, com e sem sombreamento, esse resultado pode ser também um indicativo da presença de alcaloides.

Em relação à coloração dos extratos aquosos, foi observada diferença na cor dos dois extratos, o extrato produzido a partir das folhas de *Phyllanthus tenellus* Roxb. cultivada com sombreamento apresentaram coloração amarelo claro, já os extratos produzidos a partir das folhas de *P. tenellus* cultivadas sem



sombreamento, apresentaram coloração laranja escuro. Por fim, nos extratos não foram observadas a presença de heterosídeos cianogenéticos e o pH permaneceu 5,0 em ambos os grupos.

Grupos analisados	Tratamentos	
	Com sombreamento- extrato de 15 g L <sup>-1</sup>	Sem sombreamento- extrato de 15 g L <sup>-1</sup>
Heterosídeos antociânicos	+	+
Heterosídeos saponínicos	-	+
Heterosídeos cianogenéticos	-	-
Taninos condensáveis	+	+
Taninos hidrolisáveis	+	+
Aminogrupos	+	+
pH	5	5
Cor	Amarelo claro	Laranja escuro

**Tabela 5-** Caracterização química da parte aérea de *Phyllanthus tenellus* Roxb

(+) indica presença e (-) indica a ausência dos grupos analisados.

### 3.4. DISCUSSÃO

As análises qualitativas dos extratos aquosos de *Phyllanthus tenellus* Roxb. apresentaram resultado positivo para heterosídeos antociânicos, taninos condensáveis, taninos hidrolisáveis, aminogrupos e ausência de heterosídeos cianogenéticos para os grupos com e sem sombreamento. Já o grupo de heterosídeos saponínicos estava presente apenas no grupo sem sombreamento.

Os resultados indicam a presença de metabólitos secundários que podem estar relacionados à ação medicinal de *Phyllanthus tenellus* Roxb. no tratamento de diversas patologias. E, das substâncias produzidas pelo metabolismo secundário, destacam-se os compostos fenólicos, que estão associados ao valor terapêutico da espécie (HUANG et al., 2003).

Mouco et al. (2003) realizaram ensaios químicos para a identificação de classes químicas a partir de amostras comerciais do gênero *Phyllanthus*, nas quais realizaram análises para taninos, heterosídeos, flavonoídicos, heterosídeos saponínicos, heterosídeos antraquinônicos, alcaloides e óleos voláteis. Os resultados demonstraram a presença de flavonoides, heterosídeos

antraquinônicos e alcaloides. Estes resultados diferiram quando comparado ao que foi encontrado nos extratos aquosos de *Phyllanthus tenellus* Roxb cultivada sob duas condições de luminosidade, visto que, nas condições de cultivo dessa pesquisa, foram detectados taninos, tanto condensáveis como hidrolisáveis, e heterosídeos saponínicos. As saponinas, pertencentes à classe de glicosídeos saponínicos, são componentes importantes para ação de muitas drogas vegetais, destacando-se aquelas tradicionalmente utilizadas como expectorantes e diuréticas (FIUZA et al., 2008).

As plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional no tratamento de diversas doenças, tais como diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais (azia, náusea, gastrite e úlcera gástrica), problemas renais e do sistema urinário e processos inflamatórios em geral, além de apresentarem atividade antioxidante (PESSUTO et al., 2009).

Os heterosídeos antociânicos ou glicosídeos antociânicos, de acordo com Favila (2006), são constituintes responsáveis pela cor dos vegetais e também apresentam propriedades antiinflamatórias e antidermatogênicas. Estando de acordo, como mencionado por Narasumhudu e Raju (2012), que investigou os principais constituintes do gênero *Phyllanthus* e detectou antocianinas nos extratos analisados.

E, a presença de aminogrupos, foi observada em ambos os extratos estudados, esse resultado pode ser um indicativo da presença de alcaloides. De acordo com Fumagali et al. (2008), os alcaloides podem ser definidos como compostos farmacologicamente ativos, contendo um nitrogênio e derivados de aminoácidos. Entretanto, os alcaloides não são distribuídos de maneira uniforme no reino vegetal e são mais específicos para alguns gêneros e espécies de planta.

### **3.5. CONCLUSÃO**

As condições de luminosidade em que as plantas foram submetidas alteraram a ocorrência do grupo de heterosídeos saponínicos. Foi observada a presença de heterosídeos saponínicos no grupo de tratamento sem

sombreamento e ausência no grupo com sombreamento, indicando que a condição de luminosidade altera a composição dos extratos.

Este é um estudo preliminar dos compostos secundários presentes nas folhas dessa espécie, fazendo-se necessário um estudo quantitativo para identificar especificamente os compostos presentes nos extratos.

#### **CAPÍTULO 4: DISCUSSÃO GERAL**

Embora o uso de plantas medicinais, principalmente na forma de chás, seja muito comum na cultura popular mundial, é necessária a avaliação de possíveis efeitos tóxicos causados pelo uso desses extratos aquosos. Autores como Vicentini et al. (2001), Peron et al. (2008), Sampaio et al. (2012) e Belcavello et al. (2012) relatam sobre a presença de substâncias que podem ser consideradas genotóxicas e citotóxicas em infusões de plantas medicinais, sendo necessários mais estudos sobre os efeitos dos usos destas plantas, além da elucidação dos componentes químicos presentes nessas plantas (MACIEL et al., 2002).

Os extratos aquosos de *Phyllanthus tenellus* Roxb., cultivadas sob duas condições de luminosidade, com e sem sombreamento, apresentaram atividade genotóxica apenas em uma concentração de extrato, 5 g L<sup>-1</sup> do grupo de tratamento com sombreamento. Há variações quanto à genotoxicidade do gênero *Phyllanthus* e da espécie *P. tenellus*, pois Neves et al. (2013), ao analisar o efeito de quatro concentrações do extrato aquoso de *Phyllanthus niruri* L., espécie pertencente ao mesmo gênero e que é utilizada com a mesma finalidade medicinal, apresentou atividade genotóxica, causando diversas alterações celulares.

E, Silva et al. (2008), analisaram os extratos alcoólicos de *P. tenellus* em camundongos e, foi possível observar durante a pesquisa que os roedores apresentaram mudanças comportamentais para as duas doses estudadas, sendo que, o grupo que recebeu a maior concentração do extrato alcoólico apresentou mais alterações, tais como, edema no focinho, hidrocele e até mesmo óbito.

No estudo de Ignácio et al. (2001), os extratos de *Phyllanthus tenellus* Roxb. Apresentaram baixa toxicidade. Estas diferenças de atividade genotóxica podem

estar relacionadas com o modo de cultivo e o local onde as plantas se encontram. Em relação à atividade citotóxica dos extratos de *P. tenellus*, ambos os tratamentos apresentaram atividade antiproliferativa.

A luminosidade, como demonstrado no trabalho de Aguilera et al. (2004), interferiu no desenvolvimento da espécie medicinal *Siegesbeckia orientalis*, alterando o crescimento e a produção de biomassa, podendo também, influenciar no metabolismo e, conseqüentemente, na composição química das plantas. A luz sofre mudanças consideráveis quanto à sua intensidade, duração e qualidade dependendo do ambiente.

Em geral, os diferentes graus de luminosidade causam mudanças morfológicas e fisiológicas na planta, e o grau de adaptação é ditado por características genéticas da planta em interação com o seu meio ambiente (MORAIS NETO et al., 2000; SCALON et al., 2001).

A diferença de incidência de luminosidade no experimento alterou a concentração dos metabólitos secundários das mudas de *P. tenellus*, quando comparados os dois grupos de tratamento, com e sem sombreamento. O grupo de plantas que foi cultivado sem sombreamento, obteve as maiores médias de polifenóis totais, flavonoides e taninos totais, diferindo significativamente do grupo com sombreamento.

Este resultado está de acordo com o estudo de Nascimento et al. (2008), em que, três espécies do gênero *Phyllanthus* (*P. niruri*, *P. amarus* e *P. tenellus*) foram coletadas em diferentes locais e apresentaram diferenças quanto à composição química e, até mesmo quanto à toxicidade das espécies. Sendo que, *P. tenellus* apresentou, além de antraquinonas, flavonoides, taninos e terpenoides, alcalóides e taninos condensáveis, bem como, variação conforme a localidade para saponinas e naftoquinonas.

A presença destes compostos secundários pode justificar a ação medicinal da espécie *P. tenellus*, já que os compostos fenólicos encontrados possuem ação antioxidante e hepatoprotetora (HARISH et al., 2006), atividade antiinflamatória (KASSUYA et al., 2006), analgésica (SANTOS et al., 2012), atividade contra o vírus da hepatite B (HUANG et al., 2003) e, principalmente, em doenças do trato urinário (NISHIURA et al., 2004).

A diferença encontrada, entre os dois grupos de tratamentos, na quantidade polifenóis, flavonoides e taninos totais pode ser explicada pelo fato de que há diversos fatores abióticos que influenciam na produção destes compostos secundários, entre esses fatores, podemos citar variações temporais e espaciais, luminosidade, nutrição, índice pluviométrico e temperatura (GOBBO-NETO e LOPES, 2007), como também as interações planta/microrganismos, planta/insetos e planta/planta e, os estímulos decorrentes do ambiente, no qual a planta se encontra, podem redirecionar a rota metabólica, ocasionando a biossíntese de diferentes compostos em diferentes quantidades (MORAIS, 2009). No caso específico deste trabalho, as diferenças encontradas estão relacionadas ao efeito da variação de luz nos dois grupos de tratamento, com e sem sombreamento.

A análise preliminar qualitativa dos extratos aquosos indicou a presença de diversos compostos secundários, evidenciando a presença de compostos fenólicos. Foi possível observar a presença de heterosídeos saponínicos, heterosídeos antociânicos, taninos (condensáveis e hidrolisáveis) e aminogrupos e a ausência de heterosídeos cianogenéticos. Não houve diferença quanto aos compostos encontrados em ambos os grupos de tratamentos.

Os heterosídeos antociânicos ou glicosídeos antociânicos, de acordo com Favila (2006), são responsáveis pela cor dos vegetais e também apresentam propriedades antiinflamatórias e antiedermatogênicas. As saponinas, pertencente à classe de glicosídeos saponínicos, possuem ação expectorante e diurética (FIUZA et al., 2008).

Plantas ricas em taninos são utilizadas, principalmente, para diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais (azia, náusea, gastrite e úlcera gástrica), problemas renais e do sistema urinário e processos inflamatórios em geral, além de apresentarem atividade antioxidante (PESSUTO et al., 2009). E, por fim, a presença de aminogrupos, que pode indicar a presença de alcaloides.

## **CAPÍTULO 5: CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Conclui-se que, o teste *Allium cepa* é um método eficiente para detectar ações citotóxicas e genotóxicas e, nas condições estudadas neste trabalho, com

variação de luminosidade, os extratos aquosos da parte aérea de *Phyllanthus tenellus* Roxb., apresentam atividade citotóxica, caracterizada pela ação antiproliferativa na maioria das concentrações analisadas, diminuindo o número de divisões celulares em cinco, dos seis, tratamentos avaliados, nas concentrações de 10 g L<sup>-1</sup> e 15 g L<sup>-1</sup> do grupo com sombreamento e, a ação antiproliferativa foi evidenciada nas concentrações de 5 g L<sup>-1</sup>, 10 g L<sup>-1</sup> e 15 g L<sup>-1</sup> do grupo sem sombreamento.

Em relação a genotoxicidade, que avalia o número de alterações cromossômicas nas células, apenas o tratamento de 5 g L<sup>-1</sup> do grupo com sombreamento apresentou aumento nas alterações.

A ação genotóxica pode estar relacionada com a ação antiproliferativa dos extratos, visto que, quanto maior a concentração dos extratos, menor o número de alterações cromossômicas e menor o índice mitótico.

A luz interferiu tanto na genotoxicidade como na citotoxicidade, pois o grupo de tratamento sem sombreamento apresentou os menores índices mitóticos e o menor número de células com alterações cromossômicas.

A composição química dos extratos aquosos analisados durante a pesquisa variou de um grupo para outro, demonstrando que a planta produz uma maior concentração de polifenóis totais, flavonoides e taninos totais quando cultivada com incidência de luz direta. A maior concentração de compostos secundários no grupo sem sombreamento pode ser explicada pelo fato de que, alguns destes compostos, como por exemplo os flavonóides, apresentam ação de proteção e absorção de raios UV.

Esse resultado pode ser utilizado para potencializar a ação terapêutica da planta, visto que, vários destes compostos secundários estão envolvidos em atividades antioxidantes, antiinflamatórias e, principalmente, em problemas do trato urinário. E, como recomendado, o plantio de espécies vegetais medicinais deve ser a pleno sol para intensificar a produção de compostos secundários

Ainda são necessários estudos mais aprofundados sobre a espécie *P. tenellus*, porque são escassos trabalhos na literatura relatando os efeitos da planta em organismos vivos e, também, pesquisas voltadas para a variação da composição química de *P. tenellus* cultivadas em diferentes habitats.

## 6. REFERÊNCIAS

ALVES, A. M.; ALVES, M. S. O.; FERNANDES, T. O.; NAVES, R. V.; NAVES, M. M. V. Caracterização física e química, fenólicos totais e atividade antioxidante da polpa e resíduo de gabiroba. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 3, p. 837-844, 2013.

AGOSTINI COSTA, T. S.; GARRUTI, D. S.; LIMA, L. FREIRE, S.; ABREU, F. A. P.; FEITOSA, T. Avaliação de metodologias para determinação no suco de caju. **Boletim CEPPA**, v. 12, n. 2, p. 167-176, 1999.

AGUILERA, D. B.; FERREIRA, F. A.; CECON, P. R. Crescimento de *Siegesbeckia orientalis* sob diferentes condições de luminosidade. **Planta Daninha**, v. 22, n. 1, p. 43-41, 2004.

AITA, A. M.; MATSUURA, H. N.; MACHADO, C. A.; RITTER, M. R. Espécies medicinais comercializadas como “quebra-pedras” em Porto Alegre, Rio grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2, p. 471-477, 2009.

AMORIM, A. S.; FROTA, R. G.; CARNEIRO, J. K. R.; OLIVEIRA, M. A. S. Avaliação citológica, genotóxica e mutagênica do infuso da espécie quebra-pedra (*Phyllanthus amarus*- Euphorbiaceae) em diferentes concentrações através do sistema *Allium cepa*. **Revinter**, v. 11, n. 3, p. 150-161, 2018.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

AYRES M.; AYRES M. J.; AYRES D. L.; SANTOS A. A. BioEstat: **aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas**. Ong Mamiraua, Belém, 364p, 2007.

BALICK, M. J.; COX, P. A. **Plants, people and culture**. Scientific American Library, 1997.

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.

BARROS, M. E.; SCHOR, N.; BOIM, M. A. Effects of an aqueous extract from *Phyllanthus niruri* on calcium oxalate crystallization in vitro. **Urological Research**, v. 30, n. 6, p. 374-379, 2003.

BARROS, M. E.; LIMA, R.; MERCURI, L. P.; MATOS, J. R.; SCHOR, N.; BOIM, M. A. Effect of extract of *Phyllanthus niruri* on crystal deposition in experimental urolithiasis. **Urological Research**, v. 34, n. 6, p.351-357, 2006.

BASTOS, I. V. G. A.; SILVA, G. K. C.; RODRIGUEZ, G. C. R.; MELO, C. M.; XAVIER, H. S.; SOUZA, I. A. Estudo fitoquímico preliminar e avaliação da toxicidade aguda do extrato etanólico bruto de *Caesalpinia echinata* Lam. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 92, n. 3, p. 219-222, 2011.

BELCAVELLO, L.; CUNHA, M. R. H.; ANDRADE, M. A.; BATITUCCI, M. C. Citotoxicidade e danos ao DNA induzidos pelo extrato de *Zornia diphylla*, uma planta medicinal. **Natureza on line**, v. 10, n. 3, p 140-145, 2012.

BERG, J. M. T.; LUBERT, J. **Bioquímica**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 545p , 2008.

BESSA, N. G. F.; BORGES, J. C. M.; BESERRA, F. P.; CARVALHO, R. H. A.; PEREIRA, M. A. B.; FAGUNDES, R.; CAMPOS, S. L.; QUIRINO, M. S.; CHAGAS JUNIOR, A. F.; ALVES, A. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde- Tocantins. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 4, p. 692-707, 2013.

BORRELI, F.; IZZO, A. A. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 581-591, 2000.



BRASIL. Farmacopéia Brasileira. 5 ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, p. 904, 2010. Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33832/260079/5%C2%AA+edi%C3%A7%C3%A3o+-+Volume+1/4c530f86-fe83-4c4a-b907-6a96b5c2d2fc>> Acesso em: 28 janeiro 2020.

BRASIL. Farmacopéia Brasileira. 5 ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, p. 904, 2010. Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33832/260079/5%C2%AA+edi%C3%A7%C3%A3o+-+Volume+1/4c530f86-fe83-4c4a-b907-6a96b5c2d2fc>> Acesso em: 28 janeiro 2020.

BRASIL. Governo do Brasil. Ministério da Saúde. Brasília, 2016. Uso de plantas medicinais e fitoterápicos sobe 161%. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2016/06/uso-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos-sobe-161>>. Acesso em: 19 outubro 2019.

BRASIL. Governo do Brasil. Ministério da Saúde. Brasília, 2019. Plantas Medicinais de Interesse ao SUS – Rénisus. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/acoes-e-programas/programa-nacional-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos-ppnmpf/politica-e-programa-nacional-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos/plantas-medicinais-de-interesse-ao-sus-renisus>>. Acesso em: 21 outubro 2019.

CABRERA, G. L.; RODRIGUES, D. M. G. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. **Mutation Research**, v. 426, p. 211-214, 1999.

CAMPAROTO, M. L.; TEIXEIRA, R. O.; MANTOVANI, M. S.; VICENTINI, V. E. P. Effects of *Maytenus salicifolia* Mart. and *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion roottip and rat bone-marrow cells. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, p. 85-89, 2002.

CALIXTO J. B.; SANTOS, D. R.; CECHINEL, V. F.; YUNES, R. A. A Review of plants of genus *Phyllanthus*: their chemistry pharmacological and therapeutic potencial. **Medicinal Research Reviews**, v. 18, p. 225-258, 1998.

CARVALHO, J. C. T.; GROSSMAN, G.; SCHENKEL, E. P. **Compostos fenólicos simples e heterosídeos in: Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Organizado Simões. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.

CHANDRA, S.; DE MEJIA, E. G. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to Mate (*Ilex paraguariensis*) and Green (*Camellia sinensis*) Teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3583 - 3589, 2004.

CHASE, M. W.; ZMARTZTY, S.; LLEDÓ, M. D.; WURDACK, K. J.; SWESEN, S. M.; FAY, M. F. When in doubt, put it in Flacourtiaceae: a molecular phylogenetic analysis based on plastid rbcL DNA sequences. **Kew Bulletin**, v. 57, p. 141-181, 2002.

CHEZEM, W. R.; CLAY, N. K. Regulation of plant secondary metabolism and associated specialized cell development by MYBs and bHLHs. **Phytochemistry**, v. 131, n. 1, p. 26-43, 2016.

CORDELIA, O. Evaluation of chemical constituents of *Phyllanthus niruri*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 6, n. 3, p. 125-128, 2012.

DALLA NORA, G.; PASTORI, T.; LAUGHINGHOUSE IV, H. D.; CANTO-DOROW, T. S.; TEDESCO, S. B. Antiproliferative and genotoxic effects of *Mikania glomerata* (Asteraceae). **Biocell**, v. 34, n. 3, p. 95-101, 2010.

DIAS, M. G.; CANTO-DOROW, T. S.; COELHO, A. P. D.; TEDESCO, S. B. Efeito genotóxico e antiproliferativo de *Mikania cordifolia* (L. F.) Willd. (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa* (L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 202-208, 2014.

FACHINETO, J. M.; BAGATINI, M. D.; DURIGON, J.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 49-54, 2007.

FARIAS, M. R. **Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: Farmacognosia – da planta ao medicamento.** 5 ed. Organizado por Simões. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, p. 263 – 288, 2004.

FAVILA, M. A. C. **Estudo Químico e Biológico de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (Astereaceae).** 2006. 106f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

FIUZA, T. S.; REZENDE, M. H.; SABÓIA-MORAIS, S. M. T.; BARA, M. T.; TRESVENZOL.; PAULA, J. R. Caracterização farmacognóstica das folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 5, n. 2, p. 1-11, 2008.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FREITAS, A. M.; SCHOR, N.; BOIM, M. A. The effect of *Phyllanthus niruri* on urinary inhibitors of calcium oxalate crystallization and other factors associates with renal stone formation. **BJU International**, v. 89, n. 9, p. 829-34, 2002.

FRESCURA, V. D.; KUHN, A. W.; LAUGHINGHOUSE IV, H. D.; NICOLOSO, F. T.; LOPES, S. J.; TEDESCO, S. B. Evaluation of the allelopathic, genotoxic, and antiproliferative effect of the medicinal species *Psychotria brachypoda* and *Psychotria birotula* (Rubiaceae) on the germination and cell division of *Eruca sativa* (Brassicaceae), **Caryologia**, v. 66, p. 138-144, 2013.

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R. A. C.; MACHADO, M. F. P. S.; VIDOTI, G. J.; OLIVEIRA, A. J. B. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade Brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 178-182, 2005.

GARCIA, C. M.; ZANETTI, G. D.; ZAGO, A. M.; BITTENCOURT, C. F.; HEINZMANN, B. M. Estudo morfo-anatômico de *Phyllanthus niruri* L. e *Phyllanthus tenellus* Roxb. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 23, p. 67-70, 2004.

GARLET, T. M. B. **Levantamento das plantas medicinais utilizadas no município de Cruz Alta, RS, Brasil**. 2000. 220f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

GIRALDI, M.; HANAZAKI, N. Uso e conhecimento tradicional de plantas medicinais no Sertão do Ribeirão, Florianópolis, SC, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 2, p. 395-406, 2010.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto: FUNPEC, 131p, 2002.

HARISH, R.; SHIVANANDAPPA, T. Antioxidant activity and hepatoprotective potential of *Phyllanthus niruri*. **Food Chemistry**. Article in press, 2006.

HERRERO, O.; PÉREZ MARTÍN, J. M.; FERNÁNDEZ FREIRE, P.; CARVAJAL LÓPEZ, L.; PEROPADRE, A.; HAZEN, M. J. Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the *Allium cepa* test. **Mutation Research**, v. 743, p. 20-24, 2012.

HOEHNE, F. C. **O que vendem os hervanários da cidade de São Paulo**. Casa Duprat, São Paulo, 1920.

HUANG, R.; HUANG, Y.; OU, J.; CHEN, C.; HSU, F.; CHANG, C. Screening of 25 compounds isolated from *Phyllanthus* species for Anti-human Hepatitis B virus *In Vitro*. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 5, p. 449-453, 2003.

IGNÁCIO, S. R. N.; FERREIRA, J. L. P.; ALMEIDA, M. B.; KUBELKA, C. F. Nitric oxide production by murine peritoneal macrophages in vitro and in vivo treated with *Phyllanthus tenellus* extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, n. 2, p. 181-187, 2001.

JUNIOR, V. F. V.; PINTO, A. C. Plantas Mediciniais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

KATOH, T.; KASAYA, M.; KAGAMIMORI, S.; KOZUKA, H.; KAWANO, S. Effects of air-pollution on tannin biosynthesis and predation damage in *cryptomeria-japonica*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 2, p. 439-445, 1989.

KASSUYA, C. A. L.; SILVESTRE, A.; MENEZES-DE-LIMA, O.; MAROTTA, D. M.; REHDER, V. L. G.; CALIXTO, J. B. Antiinflammatory and antiallodynications of the lignan niranthin isolated from *Phyllanthus amarus*. Evidence for interaction with platelet activating factor receptor. **Journal Europe Pharmacology**, v. 546, n. 1-3, p. 182-188, 2006.

KHANNA, A. K.; RIZVI, F.; CHANDER, R. Lipid lowering activity of *Phyllanthus niruri* in hiperlipemic rats. **Journal Ethnopharmacology**, v. 82, n. 1, p. 19-22, 2002.

KNOLL, M. F.; SILVA, A. C. F.; CANTO-DOROW, T. S.; TEDESCO, S. B. Effects of *Pterocaulon polystachyum* DC. (Asteraceae) on onion (*Allium cepa*) root-tip cells. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 539-542, 2006.

KUHN, A. W.; TEDESCO, M.; LAUGHINGHOUSE IV, H. D.; FLORES, F. C.; SILVA, C. B.; CANTO-DOROW, T. S.; TEDESCO, S. B. Mutagenic and antimutagenic effects of *Eugenia uniflora* L. by the *Allium cepa* L. test. **Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics**, v. 68, n. 1, p. 25-30, 2015.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed petroleum polluted water – a case study. **Mutation Research**, v. 650, p. 80-86, 2008.

LEVAN, A. The effect of colchicines on root mitoses in *Allium cepa*. **Hereditas**, XXIV, p. 471-486, 1938. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1601-5223.1938.tb03221.x/pdf>. Acesso em: 19 outubro 2019.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JÚNIOR, V. F. Plantas Medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas medicinais**. Editora UFV: Universidade Federal de Viçosa, 220p, 2000.

MARTINS, E. R.; LIMA, L. R.; CORDEIRO, I. *Phyllanthus* (Phyllanthaceae) no estado do Rio de Janeiro. **Rodriguesia**, v. 65, n. 2, p. 405-424, 2014.

MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 2 ed. Fortaleza: Edições UFC, 141 p, 1997.

MATOS, F. J. A. Plantas medicinais – **Guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil**, 2 ed. Imprensa Universitária da UFC, Fortaleza, 2000.

METLEN, K. L.; ASCHEHOUG, E. T.; CALLAWAY, R. M. Plant behavioural ecology: dynamic plasticity in secondary metabolites. **Plant, Cell & Environment**, v. 32, n. 6, p. 641-653, 2008.

MIRANDA, G. S.; SANTANA, G. S.; MACHADO B. B.; COELHO, F. P.; CARVALHO, C. A. Atividade antibacteriana *in vitro* de quatro espécies vegetais em diferentes graduações alcoólicas. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 15, n. 1, p. 104-111, 2013.

MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27, p. 4050-4063, 2009.

MORAIS NETO, S. P.; GONÇALVES, J. L. M.; TAKAKI, M.; CENCI, S.; GONÇALVES, J. C. Crescimento de mudas de algumas espécies arbóreas que

ocorrem na mata atlântica em função do nível de luminosidade. **Revista Árvore**, v. 24, n. 1, p. 35-45, 2000.

MOREIRA, E. A. **Contribuição ao estudo fitoquímico de *Lobelia hassleri* A. Zahlb e *Lobelia stellfeladii* R. Braga. Campanulaceae.** Tribuna Farmacêutica, v. 5, n. 9, p. 13-39, 1979.

MOUCO, G. B.; BERNARDINO, M. J.; CORNÉLIO, M. L. Controle de qualidade de ervas medicinais. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 31, n. 2, p. 68-73, 2003.

MUSTOFA, S. E. N.; WAHYUONO, S. *In vitro* and *in vivo* antiplasmodial activity and cytotoxicity of extracts of *Phyllanthus niruri* L. herbs traditionally used to treat malaria in Indonesia. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 38, p. 609-615, 2007.

NASCIMENTO, J. E.; MELO, A. F. M.; LIMA E SILVA, T. C.; VERAS FILHO, J.; SANTOS, E. M.; 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). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 2, p. 145-150, 2008.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 95-111, 2004.

NARASIMHUDU, C.; RAJU, R.; Phytochemical constituents of *Phyllanthus* species (Euphorbiaceae) from eastern ghats of andhra Pradesh. **International research Journal of Pharmacy**, v. 3, n. 5, p. 184-200, 2012.

NASCIMENTO, J. E.; MELO, A. F. M.; LIMA E SILVA, T. C.; VERAS FILHO, J.; SANTOS, E. M.; 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). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e aplicada**, v. 29, n. 2, p. 145-150, 2008.

NEVES, E. S. B.; FERREIRA, M. P.; LIMA, L. H. G. M.; PERON, A. N. Action of Aqueous Extrats of *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae) leaves on Meristematic

Roots Cells of *Allium cepa* L. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 3, p. 1131-1136, 2014.

NISHIURA, J. L.; CAMPOS, A. H.; BOIM, M. A.; HEILBERG, I. P.; SCHOR, N. *Phyllanthus niruri* normalizes elevated urinary calcium levels in calcium stone forming (CSF) patients. **Urological Research**, v. 32, p. 362-266, 2004.

OKOLI, C. O.; IBIAM, A. F.; EZIKE, A. C.; AKAH, P. A.; OKOYE, T. C. **Evaluation** of antidiabetic potentials of *Phyllanthus niruri* in alloxan diabetic rats. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 2, p. 248-259, 2010.

OTT, M.; THYAGARAJAN, S. P.; GUPTA, S. *Phyllanthus amarus* suppresses hepatitis B virus by interrupting interactions between HBV enhancer I and transcription factors. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 27, p. 908-915, 1997.

OLIVEIRA, D. F.; PEREIRA, A. C.; FIGUEIREDO, H. C.; CARVALHO, D. A.; SILVA, G.; NUNES, A. S.; ALVES, D. S.; CARVALHO, H. W. Antibacterial activity of plant extracts from Brazilian southeast region. **Fitoterapia**, v. 78, n. 2, p. 142-145, 2007.

PEREIRA, J. S.; RODRIGUES, L. G.; FREITAS, J. M. B.; TEDESCO, S. B. Potencial antiproliferativo de extratos aquosos de cascas de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) Mattos pelos teste *Allium cepa* L.. **Enciclopédia Biosfera**, v. 16, n. 29, p. 1925, 2019.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PERON, A. P.; FELIPES, J.; MATTGE, G. I.; CANTAGALLI, L. B.; MARIUCCI, R. G.; VICENTINI, V. E. P. Avaliação mutagênica das plantas medicinais *Baccharis trimera* Less. E *Solanum melongena* L. em células de medula óssea de ratos Wistar. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 6, n. 2, p. 127-130, 2008.



*Phyllanthus* in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB38571>>. Acesso em: 10 janeiro 2020.

PESSUTO, M. B.; COSTA, I. C.; SOUZA, A. B.; NICOLI, F. M.; MELLO, J. C. P. Atividade antioxidante de extratos e taninos condensados das folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reiss. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 412-416, 2009.

RAPHAEL, K. R.; AJITH, A.; JOSEPH S.; KUTTAN, R. Anti-mutagenic activity of *Phyllanthus amarus* Schum & Thonn in vitro as well as in vivo. **Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis**, v. 22, p. 285-291, 2002.

REIS, M. S.; MARIOT, A. **Diversidade natural e aspectos agrônômicos de plantas medicinais**. Organizado por Simões. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 4 ed. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, p. 41-62, 2002.

RIO, R. G. W. **Métodos de controle químico de amostras de própolis**. 1996. 81f. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos- Insumos Farmacêuticos)- Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 1996.

ROCKENBACH, A. P.; RIZZARDI, M. A.; NUNES, A. L.; BIANCHI, M. A.; CAVERZAN, A.; SCHNEIDER, T. Interferência entre plantas daninhas e a cultura: alterações no metabolismo secundário. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 17, n. 1, p. 59-70, 2018.

RUSAK, G.; KUSTRAK, D.; MALES, Z.; PLESE, N. The determination of the content of polyphenols in the aerial parts of the species *Centaurea rupestris* L. and *C. fritschii* Hayek (Asteraceae). **Acta Pharmaceutica**, v. 43, p. 121-125, 1993.

SAMPAIO, J.; TREMÉA, R.; DE MARCO, M. G.; VIEIRA, R. B.; TACCA, J. A.; STROHER, D. J.; PILAR, B. C.; GULLICH, A. A. C.; SCHWANZ, M.; MANFREDINI, V. Estudo da genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* após exposição aguda e subcrônica de extratos aquosos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. obtidos por infusão. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 10, n. 4, p. 462-467, 2012.

SANDINI, T. M.; RODRIGUES, N. M.; PELOI, K. E.; PEREZ, E. Avaliação farmacognóstica de *Phyllanthus tenellus* Roxb., Euphorbiaceae (Quebra-Pedra) coletadas em Rancho Alegre D'Oeste, Paraná. **Biosaúde**, v. 13, n. 1, p. 2, 2011.

SCALON, S. P. Q.; FILHO, H. S.; RIGONI, M. R.; VERALDO, F. Germinação e crescimento de mudas de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) sob condições de sombreamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 3, p. 652-655, 2001.

SANTOS, M. S.; PEREIRA-FILHO, E. R.; FERREIRA, A. G.; BOFFO, E. F.; FIGUEIRA, G. M. Authenticity study of *Phyllanthus* species by NMR and FT-IR techniques coupled with chemometric methods. **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2210-2217, 2012.

SEBOLD, D. F. **Levantamento etnobotânico de plantas de uso medicinal no município de Campo Bom, Rio Grande do Sul, Brasil**. 2003. 107f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

SILVA, M. J.; SALES, M. F. O gênero *Phyllanthus* L. (Phyllanthaceae–Euphorbiaceae Juss) no bioma Caatinga do estado de Pernambuco– Brasil. **Rodriguésia**, v. 55, n. 84, p. 101-126, 2004.

SILVA M. J.; SALES M. F. *Phyllanthus* L. (Phyllanthaceae) em Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, n. 1, p. 79-98, 2007.

SILVA, T. C. L.; SOUZA, I. A.; ARAÚJO, E. C.; AMORIM, E. L. C.; GOMES, T. L. B.; FILHO, J. V. Estudo de toxicidade subcrônica de *Phyllanthus tenellus* Roxb.: Avaliação comportamental. **Revista de Enfermagem, UFPE Online**, v. 2, n. 1, p. 17-22, 2008.

SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 618-626, 2008.

SIMÕES, O. M. C.; SPITZER, V. **Farmacognosia, da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007.

- SOBREIRA, G. C. **Mecanismos de atividade antiúlcera de *Phyllanthus tenellus* Roxb. (Phyllanthaceae) e isolamento dos principais constituintes.** 2016. 103f. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos, Área de Insumos Farmacêuticos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- SOUZA, S. A. M. **Biotestes na Avaliação da Fitotoxicidade de Extratos Aquosos de Plantas Medicinais Nativas do Rio Grande do Sul.** 2005. 89f Monografia (Curso de Ciências Biológicas)- Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.
- SOUZA, J. R. P.; MORAIS, H.; CARAMORI, P. H.; JOHANNSSON, L. A. P. S.; MIRANDA, L. V. Desenvolvimento da espinheira-santa sob diferentes intensidades luminosas e níveis de poda. **Horticultura Brasileira**, v. 26, p. 40-44, 2009.
- SOUZA, L. F. B.; LAUGHINGHOUSE IV, H. D.; PASTORI, T.; TEDESCO, M.; KUHN, A. W.; CANTO-DOROW, T. S.; TEDESCO, S. B. Genotoxic potential of aqueous extracts of *Artemisia verlotorum* on the cell cycle of *Allium cepa*. **International Journal of Environmental Studies**, v. 67, n. 6, p. 871-877, 2010.
- SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 435-440, 2010.
- SPRENGER, R. F.; CASS, Q. B. Characterization of four *Phyllanthus* species using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1291, p. 97-103, 2013.
- TAKECHI, M.; TANAKA, Y.; TAKEHARA, M.; NONAKA, G.; NISHIOKA, I. Structure and antiherpetic activity among the tannins. **Phytochemistry**, v. 24, p. 2245-2250, 1985.
- TEDESCO, S. B.; LAUGHINGHOUSE IV, H. D. Bioindicator of genotoxicity: the *Allium cepa* test. In: **Environmental Contamination**, InTech Publisher, p. 137-156, 2012.

TEIXEIRA, R. O.; CAMPAROTO, M. L.; MANTOVANI, M. S.; VICENTINI, V. E. P. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L. in in vivo assays. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, p. 551-555, 2003.

THE PLANT LIST. Quick name search. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org>>. Acesso em: 10 outubro 2019.

UBESSI, C.; TEDESCO, S. B.; DA SILVA, C. D. B.; BALDONI, M.; KRYSCZUN, D. K.; HEINZMANN, B. M.; ROSA, I. A.; MORI, N. C. Antiproliferative potential and phenolic compounds of infusions and essential oil of chamomile cultivated with homeopathy. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 239, 2019.

VARANDA, E. A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 27, n. 1, p. 1-7, 2006.

VENDRUSCOLO, G. S.; RATES, S. M. K.; MENTZ, L. A. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 361-372, 2005.

VENDRUSCOLO, G. S. **Estudo etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais por moradores do bairro Ponta Grossa**. 2004. 276f. Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

VICENTINI, V. E. P.; CAMPAROTO M. L.; TEIXEIRA R. O.; MANTOVANI, M. S. *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissus sicyoides* L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and test systems. **ActaScientiarum**, v. 23, p. 593-598, 2001.

VICTORIO, C. P.; LEAL-COSTA, M. V.; TAVARES, E. S.; KUSTER, R. M.; LAGE, C. S. Effects of Supplemental UV-A on the Development, Anatomy and Metabolite Product of *Phyllanthus tenellus* Cultured In Vitro. **Photochemistry and Photobiology**, v. 87, p. 685-689, 2011.

VOLPATO, A. M. M. **Investigação do potencial antibacteriano de *Calendula officinalis* (Asteraceae) para seu emprego como fitoterápico.** 2005. 115f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

WEBSTER, G. L. A monographic study of the West Indian species of *Phyllanthus*. **Journal of the Arnold Arboretum**, v. 48, p. 111-212, 1958.

WEBSTER, G. L. Three new sections and a new subgenus of *Phyllanthus* (Euphorbiaceae). **Novon**, v. 12, p. 290-298, 2002a.

WEBSTER, G. L. A synopsis of the Brazilian taxa of *Phyllanthus* section *Phyllanthus* (Euphorbiaceae). **Lundellia**, v. 5, p. 1-26, 2002b.

WEBSTER, G. L.; CAERPENTER, K. J. Pollen morphology and phylogenetic relationships in neotropical *Phyllanthus* (Euphorbiaceae). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 138, p. 325-338, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants.** Genebra, v. 1, p. 133, 2003.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. B. **Flavonóides in: Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 6 ed. Organizado por Simões. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.