

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Fernanda Brum Pires

***Ruellia angustiflora* (NEES) LINDAU EX RAMBO (ACANTHACEAE):
ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO**

Santa Maria, RS
2020

Fernanda Brum Pires

***Ruellia angustiflora* (NEES) LINDAU EX RAMBO (ACANTHACEAE):
ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Ciências Farmacêuticas**.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Barcellos da Rosa

Santa Maria, RS
2020

Pires, Fernanda Brum
Ruellia angustiflora (NEES) LINDAU EX RAMBO
(ACANTHACEAE): ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO / Fernanda Brum
Pires.- 2020.
124 p.; 30 cm

Orientador: Marcelo Barcellos da Rosa
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2020

1. Plantas Medicinais 2. Fitocompostos 3.
Caracterização Química 4. Estudo Biológico 5. Propriedades
Medicinais I. da Rosa, Marcelo Barcellos 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, FERNANDA BRUM PIRES, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) 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.

Fernanda Brum Pires

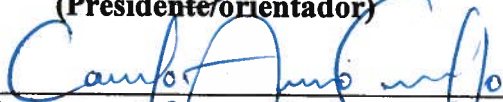
***Ruellia angustiflora* (NEES) LINDAU EX RAMBO (ACANTHACEAE):
ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Ciências Farmacêuticas**.

Aprovado em 27 de Março de 2020:



Marcelo Barcellos da Rosa, Dr.
(Presidente/orientador)



Camilo Amaro de Carvalho, Dr. (UFV) - Parecer



Liliana Essi, Dra. (UFSM) - Parecer



Ionara Regina Pizzutti, Dra. (UFSM) - Parecer



Michele Rorato Sagrillo Dra. (UFN) - Parecer

Santa Maria, RS
2020

RESUMO

***Ruellia angustiflora* (NEES) LINDAU EX RAMBO (ACANTHACEAE): ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO**

AUTORA: Fernanda Brum Pires
ORIENTADOR: Marcelo Barcellos da Rosa

Ruellia angustiflora (Nees) Lindau Ex Rambo (Acanthaceae) é conhecida popularmente como “flor de fogo” e suas folhas são usadas para promover a cicatrização de feridas, mas não há evidências científicas que apoiem seu uso popular. Esta tese tem como objetivo extrair e caracterizar os extratos de *R. angustiflora* obtidos por fluido supercrítico e sonda de ultrassom, afim de obter um panorama da composição química da espécie. Além disso, investigar as atividades antioxidante, antimicrobiana, citogenotóxica, antitrypanosoma, nematicida e cicatrizante de feridas, afim de respaldar seu uso popular. A extração por fluido supercrítico usando dióxido de carbono (SFE-CO₂) identificou ácidos graxos, triterpenos, tetraterpenos, tocoferóis e fitoesteróis. A extração assistida por ultrassom usando etanol (EAU-EtOH), apresentou ácidos fenólicos e flavonoides. Os dois extratos apresentaram atividade antioxidante frente ao radical DPPH, tendo o extrato UAE-EtOH apresentado maior atividade (IC₅₀ 26,1±1,4 µg/mL) que SFE-CO₂ (IC₅₀ 242,4 ± 5,5 µg/mL), sendo o padrão ácido ascórbico (IC₅₀ 8,2 ± 0,2 µg/mL). O extrato EAU-EtOH na concentração de 130 mg/mL, foi capaz de inibir o crescimento bacteriano de *Acinetobacter baumannii* e *Aeromonas caviae* pelo método de difusão em disco. Para ambos micro-organismos a concentração inibitória mínima foi de 4,4 mg/mL. O tempo de morte foi avaliado como forma complementar ao estudo da atividade antibacteriana. Pelo método de difusão com perfuração de poço o extrato EAU-EtOH apresentou atividade antibacteriana contra *Proteus vulgaris*, *Citrobacter freundii*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* até a concentração de 17,5 mg/mL e para *Escherichia coli* até 35 mg/mL. O extrato SFE-CO₂ na concentração de 130 mg/mL não apresentou atividade antimicrobiana para ambos os métodos avaliados. Tanto o extrato SFE-CO₂ como o UAE-EtOH não apresentaram citotoxicidade pelo teste de MTT ((3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5- difenil brometo de tetrazolina) nem genotoxicidade no ensaio cometa nas concentrações 500-31,25 µg/mL e 62,5-1,9 µg/mL, respectivamente. Em média os extratos SFE-CO₂ e UAE-EtOH e as diluições eliminaram 75% e 77% de larvas J2 do nematoide *Meloidogyne javanica*, respectivamente. Os extratos SFE-CO₂ e UAE-EtOH nas concentrações de 500, 125 e 31,25 mg/mL e 62,5, 15,6 e 1,9 mg/mL respectivamente ao final do experimento (9h), levaram a morte de 100% de *Trypanosoma evansi*. A avaliação do processo de cicatrização em modelo animal revelou a eficácia do extrato UAE-EtOH em relação à sulfadiazina de prata na concentração de 70 mg/mL. Importantes fitocompostos foram identificados nos extratos de *R. angustiflora*, ratificando as atividades, antioxidante, antimicrobiana, anti-trypanosoma, nematicida e cicatrizante. Ainda sugere-se segurança destes, visto que não resultaram em efeitos citogenotóxicos. Portanto, o uso medicinal de *R. angustiflora* é justificável, podendo em estudos futuros ser utilizada como ingrediente ativo em formulação para aplicação clínica no desenvolvimento de novos medicamentos.

Palavras-chaves: Plantas Medicinais. *Ruellia angustiflora*. Antioxidante. Antimicrobiana. Nematicida. Anti-trypanosoma. Cicatrizante. Atóxica.

ABSTRACT

***Ruellia angustiflora* (NEES) LINDAU EX RAMBO (ACANTHACEAE): CHEMICAL AND BIOLOGICAL STUDY**

AUTHOR: Fernanda Brum Pires
ADVISOR: Marcelo Barcellos da Rosa

Ruellia angustiflora (Nees) Lindau Ex Rambo (Acanthaceae) is popularly known as “fire flower” and its leaves are used to promote wound healing, but there is no scientific evidence to support its popular use. This thesis aims to extract and characterize the extracts of *R. angustiflora* obtained by supercritical fluid and ultrasound probe, in order to obtain an overview of the chemical composition of the species. In addition, to investigate the antioxidant, antimicrobial, cytogenotoxic, antitrypanosone, nematicide and wound healing activities, to justify its popular use. Supercritical fluid extraction using carbon dioxide (SFE-CO₂) identified fatty acids, triterpenes, tetraterpenes, tocopherols and phytosterols. Ultrasound-assisted extraction using ethanol (EAU-EtOH), presented phenolic acids and flavonoids. The two extracts showed antioxidant activity against the DPPH radical, with the UAE-EtOH extract showing greater activity (IC₅₀ 26.1 ± 1.4 µg/ mL) than SFE-CO₂ (IC₅₀ 242.4 ± 5.5 µg/mL), the standard being ascorbic acid (IC₅₀ 8.2 ± 0.2 µg/mL). The EAU-EtOH extract at a concentration of 130 mg/mL, was able to inhibit the bacterial growth of *Acinetobacter baumannii* and *Aeromonas caviae* by the disk diffusion method. For both microorganisms the minimum inhibitory concentration was 4.4 mg/mL. The time of death was evaluated as a complement to the study of antibacterial activity. By the diffusion method with well drilling, the EAU-EtOH extract showed antibacterial activity against *Proteus vulgaris*, *Citrobacter freundii*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* up to a concentration of 17.5 mg/mL and for *Escherichia coli* up to 35 mg/mL. The SFE-CO₂ extract at a concentration of 130 mg/mL did not show antimicrobial activity for both methods evaluated. Both the SFE-CO₂ extract and the UAE-EtOH did not show cytotoxicity by the MTT ((3- (4,5-dimethylthiazol-2yl) -2,5-diphenyl tetrazoline bromide) test or genotoxicity in the comet assay at concentrations 500-31.25 µg/mL and 62.5-1.9 µg/mL, respectively. On average, the SFE-CO₂ and UAE-EtOH extracts and the dilutions eliminated 75% and 77% of J2 larvae of the *Meloidogyne javanica* nematode, respectively. The extracts SFE-CO₂ and UAE-EtOH at concentrations of 500, 125 and 31.25 mg/mL and 62.5, 15.6 and 1.9 mg/mL respectively at the end of the experiment (9 h), led to the death of 100% *Trypanosoma evansi*. The evaluation of the healing process in an animal model revealed the effectiveness of the UAE-EtOH extract in relation to silver sulfadiazine at a concentration of 70 mg/mL. Important phytochemicals were identified in the extracts of *R. angustiflora*, ratifying the activities, antioxidant, antimicrobial, anti-trypanosoma, nematicide and healing. Their safety is still suggested, as they did not result in cytogenotoxic effects. Therefore, the medicinal use of *R. angustiflora* is justified, and in future studies it can be used as an active ingredient in formulation for clinical application in the development of new drugs.

Keywords: Medicinal plants. *Ruellia angustiflora*. Antioxidant. Antimicrobial. Nematicide. Anti-trypanosoma. Healing. Non-toxic.

LISTAS DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 - <i>Ruellia angustiflora</i> , município de Santa Maria, RS	16
Figura 2- Biossíntese dos metabólitos secundários	18
Figura 3- Procedimento de extração em fase sólida	23

MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 4- Esquema da extração supercrítica	37
Figura 5- Fluxograma esquemático dos procedimentos envolvidos nesse trabalho	51

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 6 - Atividade antioxidante dos extratos frente ao radical DPPH	66
Figura 7 - Avaliação da Citotoxicidade pelo ensaio de MTT dos extratos SFE-CO ₂ e UAE-EtOH de <i>R. angustiflora</i>	68
Figura 8- Avaliação da Genotoxicidade pelo ensaio de Cometa dos extratos SFE-CO ₂ e UAE-EtOH de <i>R. angustiflora</i>	68
Figura 9- Curva de Tempo de Morte do extrato UAE-EtOH de <i>R. angustiflora</i> frente a <i>Acinetobacter baumannii</i>	72
Figura 10- Curva de Tempo de Morte do extrato UAE-EtOH frente a <i>Aeromonas caviae</i>	73
Figura 11- Número de juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne</i> vivos após ação do extrato SFE-CO ₂ de <i>R. angustiflora</i>	78
Figura 12- Número de juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne</i> vivos após ação do extrato UAE-EtOH <i>R. angustiflora</i>	79
Figura 13- Atividade tripanocida do extrato UAE-EtOH de <i>R. angustiflora</i> frente a <i>Trypanosoma evansi</i>	81
Figura 14- Atividade tripanocida do extrato SFE-CO ₂ de <i>R. angustiflora</i> frente a <i>Trypanosoma evansi</i>	82
Figura 15- Avaliação macroscópica do processo de cicatrização	84
Figura 16- Avaliação do processo de Cicatrização - (A) área da ferida, (B) taxa de regressão, (C) celularidade, (D) vascularização, (E) fibras de colágeno III, (F) fibras de colágeno I	85
Figura 17- Fotomicrografias representativas da celularidade tecidual no processo de cicatrização em cortes histológicos de pele de ratos observados ao microscópio de luz	87
Figura 18- Fotomicrografias representativas da síntese de colágeno no processo de cicatrização dos animais	88

LISTA DE TABELAS

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 1 - Parâmetros do método analítico empregando UPLC-MS	53
Tabela 2- Constituintes fenólicos determinados por UPLC-MS em <i>Ruellia angustiflora</i> ...	55
Tabela 3 - Possíveis atividades farmacológicas dos compostos identificados por UPLC-MS	57
Tabela 4 - Dados obtidos por GC-MS	60
Tabela 5 - Atividades farmacológicas dos compostos identificados por GC-MS	62
Tabela 6 - Dados obtidos da atividade antirradicalar frente ao radical DPPH.....	65
Tabela 7- Halo de inibição obtido para o extrato UAE-EtOH de <i>R. angustiflora</i>	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CO ₂	Dióxido de carbono
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
Ágar BHI	<i>Brain Heart Infusion agar</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CLSI	Instituto de Normas de Laboratório Clínico (do inglês <i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>)
CN	Controle netativo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EAU-EtOH	Extração assistida por ultrassom usando etanol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EI	Ionização eletrônica (do inglês <i>Electron ionization</i>)
ESI	Ionização eletrospray (do inglês <i>electrospray ionization</i>)
GC	Cromatografia gasosa (do inglês <i>gas chromatography</i>)
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (do inglês <i>gas chromatography-mass spectrometry</i>)
HE	Hematoxilina-eosina
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês <i>high liquid performance chromatography</i>)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50%
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
m/z	Razão massa-carga
MIC	Concentração Inibitória Mínima (do inglês <i>minimal inhibitory concentration</i>)
MPa	Mega Pascal
MRM	Monitoramento de reação múltipla, (do inglês <i>multiple reaction monitoring</i>)
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5- difenil brometo de tetrazolina
SFE-CO ₂	Extração por fluido supercrítico usando dióxido de carbono
SPE	Extração em fase sólida (do inglês <i>solid phase extraction</i>)
SULF	Sulfadiazina de prata
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico (do inglês <i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
UFC	Unidade formadora de colônia
UPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência (do inglês <i>ultra performance liquid chromatography</i>)
UPLC-MS	Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas (do inglês <i>ultra efficient liquid chromatography coupled with mass spectrometry</i>)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 OBJETIVOS	13
1.1.1 Objetivo Geral	13
1.1.2 Objetivos Específicos	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 BIOMA PAMPA	14
2.2 ACANTHACEAE E O GÊNERO <i>RUELLIA</i> L.	14
2.2.1 <i>Ruellia angustiflora</i> (Nees) Lindau ex Rambo	15
2.3 METABOLISMO VEGETAL	16
2.4 COMPOSTOS FENÓLICOS	18
2.5 TERPENÓIDES	19
2.6 FITOESTEROIS	20
2.7 VITAMINA E (TOCOFEROL)	20
2.8 ÁCIDOS GRAXOS	21
2.9 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO	21
2.9.1 Sonda de Ultrassom	21
2.9.1.1 Extração em Fase Sólida - SPE	22
2.9.2 CO ₂ supercrítico	23
2.10 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO	24
2.10.1 Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada na espectrometria de massas (UPLC-MS)	24
2.10.2 Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS)	25
2.11 RADICAIS LIVRES E ANTIOXIDANTES	25
2.12 ATIVIDADE ANTIRRADICALAR	26
2.12.1 Método do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)	27
2.13 ATIVIDADE CITOTÓXICA E GENOTÓXICA	27
2.14 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	29
2.15 ATIVIDADE NEMATICIDA	31
2.16 ATIVIDADE ANTI-TRYPANOSOMA	32
2.17 ATIVIDADE CICATRIZANTE DE FERIDAS	32
3 METODOLOGIA	35
3.1 PLANTA ESTUDADA	35
3.2 PREPARO DOS EXTRATOS	35
3.2.1 Extração com sonda de ultrassom	35
3.2.1.1 Preparo da amostra por extração em fase sólida	36
3.2.2 Extração com CO ₂ supercrítico	36
3.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS	37
3.3.1 Metodologia analítica para compostos polares empregando UPLC-MS	37
3.3.1.1 Reagentes e soluções	38
3.3.2 Metodologia analítica para compostos não polares empregando GC-MS	38
3.4 ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	39
3.4.1 Determinação da Atividade Antirradicalar	39
3.4.1.1 Método do radical DPPH	39
3.4.2 Citotoxicidade e genotoxicidade	40
3.4.2.1 Obtenção de células sanguíneas	40
3.4.2.2 Separação dos linfócitos e tratamentos	40

3.4.2.3 Avaliação da viabilidade celular por MTT.....	41
3.4.2.4 Ensaio cometa	41
3.4.2.5 Análise Estatística	42
3.4.3 Avaliação da Atividade Antimicrobiana	42
3.4.3.1 Atividade antimicrobiana pelo método de disco-difusão, microdiluição em caldo e curva de tempo de morte	42
3.4.3.1.1 Micro-organismos	42
3.4.3.1.2 Preparo do inóculo	42
3.4.3.1.3 Método de difusão em ágar: Disco-difusão	43
3.4.3.1.4 Microdiluição em Caldo - Concentração Inibitória Mínima (MIC)	43
3.4.3.1.5 Curva de Tempo de Morte	44
3.4.3.2 Atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar: perfuração de poço.....	44
3.4.3.2.1 Preparação da amostra	44
3.4.3.2.2 Micro-organismos e condições de cultura	45
3.4.3.2.3 Perfuração de poço	45
3.4.4 Avaliação Atividade Nematicida	45
3.4.4.1 Obtenção e preparo do inóculo de <i>Meloidogyne javanica</i>	46
3.4.4.2 Efeito da ação dos extratos em larvas de segundo estágio de <i>Meloidogyne javanica</i>	46
3.4.4.3 Análise Estatística	46
3.4.5 Avaliação Atividade anti-<i>Trypanosoma evansi</i>	46
3.4.5.1 <i>Trypanosoma evansi</i> isolamento e ensaio	47
3.4.5.2 Análise dos dados	48
3.5 ENSAIOS <i>IN VIVO</i>	48
3.5.1 Avaliação da Atividade Cicatrizante dos extratos	48
3.5.1.1 Incisão cirúrgica e tratamentos dos animais	48
3.5.1.2 Avaliação das feridas	49
3.5.1.3 Coleta e processamento histológico do material	49
3.5.1.4 Avaliação histopatológica e histomorfométrica do processo de cicatrização	50
3.5.1.5 Análise estatística	50
3.6 FLUXOGRAMA ESQUEMÁTICO DOS PROCEDIMENTOS ENVOLVIDOS NESSE TRABALHO	51
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA POR UPLC-MS	52
4.2 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA POR GC-MS	60
4.3 ATIVIDADE ANTIRRADICALAR FRENTE AO RADICAL DPPH	65
4.4 ATIVIDADE CITOTÓXICA E GENOTÓXICA	67
4.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	69
4.5.1 Ensaio Disco-Difusão	69
4.5.2 Concentração Inibitória Mínima(MIC)	70
4.5.3 Curva de morte	71
4.5.4 Difusão com Perfuração de poço	74
4.6 ATIVIDADE NEMATICIDA	78
4.7 ATIVIDADE ANTI-TRYPANOSOMA	80
4.8 ATIVIDADE CICATRIZANTE: HISTOPATOLOGIA E ANÁLISE CLÍNICA DOS ANIMAIS	83
5 CONCLUSÃO	91
REFERÊNCIAS	93
APÊNDICE A – CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR UPLC-MS.....	116
APÊNDICE B – CROMATOGRAMA OBTIDO POR GC-MS	122

ANEXO A – ESTRUTURAS QUÍMICAS: COMPOSTOS OBTIDOS POR UPLC-MS	
.....	123
ANEXO B – ESTRUTURAS QUÍMICAS: COMPOSTOS OBTIDOS POR GC-MS ...	124

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais como recurso terapêutico é uma prática milenar exercida desde os primórdios da humanidade (VEIGA; PINTO; MACIEL, 2005; BATISTA et al., 2012; BRITO et al., 2017). O emprego da fitoterapia originou-se a partir dos conhecimentos populares e durante muito tempo permaneceu como única alternativa para os problemas de saúde (ALVIM et al., 2006; SILVA; SANTOS; RABELO, 2010; GADELHA et al., 2013).

Ao longo dos anos, gradualmente o uso de plantas abandonou o lado empírico à medida que foram comprovadas cientificamente a eficácia de algumas espécies (PETROVSKA, 2012). Sendo nas últimas décadas consolidado por atuar de maneira complementar a medicina moderna (ALVIM et al., 2006; POPOVIĆ et al., 2016).

No Brasil, o uso de plantas medicinais é facilitado pois, o país apresenta a maior biodiversidade resultando numa infinidade de princípios ativos (BRASIL, 2006; PORT'S et al., 2013). Em contrapartida, sabe-se que muitas das plantas desta biodiversidade ainda não foram exploradas (BOLZANI et al., 2012). Acredita-se que aproximadamente 50.000 espécies de plantas superiores tenham sido usadas medicinalmente e apenas 5.000 apresentem evidências para uso medicinal (POPOVIĆ et al., 2016).

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas - IBGE (2004), o Brasil apresenta seis biomas distintos (Amazônia, Mata Atlântica, Caatinga, Cerrado, Pantanal e Pampa). Alguns biomas têm se tornado o foco de estudos na última década. Um desses biomas é o Pampa, que abrange, no Brasil, apenas o estado do Rio Grande do Sul (BRASIL, 2017).

Inúmeras famílias botânicas do bioma Pampa despertam interesse como a Acanthaceae, ordem Lamiales (AFZAL et al., 2015), que inclui 23 famílias e cerca de 22.000 espécies. Dessas, inúmeras de uso medicinal. Dentre algumas outras famílias de grande destaque dessa ordem tem-se: Bignoniaceae (família do ipê), Lamiaceae (família da hortelã e do alecrim) e Oleaceae (família das oliveiras) (WORTLEY et al., 2005). Em vista disso, torna-se relevante a busca de princípios ativos de interesse farmacêutico através da pesquisa em espécies filogeneticamente afins a outras previamente conhecidas.

Inserido na família Acanthaceae o gênero *Ruellia* é um dos mais ricos devido a sua diversidade, compreende mais de 250 espécies (FARIA; ARAUJO, 2010). A família, assim como o gênero, caracterizam-se por apresentar espécies utilizadas como ornamentais (MEYER; LAVERGNE, 2004; CHOTHANI et al., 2010).

Diversas espécies desse gênero são utilizadas na medicina tradicional, sendo respaldadas por estudos reportados na literatura que demonstram as atividades biológicas (SAMY et al., 2015; AFZAL et al., 2015). Entretanto, considerando-se a abrangência do gênero, muitas espécies ainda precisam ser investigadas devido à falta de informações científicas, como *Ruellia angustiflora* (Nees) Lindau ex Rambo, com ocorrência no município de Santa Maria, Rio Grande do Sul.

Nesse sentido, a escolha da metodologia empregada para recuperação e isolamento dos constituintes bioativos no material vegetal é de grande importância (STALIKAS, 2007), uma vez que cada processo afeta a seletividade, principalmente quando envolve a pesquisa de compostos antioxidantes, já que estes são sensíveis à ação da luz, oxigênio e calor (ANDREO; JORGE, 2006; PEREIRA; MEIRELES, 2010). Para isso, é necessária uma avaliação dos métodos extrativos a fim de se garantir eficiência e qualidade do material que será analisado. Dessa forma, os métodos de extração não convencionais têm se destacado. A aplicação da tecnologia supercrítica, utilizando dióxido de carbono como solvente, é uma alternativa eficiente para extração de compostos bioativos. Por se tratar de um processo livre de resíduos tóxicos e conduzidos em baixas temperaturas, não provoca a degradação térmica dos extratos. Além disso, proporciona melhor seletividade e eficiência ao processo (PEREIRA et al., 2004). Já a extração por ultrassom utiliza uma quantidade de solvente inferior as demais, além de proporcionar uma melhor extração em um tempo mais curto (LUQUE DE CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2007; PORTO; PORRETTO; DECORTI, 2013).

Os procedimentos de extração mencionados, permitem a determinação dos constituintes responsáveis pelas atividades biológicas e/ou farmacológicas por meio de análises cromatográficas, como a cromatografia líquida de ultra eficiência e cromatografia gasosa ambas acopladas à espectrometria de massas, favorecendo a comprovação do potencial medicinal da espécie.

Por meio de pesquisa nas bases de dados Scopus, ScienceDirect, PubMed e Google acadêmico, até o presente momento não foram encontrados estudos nesse sentido envolvendo a espécie de *Ruellia angustiflora*. Portanto, este trabalho visa coletar informações dos constituintes químicos majoritários, avaliar *in vitro* a atividade antirradicalar, antimicrobiana, nematocida, anti-trypanosoma, potencial citogenotóxico e cicatrizante dos extratos da espécie obtidos por SFE-CO₂ e UAE-EtOH, com a finalidade de investigar as potencialidades farmacológicas dessa espécie.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Estudar química e biologicamente a espécie *Ruellia angustiflora* (Nees) Lindau ex Rambo.

1.1.2 Objetivos Específicos

- ✓ Extrair os compostos bioativos não polares de *Ruellia angustiflora* através da extração por fluido supercrítico utilizando dióxido de carbono (SFE-CO₂);
- ✓ Extrair os compostos bioativos polares de *Ruellia angustiflora* através da extração assistida por ultrassom usando etanol (UAE-EtOH);
- ✓ Caracterizar cromatograficamente os constituintes químicos dos extratos SFE-CO₂ e UAE-EtOH de *Ruellia angustiflora*;
- ✓ Verificar atividade antirradicalar dos extratos SFE-CO₂ e UAE-EtOH de *Ruellia angustiflora*;
- ✓ Avaliar o potencial citotóxico e genotóxico *in vitro* dos extratos SFE-CO₂ e UAE-EtOH de *Ruellia angustiflora*;
- ✓ Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos SFE-CO₂ e UAE-EtOH de *Ruellia angustiflora*;
- ✓ Avaliar a atividade nematicida *in vitro* dos extratos SFE-CO₂ e UAE-EtOH *Ruellia angustiflora*;
- ✓ Avaliar a atividade anti-trypanosoma *in vitro* dos extratos SFE-CO₂ e UAE-EtOH *Ruellia angustiflora*;
- ✓ Avaliar o efeito cicatrizante *in vivo* dos extratos SFE-CO₂ e UAE-EtOH de *Ruellia angustiflora*;

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIOMA PAMPA

O pampa é um dos seis biomas terrestres do Brasil. Porém não é exclusivamente brasileiro, pois abrange todo Uruguai, centro-leste da Argentina e o extremo sudeste do Paraguai, além da metade sul do Rio Grande do Sul. Essa região, denominada *Pastizales del Río de la Plata* ou, simplesmente, Campos e Pampas, constitui a maior extensão de ecossistemas campestres de clima temperado do continente sul-americano. (BENCKE, CHOMENKO, SANT'ANNA, 2016). No Brasil, o bioma Pampa está restrito ao estado do Rio Grande do Sul, onde ocupa 178.243 km², o que corresponde a 63% do território estadual e a 2,07% do território nacional. O bioma abriga uma riquíssima biodiversidade. Estimativas indicam valores em torno de 3.000 espécies de plantas (BRASIL, 2014).

De acordo com Overbeck e colaboradores (2007) e Pillar e Vélez, (2010), o grau de proteção dos campos sulinos é muito baixo, sua conservação esta sendo negligenciada. Dessa forma, muitas espécies ainda não foram exploradas e podem desaparecer sem nunca terem sido estudadas.

A perda dessa diversidade compromete o potencial e desenvolvimento da região, seja pela perda de espécies de valor alimentar, ornamental e medicinal, seja pelo comprometimento ambiental, visto que a vegetação campestre proporciona controle da erosão do solo, sequestro de carbono e atenuação das mudanças climáticas (BRASIL, 2014).

2.2 ACANTHACEAE E O GÊNERO *RUELLIA* L.

Acanthaceae inclui cerca de 240 gêneros e cerca de 3.250 espécies, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo e algumas áreas temperadas. Os centros de diversidade da família são: Indo-Malásia, África, América Central, Andes e Brasil (MARCHIORETTO, 2016). No Brasil, apresenta-se em todas as regiões (Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul), possui 5 gêneros e 251 espécies endêmicas (REFLORA, 2020).

Dentro desta família, tem-se o gênero *Ruellia* L., o Brasil possui 84 espécies distribuídas em todos os domínios fitogeográficos (Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal). A região Sul, detém 17 espécies do gênero (REFLORA, 2020). No Rio Grande do Sul são descritas 12 espécies de *Ruellia* (MARCHIORETTO, 2016).

O gênero *Ruellia* caracteriza-se por apresentar espécies ornamentais populares e algumas medicinais. Por exemplo, tem-se *Ruellia tuberosa* Linn. introduzida na Índia e África como ornamental e tem sido utilizada na medicina tradicional apresentando atividades como: diurética, antidiabética, antipirética, analgésica, antioxidante, anti-hipertensiva, protetora gástrica e no tratamento da gonorreia (CHOTHANI; MISHRA, 2012; AFZAL et al., 2015).

As folhas de *Ruellia prostrata* Poir. são usadas no tratamento de reumatismo crônico, paralisia facial e cólicas infantis. Das folhas de *Ruellia patula* Jacq. é feita uma solução e aplicada para problemas no ouvido; *Ruellia hygrophila* Mart. tem atividade antiespasmódica e analgésica (AFZAL et al., 2015). *Ruellia asperula* (Mart. & Nees) Lindau é utilizada no tratamento da bronquite, asma, gripe, febre e inflamação do útero (ALBUQUERQUE et al., 2007)

A presença de importantes metabólitos secundários como flavonoides, esteroides, triterpenos, cumarinas e alcaloides são referenciados a espécies de *Ruellia* (SALAH; GATHUMBI; VIERLING, 2002; CHOTHANI et al., 2010; SAMY et al., 2015). Estes compostos são responsáveis por conferir as atividades cardiovascular (cardiotônica), anti-hiperglicêmica, citotóxica, antibacteriana, antioxidante, antinociceptiva, anti-inflamatória, gastroprotetora e cicatrizante de feridas, dentre outras já comprovadas para espécies deste gênero (SAMY et al., 2015; AFZAL et al., 2015).

2.2.1 *Ruellia angustiflora* (Nees) Lindau ex Rambo

Ruellia angustiflora tem ocorrência no Brasil, Uruguai, Paraguai e Argentina, sendo encontrada em habitats úmidos e ensolarados (FARIA; ARAUJO, 2010), desenvolve-se em bordas e interior de matas, beira de estradas e próximo a arroios (FUHRO; VARGAS; LAROCCA 2005; MARCHIORETTO, 2016). No Brasil, distribui-se nas regiões Centro-Oeste (Mato Grosso do Sul, Mato Grosso), Sudeste (São Paulo) e Sul (Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina) (REFLORA, 2020).

É uma espécie nativa, na forma de arbusto, suas folhas tem pecíolo de 10 a 50 mm de comprimento, apresenta forma elíptica (comprimento duas vezes maior que a sua largura, sendo a região central do limbo a mais larga), flores de cor vermelha (REFLORA, 2020). Popularmente conhecida por flor-de-fogo, devido a cor vermelha de suas flores (ALICE et al., 1995; FUHRO; VARGAS; LAROCCA 2005) e suas folhas são referenciadas como

cicatrizantes na medicina tradicional (ALICE et al., 1995). Na figura 1, imagem de *Ruellia angustiflora*.

Figura 1 - *Ruellia angustiflora*, município de Santa Maria, RS.



Fonte: Autor.

2.3 METABOLISMO VEGETAL

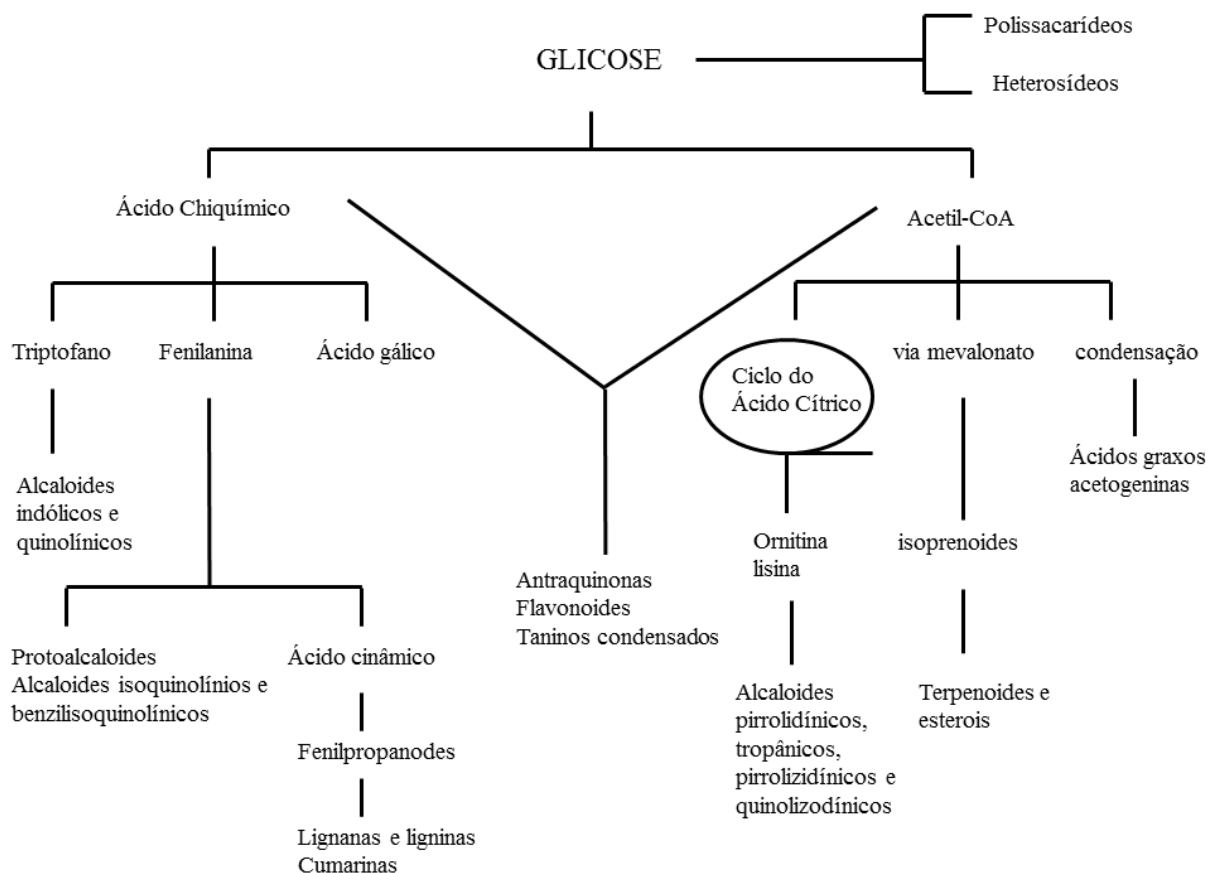
Metabolismo é o conjunto de transformações das moléculas orgânicas, catalisadas por enzimas, que ocorre em células vivas, fornecendo energia e garantindo a continuidade das espécies. O metabolismo vegetal compreende metabólitos, conhecidos por primários e secundários (PEREIRA; CARDOSO, 2012; LIMA; SILVA, 2016).

O metabolismo primário ou também chamado de essencial é responsável pela síntese de celulose, ligninas, proteínas, lipídeos, açúcares e outras substâncias relacionadas às funções vitais (PEREIRA; CARDOSO, 2012; REZENDE et al., 2016). Dentre estas: divisão celular, crescimento, respiração, armazenamento e reprodução (BOURGAUD et al., 2001).

O metabolismo secundário ou não essencial é produzido a partir do primário, por aminoácidos ou acetil coenzima A (MATSUMURA et al., 2013). Está diretamente envolvido aos mecanismos que permitem a adequação dos vegetais ao meio (PEREIRA; CARDOSO, 2012; REZENDE et al., 2016), pois confere proteção contra patógenos como insetos, fungos, vírus e bactérias e radiação ultravioleta (SANTOS, 2004; TIVERON et al., 2012), e ainda relacionado a diversas atividades biológicas, possuindo importância comercial, devido interesse farmacológico (BOURGAUD et al., 2001; ZUANAZZI; MONTANHA, 2004; REZENDE et al., 2016) e valor nutricional (HUBER; AMAYA, 2008; PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Os metabólitos secundários são classificados com base na origem biosintética e resultam em diversas classes de compostos bioativos (SANTOS, 2004). Em Pereira e Cardoso (2012), a origem destes pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, através de dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato. O ácido chiquímico é precursor de constituintes como: taninos hidrolisáveis, cumarinas, alguns alcaloides e fenilpropanoides; já os derivados do acetato originam terpenoides, esteroides, taninos condensados, alguns alcaloides dentre outros, como mostra a figura 2:

Figura 2 - Biossíntese dos metabólitos secundários:



Fonte: (SANTOS, 2004).

2.4 COMPOSTOS FENÓLICOS

Pode ser definido como “fenólico” ou “polifenólico” uma substância que tem um ou mais núcleos aromáticos contendo substituintes hidroxilados e/ou seus derivados funcionais (ésteres, éteres metílicos, glicosídeos e outros). No entanto, deve-se levar em consideração também sua origem biossintética para coerente definição (ZUANAZZI; MONTANHA, 2004). Estes compostos podem variar de fenólicos simples à estruturas altamente polimerizadas (NACZK; SHAHIDI, 2004).

As ações medicinais que as plantas apresentam resultam da presença de metabólitos secundários em sua constituição (PAREKH; CHANDA, 2006; TAKSHAK, AGRAWAL, 2019). Os compostos fenólicos são um grupo amplamente distribuído no reino vegetal (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2004), proporcionam propriedades antioxidantes (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2004; ZUANAZZI; MONTANHA, 2004;

BANERJEE; RAJAMANI, 2013; ORSAVOVÁ et al., 2019), antimicrobianas (BROWN et al., 2009; BORGES et al., 2013; YIN et al., 2019), antivirais (ZUANAZZI; MONTANHA, 2004) anti-inflamatórias (COUTINHO et al., 2009; ANTUS et al., 2015; YIN et al., 2019), antialérgicas (PIETTA et al., 2000) dentre outras. Nos últimos anos, houve um crescente aumento no interesse, tanto por parte da pesquisa, como quanto pelo consumo humano de polifenóis (AJILA et al., 2011; BUNTE, HENSEL; BEIKLERC, 2019).

Dividem-se em pelo menos 10 classes (BRAVO, 1998); Os ácidos fenólicos provêm da via do ácido chiquímico, podendo ser originados a partir do ácido benzoico (ácido gálico), que possuem esqueleto básico (C_6-C_1), outros se originam a partir ácido hidroxicinâmico (ácido cafeico, ferúlico, *p*-cumárico), este último origina as cumarinas, com esqueleto comum (C_6-C_3). Da combinação de unidades do ácido chiquímico com unidades de acetato, com estrutura básica ($C_6-C_2-C_6$), tem-se os estilbenos e ainda os flavonoides ($C_6-C_3-C_6$), sendo que os últimos podem subdividir-se em diversas classes, dependendo dos substituintes (BRAVO, 1998; SANTOS, 2004).

2.5 TERPENOIDES

Os terpenos são hidrocarbonetos naturais produzidos por uma grande variedade de plantas e animais. Mais de 55 mil moléculas destes compostos já foram descobertos. Os terpenos são compostos derivados de unidades de isopreno (C_5H_8)_n incluem: hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterterpenos, triterpenos, tetrapenos ou carotenoides e politerpenos. Possuem papel no sistema de defesa e adaptação da planta, também mostram importantes propriedades farmacológicas e são de alto interesse para a indústria químico-farmacêutica (BRAHMKSHATRIYA; BRAHMKSHATRIYA, 2013).

Os triterpenos são terpenos constituídos de trinta carbonos (C_{30}) com propriedades farmacológicas promissoras (MUFFLER et al., 2011). Apresenta ação gastroprotetora, hepatoprotetora, anti-inflamatória, antiviral, antitumoral, antimicrobiana, antioxidante, cardioprotetora, dentre outras (MARTELANC et al., 2009; SALEEM, 2009; SÁNCHEZ-ÁVILA et al., 2009; DONFACK et al., 2010; ANGHEL et al., 2013; SCHMIDT et al., 2018).

Os carotenóides são tetraterpenoides (C_{40}) naturais de grande distribuição em plantas, algas, fungos e bactérias. Responsáveis pela pigmentação laranja, amarelo e vermelho de flores, frutos e raízes. Desempenham funções essenciais na fotossíntese e fotoproteção aos vegetais. São componentes essenciais na nutrição humana em razão da fonte de vitaminas e funcionam

como antioxidantes reduzindo o aparecimento de doenças mediadas por radicais livres, como algumas doenças crônicas, cânceres e cardiovasculares (SUN et al., 2018; KULCZYŃSKI et al., 2017).

2.6 FITOESTEROIS

Esteroides vegetais ou fitoesteroides, são um grupo de substâncias naturais que ocorrem em plantas. Estruturalmente caracterizam-se por compostos com (C₂₈) ou (C₂₉) carbonos, diferindo do colesterol (C₂₇) pela presença de uma ramificação metila ou etila adicional na cadeia carbônica (PEREIRA; CARDOSO, 2012). Mais de 200 compostos são descritos, β -sitosterol, campesterol e estigmasterol são os mais comuns sendo foco da maioria das pesquisas (CHERIF, 2012; SHAHZAD et al., 2017).

Dentre os benefícios à saúde humana destaca-se a redução da absorção do colesterol da dieta, com consequente redução dos níveis sanguíneos; A grande similaridade com a molécula do colesterol parece ser responsável pela excreção do colesterol da dieta e consequente redução do colesterol sérico (PEREIRA; CARDOSO, 2012; MERINO et al., 2015). Outras atividades são descritas para esses compostos, como: hepatoprotetor, antitumoral (SHAHZAD et al., 2017), antimicrobiano (CORTEZ et al, 1998) anti-inflamatório e antioxidante (CHERIF, 2012).

2.7 VITAMINA E (TOCOFEROL)

O termo “Vitamina E” é utilizado para designar oito diferentes compostos, nomeados α -, β -, γ - e δ - (alfa, beta, gama e delta) tocoferóis e tocotrienóis (WELLS et al., 2010). Ambos ocorrem em uma variedade de isômeros que diferem na estrutura de acordo com o número e a localização de grupos substituintes no anel cromanol (VASCONCELHOS et al., 2007; GUINAZ et al., 2009). Todos seus isômeros apresentam forte atividade antioxidante (WELLS et al., 2010).

Devido a capacidade antioxidante esses compostos protegem os tecidos contra o ataques de radicais livre, prevenindo diversas patologias associadas ao estresse oxidativo, como doenças neurodegenerativas, aterosclerose, inflamação crônica, câncer e envelhecimento precoce (SAMPAIO; ALMEIDA, 2009; GUINAZ et al., 2009; WELLS et al., 2010; ORSAVOVÁ et al., 2019).

2.8 ÁCIDOS GRAXOS

Os ácidos graxos em plantas são ácidos carboxílicos de cadeias lineares, ou não, com 4 ou mais átomos de carbono (SIMÕES et al., 2004). Os ácidos graxos ocorrem amplamente em gorduras naturais e em óleos da dieta, desempenham papel importante como substâncias nutritivas e metabólitos em organismos vivos (AGORAMOORTHY1 et al., 2007).

Muitos ácidos graxos são conhecidos pelas propriedades antibacterianas e antifúngicas como: ácido palmítico, linolênico, linoleico, oleico, esteárico, entre outros (AGORAMOORTHY1 et al., 2007). Dentre estes, ácido linolênico é o mais abundante ácido graxo na maioria dos tecidos de plantas estando em maior concentração nas sementes (BATISTA et al., 2002; MOREIRA; CURI; MANCINI FILHO, 2002).

2.9 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Extração é uma operação unitária que tem por objetivo a separação de determinadas substâncias em diferentes matrizes, sólidas ou líquidas, através de processos químicos, físicos ou mecânicos (KELLNER et al., 2004). É o principal procedimento para a recuperação e isolamento dos compostos bioativos a partir de plantas antes da análise (STALIKAS, 2007). Dentre os diversos métodos de extração têm-se os chamados convencionais, como soxhlet, hidrodestilação e maceração, e os considerados alternativos a estes como sonda de ultrassom e fluido supercrítico, os quais surgiram a fim de minimizar as desvantagens dos métodos convencionais de extração (VINATORU, 2001; WU et al., 2015).

2.9.1 Sonda de Ultrassom

A extração por sonda de ultrassom apresenta vantagens como simplicidade de operação, tempo reduzido do processo, menor quantidade de solvente utilizado e maior rendimento final (PORTO; PORRETTO; DECORTI, 2013). Pode ser utilizada para a extração de compostos termolábeis, em razão da possibilidade de controle de temperatura (AJILA et al., 2011).

Esse método de extração é considerado uma tecnologia limpa, já que o consumo de solventes é inferior a outros métodos, além de proporcionar uma melhor extração em um tempo menor (LUQUE DE CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2007). A técnica envolve o fenômeno de

cavitação, o qual promove rápida liberação de compostos bioativos da matriz vegetal devido à ruptura da parede celular dos vegetais (VEGGI, 2013; DAL PRÁ et al., 2015).

Devido seu potencial de aplicação na indústria fitofarmacêutica (VILKHU et al., 2008), tem sido bastante empregada para obter extratos ricos em compostos fenólicos (ROUTRAY; ORSAT, 2013) e outros constituintes como estes, com elevada atividade antioxidante (VEGGI, 2013; DAL PRÁ et al., 2017). Ghitescu e colaboradores (2015), reúnem estudos que demonstram o potencial dessa extração na produção rápida e no alto rendimento de polifenóis, como ácidos fenólicos e flavonoides.

Segundo Dal Prá e colaboradores (2015), a extração em ultrassom do extrato vegetal de *Brassica oleracea* var. *capitata* L. apresentou efeito positivo em comparação com extração convencional (maceração). Em análise empregado cromatografia líquida de alta eficiência, observou-se um aumento em média de $36,1 \pm 15,5\%$ da área do pico cromatográfico.

2.9.1.1 Extração em Fase Sólida - SPE

A extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*) é uma etapa prévia de preparo de amostra. Os principais objetivos são promover a extração e, muitas vezes, a concentração dos analitos de interesse e a remoção, tanto quanto possível, dos interferentes (JARDIM et al., 2010). Esse procedimento é utilizado para isolamento, purificação e pré-concentração de fitoquímicos, comumente aplicada para compostos fenólicos (AJILA et al., 2011). Dessa forma, permite que analitos em baixas concentrações nas amostras sejam determinados pelos diversos métodos de caracterização como cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia gasosa e eletroforese capilar (JARDIM et al., 2010).

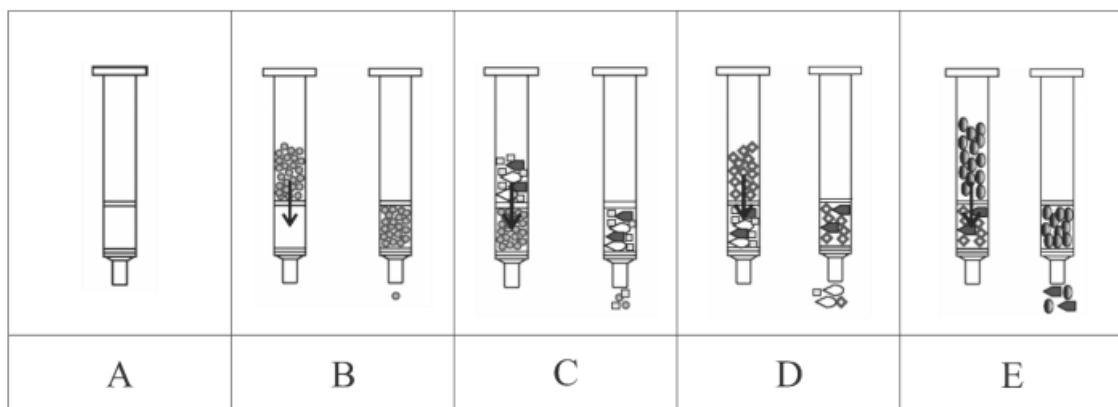
É um método baseado na diferença de afinidade que os analitos da matriz apresentam entre a fase sólida. Dessa forma, quando uma amostra líquida entra em contato com um sorvente sólido, alguns compostos são retidos no sorvente enquanto outros não sofrerão influência da fase sólida (MOLDOVEANU; DAVID, 2002).

A extração em fase sólida se dá através de cartuchos contendo como sorventes grupos orgânicos como C₁₈, C₈, C₂, dentre outros, ligados quimicamente à sílica, semelhantes ao corpo de uma seringa. (CÂMARA et al., 2002; JARDIM et al., 2010). Os sorventes apolares do tipo C₁₈ são constituídos por partículas sólidas de sílica recobertas por cadeias alquílicas, contendo 18 átomos de carbono, quimicamente ligadas ao suporte sólido. Esse tipo de sorvente é bastante adequado para a retenção de compostos orgânicos presentes em amostras líquidas polares (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2009).

Em geral, os procedimentos de extração em fase sólida contêm as seguintes etapas: condicionamento do sorvente com solvente adequado para ajustar as forças do solvente de eluição com o solvente da amostra; introdução da amostra, quando ocorre a retenção do analito e às vezes de alguns interferentes; limpeza da coluna para retirar os interferentes menos retidos que o analito, etapa conhecida como lavagem com solvente ou *clean-up*; eluição do analito (JARDIM et al., 2010).

A representação esquemática das etapas de um método de extração em fase sólida, estão representadas na figura 3: (A) Representação de um cartucho de SPE; (B) etapa de condicionamento do cartucho com um solvente adequado; (C) amostra ou extrato; (D) etapa de lavagem com um solvente adequado; e (E) eluição dos analitos retidos com um solvente de maior força eluotrópica.

Figura 3: Procedimento de extração em fase sólida



Fonte: Adaptado de SUPELCO (1998).

2.9.2 CO₂ supercrítico

A tecnologia supercrítica com dióxido de carbono (CO₂) consiste num processo livre de resíduos tóxicos, não provoca a degradação térmica dos extratos e não requer grandes gastos de energia. Assim, tem sido considerada uma opção promissora para a extração e fracionamento de produtos naturais, especialmente para as indústrias de alimentos e farmacêutica (PEREIRA et al., 2004; DAL PRÁ, 2013; SILVA; ROCHA-SANTOS; DUARTE, 2016).

Segundo Moraes e colaboradores (2013) a extração supercrítica usando CO₂ puro é mais apropriada para extração de compostos não polares como terpenoides, tocoferóis e sitosteróis

em vegetais, visto que segundo Carrilho e colaboradores (2001) o CO₂ é um gás apolar. Entretanto, substâncias de alta polaridade também podem ser extraídas por esse método com o emprego de co-solventes, com os quais é possível aumentar o espectro de substâncias solúveis ao CO₂ (SILVA et al., 2015; BASA'AR et al., 2017).

Pereira e Meireles (2010) reúnem diversos trabalhos envolvendo a extração com CO₂ supercrítico em inúmeras espécies de plantas, demonstrando sucesso na recuperação das substâncias extraídas, boa qualidade, maior rendimento, na maioria dos casos, maior atividade dos compostos obtidos. Basa'ar e colaboradores (2017), mencionam ser uma tecnologia verde para extrair compostos bioativos em matrizes vegetais.

De acordo com Dal Prá e colaboradores (2013), a extração com CO₂ supercrítico demonstrou ser um método promissor em relação as extrações convencionais, visto que permitiu extração de fitocompostos de interesse científico e industrial, como derivados de ácidos graxos, compostos de enxofre, fitoesteróis e triterpenos.

2.10 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO

2.10.1 Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas (UPLC-MS)

A cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC, do inglês *ultra performance liquid chromatography*) fundamenta-se nos mesmos princípios de separação da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (MALDANER; JARDIM, 2012). Difere de sua antecessora tecnológica, principalmente por três razões que, quando combinadas, aumentam drasticamente sua eficiência de separação: o uso de partículas de fase estacionária com menor diâmetro, maiores temperaturas de separação e pressões bastante elevadas nas separações cromatográficas (SNYDER, KIRKLAND e DOLAN, 2009).

As colunas cromatográficas empregadas são de dimensões reduzidas (5-10 cm de comprimento e diâmetros internos de 1-2,1 mm), recheadas com partículas de fase estacionária $\leq 2 \mu\text{m}$. Para manter a vazão da fase móvel praticamente constante devido ao tamanho de partícula menor, operara-se em pressões mais elevadas (MALDANER; JARDIM, 2012, FACCIN, 2016).

Nesse contexto, a hifenização da cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) com a espectrometria de massas (MS, do inglês *mass spectrometry*) melhora consideravelmente a caracterização dos compostos, explorando o poder de separação da UPLC e elucidação da

estrutura por MS em tempos de análise consideravelmente reduzidos. É uma excelente abordagem para estudo da estrutura polifenólica (STALIKAS, 2007; IGNAT et al., 2013; FACCIN, 2016).

Svoboda e colaboradores (2015), identificaram por UPLC-MS/MS 8 derivados de catequinas em amostras de chás (preto, verde e branco) em 3 minutos e 20 segundos de análise. Assim como, Hamdi e colaboradores (2018), determinaram 33 compostos (ácidos fenólicos, flavonoides e alcaloides) no extrato vegetal de *Haplophyllum tuberculatum* (Forssk.) A. Juss. em cerca de 15 minutos.

2.10.2 Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS)

A cromatografia gasosa (GC, do inglês *gas chromatography*) é usada para separar moléculas voláteis e termicamente estáveis em uma amostra, enquanto o espectrômetro de massas fragmenta as moléculas gerando um íon molecular característico (CHAUHAN et al., 2014). A GC-MS pode determinar sensivelmente inúmeros compostos em uma única análise da amostra (JONSSON et al., 2004), onde os resultados são baseados em bibliotecas de espectros cada vez mais completas e específicas, permitindo o emprego da técnica para uma grande variedade de matrizes (MATEUS et al., 2010).

Uma diversidade de constituintes vegetais podem ser avaliados, como componentes de óleos essenciais (SHARMA et al., 2013), esteroides, terpenos (CHAUHAN et al., 2014) alcaloides (GEORGIEV et al., 2013), ácidos fenólicos (STALIKAS, 2007), dentre outros. Sua aplicação também se dá em amostras de sangue, pesticidas, medicamentos e cosméticos (CHAUHAN et al., 2014).

Hongchuan e colaboradores (2012) determinaram 111 constituintes voláteis de baixa polaridade presentes no extrato *Isodon excisa* (Maxim.) Hara, onde o β -sitosterol foi o composto majoritário. Também apresentou outros fitoesteróis (estigmasterol e campesterol) e ainda vitamina E. Ainda, por esse método, Raman e colaboradores (2012) determinaram 44 compostos em *Eupatorium odoratum* L., dentre estes tocoferóis (α e β -tocoferol), fitoesteróis (γ -sitosterol, estigmasterol) e triterpenos (metil comate D e α -amirina).

2.11 RADICAIS LIVRES E ANTIOXIDANTES

Segundo Cotinguiba e colaboradores (2013), radicais livres são espécies químicas que apresentam elétron desemparelhado na sua órbita mais externa. É este não emparelhamento de elétrons confere alta reatividade, uma vez que para se manterem estáveis precisam doar ou retirar um elétron de outra molécula.

Nesta tentativa de se estabilizar quimicamente, os radicais livres propiciam reações que alteram a conformação, a estrutura ou as funções de diversos componentes celulares (LIMA, 2013). Porém esses efeitos são expressados quando em quantidades excessivas, pois a formação em condições normais é inevitável, visto que são necessários para processos fisiológicos no organismo como respiração celular e defesa do sistema imunológico. A fim de neutralizar as moléculas de radicais livres é preciso a presença de substâncias antioxidantes (COTINGUIBA et al., 2013).

Antioxidantes são qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz. Nesse sentido, se faz necessário um equilíbrio entre as moléculas oxidantes (radicais livres) e antioxidantes, pois o desequilíbrio resulta na indução de danos celulares, o chamado estresse oxidativo (LIMA, 2013; COTINGUIBA et al., 2013).

2.12 ATIVIDADE ANTIRRADICALAR

A atividade antioxidante dos compostos químicos não pode ser medida diretamente, mas pode ser avaliada pelos efeitos das substâncias antioxidantes presentes na amostra em controlar a extensão da oxidação (ANTOLOVICH et al., 2002). Os diversos testes propostos na literatura variam quanto ao tipo de radicais gerados, ao indicador de oxidação escolhido e ao método usado para sua detecção e quantificação (VASCONCELOS et al., 2007).

A determinação da reatividade de radicais livres por métodos *in vitro* normalmente envolve o uso de uma fonte de radicais livres e um substrato específico, que deve ser atacado pelos radicais livres gerados artificialmente (LIMA, 2013). Dentre os radicais utilizados para mensurar a atividade antioxidante dos extratos das espécies de plantas medicinais, o DPPH tem sido amplamente utilizado para avaliar a atividade antirradicalar de diversos sucos de frutas, extratos vegetais e substâncias puras, tais como flavonoides e terpenoides. É considerado do ponto de vista metodológico, um método simples, preciso e reprodutivo na avaliação da atividade antioxidante (ALVES et al., 2010; COTINGUIBA et al., 2013).

2.12.1 Método do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)

O DPPH é um radical orgânico livre estável e possui boa estabilidade na ausência da luz (OLIVEIRA et al., 2015). Possui cor púrpura ou violeta com uma absorção em solução de etanol ou metanol a 515-520 nm. Uma substância antioxidante pode doar um átomo de hidrogênio ou transferir um elétron para a molécula de DPPH, que ao aceitar para se tornar uma molécula estável origina a forma reduzida DPPH-H passa sua coloração para amarelo pálido ou violeta claro (OLIVEIRA et al., 2015; SCHAICH et al., 2015).

A mudança da coloração resulta na diminuição da absorbância do radical DPPH, podendo ser monitorada por um espectrofotômetro. Esse monitoramento tem que ser realizado sempre no escuro, por que a luz é um fator que interfere diretamente na reação do radical DPPH com uma substância, acelerando a diminuição da absorbância e consequente alterando a resposta (OLIVEIRA et al., 2015).

A interpretação do resultado é expressa pelo termo concentração eficaz que inibi 50% da concentração inicial do radical DPPH (IC₅₀) (OLIVEIRA et al., 2015). Para fins de comparação a literatura referência a utilização de um padrão com atividade antioxidante reconhecida, como exemplo ácido ascórbico (MARTINEZ-CORREA et al., 2011; ANDRADE et al., 2012; HIDAYAT et al., 2017).

Brum e colaboradores (2013) avaliaram a capacidade antioxidante de diferentes extratos de *Vitex megapotamica* (Spreng.) Moldenke frente o DPPH e utilizaram ácido ascórbico como padrão comparativo. Os autores identificaram nas análises dos extratos alguns ácidos fenólicos nos extratos, e sugerem o potencial antioxidante da espécie a estes compostos.

Ahmad e colaboradores (2017) isolaram um composto flavonoide das folhas de *Ruellia tuberosa* e determinaram atividade antirradicalar frente o DPPH. O isolado apresentou IC₅₀ próximo ao padrão BHT (hidroxitolueno butilado) e menor que quercetina, demonstrando elevado poder antioxidante.

2.13 ATIVIDADE CITOTÓXICA E GENOTÓXICA

A utilização de plantas medicinais e seus extratos foram ao longo da história amplamente empregadas no tratamento de diversas doenças. Em razão da origem natural, perpetuou-se a crença de que produtos naturais e seus derivados não são nocivos à saúde, com

isso grande parte destas são consumida sem nenhum conhecimento sobre sua segurança (VEIGA; PINTO; MACIEL, 2005; FIRMO et al., 2011; ALECRIM et al., 2017).

A toxicidade de plantas medicinais e fitoterápicos é um problema de saúde pública, visto que as informações técnicas ainda são insuficientes para a maioria, de modo a garantir qualidade, eficácia e segurança no uso (VEIGA; PINTO; MACIEL, 2005; FIRMO et al., 2011). Nesse sentido, de acordo com Kamdem e colaboradores (2013), são necessários estudos de citogenotoxicidade, afim de avaliar os possíveis riscos toxicogenéticos, mutagênicos e cancerígenos.

As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) têm sido usadas como biomarcadores de efeitos citotóxicos e genotóxicos; elas são abundantes na corrente sanguínea e capazes de refletir danos recentes se expostos a qualquer agente mutagênico. As PBMCs baseadas em cultura tornaram-se um modelo *in vitro* muito promissor (MALUF et al., 2011), através do qual plantas para fins terapêuticos podem ser avaliadas.

Um dos ensaios utilizados para mensurar a citotoxicidade em extratos vegetais é MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5- difenil brometo de tetrazolina. É uma ferramenta para estimar a atividade metabólica das células vivas (viabilidade celular). As enzimas desidrogenais mitocondriais, presentes apenas em células viáveis, reduzem o anel tetrazólico do MTT, composto de coloração amarela e transformam em formazan um composto de colocação roxa que pode ser quantificado espectrofotometricamente. O valor da absorbância do MTT-formazan é diretamente proporcional ao número de celular vivas (SILVA et al., 2015; GRELA; KOZLOWSKA, GRABOWIECKA, 2018).

O teste do cometa, tornou-se um dos principais métodos para estudo de lesões no DNA, com aplicabilidade em estudos de genotoxicidade avaliado através do índice de dano de DNA (ROCCO et al., 2010). Segundo Mezzalira e colaboradores (2014), essa técnica avalia lesões no DNA envolvendo aplicações de corrente elétrica nas células, sobre lâminas com gel de agarose, coradas com prata e visualizadas por microscopia óptica. As células com material nuclear lesionado se assemelham a um cometa devido sua morfologia, na qual o DNA perde sua integridade, e migra por força da eletroforese.

Sabini e colaboradores (2013), avaliaram a citotoxicidade (ensaio MTT) e genotoxicidade (ensaio cometa) do extrato aquoso de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. utilizando PBMCs. O extrato não mostrou diminuição da viabilidade celular, nem foi capaz de causar dano em DNA. Dessa forma, o estudo mostrou que a infusão de *A. satureioides* pode ser consumida com segurança porque não mostrou efeitos citotóxicos ou genotóxicos.

Ainda, Basak e colaboradores (2017), realizaram estudos de citotoxicidade com folhas de *Aloe vera* (L.) Burm. f. frente a PBMC e linhagem tumoral. O extrato não apresentou efeitos tóxicos através do ensaio de MTT para as células PBMC, no entanto apresentou capacidade de inibir o crescimento de células de câncer de mama na concentração, mostrando ainda mais promissor visto que não apresenta efeitos nocivos as células sadias.

2.14 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os compostos de origem vegetal têm cada vez mais despertado interesse em pesquisas, principalmente no sentido de explorar a atividade antimicrobiana, devido ao aumento de casos de resistência bacteriana, em razão o mau uso de antibióticos (BORGES et al., 2013; CARVALHO et al., 2014; MESQUITA; PINTO; MOREIRA, 2017). Diversos metabólitos secundários podem atuar como inibidores do crescimento de bactérias, fungos e vírus (BORGES et al., 2013).

Uma metodologia *in vitro* bastante utilizada para análises de extratos vegetais são as técnicas de difusão em ágar, a qual fundamentam-se na difusão da substância a ser testada, em um meio de cultura inoculado com o micro-organismo. A partir da difusão ocorre o aparecimento de um halo, no qual não há crescimento do micro-organismo, denominado halo de inibição. Os halos podem ser medidos utilizando régua milimetrada. Diferentes tipos de reservatórios podem ser empregados incluindo discos de papel (disco difusão), cilindros de porcelana ou de aço inoxidável (método dos cilindros) e poços feitos no meio de cultura (difusão em poços) (OSTROSKY et al., 2008; SILVEIRA et al., 2009).

Na difusão em disco as placas de ágar são inoculadas com inóculo padronizado do micro-organismo teste, posteriormente um determinado volume da substância de interesse é aplicado em discos de papel filtro (cerca de 6 mm de diâmetro), os quais são colocados na superfície do ágar. As placas de petri são incubadas sob condições adequadas onde o agente antimicrobiano se difunde no ágar e inibe a germinação e o crescimento do micro-organismo em teste e, posteriormente, os diâmetros das zonas de crescimento de inibição são medidos (BALOUIRI et al., 2016).

No método de difusão em poço, após a incubação com inóculo padronizado do micro-organismo-teste são feitos poços na superfície do ágar de aproximadamente 6-8 mm de diâmetro, nos quais é introduzido um volume estabelecido da substância teste. Posteriormente,

o procedimento segue o mesmo que na difusão em disco (OSTROSKY et al., 2008; BALOUIRI et al., 2016).

Também pode-se determinar a concentração inibitória mínima (MIC, do inglês *minimal inhibitory concentration*) como a menor quantidade de substância capaz de inibir o crescimento do micro-organismo-teste. Pode ser realizada através de métodos de diluição (microdiluição e macrodiluição) em caldo. A microdiluição utiliza microplacas com 96 poços, já a macrodiluição tubos de ensaio (OSTROSKY et al., 2008; BALOUIRI et al., 2016).

A curva de tempo de morte (do inglês *Time Kill* – TK), pode ser utilizada de maneira complementar aos ensaios antimicrobianos. Essa técnica tem por finalidade avaliar a evolução de uma população de micro-organismos num período específico frente a exposição do extrato de interesse (NÓBREGA et al., 2013). É o método mais apropriado para determinar o efeito bactericida ou fungicida (BALOUIRI et al., 2016). São considerados agentes bactericidas aqueles que causam a morte microbiana $\geq 99,9\%$. (SILVA et al., 2015; BHAGWAT et al., 2019).

Ainda, revela se o efeito antimicrobiano dependente do tempo ou dependente da concentração (CLSI-M26-A, 1999; BALOUIRI et al., 2016). É considerada ferramenta para obter informações sobre a interação dinâmica entre o agente antimicrobiano e o micro-organismo. Ainda, pode ser utilizado para determinar o sinergismo ou antagonismo entre agentes antimicrobianos (duas ou mais) em combinações (SOPIRALA et al., 2010; BALOUIRI et al., 2016).

Abdallah (2016), avaliou a atividade antimicrobiana através da determinação da concentração inibitória mínima do extrato metanólico do cálice de *Hibiscus sabdariffa* L., contra cinco isolados multiresistentes de *Acinetobacter baumannii*. Segundo Abdallah, o extrato pode ser usado como uma fonte substituta dos atuais antibióticos sintéticos ineficazes contra cepas resistente deste micro-organismo.

Lakshmi e colaboradores (2017) realizaram estudo por disco-difusão e determinaram a concentração inibitória mínima de diferentes extratos de *Ruellia patula* para *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Vibrio vulnificus*. Todos extratos avaliados foram capazes de inibir o crescimento dos micro-organismos avaliados.

Boonyanugomol e colaboradores (2017) avaliaram a cinética antibacteriana pela curva de tempo de morte do óleo essencial de *Zingiber cassumunar* Roxb. contra *Acinetobacter baumannii*. Verificou-se que a concentração inibitória mínima do extrato é capaz de inibir completamente o crescimento desse micro-organismo e o óleo essencial demonstrou efeito

sinérgico quando combinado com alguns antibióticos. Sugerem a associação do óleo essencial com fármacos antibióticos para tratamento bactérias resistente aos medicamentos, como *A. baumannii*.

2.15 ATIVIDADE NEMATICIDA

Os nematoides do gênero *Meloidogyne*, são fitopatógenos que acometem culturas comprometendo produção e qualidade de produtos agrícolas (MARTINS; SANTOS, 2016). São também conhecidos por nematoides de galha em razão do seu parasitismo induzir a formação de galhas, engrossamento das raízes das plantas (LOPES, 2017). Dentro do gênero as quatro espécies mais importantes são *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. incognita* e *M. hapla*. O nematoide *Meloidogyne javanica* é a segunda mais comum por causar vários danos, ampla distribuição geográfica podendo ser hospedeiro de diversas plantas (GUIMARÃES, 2012).

Compostos ativos de origem vegetal estão recebendo mais atenção como agentes contra várias espécies de parasitas, incluindo os nematoides do gênero *Meloidogyne*, visto que os nematicidas químicos apresentam custo elevado, geralmente são pouco efetivos e podem deixar resíduos nos alimentos, causando riscos à saúde humana e ao meio ambiente (MOREIRA; FERREIRA, 2015; NILE et al., 2017).

Lopes (2017), avaliou *in vitro* o extrato metanólico de cinco espécies nativas do cerrado no controle de *M. javanica*. As espécies envolvidas no estudo foram: *Hancornia speciosa* Gomes, *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, *Caryocar brasiliense* Cambess., *Hymenaea stigonocarpa* Mart. e *Solanum lycocarpum* A.St.-Hil. Os extratos apresentam diferença significativa na eficiência em causar a mortalidade dos J2 de *M. javanica*. O extrato de *S. adstringens* apresentou maior atividade nematicida. O autor atribui a atividade da espécie a presença de metabólicos secundários pertencentes a classes importantes, tais como esteroides, fenóis simples, flavonoides, flavanonas, flavanonóis, saponinas e taninos, substâncias conhecidas por apresentar atividade nematicida.

Estudos de Kimbaris e colaboradores (2017), investigaram o óleo essencial de espécies de *Mentha* sp. L. As espécies *M. pulegium* e *M. spicata*, induziram elevada mortalidade de *M. javanica* (J2).

2.16 ATIVIDADE ANTI-TRYPANOSOMA

Trypanosoma evansi é um protozoário flagelado, agente etiológico da tripanossomose, conhecida como “Mal das cadeiras” ou “Surra”. Infecta diversos animais domésticos e selvagens como: cavalos, mulas, burro, camelos, gado, búfalos, ovelhas, cabras, cães, gatos, porcos, veados, capivara e raposas (BALDISSERA et al., 2014; BALDISSERA et al., 2016; BOUSHAKI et al., 2019). A doença é transmitida por insetos hematófagos principalmente das espécies (*Tabanus sp.*, *Chrysops sp.*, *Stomoxys sp.* e *Hematopota sp.*) e caracterizada por rápida perda de peso, fraqueza e anemia progressiva, febre intermitente, edema nas partes inferiores do corpo (DESQUESNES et al., 2013, BALDISSERA et al., 2014; GIONGO et al., 2017; BOUSHAKI et al., 2019).

O tratamento da tripanossomose causada por *T. evansi* é baseada em diminazeno aceturato, único tratamento comercializado no Brasil, no entanto a ineficiência devido aos casos de mortalidade e a recorrência da doença após o tratamento têm sido relacionadas à impossibilidade do medicamento atravessar a barreira hematoencefálica em dose suficientemente eficaz (BALDISSERA et al., 2014; BALDISSERA et al., 2016). Em razão das limitações da terapia convencional, surge a necessidade de encontrar drogas alternativas contra *T. evansi*. Com isso, pesquisas vêm sendo realizadas a partir de extratos vegetais na busca por bioativos eficazes no controle do tripanosoma.

Giongo e colaboradores (2017), avaliaram a atividade tripanocida *in vitro* do óleo essencial de *Aniba canelilla* (H.B.K.) Mez contra a *T. evansi*. O estudo demonstrou que o óleo extraído de *A. canelilla* pode ser considerado um possível tratamento natural para a tripanossomose. Ainda nesse sentido, Alves e colaboradores (2016), investigaram a ação anti-trypanosoma do extrato bruto e frações de *Equisetum hyemale* L. frente a *T. evansi*, onde extrato butanol foi capaz de reduzir a totalidade dos tripomastigotas, demonstrando importante ação antiprotozoária.

2.17 ATIVIDADE CICATRIZANTE DE FERIDAS

De acordo com Vieira e colaboradores (2002), a restauração da pele ocorre por meio de um processo dinâmico, contínuo, complexo e interdependente, composto por uma série de fases sobrepostas, denominadas de cicatrização. A cicatrização envolve a progressão ordenada de eventos a fim de estabelecer o tecido danificado (ROY et al., 2012), através mecanismos celulares e extracelulares visam a proliferação celular, vascularização no tecido lesionado

(SARANDY et al., 2015). Esse processo é dividido em três fases: inflamatória, proliferativa e remodelação (SARANDY, 2007; SARANDY et al., 2015; RIBEIRO, 2018).

A fase inflamatória inicia logo que imediatamente após a lesão no tecido, uma reação vascular e inflamatória, que conduz a hemostasia. Ocorre a vasoconstrição e termino do sangramento, processo que envolve plaquetas, coágulo de fibrina que ativam a cascata de coagulação levando a liberação de mediadores inflamatórios, a fim de proteção e preparação para o reparo do tecido (VIEIRA; MAGALHÃES; BAJAH, 2002; ROY et al., 2012; RIBEIRO, 2018).

A fase proliferativa compreende a granulação, epitelização e contração. A granulação é a formação de um tecido novo, com novos capilares, proliferação de fibroblastos responsáveis pela síntese de colágeno. Ao final, ocorre a epitelização, que levará ao fechamento das superfícies da ferida, por meio da multiplicação das células epiteliais e aumento do colágeno. A ação dos fibroblastos reduz o tamanho da lesão (VIEIRA; MAGALHÃES; BAJAH, 2002; ROY et al., 2012; RIBEIRO, 2018).

Remodelamento ou fase de reparo, caracteriza-se pelo aumento da síntese de colágeno que aumenta a resistência. Na fase inicial, o colágeno presente é do tipo III, que é caracterizado por ser mais fino e organizado de forma aleatória. Este colágeno será substituído pelo colágeno tipo I que se apresenta espesso de uma forma mais organizada e entrelaçada. Estas mudanças levam a um aumento na força contrátil e como consequência ocorre a contração do ferimento (VIEIRA, MAGALHÃES; BAJAH; 2002; ROY et al., 2012; RIBEIRO, 2018).

Estudos envolvendo extratos vegetais e suas formulações vem aumentando constantemente como alternativa na terapia na cura de feridas (SARANDY et al., 2015; KAYIR et al., 2018). Ensaios em modelos animal e não animal podem ser utilizados para testar os agentes terapêuticos (SAMI et al., 2019).

Segundo Sami e colaboradores (2019), os modelos *in vivo* são os mais eficientes e clinicamente relevantes no estudo na cura de feridas. Esses modelos podem ser em pequenos animais, grandes animais ou humanos. Eles providenciam várias vantagens sobre os estudos *in vitro*, pois permitem o estudo da fisiopatologia da cicatrização de feridas em tempo real. Modelos *in vivo* são obrigatórios para o estudo de novas terapêuticas antes de avançar para os ensaios clínicos.

Kayir e colaboradores (2018), avaliaram os efeitos *in vivo* da formulação contendo o extrato metanólico de *Verbascum speciosum* Schrad. integrado a um creme à base de vaselina. As análises macroscópicas indicam a espécie como um potente agente na cicatrização devido a

eficácia na contração da ferida ter sido superior ao controle positivo. No entanto, os ensaios histológicos não apresentaram diferença significativa. Em vista disso, os autores sugerem estudos adicionais afim de organizar a dose e a formulação e entender o mecanismo molecular para atividade promotora de cicatrização.

Estudos realizados por Safavi e colaboradores (2019), investigaram a propriedade cicatrizante de diferentes extratos obtidos da raiz de *Onosma dichroantha* Boiss. O extrato ciclohexano da espécie mostrou-se mais eficaz na cura de feridas em virtude de apresentar maior estímulo a proliferação de fibroblastos quando comparado aos extratos acetato de etila e metanol.

3 METODOLOGIA

3.1 PLANTA ESTUDADA

Amostras de folhas *Ruellia angustiflora* foram coletadas em março de 2017 no município de Santa Maria-RS, no caminho entre o Morro Santo Antão e o Morro da Pedra do Lagarto, cuja localização é S 29° 37' 18,6'' W 053° 51' 35,6.

A coleta ocorreu com auxílio da Profª. Dra. Liliana Essi do laboratório de Taxonomia do Departamento de Biologia da UFSM. Foi coletado um exemplar como testemunho da coleta “*voucher*”, o qual foi depositado no herbário SMDB (Jardim Botânico da Universidade Federal de Santa Maria) sob o número de registro 17547. Também realizamos o cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) sob registro A24F71F.

As amostras destinadas à análise foram secas em estufa a 40°C até massa constante. Posteriormente a secagem, as amostras foram moídas em moinho de facas (Marconi, SP, Brasil) e mantidas a -12 °C ao abrigo da luz.

3.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

O procedimento de preparação dos extratos vegetais foi realizado no Laboratório Biotec Factory- Departamento de Engenharia Química da UFSM.

3.2.1 Extração com sonda de ultrassom

Foi utilizado um reator revestido (250 mL de capacidade) conectado a um banho de água termostático (precisão de temperatura de $\pm 1,0$ °C) para o controle da temperatura e um processador de ultrassom de alta intensidade de 24 kHz (Hielscher, modelo UP 400S). O ultrassom estava equipado com uma sonda de titânio de 22 mm (Modelo H22 Tip 22) e intensidade máxima de 300 W.cm⁻².

As extrações foram realizadas conforme metodologia descrita por Dal Prá e colaboradores (2017). A sonda ultrassônica foi colocada no centro do reator contendo 10 g de planta moída e 100 mL de etanol Panreac (Castellar del Vallès, Spain). Posteriormente, a temperatura de circulação de água foi ajustada para 20 ± 2 °C. Todas as extrações foram

realizadas por 2 h em intensidade do ultrassom 120 W.cm^{-2} e ciclo de pulso 0,46. O extrato obtido dessa extração foi submetido posteriormente à extração em fase sólida anteriormente a análise cromatográfica (UPLC-MS).

3.2.1.1 Preparo da amostra por extração em fase sólida

O extrato líquido final obtido foi submetido a uma etapa de *clean-up* utilizando SPE. O procedimento foi realizado conforme descrito por Faccin e colaboradores (2016), dessa forma, um volume de 3 mL de extrato foram diluídos em 12 mL água ultrapura (1:4). Posteriormente, ácido acético foi adicionado até uma proporção final de 0,1% (v/v), um volume de aproximadamente 15 μL .

Cartuchos do tipo Strata C18E, 500 mg, 3 mL (Phenomenex, Torrance, EUA), foram condicionados com 6 mL de uma solução metanol/ácido acético 0,2% (1:1; v/v) e então equilibrados com 6 mL de uma solução de ácido acético 0,1% (v/v) em água. Um volume fixo de 2 mL dos extratos obtidos com composição etanol/água/ácido acético (20:80:0,1; v/v) foi percolado a uma vazão de 2 mL/min, sendo seguido por uma lavagem com 2 mL da solução de ácido acético 0,1% (v/v). Por último, os analitos retidos foram eluídos com 2 mL de metanol. Antes da análise cromatográfica, o eluato obtido pelo procedimento de SPE foi diluído a 0,5 g/L com uma solução de metanol/ácido acético 0,1% (1:1; v/v).

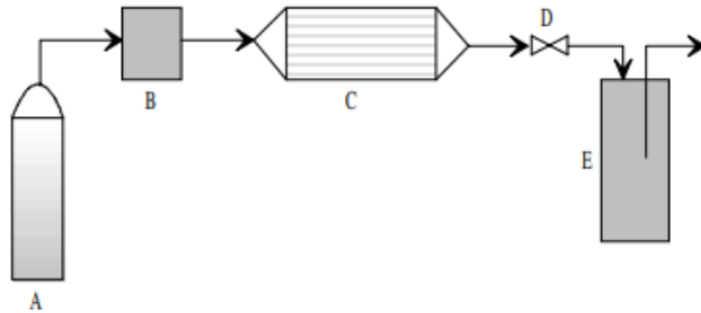
3.2.2 Extração com CO_2 supercrítico

A unidade experimental consiste de um cilindro de CO_2 (White & Martins com 99,9% de pureza), dois banhos termostáticos (Quimis), uma bomba de alta pressão (ISCO 500 D), um extrator encamisado com volume interno aproximado de 100 mL, um tubo coletor de vidro, uma válvula micrométrica e um transdutor absoluto de pressão (Smar LD 301) equipado com um programador portátil (Smar, HT 201), como mostra figura 4.

As extrações foram realizadas utilizando metodologia conforme Dal Prá e colaboradores (2013), empregando aproximadamente 25 gramas de amostra moída. O solvente (CO_2) foi bombeado para o leito, sustentado por dois discos de arame de 300 malhas nas duas extremidades e mantido em contato com a matriz herbácea por pelo menos 60 minutos para permitir a estabilização do sistema. As extrações foram realizadas em pressão constante, temperatura e fluxo de CO_2 de 25 Mpa, 60°C e 2 g/min, respectivamente, por 3 h. Os extratos

foram coletados em tubos de ensaio, abrindo a válvula micrométrica localizada na saída do extrator.

Figura 4 - Esquema da extração supercrítica



(A = cilindro de CO₂, B = bomba de alta pressão, C = extrator, D = válvula de expansão e E = tubo coletor).
Fonte: Mossi, 2003.

3.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS

3.3.1 Metodologia analítica para compostos polares empregando UPLC-MS

As análises ocorreram baseadas na metodologia de Faccin e colaboradores (2016), com algumas modificações no Centro de Pesquisa e Análise de Resíduos e Contaminantes da UFSM em parceria com a Profa. Ionara Regina Pizzutti. O sistema UPLC-MS utilizado consisti em um ACQUITY UPLC acoplado a um espectrômetro de massas XEVO TQ-S (triplo quadrupolo) (Waters, Milford, EUA). As separações cromatográficas foram realizadas utilizando uma coluna ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2,1 mm × 100 mm, tamanho de partícula de 1,7 µm), mantida sob aquecimento a 40 °C.

O método emprega uma eluição por gradiente, contendo ácido acético 0,1% (A) e acetonitrila (B), a uma vazão constante de 800 $\mu\text{L}/\text{min}$, de acordo com as seguintes condições: 8,0% B (0,00-0,10 min); 8,0-25,8% B (0,10-3,45 min); 25,8-54,0% B (3,45-6,90 min); 54,0-100,0% B (6,90-7,00 min); 100,0% B (7,00-9,00 min) e volume de injeção de 5 μL . O espectrômetro de massas foi operado em modo de ionização eletro spray negativo (ESI, do inglês *electrospray ionization*).

Os parâmetros para ESI foram: vazão de gás (N_2) de 11 L/min; pressão do nebulizador igual a 30 psi; voltagem do capilar igual a $\pm 2,4\text{kV}$ e temperatura do gás de secagem igual a 250 $^\circ\text{C}$. Os compostos de interesse foram analisados no espectrômetro de massas operando por monitoramento de reação múltipla (MRM, do inglês *multiple reaction monitoring*). A quantificação foi realizada através método de padronização externa pelos dados obtidos das curvas analíticas. Os dados adquiridos foram analisados pelo Software MassLynx Mass Spectrometry Software - Waters versão 4.1.

3.3.1.1 Reagentes e soluções

Os padrões analíticos empregados na metodologia em questão foram: (+) - catequina, 3,6-dihidroxi-flavona, 4-hidroxicumarina, 6-hidroxicumarina, apigenina, ácido clorogênico, crisina, fisetina, galangina, ácido gálico, canferol, luteolina, miricetina, ácido *p*-cumárico, quercetina, quercitrina, resveratrol, ácido rosmarínico, rutina, ácido trans-cinâmico, ácido vanílico, obtidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA), ácido cafeico e ferúlico Fluka Analytical (Buchs, Suíça). Todos os padrões de grau analítico com um mínimo de 95% de pureza. Foram preparados a 1g/L em metanol (grau LC/MS) obtido de Merck (Germany).

Os constituintes da fase móvel acetonitrila (grau LC/MS) obtido de Merck (Germany) e ácido acético obtido de J. T. Baker (Deventer, Netherlands), a água ultrapura obtida do sistema Milli-Q Synergy UV (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). A água acidificada com ácido acético foi preparada a uma concentração de 0,1% (v/v) em balão volumétrico.

3.3.2 Metodologia analítica para compostos não polares empregando GC-MS

As análises de GC-MS foram realizadas conforme metodologia descrita por Karthika e colaboradores (2016). Tendo em vista o emprego deste método para *Ruellia patula*, optou-se por aplica-lo na espécie deste trabalho, em razão de pertencerem ao mesmo gênero. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Manejo Integrado de Pragas, Departamento

de Defesa Fitossanitária da UFSM em parceria com Prof. Márcio Antonio Mazutti.

O extrato obtido da extração com CO₂ supercrítico foi analisado em cromatógrafo GC-MS-2010 (Shimadzu) equipado com uma coluna capilar não polar RTX-5MS (Restek) (30m x 0,25 mm x 0,25 µm) composta de 5% de difenil e 95% de dimetil polisiloxano.

Para detecção por GC-MS, um sistema de ionização eletrônica (EI) com energia ionizante de 70 eV foi usado. Empregou-se gás Hélio (99,999%) como transportador a taxa de fluxo de gás constante de 1 mL/min e um volume de injeção de 2 µL; Temperatura do injetor 250 °C; temperatura da fonte de íons 280 °C. A temperatura do forno foi programada a partir de 110 °C (isotérmico por 2 minutos) com um aumento de 10°C por minutos a 200 °C, depois 5 °C por minuto até 280 °C, terminando com 9 minutos isotérmico a 280 °C. Os espectros de massa foram realizados a 70 eV, um intervalo de varredura de 0,5 segundos e fragmentos de 45 a 450 kDa. O tempo total da corrida cromatográfica foi de 36 minutos (KARTHIKA et al., 2016).

A identificação de componentes individuais foi feita usando seus índices de relativos de retenção com os Registros Wiley de Dados Espectrais de Massa (Palisade Corporation, Newfield, NY).

3.4 ENSAIOS *IN VITRO*

3.4.1 Determinação da Atividade Antirradicalar

3.4.1.1 Método do radical DPPH

Os ensaios antioxidantes frente ao DPPH foram realizados em microplacas baseados na metodologia de Choi e colaboradores (2002). Ocorreu no Laboratório de Manejo Integrado de Pragas, Departamento de Defesa Fitossanitária em parceria com Prof. Márcio Antonio Mazutti.

Para os extratos EAU-EtOH e SFE-CO₂ e para o padrão de ácido ascórbico foram preparadas 6 concentrações compreendidas entre 62,5-1,90 µg/mL (EAU-EtOH), 500-31,25 µg/mL (SFE-CO₂) e 15,62-0,98 µg/mL (ácido ascórbico) através de diluições seriadas em solvente etanol. Solução de DPPH foi preparado em etanol a 0,3 mM.

A atividade antioxidante das amostras foi avaliada da seguinte forma: 214,3 µL da amostra foram adicionadas a 85,7 µL da solução de DPPH. Paralelamente, foi conduzido um branco para cada amostra contendo 214,3 µL da amostra e 85,7 µL de etanol. O controle

compreendeu 214,3 µL de etanol e 85,7 µL de DPPH. Todos foram preparados em triplicata de cada concentração. Após 30 minutos de reação sob abrigo da luz as absorvâncias foram medidas em leitor de microplacas - Microplate reader (Hidex Sense) em 518 nm. A porcentagem da atividade antioxidante frente ao radical DPPH foi calculada conforme equação:

$$\% = 100 - [(Abs amostra - Abs branco)] \times 100 / Abs controle]$$

A concentração inibitória IC₅₀ foi calculada através da regressão linear, onde a abscissa representou a concentração de planta testada e ordenada a porcentagem de inibição obtida. Comparou-se a IC₅₀ do ácido ascórbico a IC₅₀ dos extratos. O DPPH e ácido ascórbico foram obtidos de Sigma-Aldrich (St.Louis, USA).

3.4.2 Avaliação da Citotoxicidade e Genotoxicidade

Os ensaios de citogenotoxicidade foram realizados no Laboratório de Genética e Cultura Celular da Universidade Franciscana (UFN), através da parceria com a Profa. Michele Rorato Sagrillo. Para testar os efeitos citotóxicos e genotóxicos dos extratos sobre a viabilidade celular e danos no DNA, um protocolo experimental conforme descrito por Wilms e colaboradores (2005), em PBMC foi aplicado.

3.4.2.1 Obtenção de células sanguíneas

Amostras de sangue periférico foram obtidas através do descarte do Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Franciscana, após aprovação no Comitê de Ética (CAAE: 31211214.4.0000.5306) com ausência de identificação. As amostras foram obtidas por punção venosa utilizando tubos com heparina do tipo Vacutainer®.

3.4.2.2 Separação dos linfócitos e tratamentos

As separações de PBMC ocorreram por gradiente de densidade (Histopaque®-1077) por centrifugação, e a concentração de 2×10^5 células/mL foi obtida pela contagem em uma câmara de Neubauer com 0,4% de azul de tripano. As células foram tratadas com extratos SFE-CO₂ e EAU-EtOH de *Ruellia angustiflora* nas concentrações de 500; 250; 125; 62,5; 31,25 µg/mL e 62,5; 31,25; 15,6; 7,8; 1,9 µg/mL, respectivamente. Utilizou-se o meio de cultura

contendo as células como controle negativo e utilizou-se células, meio de cultura adicionando 100 mM de peróxido de hidrogênio como controle positivo.

3.4.2.3 Avaliação da viabilidade celular por MTT

O experimento foi realizado em placas de 96 poços contendo os tratamentos, células na concentração 2×10^5 células/mL e RPMI meio de cultura (suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% antibiótico). Após incubação por 24 h (37 °C e 5% de CO₂), 20 µL de MTT foi adicionado a cada poço e armazenado em estufa por um período adicional 4 h. Após a incubação, 200 µL do sobrenadante foram removidos e 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados e os resultados quantificados colorimetricamente por espectrofotometria UV-Vis em comprimento de onda de 570 nm. O controle negativo do experimento foi composto por células e meio de cultura, e o controle positivo pelas células, meio de cultura e peróxido hidrogênio (10 µM). O experimento foi realizado em triplicata. O valor de absorbância é proporcional ao número de células viáveis em comparação ao controle negativo (MOSMANN, 1983; DENIZOT; LANG, 1986).

3.4.2.4 Ensaio cometa

O teste do cometa foi realizado conforme Singh e colaboradores (1988), modificado por García e colaboradores (2004). Em uma lâmina de vidro previamente coberta com uma camada de agarose a 1,5%, as células mononucleares contendo os tratamentos foram suspensas em agarose de baixo ponto de fusão cobertos por uma lamínula. O material é então imerso em solução de lise (89 mL de solução de lise para 10 mL de DMSO e 1 mL de Triton X-100) para a remoção das membranas celulares e do citoplasma. Subsequentemente, as lâminas são incubadas em tampão de eletroforese alcalina pH 13 (NaOH 300 mM e EDTA 1 mM em água destilada) e sujeitas a eletroforese durante cerca de 30 min a 25 V e 300 mA. Em seguida, foram realizados os processos de neutralização (tampão neutralizante pH 7,5), fixação (ácido tricloroacético a 15%) e coloração (laranja acridina), para que o material genético pudesse ser analisado. As células foram analisadas em um microscópio óptico (Olympus CX31).

3.4.2.5 Análise Estatística

Os resultados foram avaliados estatisticamente no programa Graphpad Prism versão 5.0 e os dados expressos com média \pm desvio padrão (DP). Os experimentos foram conduzidos em triplicata e os tratamentos foram comparados por ANOVA de 1 via seguido de post hoc de Dunnett. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3.4.3 Avaliação da Atividade Antimicrobiana

3.4.3.1 Atividade antimicrobiana pelo método de disco-difusão, microdiluição em caldo e curva de tempo de morte

Os ensaios de disco-difusão, microdiluição e curva de morte foram realizados baseados nas metodologias descritas por Alves e colaboradores (2016) e Jobim e colaboradores (2014), sendo realizados através da parceria com Prof. Robert Christ Vianna Santos no Laboratório Microbiologia Oral da UFSM.

3.4.3.1.1 Micro-organismos

No estudo estirpes de padrões bacterianos e fúngicos (American Type Culture Collection – ATCC) e isolados clínicos foram utilizados. *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606), *Aeromonas caviae* (isolado clínico-IC), *Pseudomonas aeruginosa* (PA01) e *Candida albicans* (ATCC 24433).

3.4.3.1.2 Preparo do inóculo

Os tamanhos dos inóculos bacterianos foram padronizados de acordo com as diretrizes do CLSI (2008). Isoladas as colônias foram cultivadas durante 18-24 h em Mueller-Hinton Ágar (Himedia) e a suspensão foi preparada numa solução salina (NaCl 0,85%) com densidade ajustada para 0,5 no McFarland escala ($1,5 \times 10^8$ CFU/mL).

3.4.3.1.3 Método de Difusão: Disco-difusão

O ensaio de disco difusão foi realizado como teste de *screening* para a avaliação da atividade antimicrobiana. Utilizando um swab estéril, a suspensão do inóculo equivalente a 0,5 na escala de Mac Farland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL), foi distribuída uniformemente sobre a superfície do ágar Mueller-Hinton (Himedia). Em seguida foram dispostos os discos de papel de 6 mm impregnados com 15 μ L dos extratos (EAU-EtOH e SFE-CO₂) na concentração de 130 mg/mL. Concomitantemente foi realizado um controle com dimetilsulfóxido (DMSO, Vetec Química Fina Ltda), o diluente do extrato. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Finalmente, as placas foram levadas a estufa e incubadas a 37 °C por 24 h. Após a incubação, foi verificado se houve ou não o crescimento do halo de inibição. A partir dos resultados obtidos foi realizada a determinação da concentração inibitória mínima para o extrato que apresentou inibição microbiana.

3.4.3.1.4 Microdiluição em Caldo - Concentração Inibitória Mínima (MIC)

A concentração inibitória mínima do extrato (EAU-EtOH) foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo com microplacas de 96 poços utilizando meio de cultura caldo Mueller-Hinton (Himedia). Os testes foram conduzidos frente à *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606) e *Aeromonas caviae* (isolado clínico-IC). O inóculo foi ajustado a 0,5 na escala de Mac Farland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL). O DMSO foi utilizado como diluente do extrato.

O extrato na concentração inicial de 130 mg/mL foi misturado com o inóculo e posteriormente foram realizadas diluições em série até a determinação da concentração inibitória mínima (4,4 mg/mL). O ensaio foi realizado em triplicata. Como controle negativo foi utilizado o meio de cultura e como controle positivo, meio de cultura mais o inóculo. As placas foram incubadas a 37 °C e a concentração inibitória mínima foi registrada após 24 horas de incubação, quando aplicou-se a substância indicadora de crescimento microbiano (cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio). As MICs foram definidas como a menor concentração de extrato que inibe o crescimento bacteriano visível.

3.4.3.1.5 Curva de Tempo de Morte

O comportamento antimicrobiano do extrato (EAU-EtOH) foi investigado frente a *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606) e *Aeromonas caviae* (isolado clínico-IC) através da determinação da curva de tempo de morte. Os inóculos foram preparados em tubos contendo meio BHI até atingir 0,5 na escala de Mac Farland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Posteriormente os micro-organismos foram expostos a concentrações de 2 x MIC (8,8 mg/mL), MIC (4,4 mg/mL) e 0,5 x MIC (2,2 mg/mL).

A cada tempo da curva um volume de 10 μ L de cada inóculo contendo os extratos foram diluídas em solução salina (1:1000) a fim de se obter aproximadamente 1×10^4 UFC/mL e posteriormente um volume de 10 μ L foi retirado e semeado em placa com ágar Muller-Hinton. Os testes foram realizados em triplicata a 37 °C. Os tempos utilizados para construir a curva foram 0, 6, 12 e 24 h. Como controle negativo foi utilizado o meio de cultura e como controle positivo, meio de cultura mais o inóculo.

Após incubação nos tempos determinados foram contados os números de colônias. Os resultados foram calculados em média e representados como Log UFC/mL versus tempo (h) para cada ponto de tempo.

3.4.3.2 Atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar: perfuração de poço

As análises foram realizadas através de parceria com Prof. Camilo Amaro de Carvalho, na Universidade federal de Viçosa (UFV).

3.4.3.2.1 Preparação da amostra

Para a realização do ensaio os solventes foram evaporados e o resíduo foi ressuspenso em água destilada esteril + tveem 80 para o extrato SFE-CO₂ e água destilada esteril para o extrato UAE-EtOH. Após, foi realizada diluição seriada a partir da concentração 70 mg/mL para obtenção das diluições 1:2, 1:4, 1:6, 1:8 dos extratos SFE-CO₂ e UAE-EtOH.

3.4.3.2.2 Micro-organismos e condições de cultura

Os micro-organismos utilizados para os testes antibacterianos foram estirpes de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* ATCC 33591, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, *Salmonella tiphimurium* ATCC 14028, *Proteus vulgaris* ATCC 13315, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Shigella flexinerii* ATCC 12022, *Moroxella cat.* ATCC 25238, *Escherichia coli* ATCC 29214.

As bactérias foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 3-4 mL de meio Luria-Bertani (LB) líquido e cresceram em estufa à 37 °C *overnight*. A partir de culturas, foram preparadas suspensões bacterianas, contendo 1 mL do inóculo de cada bactéria e 1 mL do branco em tubos distintos, em solução salina NaCl 0,9% com turvação equivalente a Escala de McFarland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ células/mL), sendo a leitura realizada em espectrofotômetro UV-Vis ajustado para o comprimento de onda de 600 nm.

3.4.3.2.3 Perfuração em poço

A atividade antibacteriana foi avaliada segundo a técnica de difusão em ágar com perfuração de poço em meio Mueller-Hinton (Himedia^R) (BAUER et al., 1966). As suspensões bacterianas são acrescidas de 20 mL de meio àgar Mueller-Hinton e vertidas em placas de Petri. Após a solidificação, poços de aproximadamente 6 mm de diâmetro e 3 mm de altura foram feitos no ágar. Foram inoculados em cada orifício 15 µL dos extratos SFE-CO₂ e UAE-EtOH nas concentrações mencionadas no item 3.4.3.2.1, DMSO (controle negativo), ampicilina 50 mg/mL (controle positivo) e cloranfenicol 30 µg/mL (controle positivo) para *E. coli*. As placas foram colocadas em estufa de crescimento a 37 °C, *overnight*. Após esse período, os halos de inibição foram medidos em milímetros. O teste foi realizado em triplicata.

3.4.4 Avaliação da Atividade Nematicida

As análises foram realizadas através de parceria com Prof. Camilo Amaro de Carvalho, da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

3.4.4.1 Obtenção e preparo do inóculo de *Meloidogyne javanica*

O inóculo do nematóide utilizado nos ensaios foi obtido de raízes de tomate mantido em casa de vegetação. Os ovos foram extraídos pela técnica de Hussey e Berker (1973), modificada por Boneti e Ferraz (1981). A suspensão resultante foi calibrada com o uso de microscópio e câmara de Peters. Após a extração dos ovos, montou-se uma câmara de eclosão obtendo-se assim os juvenis (J2) que serão usados nos testes.

3.4.4.2 Efeito da ação dos extratos em larvas de segundo estágio de *Meloidogyne javanica*

Para a realização dos ensaios biológicos os solventes foram evaporados e o resíduo foi ressuscitado em água destilada esteril + tweem 80 para o extrato SFE-CO₂ e água destilada estéril para o extrato UAE-EtOH. Após, foi realizada diluição seriada 1:2, 1:4, 1:6, 1:8 a partir da concentração 70 mg/mL dos extratos SFE-CO₂ e UAE-EtOH.

Em placas de Elisa previamente esterilizadas, foram adicionados 100 µL de cada extrato e 100 µL de suspensão contendo 30 juvenis em estágio 2 (J2) de *Meloidogyne javanica*. O Tratamento testemunha foi realizado da mesma forma, usando água destilada. Estas placas foram incubadas à temperatura de 26 °C por até 48 h. Ao final do período de incubação, foram avaliados os números de nematóides vivos em 48 h após a exposição aos extratos. A análise do número de juvenis foi quantificado sob Microscópio óptico Olympus CX41 com a câmara acoplada (20 ×).

3.4.4.3 Análise Estatística

Os dados foram expressos como média ± DP de quatro repetições e analisados por análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Valores em (p<0,05) foram considerados estatisticamente significativos. Foi utilizado o programa estatístico SigmaPlot versão 14.0.

3.4.5 Avaliação Atividade *anti-Trypanosoma evansi*

As análises foram realizadas no Laboratório de Parasitologia Veterinária da UFSM em parceria com a Profa. Silvia Gonzales Monteiro.

3.4.5.1 *Trypanosoma evansi* isolamento e ensaio

O teste foi realizado seguindo a metodologia de Baldissera e colaboradores (2013). Os protozoários da espécie *T. evansi*, utilizados no teste, foram originados de um cão naturalmente infectado, os quais foram mantidos através de criopreservação em nitrogênio líquido em condições de laboratório. Para a realização do experimento, ratos foram experimentalmente infectados. Quando os ratos apresentaram alta parasitemia (1×10^7 tripanossomas/ μL), foram anestesiados com isofluorano em câmara anestésica para coleta de sangue através de punção cardíaca. As amostras de sangue foram armazenadas em tubos contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético 10%). Para a separação dos tripanossomas, foram utilizados 200 μL de sangue e 200 μL de meio de cultura (diluído v/v) e centrifugado a 400 rpm, 21 °C durante 10 min. O sobrenadante foi removido e os tripanossomas foram contados em câmara de Neubauer.

O meio de cultura de *T. evansi* foi adaptado de Baltz e colaboradores (1985) usando meio essencial mínimo (MEM) sem glutamina (0,376 g), glutamina (0,016 g), bicarbonato de sódio (0,088 g), glicose (0,04 g), HEPES sem sódio (0,238 g), solução aminoácido não essencial (200 μL), penicilina (1596 U/mL) e estreptomicina (100 $\mu\text{g/mL}$). Os ingredientes foram dissolvidos e homogeneizados em 30 mL de água com pH ajustado para 7,1 usando NaOH. Em seguida, foi preenchida com água ultrapura até um volume de 42 mL e a osmolaridade foi verificada (0,30). O meio de cultura foi então esterilizado por filtração (0,22 μm) e armazenado na geladeira. No dia do teste, 10 mL foram separados em tubo falcon e adicionando 1 $\mu\text{L/mL}$ de hipoxantina 50 mM (dissolvida em NaOH 0,1 M) e 2 $\mu\text{L/mL}$ de 2-mercaptoetanol 1,2 mM. Subsequentemente, o meio de cultura foi equilibrado por 2 h (37 °C com 5% de CO_2).

O meio de cultura com os parasitos foi distribuído em placas de microtitulação (270 $\mu\text{L/poço}$), seguido da adição de 5 μL dos extratos obtidos por SFE- CO_2 e UAE-EtOH de *Ruellia angustiflora* (diluídos em DMSO) nas concentrações de 500 $\mu\text{g/mL}$, 125 $\mu\text{g/mL}$ e 31,25 $\mu\text{g/mL}$ e 62,5 $\mu\text{g/mL}$, 15,6 $\mu\text{g/mL}$, 1,9 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Dois controles negativos (DMSO e meio de cultura + tripanosoma) também foram realizados, no mesmo volume (5 μL). Os testes foram realizados simultaneamente em triplicata e os parasitos foram contados em câmara de Neubauer (BALTZ et al., 1985) 1, 3, 6 e 9 h após o início do teste.

3.4.5.2 Análise dos dados

Todos as análises foram realizadas em triplicata. Os dados foram expressos como média \pm DP.

3.5 ENSAIOS *IN VIVO*

Os experimentos em modelo animal foram realizados em parceria com Prof. Camilo Amaro de Carvalho no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Medicina e Enfermagem da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

3.5.1 Avaliação da Atividade Cicatrizante dos extratos

Foram utilizados 24 camundongos (Balb C) machos, com 45 dias de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa-MG. O número de animais foi definido em função das análises estatísticas. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de polipropileno higienizadas diariamente em temperatura controlada (22-24 °C) e ciclo luz/escuro de 12 horas. Ao longo do período experimental, os animais foram alimentados com ração e água *ad libitum*. Durante os primeiros 15 dias os animais ficaram em processo de adaptação na área experimental. Após o experimento os animais foram eutanasiados seguindo as recomendações do Comitê de Ética em Experimentação animal da UFV sob número (CEUA/UFV, nº 597/2017), sendo as carcaças recolhidas pelo serviço de biossegurança da Universidade Federal de Viçosa.

3.5.1.1 Incisão Cirúrgica e Tratamentos dos animais

Após a aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Viçosa, as lesões experimentais foram realizadas pelo método cirúrgico, anestesiando os animais com cloridrato de xilazina na posologia de 8,0 mg/kg, associado ao cloridrato de ketamina na posologia de 140 mg/kg, via intraperitoneal. Posteriormente, foi realizado o processo de tricotomização e antisepsia com clorexidine a 2%. Com um bisturi circular de 6 mm foi realizada uma incisão por meio de remoção da pele da região dorsal, segundo metodologia proposta por Carvalho e colaboradores (2013). As feridas foram mantidas abertas, sem nenhuma manipulação local, somente a aplicação dos tratamentos. Os tratamentos foram

divididos em três grupos: tratamento SFE-CO₂ (n=7), tratamento UAE-EtOH (n=7) e tratamento controle positivo (n=10) onde foi utilizado sulfadiazina de prata (Sulf). Durante o período de aclimação houve a perda de um animal do tratamento apolar. Os extratos vegetais foram avaliados na concentração 70 mg/mL, já o controle positivo sulfadiazina de prata a 1%.

No primeiro dia experimental, uma incisão cirúrgica com auxílio de bisturi circular (6 mm) de diâmetro foi realizada no dorso dos animais. O fragmento retirado foi denominado de Tempo “0”, controle. Posteriormente, foram coletadas amostras das lesões no 4º e 8º dia experimental. Este período iniciou imediatamente após a realização da lesão, sendo a aplicação dos tratamentos realizados uma vez por dia, durante todo o experimento, sendo aplicada a mesma quantidade dos extratos UAE-EtOH e SFE-CO₂ aos grupos tratados e sulfadiazina de prata para o grupo controle. O tempo experimental total foi de 8 dias, baseado em estudo prévio (RIBEIRO, 2018).

3.5.1.2 Avaliação das feridas

Diariamente, por meio de avaliação visual, as lesões foram avaliadas, observando-se as possíveis alterações clínicas quantitativas e qualitativas como: sinais de inflamação, halo eritematoso, tempo de epitelização e tempo de cicatrização. Durante todo o período experimental, as lesões não apresentaram sinais macroscópicos de infecção nos grupos analisados.

A mensuração da área da ferida foi realizada com paquímetro manual, em duas direções: o maior comprimento e a maior largura, mensurados no 1º, 4º e 8º dias após confecção das feridas.

3.5.1.3 Coleta e Processamento histológico do material

No 4º e 8º dia de tratamento, 3 animais de cada grupo foram eutanasiados, e uma incisão cirúrgica com auxílio de bisturi circular (6 mm) realizada para a retirada do fragmento tecidual destinado à análise histopatológica. Os fragmentos da pele foram coletados de cada animal e fixados em paraformaldeído a 4% por 24 h e depois colocados em álcool 70% até a confecção das lâminas histológicas. Em seguida, foram realizados procedimentos para inclusão em parafina seguindo as etapas: desidratação usando etanol crescente (70% a 100%) e transferidos para o xilol para a diafanização utilizando-se procedimento convencional. Foram obtidos cortes

de 5 micrômetros utilizando o micrótomo rotativo, que posteriormente foram corados com picosirus (que tem a finalidade para diferenciação das fibras colágenas do tipo I e III sob luz polarizada) e hematoxilina-eosina (HE) para avaliação de fibroblasto, vascularização e células inflamatórias.

3.5.1.4 Avaliação histopatológica e histomorfométrica do processo de cicatrização

Para realizar contagem de células que compõe o processo inflamatório e os fibroblastos, foi realizada a coloração de HE (Eosina-Hematoxilina). As imagens histológicas destas lâminas foram obtidas usando uma câmera digital que é acoplada ao microscópio óptico. Foram fotografados 10 campos por lâmina com objetiva de 20X, resultando na área total tecidual submetida a análise estereológica de $7,2 \times 10^6 \mu\text{m}^2$. Para esta análise, uma área quadriculada composta por 300 pontos na área teste usada como padrão (AT) de $1,2 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ foi sobreposta a cada imagem (VIEIRA et al., 2015).

Para a análise das fibras de colágenos usou-se a coloração de Picosirius, que analisa qualitativamente as fibras colágenas presentes no tecido conjuntivo. Essa coloração permite diferenciar principalmente das fibras tipo I e tipo III, uma vez que ao serem visualizadas ao microscópio com luz polarizada, as fibras colágenas tipo I que são mais espessas, são visualizadas nas cores vermelho e amarelo em tonalidades brilhantes, e as fibras mais delicadas, frágeis, imaturas que são o colágeno tipo III, são visualizadas nas cores verdes brilhantes (VIEIRA et al., 2015). A análise estereológica foi realizada utilizando o software especializado Image-Pro Plus® (Media Cybernetics).

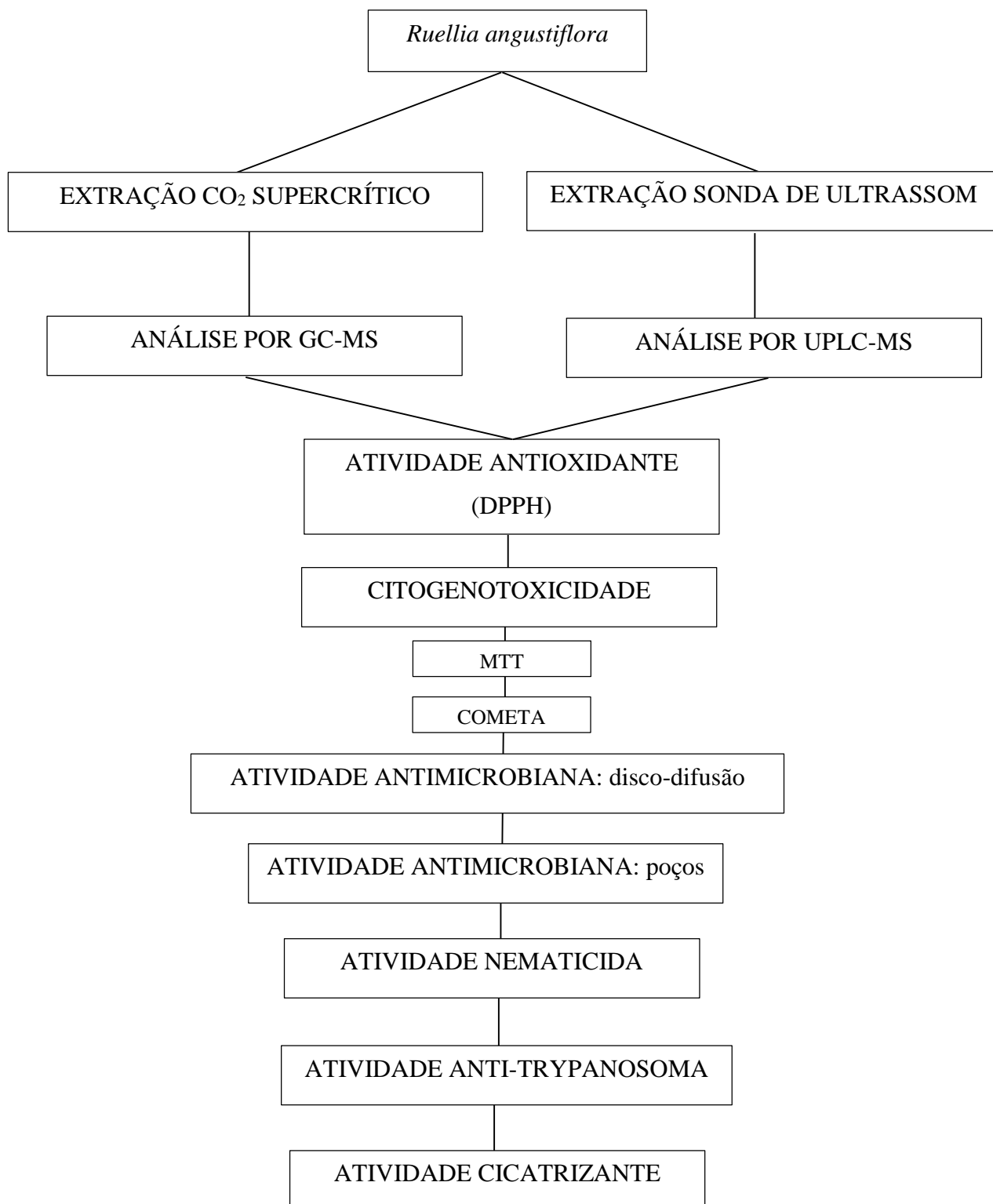
3.5.1.5 Análise Estatística

Todos os dados são expressos como média \pm (DP). As análises foram realizadas por ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey usando o software estatístico GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, Inc, CA, EUA). Valores em $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3.6 FLUXOGRAMA ESQUEMÁTICO DOS PROCEDIMENTOS ENVOLVIDOS NESSE TRABALHO

Para facilitar a compreensão das etapas realizadas, foi confeccionado um esquema (Figura 5) que resume os principais procedimentos envolvidos nesse trabalho.

Figura 5 - Fluxograma esquemático dos principais procedimentos envolvidos nesse trabalho



4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA POR UPLC-MS

O extrato polar obtido da extração com sonda de ultrassom (UAE-EtOH) item 3.2.1 foi analisado por UPLC-MS, conforme o método descrito no item 3.3.1, de acordo com os parâmetros apresentados na tabela 1 onde encontram-se os dados curva analítica, coeficiente de correlação, tempo de retenção, razão massa-carga, limite de detecção e limite de quantificação.

Tabela 1- Parâmetros do método analítico empregando UPLC-MS.

Composto Fenólico	Equação da curva analítica	r²	t_R (min)	m/z	LD (ng/mL)	LQ (ng/mL)
Ácido Gálico	$y = 7,70x + 5,90$	0,9611	0,95	169>125	7,0	23,5
Ácido Clorogênico	$y = 36,00x + 551,10$	0,9927	1,39	353>191	2,9	9,8
Catequina	$y = 137,30x + 300,20$	0,9980	1,49	289>295	3,0	10,2
Ácido Cafeico	$y = 751,24x - 17749,10$	0,9611	1,77	179>135	0,3	1,0
Ácido Vanílico	$y = 1210,30x - 12051,90$	0,9858	1,83	167>152	0,3	0,9
Rutina	$y = 1193,70x - 23522,70$	0,9751	2,19	609>300	0,1	1,1
Ácido <i>p</i> -cumárico	$y = 4429,02x - 466111,70$	0,9849	2,29	163>119	0,1	0,2
6-Hidroxycumarina	$y = 1593,80x - 9237,20$	0,9920	2,37	161>133	0,1	1,1
Ácido Ferúlico	$y = 2432,19x - 28111,50$	0,9848	2,49	193>134	0,3	0,4
Quercitrina	$y = 3359,60x - 24731,80$	0,9926	2,60	447>301	0,1	0,4
Ácido Rosmarínico	$y = 49,40x + 686,90$	0,9996	2,67	359>181	1,0	3,2
Miricetina	$y = 64,30x + 399,50$	0,8843	2,90	317>179	0,8	2,8
Fisetina	$y = 660,60x - 5642,90$	0,9853	2,93	285>135	0,7	2,2
4- Hidroxycumarina	$y = 4495,70x + 59729,50$	0,9907	3,12	161>117	0,1	0,2
Resveratrol	$y = 1181,10x - 20039,60$	0,9856	3,20	227>143	0,2	0,5
Ácido trans-cinâmico	$y = 925,20x + 7442,50$	0,9909	3,47	147>103	0,1	0,3
Luteolina	$y = 2103,30x + 583,60$	0,9993	3,51	285>133	0,2	0,5

Quercitina	$y=597,70x + 2261,30$	0,9923	3,56	301>179	0,5	1,6
Apigenina	$y=1764,00x + 3824,40$	0,9978	4,05	259>117	0,1	0,3
Canferol	$y=277,90x - 2072,70$	0,9972	4,17	285>151	0,3	1,1
3,6 Dihidroxiavona	$y=1091,10x + 1700,20$	0,9945	5,19	253>197	0,1	0,4
Crisina	$y=1338,00x + 22818,90$	0,9644	5,33	253>143	0,03	0,1
Galangina	$y=698,50x + 111059,00$	0,9647	5,49	259>169	0,1	0,3

t_R : tempo de retenção, r^2 : coeficiente de correlação, m/z: razão massa-carga, LD: Limite de detecção, LQ: Limite de Quantificação

Fonte: Autor.

Os compostos determinados (identificados e quantificados) por UPLC-MS encontram-se na tabela 2, na qual estão descritas as concentrações \pm desvio padrão e concentrações relativas. Os cromatogramas relativos as análises por UPLC-MS encontram-se no apêndice A. As estruturas químicas dos compostos determinados encontram-se no anexo A.

Tabela 2 - Constituintes fenólicos determinados por UPLC-MS em *Ruellia angustiflora* no extrato UAE-EtOH

Composto Fenólico	Concentração ($\mu\text{g/g}$)	Concentração Relativa %
Rutina	3,97 \pm 1,90	25,8
Ácido Cafeico	2,74 \pm 1,56	17,8
Ácido Vanílico	1,71 \pm 0,43	11,1
Ácido <i>p</i> -Cumárico	1,57 \pm 0,40	10,2
Ácido Ferúlico	1,55 \pm 0,44	10,1
Canferol	0,93 \pm 0,15	6,0
Apigenina	0,90 \pm 0,27	5,8
Quercitrina	0,85 \pm 0,15	5,5
Luteolina	0,52 \pm 0,20	3,4
6-Hidroxicumarina	0,37 \pm 0,29	2,4
Resveratrol	0,22 \pm 0,08	1,4
Quercetina	< LD	-
Miricetina	< LD	-
Galangina	< LD	-
Fisetina	< LD	-
Crisina	< LD	-
Catequina	< LD	-
Ácido trans-cinâmico	< LD	-
Ácido Rosmarínico	< LD	-
Ácido Gálico	< LD	-
Ácido Clorogênico	< LD	-
4-Hidroxicumarina	< LD	-
3,6-Dihidroxi-flavona	< LD	-

< LD: menor que limite de detecção

Estudos da análise fitoquímica realizados por Ramadevi e colaboradores (2016) e Karthika e colaboradores (2016) confirmam a presença de fenóis e flavonoides no extrato etanólico das folhas de *R. patula*. Segundo Samy e colaboradores (2015), apigenina foi descrito em *R. prostata* Poir.; ácido vanílico como constituinte de *R. tuberosa*; ácido *p*-cumárico foi encontrado em *R. brittoniana* Leonard e apigenina e luteolina presentes em *R. rosea* (Nees) Hemsl. Esses achados envolvendo outras espécies de *Ruellia* apoiam os resultados obtidos UPLC-MS para *R. angustiflora*.

As classes dos compostos determinados por UPLC-MS na amostra de *Ruellia angustiflora* são reconhecidos por inúmeras propriedades medicinais apresentadas no item 2.4 e tabela 3. A tabela 3 apresenta um panorama das possíveis atividades farmacológicas encontradas na literatura para esses constituintes.

Tabela 3 – Possíveis atividades farmacológicas dos compostos determinados por UPLC-MS.

Polifenois/Flavonoides/Cumarina	Atividade Farmacológica
Rutina	Anti-inflamatório (COUTINHO et al., 2009; GANESHPURKAR; SALUJA, 2017; GULLÓN et al., 2017; SILVA et al., 2019); Antidiabético (BABU et al., 2013; GULLÓN et al., 2017); Cicatrizante (ALMEIDA et al., 2012); Antimicrobiana, anticâncer, antialérgico (GULLÓN et al., 2017; SILVA et al., 2019);
Ácido Cafeico	Antioxidante (SIMÕES et al., 2004; SILVA; JORGE, 2011; MARKOVIĆ et al., 2016; SARDI et al., 2016 ; SPAGNOL et al., 2019); Antibacteriano (STOJKOVIĆ et al., 2013; SARDI et al., 2016; SPAGNOL et al., 2019); Antiparasitário (nematicida) (OHRI; PANNU, 2010); Anti-inflamatório (SARDI et al., 2016); Neuroprotetor (AKOMOLAFE et al., 2017);
Ácido Vanílico	Inibição da carcinogênese e inflamação, antinociceptivo (YRBAS et al., 2015); Neuroprotetor, hepatoprotetor, antimicrobiano, antioxidante (SINDHU et al., 2015; VINOITHIYA; ASHOKKUMAR, 2017);
Ácido <i>p</i> -cumárico	Antibacteriano (STOJKOVIĆ et al., 2013; OJHA; PATIL, 2019);

	Antioxidante (STOJKOVIĆ et al., 2013; SHARMA et al., 2017; KIM et al., 2017); Anti-inflamatório, anti-ulcerogênico, anti-mutagênico (SHARMA et al., 2017);
Ácido Ferúlico	Anti-inflamatório, anticarcinogênico, hepatoprotetor, neuroprotetor (SRINIVASAN; SUDHEER; VENUGOPAL, 2007; GHOSH et al., 2017); Antimicrobiano (BORGES et al., 2013; WANG et al., 2017); Antiparasitário (nematicida) (OHRI; PANNU, 2010); Antidiabético, antioxidante (SRINIVASAN; SUDHEER; VENUGOPAL, 2007; GHOSH et al., 2017; NANKAR et al., 2017);
Canferol	Prevenção e tratamento de doenças inflamatórias, dor, diabetes, infecções (CALDERÓN-MONTAÑO, 2011; SHARMA et al., 2019; SHARMA et al., 2020); Neuroprotetor, inibi a oxidação (WU et al., 2017); Anti-inflamatório (DEVI et al., 2015);
Apigenina	Antidiabético (BABU et al., 2013); Neuroprotetor (NABAVI et al., 2018); Antioxidante (NABAVI et al., 2018; SALMANI et al 2017; TELANGE et al., 2017); Anticarcinogênico (SALMANI et al., 2017; MADUNIC, 2018); Antiprotozoário (tripanocida) (MAMADALIEVA et al., 2011);

Quercitrina	Antioxidante (BABUJANARTHANAM et al., 2011; CINCIN et al., 2014; LEE ; PARK, 2019); Antidiabético (BABUJANARTHANAM et al., 2011, BABU et al., 2013); Anticarcinogênico (CINCIN et al., 2014);
Luteolina	Anti-inflamatório (WANG et al., 2017); Redutor tumoral (KAPOOR, 2013); Antiprotozoário (tripanocida) (MAMADALIEVA et al., 2011); Antioxidante e Neuroprotetor (KWON et al., 2017);
6-Hidroxicumarina	Citotóxico a agentes cancerígenos (MONTAGNER, 2007; REHMAN et al., 2014);
Resveratrol	Antibacteriano (BROWN et al., 2009; BOSTANGHADIRI et al., 2017); Antidiabético (ÖZTÜRK et al., 2017); Anti-inflamatório (ANTUS et al., 2015); Antiprotozoário (tripanocida) (VERA et al., 2016); Antioxidante (XIA et al., 2017);

4.2 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA POR GC-MS

O extrato não polar obtido da extração SFE-CO₂ item 3.2.2 foi analisado por GC-MS de acordo com item 3.3.2, obtendo-se os resultados apresentados na tabela 4, onde estão representados os compostos com área superior a 1%, acompanhados do tempo de retenção, fórmula molecular, peso molecular e porcentagem de área. O cromatograma relativo a análise por GC-MS encontram-se no apêndice B. As estruturas químicas dos compostos identificados encontram-se no anexo B.

Tabela 4 - Dados obtidos por GC-MS

Pico	t _R	Composto	FM	PM	Área %
1	6,927	Ácido Linolênico (éster metílico)	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	292	4,2
2	12,12	Licoperseno	C ₄₀ H ₆₆	546	11,9
3	13,81	γ-tocoferol	C ₂₈ H ₄₈ O ₂	416	1,1
4	14,49	α-tocoferol	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	430	10,3
5	14,95	Vitamina E (acetato)	C ₃₁ H ₅₂ O ₃	472	1,2
6	15,57	Campesterol	C ₂₈ H ₄₈ O	400	1,8
7	15,89	β-Estigmasterol	C ₂₉ H ₄₈ O	412	4,3
8	16,54	β-Sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O	414	6,9
9	17,12	Metil comate A	C ₃₂ H ₅₂ O ₄	500	1,4
10	17,71	Metil comate D	C ₃₁ H ₅₀ O ₄	486	5,6

t_R: tempo de retenção, FM: fórmula molecular, PM: peso molecular g/mol

Fonte: Autor.

A avaliação do extrato metanólico das folhas de *R. tuberosa* por GC-MS determinou a presença de 27 fitocompostos dentre estes, éster metílico de ácido linolênico (SENTHILKUMAR et al., 2013).

A análise envolvendo GC-MS do extrato etanólico das folhas *R. patula* reportaram a presença de γ -tocoferol dentre 17 compostos (KARTHIKA et al., 2016), ainda, Lakshmi e colaboradores (2017) identificaram no extrato metanólico de *R. patula* α -tocoferol.

De acordo com Afzal e colaboradores (2015) e Samy e colaboradores (2015) a espécie *R. patula* apresenta β -sitosterol, estigmasterol e campesterol; *R. tuberosa* e *R. prostata* possuem β -sitosterol e estigmasterol. Esses achados vão ao encontro dos resultados obtidos nesse estudo para *R. angustiflora*.

As classes dos compostos obtidos por GC-MS na amostra de *Ruellia angustiflora* são reconhecidos por inúmeras atividades farmacológicas reportadas nos itens 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8 e tabela 5. A tabela 5 apresenta uma revisão bibliográfica das atividades farmacológicas encontradas na literatura para esses constituintes.

Tabela 5 - Atividades farmacológicas dos compostos identificados por GC-MS.

Pico	Composto	Atividade Farmacológica
1	Ácido Linolênico (éster metílico)	Antibacteriano e antifúngico (AGORAMOORTHY et al., 2007);
2	Licoperseno	Antimicrobiano (MALAR et al., 2016);
3	γ -tocoferol	Anti-inflamatório (WELLS et al., 2010; AZZI et al., 2018; ZHANG et al., 2019); Antitumoral (AZZI et al., 2018);
4	α -tocoferol	Antioxidante (GUINAZ et al., 2009; WELLS et al., 2010; MULLAN et al., 2017 ; ZHANG et al., 2019); Anti-inflamatório (WELLS et al., 2010; AZZI et al., 2018); Antitumoral (AZZI et al., 2018);
5	Vitamina E (acetato)	Antioxidante (TEO et al., 2010; YANG; MCCLEMENTS, 2013; ORSAVOVÁ et al., 2019); Antibacteriano (CORTEZ, 1998);
6	Campesterol	Antioxidante (SUHAJ, 2006; CHERIF, 2012); Redutor do Colesterol (NORA et al., 2016); Protetor cardiovascular (QUEIROZ et al., 2014);

		Antitumoral (LEE et al., 2012); Gastroprotetor (QUÍLEZ et al., 2010); Larvicida (GADE et al., 2017);
7	β -Estigmasterol	Antioxidante (SUHAJ, 2006; CHERIF, 2012); Anti-inflamatório, inibição tumoral e anti-HIV (RAMAN et al., 2012); Antiprotozoário (tripanocida) (AMINU et al., 2017); Gastroprotetor (QUÍLEZ et al., 2010); Analgésico, (SAEIDNIA et al., 2014); Antimicrobiano (SANTOS; MORENO, 2004); Bacteriostático (BURČOVÁ et al., 2018); Antitumoral (LEE et al., 2012; LOMENICK et al., 2015);
8	β -Sitosterol	Anti-inflamatório (SAEIDNIA et al., 2014; LOMENICK et al., 2015; RODRIGUES et al., 2017); Antioxidante (CHERIF, 2012; PARVEZ et al., 2018); Redutor do colesterol (NORA et al., 2016); Antiprotozoário (tripanocida) (SAEIDNIA et al., 2014); Protetor cardiovascular (QUEIROZ et al., 2014);
9	Metil comate A	Antioxidante (LACERDA, 2011);

10	Metil comate D	Antimicrobiano e anti-inflamatório (RAMAN et al., 2012);
----	----------------	--

Fonte: Autor.

Observando o levantamento acerca dos compostos mencionados nas tabelas 3 e 5 nota-se que estes constituintes podem conferir aos vegetais inúmeras propriedades farmacológicas. Por isso, inicialmente ensaios *in vitro* foram realizados com *R. angustiflora* a fim de explorar as potencialidades da espécie, já que os extratos demonstraram composição química atraente do ponto de vista químico farmacêutico.

4.3 ATIVIDADE ANTIRRADICALAR FRENTE AO RADICAL DPPH

Os extratos UAE-EtOH e SFE-CO₂ foram avaliados frente ao radical DPPH conforme item 3.4.1.1, afim de compreender a capacidade antioxidante. O mesmo ensaio foi realizado com padrão de ácido ascórbico para comparação dos resultados. A tabela 6 apresenta os valores obtidos, compreendendo a equação da reta, coeficiente de correlação, concentração inibitória de 50%.

Tabela 6 - Dados obtidos da atividade antirradicalar frente ao radical DPPH

DPPH	Equação da reta	r ²	IC ₅₀ (µg/mL)
Ácido Ascórbico	$y = 5,4233x + 6,7279$	0,9977	7,98
	$y = 5,7159x + 2,3081$	0,9937	8,34
	$y = 5,9689x - 0,2593$	0,9879	8,33
<i>R. angustiflora</i> UAE-EtOH	$y = 0,9428x + 24,979$	0,9941	26,54
	$y = 1,054x + 24,125$	0,991	26,55
	$y = 0,8958x + 25,684$	0,9802	27,14
<i>R. angustiflora</i> SFE-CO ₂	$y = 0,1268x + 18,956$	0,9689	244,83
	$y = 0,1363x + 16,445$	0,9793	246,18
	$y = 0,1249x + 20,515$	0,9964	236,07

r²: coeficiente de correlação, IC₅₀: Concentração inibitória de 50%

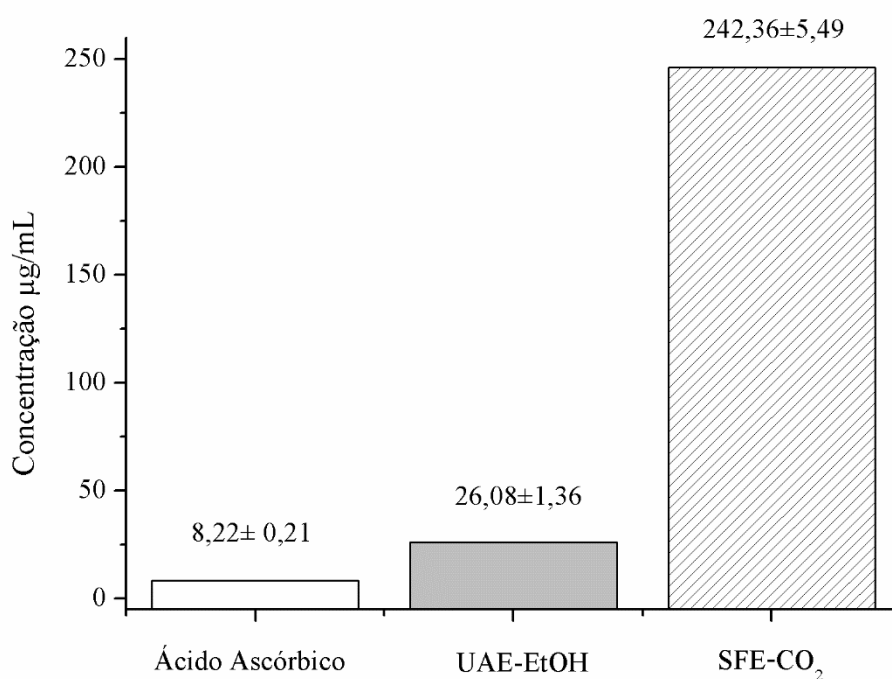
Fonte: Autor.

A partir das concentrações inibitórias (IC₅₀) obtidas pode-se estimar o potencial antioxidante dos extratos, pois esses valores representam a capacidade do extrato em inibir 50%

da concentração inicial de DPPH. Com isso, quanto menor o valor de IC_{50} maior a atividade antioxidante (GODÓI et al., 2011).

A figura 6 representa as concentrações inibitórias dos extratos necessárias para reduzir em 50% a concentração de DPPH comparados ao padrão antioxidante de ácido ascórbico com seus respectivos desvio padrão, demonstrando assim a atividade antioxidante.

Figura 6 - Atividade antioxidante dos extratos frente ao radical DPPH



Fonte: Autor.

Pode-se observar pela figura 6, que os extratos de *R. angustiflora* apresentaram potenciais antioxidantes distintos.

Chothani e Mishra (2012) avaliaram a atividade antirradicalar frente ao DPPH de diferentes extratos da raiz de *R. tuberosa*, e observaram o maior potencial antioxidante para o extrato metanólico com IC_{50} ($26,17 \mu\text{g/mL}$), e menor para o extrato acetato de etila ($571 \mu\text{g/mL}$). Lakshmi e colaboradores (2017), investigaram o mesmo radical em diferentes extratos de *R. patula*, obtiveram maior atividade antirradicalar para extrato etanólico com IC_{50} ($70 \mu\text{g/mL}$) e menor para acetato de etila ($320 \mu\text{g/mL}$). Como pode-se observar pelos estudos relatados o

ensaio responde de maneira diferente frente a característica dos solventes de extração, assim como foi verificado para *R. angustiflora* neste estudo.

Embora ambos extratos obtidos de *R. angustiflora* apresentem fitocompostos com reconhecida atividade antioxidante como referenciado nas tabelas 3 e 5, o extrato UAE-EtOH apresentou maior atividade antirradicalar que o extrato SFE-CO₂, com valor de IC₅₀ mais próximo ao ácido ascórbico. Acredita-se que a distinção dos resultados da atividade perante o DPPH é devido a diferença de polaridade dos solventes empregados. Visto que, o extrato UAE-EtOH foi extraído com etanol (solvente polar) e o extrato SFE-CO₂ extraído com CO₂ (gás apolar). Segundo Cardoso e colaboradores (2008) o radical DPPH responde melhor para amostras mais polares (CARDOSO et al., 2008).

Como foi mencionado, muitos compostos identificados nos extratos são descritos como compostos antioxidantes. O potencial antioxidante dos compostos fenólicos está relacionado ao número e a disposição dos grupos hidroxilas na molécula de interesse (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015).

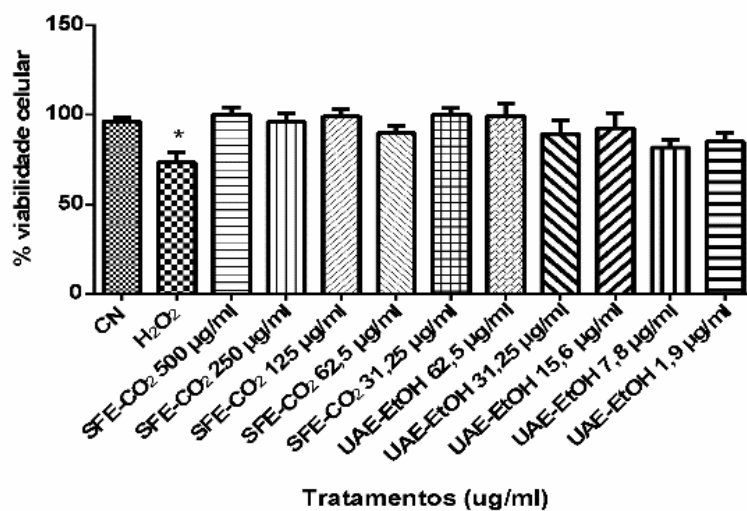
Segundo Yao e colaboradores (2004), os polifenóis possuem estrutura química ideal para a atividade de eliminação de radicais livres, já que apresentam não somente grupos hidroxilas fenólicos que são propensos a doar um átomo de hidrogênio ou um elétron para um radical livre, mas também um sistema aromático conjugado estendido para deslocar um elétron não emparelhado.

Compostos derivados de ácidos fenólicos como ácido cafeico e ferúlico, diversos flavonoides, triterpenos, tocoferóis e fitoesteroides são reportados na literatura por apresentarem atividade antioxidante (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2004; ZUANAZZI; MONTANHA, 2004; CHOTHANI; MISHRA, 2012; LACERDA, 2011; CHERIF, 2012).

4.4 ATIVIDADE CITOTÓXICA E GENOTÓXICA

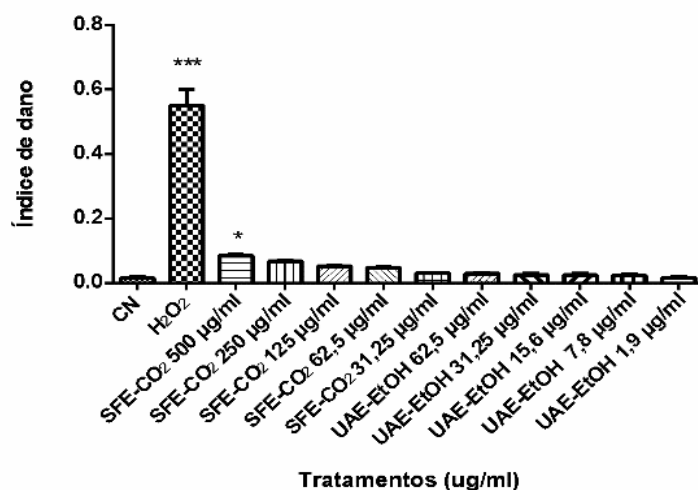
A investigação da citotoxicidade e genotoxicidade dos extratos UAE-EtOH e SFE-CO₂ foi conduzida conforme itens 3.4.2.3 e 3.4.2.4, afim de verificar a segurança dos extratos. A avaliação da citotoxicidade através do ensaio de MTT e genotoxicidade através do ensaio do cometa dos extratos de *R. angustiflora* após 24 horas de incubação estão representados na Figura 7 e Figura 8 respectivamente.

Figura 7- Avaliação da Citotoxicidade pelo ensaio de MTT dos extratos SFE-CO₂ e UAE-EtOH de *R. angustiflora*



Os resultados são expressos como uma porcentagem do controle negativo - NC (100%). Os dados são expressos como média \pm desvio padrão (DP). As análises foram realizadas por ANOVA de 1 via seguida pelo teste post hoc de Dunnett. Valores em $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. * = $p < 0,05$ e *** = $p < 0,001$.

Figura 8- Avaliação da Genotoxicidade pelo ensaio de Cometa dos extratos SFE-CO₂ e UAE-EtOH de *R. angustiflora*



Os resultados são expressos como uma porcentagem do controle negativo - NC (100%). Os dados são expressos como média \pm desvio padrão (DP). As análises foram realizadas por ANOVA de 1 via seguida pelo teste post hoc de Dunnett. Valores em $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. * = $p < 0,05$ e *** = $p < 0,001$.

Os resultados apresentados na Figura 7 mostram redução estatisticamente significativa da viabilidade celular de H₂O₂ quando comparado com o controle negativo NC (p <0,05). A exposição de células aos extratos UAE-EtOH e SFE-CO₂ de *R. angustiflora* nas diferentes concentrações avaliadas não apresenta diferença significativa quando comparados ao NC (p > 0,05), as concentrações testadas não demonstram toxicidade através da avaliação da viabilidade celular pelo método MMT.

O H₂O₂ levou ao aumento no índice de dano de DNA em relação ao NC, os quais diferem significativamente (p <0,001), como mostra figura 8. Apenas a maior concentração do extrato SFE-CO₂ de *R. angustiflora* (500 µg/mL) resultou em aumento no dano em comparação ao NC (p <0,05), no entanto, foi significativamente menor que H₂O₂. As demais concentrações dos extratos de *R. angustiflora* não diferem significativamente do NC. Os extratos nas concentrações avaliadas não apresentaram atividade genotóxica através da avaliação do dano. Kamdem et al. (2013) avaliaram a citotoxicidade e genotoxicidade do extrato etanólico de *Melissa officinalis* L. espécie que pertence a ordem Lamiales a mesma de *R. angustiflora*. A exposição das células ao extrato de *M. officinalis*, no estudo de viabilidade celular, não apresentou citotoxicidade significativa em relação ao controle H₂O₂, como *R. angustiflora*. Da mesma forma que *R. angustiflora*, a avaliação de genotoxicidade pelo método do cometa de *M. officinalis* nas concentrações testadas não demonstrou ser genotóxico as células sadias. Não foram encontrados para outras espécies de *Ruellia* estudos envolvendo a avaliação citotóxica e genotóxica frente a PBMC normais.

4.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.5.1 Ensaio disco-difusão

A metodologia de disco-difusão item 3.4.3.1.3 foi realizada como ensaio preliminar a fim de verificar ou não a formação do halo de inibição bacteriano.

Os extratos foram testados na concentração de 130 mg/mL frente aos micro-organismos descritos no item 3.4.3.1.1. Não foi verificado, para o extrato SFE-CO₂, a formação de halo de inibição para os inóculos testados. Já o extrato UAE-EtOH apresentou formação de halo frente a *Acinetobacter baumannii* e *Aeromonas caviae* bactérias gram-negativas.

Arirudran e colaboradores (2011) avaliaram a atividade antimicrobiana de diferentes extratos de *Ruellia tuberosa* através de ensaios de difusão em disco onde pelo menos um dos

tipos de extrato avaliado foi capaz de inibir o crescimento bacteriano na concentração de 100 mg/mL de *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella sonnei*, *Protease*, *Salmonella*, *Staphylococcus spp*, *Serratia* e *Bacillus spp*.

4.5.2 Concentração Inibitória Mínima (MIC)

Devido ao potencial antimicrobiano do extrato UAE-EtOH apresentado no *screening*, procedeu-se a determinação da concentração inibitória mínima conforme descrito no item 3.4.3.1.4 para *Aeromonas caviae* e *Acinetobacter baumannii*, a qual apresentou MIC de 4,4 mg/mL para ambos micro-organismos.

Ullah e colaboradores (2016), determinaram as concentrações inibitórias mínimas para três bactérias sensíveis ao extrato metanólico de *R. tuberosa*. Obteve-se MICs 10, 4,0 e 14 mg/mL, para *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente.

Como pode-se observar, *R. angustiflora* apresentou atividade antibacteriana para duas bactérias gram-negativas, *Acinetobacter baumannii* e *Aeromonas caviae*, patógenos de relevância clínica (KUMAR et al., 2012; AL-KADMY et al., 2018).

Acinetobacter baumannii é um importante patógeno em infecções nosocomiais (contraídas durante a estadia em ambientes de saúde), devido sua capacidade de resistência a múltiplos medicamentos (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; NETTO, 2013). É agente causador de septicemia, pneumonia, infecções de pele e tecido mole, infecção do sangue e morte (FAJIR; AL-NIAAME; HUSSEIN, 2017). Acomete principalmente pacientes com idade avançada, doenças subjacentes graves, imunossupressão, queimaduras, ou pacientes que realizaram alguns procedimentos invasivos, como a presença de cateter e ventilação mecânica. Portanto, os pacientes críticos são os mais infectados por esse micro-organismo em ambientes hospitalares (NETTO, 2013).

As infecções causadas por *Aeromonas* incluem doenças gastrointestinais, infecções teciduais, pneumonia, meningite, endocardite, osteomielite e artrite séptica (KUMAR et al., 2012). O gênero e espécie *Aeromonas caviae* são associados como agentes etiológicos de doenças em animais e humanos (LOPES, 2009; SOUZA et al., 2017). *Aeromonas caviae* tem-se relacionado a infecção nos tecidos moles de paciente submetido a lipoaspiração, levando a disfunção de múltiplos órgãos e necrose de pele (KUMAR et al., 2012). Estudos demonstram *A. caviae* como o patógeno mais frequente entre os casos de bacteremia causadas por *Aeromonas*, em pacientes imunocomprometidos (KIMURA; ARAOKA; YONEYAMA, 2013).

A propriedade antibacteriana de *R. angustiflora* é apoiada pela presença dos constituintes fenólicos determinados no extrato UAE-EtOH, visto que a maior parte destes são reportados como agentes antimicrobiano, conforme tabela 3. Segundo Borges e colaboradores (2013) e Stojković e colaboradores (2013), a atividade antimicrobiana dos polifenóis está relacionada ao número de grupos hidroxilas, quanto maior o número maior a toxicidade aos micro-organismos. Ainda, sugere-se um comportamento sinérgico dos constituintes fenólicos no desempenho da atividade investigada.

Khan e colaboradores (2013), lembram que em muitos casos o extrato “bruto” é farmacologicamente mais eficiente que um composto ativo purificado, devido ao sinergismo. O sinergismo entre os compostos químicos, tem sido demonstrado tanto envolvendo moléculas sintéticas associados a componentes vegetais quanto dos fitocompostos entre si, afim de obter maior ação terapêutica, sejam eles de mesma ou diferentes classes metabólicas (ROMANO et al., 2009; PRABHAKAR; DOBLE, 2009; CHANDRA et al., 2012; FERNÁNDEZ-MARÍN et al., 2013; SHUKLA et al., 2015).

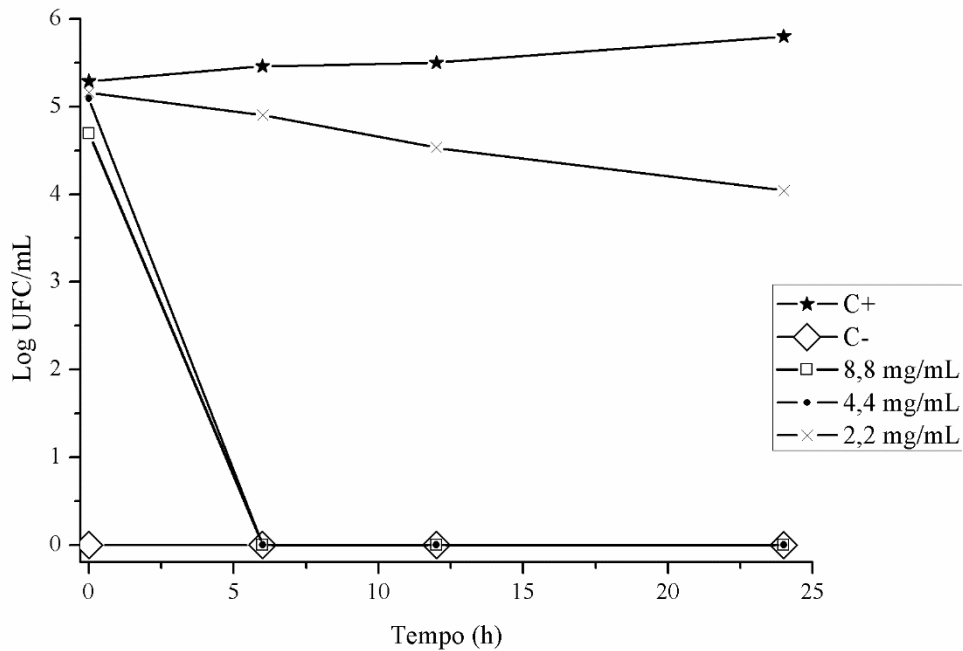
Embora o extrato SFE-CO₂ em ambos métodos avaliados tenha apresentado compostos com reconhecida atividade antimicrobiana descrita na literatura, conforme tabela 5, não apresentou capacidade de inibir o crescimento microbiano na concentração utilizada neste trabalho.

4.5.3 Curva de morte

Afim de explorar ainda mais a compreensão sobre a atividade antimicrobiana, foi realizada a curva de morte, conforme item 3.4.3.1.5 Através desse ensaio pode-se perceber a interação entre o agente antimicrobiano (extrato) e o micro-organismo. Os resultados preliminares são apresentados a seguir:

A figura 9 e 10, demonstra o comportamento do extrato EAU-EtOH nas concentrações de 2 x MIC (8,8 mg/mL), MIC (4,4 mg/mL) e 0,5 x MIC (2,2 mg/mL) ao longo de um período de 24 horas (0, 6, 12, 24) frente a *Acinetobacter baumannii* e *Aeromonas caviae* respectivamente.

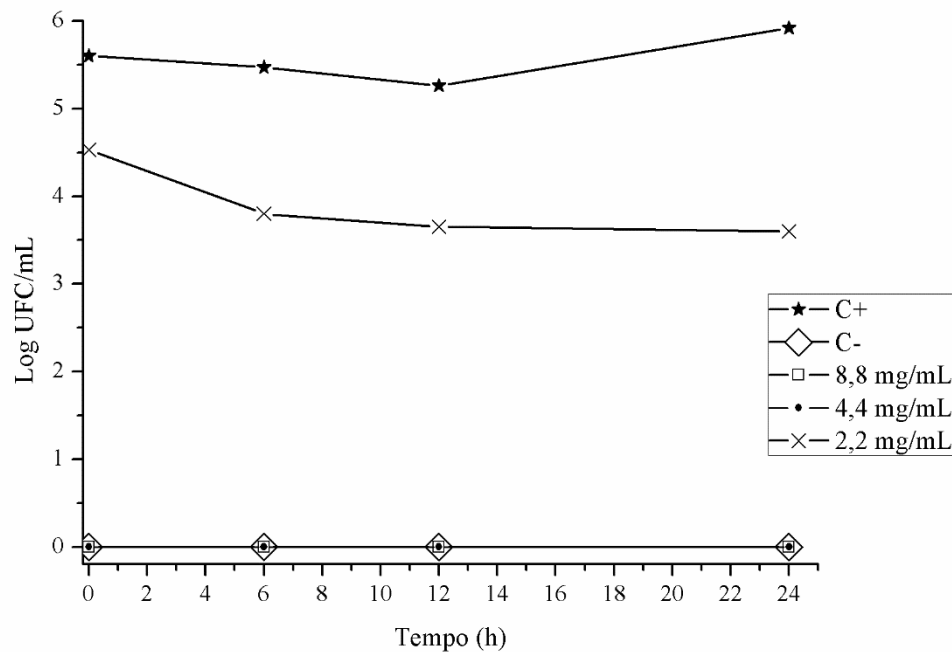
Figura 9 - Curva de Tempo de Morte do extrato UAE-EtOH de *R. angustiflora* frente a *Acinetobacter baumannii*



Fonte: Autor.

Pela análise da figura 9, observa-se que inicialmente, tempo 0 até 6 horas de interação as concentrações não conseguem evitar totalmente o crescimento de *Acinetobacter baumannii*. No entanto, a partir de 6 até 24 horas as concentrações (8,8 e 4,4 mg/mL) agem como bactericida. Já a concentração (2,2 mg/mL) diminui o crescimento bacteriano, porém não leva a morte total das colônias em 24 horas.

Figura 10 - Curva de Tempo de Morte do extrato UAE-EtOH frente a *Aeromonas caviae*



Fonte: Autor.

Observando a figura 10 nota-se que a ação bactericida do extrato nas concentrações (8,8 e 4,4 mg/mL) para *Aeromonas caviae* iniciou-se logo após o primeiro período de incubação e manteve-se por todo período avaliado. Já a concentração (2,2 mg/mL) inicialmente não é capaz de impedir o crescimento bacteriano, porém a partir de 6 horas diminuiu o número de colônias inicial. No entanto, não apresenta a eficácia das demais concentrações, pois observa-se existência de colônias até 24 horas.

Vasconcelos (2014), realizou estudos de curva de morte nos intervalos de 10, 30, 60 minutos e 5, 12 e 24 horas para *R. asperula* (Mart. ex Nees) frente a *Streptococcus sobrinus* e *R. paniculata* L. frente *Streptococcus oralis* e *Streptococcus sobrinus*. As duas espécies exerceram atividade bactericida após 5 horas de interação com os micro-organismos. Esse comportamento foi semelhante ao apresentado por *R. angustiflora* frente *Acinetobacter baumannii* onde a ação bactericida começa a partir de 6 horas de incubação. Isto difere de *R. angustiflora* para *Aeromonas caviae*, visto que a atividade bactericida foi imediata a exposição.

4.5.4 Difusão com Perfuração de poço

Ainda, investigando a atividade antimicrobiana dos extratos procedeu-se a técnica de difusão em ágar com perfuração de poço conforme item 3.4.3.2.3. Os extratos foram testados na concentração de 70 mg/mL e diluições de acordo com item 3.4.3.2.1 frente aos micro-organismos descritos no item 3.4.3.2.2.

A capacidade inibitória do extrato EAU-EtOH contra os micro-organismos avaliados e os halos de inibição obtidos para as diferentes concentrações estão apresentados na tabela 7. O extrato EAU-EtOH demonstrou atividade antibacteriana na concentração 70 mg/mL até 17,5 mg/mL, contra *P. vulgaris* (ATCC 13315), *C. freundii* (ATCC 8090), *S. aureus* (ATCC29213), *S. aureus* (ATCC33591), *S. epidermidis* (ATCC35984) e até 35 mg/mL contra *E. coli* (ATCC 29214). Não foi observada capacidade inibitória para as demais bactérias avaliadas. O maior halo de inibição foi observado contra *E. coli* (ATCC 29214) (16 mm) e o menor contra *C. freundii* (ATCC 8090) (10 mm), obtido na concentração de 70 mg/mL. Sugere-se a atividade observada aos compostos de origem fenólica, como ácidos fenólicos e flavonoides identificados no extrato, os quais são amplamente reconhecidos como antibacterianos (BORGES et al., 2013; STOJKOVIĆ et al., 2013; YIN et al., 2019).

O extrato de SFE-CO₂ não mostrou capacidade de inibir o crescimento bacteriano contra as bactérias avaliadas na concentração 70 mg/mL. No entanto, segundo Silveira e colaboradores (2009), a metodologia utilizada é mais adequada para testar a difusão de substâncias nos extratos etanólicos das plantas, justificando assim que apenas o extrato dos EAU-EtOH apresentou atividade.

Na literatura, foram relatados estudos mostrando atividade antimicrobiana pelo método de difusão em poço para outras espécies de *Ruellia*, apoiando os resultados obtidos, neste estudo. Ramadevi e colaboradores (2016) avaliaram diferentes extratos das folhas de *R. patula* frente as bactérias *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* pelo método de difusão em poço e o fungo *Aspergillus niger* Tiegh. por disco-difusão. O extrato etanólico demonstrou maior potencial de inibição do crescimento microbiano frente aos micro-organismos testados.

A atividade antimicrobiana do extrato metanólico das folhas de *R. tuberosa*, foi investigada por difusão em poço. Mostrou atividade significativa na concentração de 100 mg/mL contra as bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Bacillus subtilis*, *Proteus mirabilis* e os fungos *Aspergillus sp*, *Mucor sp*, *Penicillium sp* e *Fusarium sp* (SENTHILKUMAR et al., 2013).

Como pode-se observar, o extrato EAU-EtOH de *R. angustiflora* apresentou atividade inibitória para mais cinco bactérias, das quais quatro bactérias são gram-negativas e apenas uma gram-positiva (*S. aureus*), no entanto todas com relevância clínica.

Proteus vulgaris é mais comumente encontrada no ambiente natural e no trato intestinal de humanos e animais (ZHANG; LEI; WANG; 2018). Também encontra-se no solo contaminando água, alimentos e vegetais, bem como utensílios, equipamentos de uso comum em animais e instrumental cirúrgico. As principais manifestações clínicas descritas em humanos pelo gênero *Proteus* são infecções do trato urinário (cistite, pielonefrites), particularmente de origem nosocomial (cateter urinário). Em virtude do comportamento oportunista do micro-organismo, da presença dessa bactéria na microbiota fecal de animais e humanos, bem como contaminando utensílios de uso comum e superfície de estruturas, tem-se descrito ampla variedade de outras manifestações clínicas. Outras afecções em humanos incluem peritonite, enterite, meningoencefalite, empiema, osteomielite, dermatite, prostatite, endocardite, aneurisma, flebite e infecções oculares (ZAPPA, 2015).

Staphylococcus aureus causa várias infecções, incluindo infecções de pele e tecidos moles e pneumonia através de infecção comunitária e nosocomial (HORINO HORI, 2019). Essa bactéria pode provocar doenças, que vão desde as inflamações (espinhas, furúnculos e celulites) até infecções graves (pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico, septicemia e outras). Tornou-se uma das espécies de maior importância no quadro das infecções hospitalares e comunitárias, devido a sua enorme capacidade de adaptação e resistência (SANTOS et al., 2007; CHAKOLWA et al., 2019).

O *Staphylococcus epidermidis* é conhecido como o principal colonizador bacteriano da pele humana, mas também é um patógeno nosocomial proeminente (OLIVEIRA; FRANÇA; CERCA, 2017). Embora, por muito tempo, tenha sido considerada inócua, foi identificada como a causa mais frequente de infecções relacionadas ao dispositivo que ocorrem no ambiente hospitalar e, portanto, agora é reconhecida como um importante patógeno oportunista. *Staphylococcus epidermidis* produz uma série de moléculas que fornecem proteção contra as defesas do hospedeiro (OTTO, 2012). A maioria das doenças causadas por *S. epidermidis* são de caráter crônico e ocorrem como infecções relacionadas a dispositivos como cateter intravascular ou infecções nas próteses (FEY; OLSON, 2010; OTTO, 2012).

De acordo com Liu e colaboradores (2018), *Citrobacter freundii* são bactérias frequentemente encontradas na água, no solo, nos alimentos e nos intestinos de animais e seres humanos. Anteriormente reconhecidas como contaminantes ambientais ou colonizadores com

baixa virulência, agora são conhecidas por causar um amplo espectro de infecções envolvendo o trato urinário, fígado, vias biliares, peritônio, intestino, osso, trato respiratório, endocárdio, feridas, tecidos moles, meninges e corrente sanguínea.

Escherichia coli é encontrada no intestino grosso (cólon) de seres humanos e animais, constituindo aproximadamente 80% da flora aeróbia. Esta bactéria possui função biológica de suprimir bactérias nocivas e participar da síntese de vitaminas, como a vitamina K, importante na formação de cabelos, pelos, unhas e plaquetas sanguíneas (KORB et al., 2013). Algumas cepas são patogênicas, causadoras de infecções, inclusive sepse. As cepas mais envolvidas em infecções do trato urinário (comunitárias ou hospitalares). Citam-se infecções pielonefrites, cistites baixas (DINIZ et al., 2017) e infecções no trato digestivo como gastroenterite (VOGT; DIPPOLD, 2005).

Tabela 7: Halo de inibição obtidos para o extrato UAE-EtOH de *R. angustiflora*.

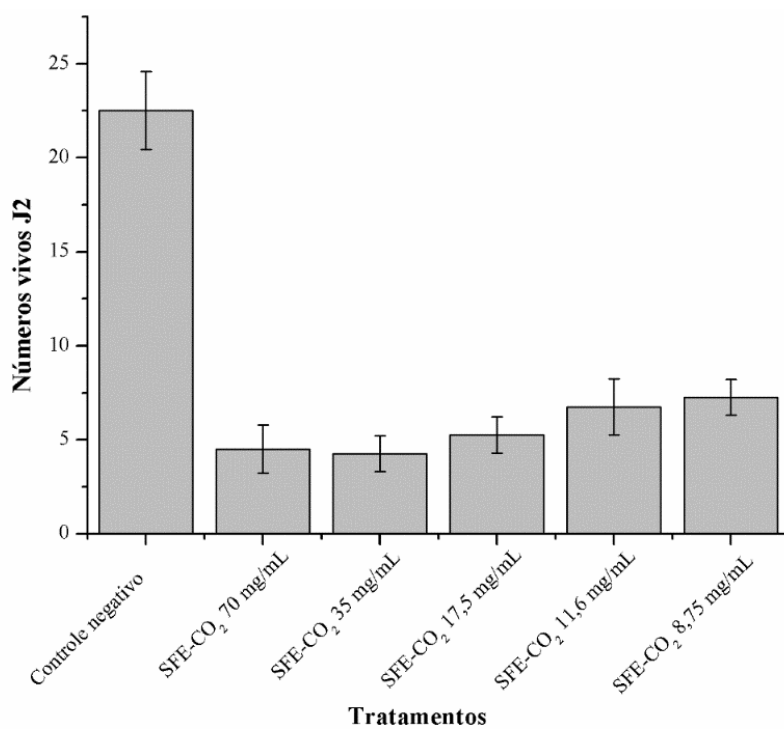
Amostra	<i>P. vulgaris</i> ATCC 13315	<i>E. coli</i> ATCC 29214	<i>C. freundii</i> ATCC 8090	<i>S. aureus</i> ATCC33591	<i>S. aureus</i> ATCC29213	<i>S. epidermidis</i> ATCC35984
<i>R. angustiflora</i> 70 mg/mL	12 mm	16 mm	10 mm	12 mm	11 mm	12 mm
<i>R. angustiflora</i> 35 mg/mL	11 mm	12 mm	9 mm	10 mm	10 mm	11 mm
<i>R. angustiflora</i> 17,5 mg/mL	8 mm	Ausente	7 mm	09 mm	9 mm	10 mm
<i>R. angustiflora</i> 11,6 mg/mL	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>R. angustiflora</i> 8,75 mg/mL	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Controle negative	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Ampicilina 50 mg/mL	22 mm	-	22 mm	21 mm	17 mm	19 mm
Cloranfenicol 30 µg/mL	-	18 mm	-	-	-	-

Fonte: Autor.

4.6 ATIVIDADE NEMATICIDA

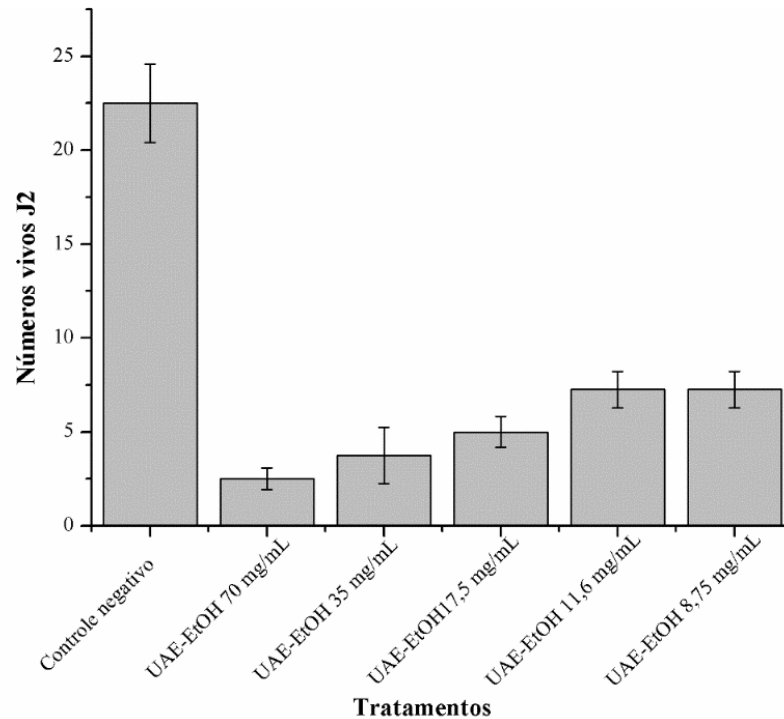
A avaliação da atividade nematicida dos extratos foi conduzida conforme item 3.4.4.2. A Figura 11 e a figura 12 apresentam respectivamente a relação entre a ação do extrato SFE-CO₂ e UAE-EtOH de *R. angustiflora* em diferentes concentrações e o número de larvas J2 de *Meloidogyne javanica* vivos, quando comparados ao controle negativo.

Figura 11 - Número de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne* vivos após ação do extrato SFE-CO₂ de *R. angustiflora*



Fonte: Autor.

Figura 12 - Número de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne* vivos após ação do extrato UAE-EtOH *R. angustiflora*



Fonte: Autor.

De acordo com os resultados obtidos as concentrações avaliadas que compreendem de 70 mg/mL a 8,75 mg/mL levaram em média a morte de 75% e 77% de larvas J2 de *Meloidogyne javanica* para os extratos SFE-CO₂ (Figura 11) e UAE-EtOH (Figura 12) respectivamente, comparados ao CN. Dentre as concentrações avaliadas para o extrato SFE-CO₂ como mostra a figura 11 apenas a concentração 8,5 mg/mL diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) das concentrações 35 mg/mL e 70 mg/mL. No entanto, para o extrato UAE-EtOH figura 12, a concentração 8,5 mg/mL e 11,6 mg/mL diferiram de 35 mg/mL e 70 mg/mL, assim como 17,5 mg/mL diferiu de 70 mg/mL com $p < 0,05$.

Não foram encontrados estudos avaliando atividade nematicida de *R. angustiflora*, mas nossos resultados vão ao encontro de trabalhos envolvendo outras espécies. Gardiano e colaboradores (2009) avaliaram o extrato aquoso de diversas espécies vegetais e verificaram que a concentração 100 mg/mL das espécies de *Mentha sp.*, *Ricinus communis* L. e *Arctium lappa* L., foram eficazes no controle de *M. javanica*. Lopes (2017), avaliou *in vitro* os extratos metanólicos de *Hancornia speciosa* (mangaba), *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão),

Caryocar brasiliense (pequi), *Hymenaea stigonocarpa* (jatobá) e *Solanum lycocarpum* (lobeira) no controle de *Meloidogyne javanica*. O extrato de *S. adstringens* a 100 mg/mL causou a maior mortalidade (80%) de J2.

Al-Marby e colaboradores (2016), avaliaram a atividade nematicida de diversos extratos vegetais contra *Steinernema feltiae*. Dentre os extratos investigados *Solanum incanum* L. apresentou maior atividade, visto que todas as concentrações avaliadas apresentaram efeito agonista ao nematoide. Os autores sugerem que a atividade nematicida observada sejam em razão da presença de fitocompostos identificados, visto que em *S. incanum* detectou-se *b*-sitosterol, estigmasterol e canferol; *Commiphora myrrh* (T. Nees) Engl., flavonoides e terpenoides; *Anthemis nobilis* L., terpenos, flavonoides como apigenina, luteolina, alguns fenóis e ácidos graxos; *Achillea biebersteinii* Afan. contém *b*-sitosterol, estigmasterol e flavonoides. Nota-se que os constituintes químicos identificados nas espécies avaliadas por Al-Marby e colaboradores (2016), com poder nematicida são comum aos encontrados nos extratos UAE-EtOH e SFE-CO₂ de *R. angustiflora*.

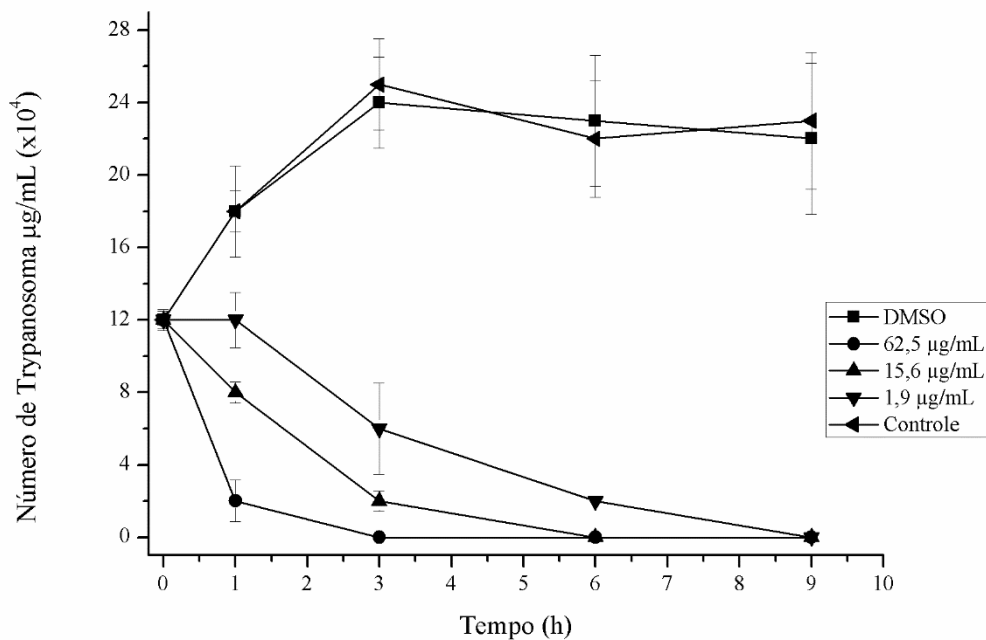
De acordo com estudos de revisão bibliográfica realizados por Ohri e Pannu (2010), inúmeros trabalhos relatam o efeito nematicida de compostos fenólicos. Dentre os compostos fenólicos identificados em *R. angustiflora*, ácido cafeico e ácido ferulico, foram descritos por apresentar alto efeito na mortalidade de *Meloidogyne incognita* (OHRI; PANNU, 2010). Dessa forma, os achados respaldam a atividade observada pelo extrato UAE-EtOH.

4.7 ATIVIDADE ANTI-TRYPANOSOMA

A investigação da atividade anti-trypanosoma dos extratos foi conduzida conforme item 3.4.5.1. A figura 13 e figura 14 apresentam o número de trypanossomas vivos após 9 horas de exposição aos extratos de *R. angustiflora* em diferentes concentrações comparados com o controle negativo (sem tratamento) e DMSO.

De acordo com as mesmas o controle negativo e DMSO não tem ação sobre o número de tripanosomas, confirmando a validade dos experimentos.

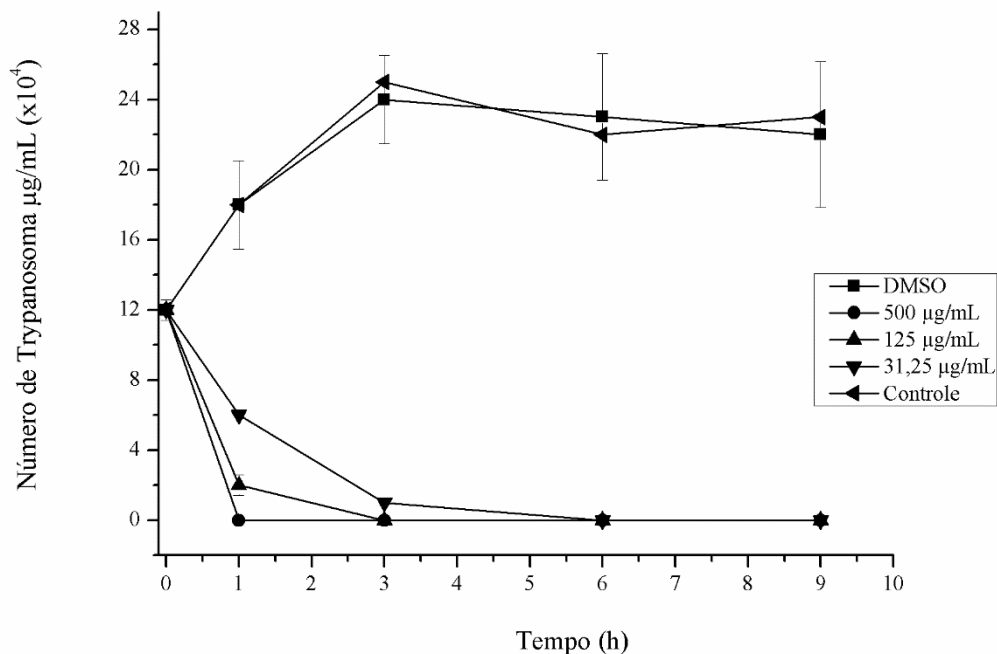
Figura 13 - Atividade tripanocida do extrato UAE-EtOH de *R. angustiflora* frente a *Trypanosoma evansi*



Fonte: Autor.

O extrato UAE-EtOH (figura 13), na concentração 62,5 $\mu\text{g/mL}$ promoveu a morte de 100 % dos tripomastigotas após 3 horas de exposição, com a concentração 15,6 $\mu\text{g/mL}$ a morte ocorreu após 6 horas e com 1,9 $\mu\text{g/mL}$ após 9 horas. Nota-se que as maiores concentrações 62,5 $\mu\text{g/mL}$ e 15,6 $\mu\text{g/mL}$ levam em 1 hora a redução de número de tripanosomas, no entanto a menor concentração 1,9 $\mu\text{g/mL}$ é capaz de promover a redução após 1 hora de exposição.

Figura 14 - Atividade tripanocida do extrato SFE-CO₂ de *R. angustiflora* frente a *Trypanosoma evansi*



Fonte: Autor.

Para o extrato SFE-CO₂ (figura 14), todas as concentrações levam a redução de número de tripanosomas em 1 hora de exposição. Na concentração 500 µg/mL não houve tripomastigotas vivos após 1 hora de exposição. Já para as concentrações 125 µg/mL e 31,25 µg/mL a morte dos tripanosomas ocorreu em 3 e 6 horas, respectivamente.

Todas as concentrações de ambos extratos avaliados ao final do tempo de experimento (9h), apresentam ação tripanocida, levando a morte de 100% *T. evansi*.

Não foram encontrados estudos sobre a atividade anti-tripanosoma de *R. angustiflora*, mas nossos resultados vão ao encontro de trabalhos envolvendo outras espécies. Estudos de Baldissera e colaboradores (2014), avaliaram os extratos aquoso, metanólico e etanólicos de *Achyrocline satureioides*, os quais apresentaram atividade tripanocida frente a *Trypanosoma evansi* após 1 hora de exposição nas concentrações 1000 µg/mL e 500 µg/mL. No entanto, a morte ocorreu após 9 horas nas concentrações 100 µg/mL e 50 µg/mL, caracterizando um comportamento dose-dependente. Ainda, a análise química destes revelaram a presença de flavonoides, que são compostos com atividade tripanocida reconhecida, os quais de acordo com a literatura podem causar a morte de tripanosomas por diferentes mecanismos (GRAEL et al., 2005; TASDEMIR et al., 2006; MAMADALIEVA et al., 2011; BALDISSERA et al., 2014).

Dentre os flavonoides mencionados por Tasdemir e colaboradores (2006) e Mamadalieva e colaboradores (2011), estão luteolina e apigenina respectivamente, os quais, foram identificados em *R. angustiflora* no extrato UAE-EtOH.

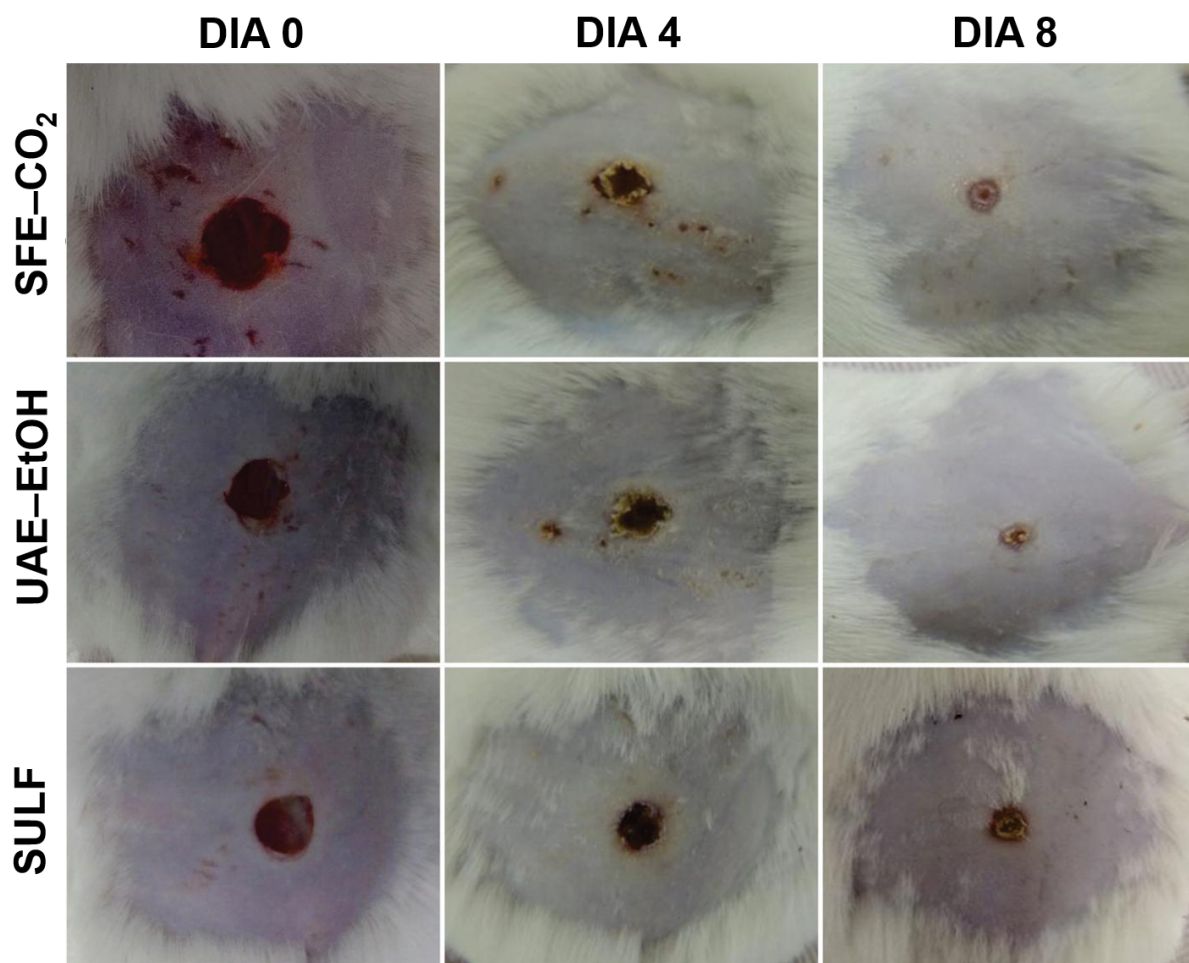
Os resultados encontrados por Baldissera e colaboradores (2014), apoiam os resultados obtidos neste estudo visto que também foi observado um comportamento dose-dependente, onde as maiores concentrações dos extratos demonstraram atividade em um menor tempo de exposição. Assim como, a presença em comum de flavonoides como, ácido cafeico, quercitrina, canferol e rutina, sendo este último o flavonoide majoritário de *R. angustiflora* e *A. satureioides*. Com tudo, sugere-se que a ação apresentada pelo extrato UAE-EtOH de *R. angustiflora* na redução do número de tripomastigotas *in vitro* deve-se a presença dos flavonoides identificados no extrato.

A ação apresentada pelo extrato SFE-CO₂ de *R. angustiflora* frente a *T. evansi* é respaldada por estudos que demonstram a atividade tripanocida de classes e/ou compostos que foram identificados no extrato. Hoet e colaboradores (2007), em estudos com as folhas de *Strychnos spinosa* Lam., isolaram triterpenóides e esteróis os quais demonstraram atividade contra *T. brucei*. Saeidnia e colaboradores (2014), relata atividade tripanocida de *b*-sitosterol contra *T. brucei*. Ibrahim e colaboradores (2015), verificaram que a combinação de α -tocoferol a uma fracção rica em fenóis da casca do caule de *Khaya senegalensis* (Desr.) A. Juss. pode ser um regime terapêutico ativo contra *T. brucei brucei*. Ainda, Baldissera e colaboradores (2016), mencionam o efeito tripanocida de terpenos contra *T. cruzi*, *T. brucei* e *T. evansi*. Com tudo, ainda sugere-se que eficácia do extrato SFE-CO₂ de *R. angustiflora* na redução do número de tripomastigotas *in vitro*, deve-se a presença de tocoferóis, fitoesteróis e terpenos identificados no extrato.

4.8 ATIVIDADE CICATRIZANTE: HISTOPATOLOGIA E ANÁLISE CLÍNICA DOS ANIMAIS

A atividade cicatrizantes dos extratos foi verificada de acordo com os procedimentos descritos nos itens 3.5.1.1, 3.5.1.2, 3.5.1.3, 3.5.1.4. A avaliação macroscópica do processo de cicatrização utilizando extratos de *R. angustiflora*, permitiu verificar a regressão da área da ferida promovida por ambos extratos de *R. angustiflora*, assim como o tratamento com sulfadiazina de prata (controle positivo), como mostra a figura 15.

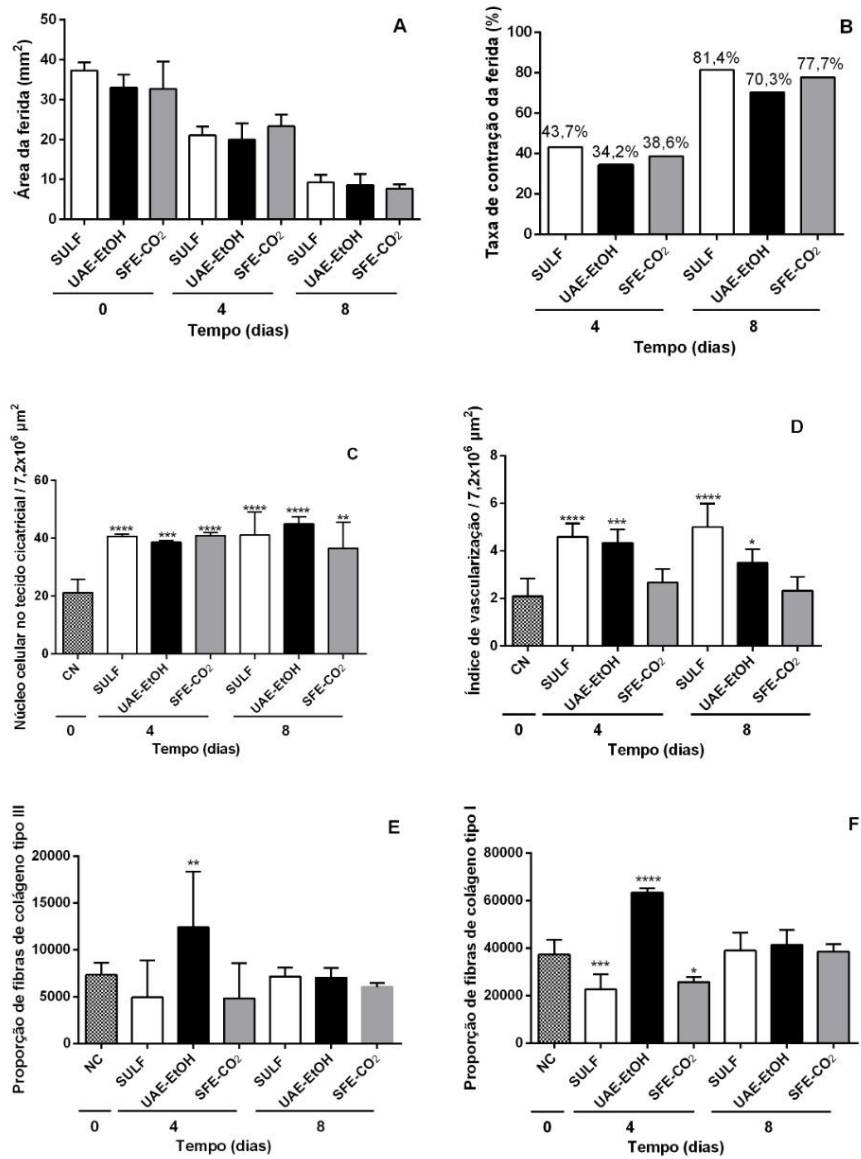
Figura 15 - Avaliação macroscópica do processo de cicatrização



Tratamento EAU-EtOH, SFE- CO₂ e Sulf - Sulfadiazina de prata (Controle positivo).
Fonte: Autor.

A avaliação da cicatrização envolveu análise da área da ferida (A), taxa de regressão (B), celularidade (C), vascularização (D) e ainda a quantificação das fibras de colágeno tipo I (E) e III (F) no tecido cicatricial representados na figura 16, 17 e 18.

Figura 16 – Avaliação do processo de Cicatrização



(A) área da ferida, (B) taxa de contração da ferida, (C), celularidade, (D) vascularização no tecido cicatricial, proporção de fibras colágenas tipo III (E) e tipo I (F) no tecido cicatricial de camundongos avaliados aos 4 e 8 dias de tratamento. Controle negativo (NC) e controle positivo - sulfadiazina de prata (SULF)

*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$ e ****= $p < 0,0001$.

Fonte: Autor.

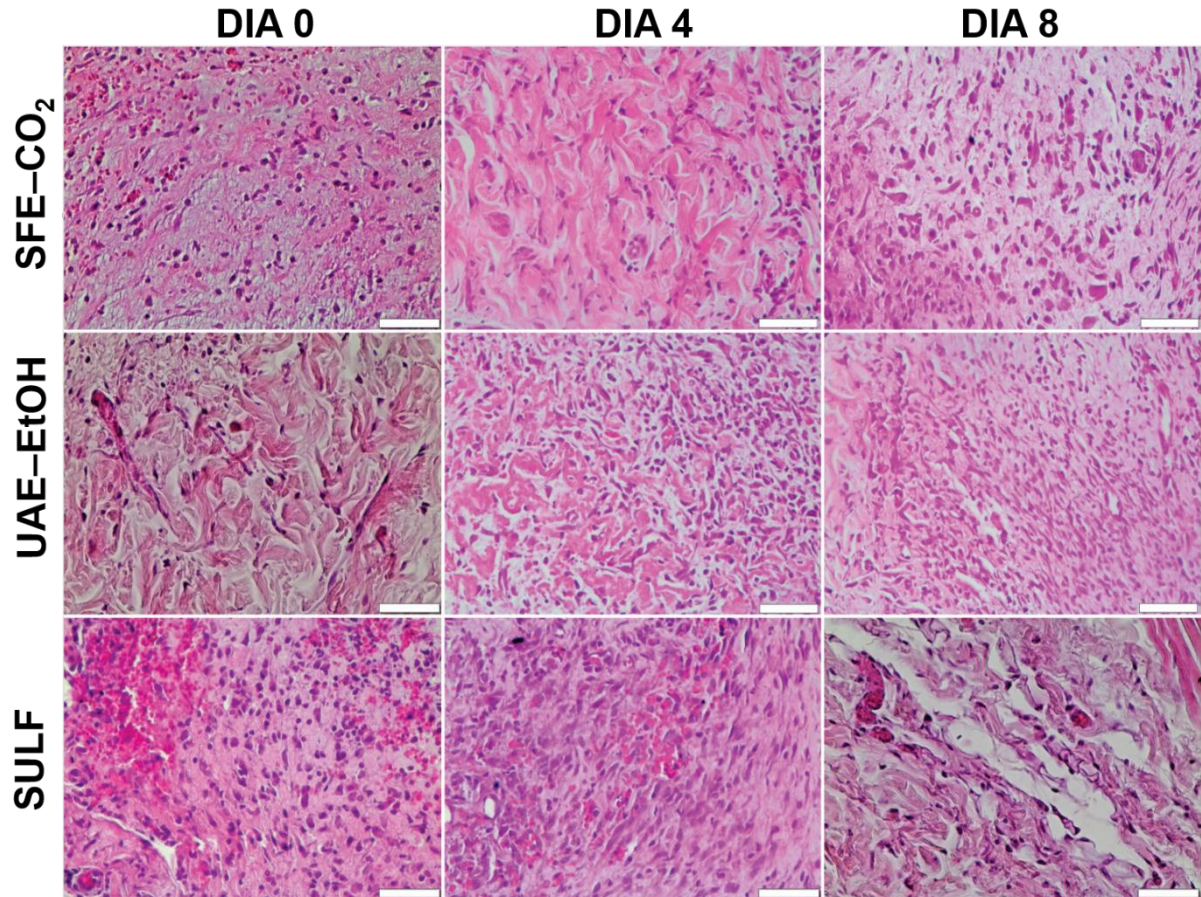
De acordo com a figura 16 (A), quando avaliados isoladamente cada período (0, 4, 8) não foi observado diferença estatística entre os grupos tratados com sulfadiazina (Sulf), SFE-CO₂ e UAE-EtOH. Observa-se uma redução na área da ferida em todos tratamentos à medida que aumenta o tempo experimental, demonstrando a eficácia dos tratamentos. Entretanto, em números absolutos, ao 4º dia de tratamento, os animais tratados com Sulf, apresentaram maior taxa de regressão da ferida (43,7%), seguido do tratamento SFE-CO₂ com (38,6%) e UAE-EtOH (34,2%). Ao 8º dia experimental, o grupo tratado com Sulf permaneceu apresentando a maior porcentagem de regressão da ferida (81,4%), seguida pelos grupos SFE-CO₂ (77,7%) e UAE-EtOH (70,3%) conforme figura 16 (B). De acordo com a taxa de regressão da área da ferida observada macroscopicamente no período avaliado, os dados revelam que os animais tratados com Sulf proporcionaram a maior taxa de regressão da ferida quando comparado ao UAE-EtOH e SFE-CO₂.

Em relação ao número de células totais, todos os tratamentos apresentam resultados superiores e estatisticamente significativos ($p < 0,01$) em relação ao grupo controle (pele íntegra), como mostra Figura 16 (C) e figura 17. Entretanto, não diferiram estatisticamente entre si ao nível de significância ($p < 0,05$), do 4º ao 8º dia de tratamento.

Como mostra Figura 16 (D), o grupo denominado controle, apresentou menor índice de vascularização diferindo estatisticamente do grupo tratado com Sulf ($p < 0,0001$) e UAE-EtOH ($p < 0,001$), no 4º e Sulf ($p < 0,0001$) e UAE-EtOH ($p < 0,05$) no 8º dia. Os tratamentos com Sulf e UAE-EtOH ao 4º e 8º dia de tratamento não apresentaram diferença estatística entre si. No 4º dia de tratamento o grupo Sulf apresentou maior índice de vascularização em relação ao grupo SFE-CO₂ ($p < 0,05$), assim como no 8º dia estes diferem ($p < 0,01$). No entanto, não observa-se diferença entre os tratamentos UAE-EtOH e SFE-CO₂ no período avaliado (4 e 8 dias). Os animais tratados com SFE-CO₂ avaliados ao 4 dia não apresentam diferença estatística em relação ao controle.

Em relação a síntese de colágeno, os animais tratados com UAE-EtOH ao 4º dia apresentaram maior produção de fibras de colágeno tipo III que os demais tratamentos no 4º e 8º dias, diferindo estatisticamente do grupo controle ($p < 0,01$). Observou-se uma diminuição na quantificação das fibras de colágeno tipo III do 4º para o 8º dia de tratamento para o grupo tratado com UAE-EtOH ($p < 0,05$), mostrando-se mais eficaz que os demais grupos, visto que faz-se necessário um aumento inicial das fibras de colágeno tipo III para posteriormente possa dar lugar as fibras tipo I, como mostra figura 16 (E).

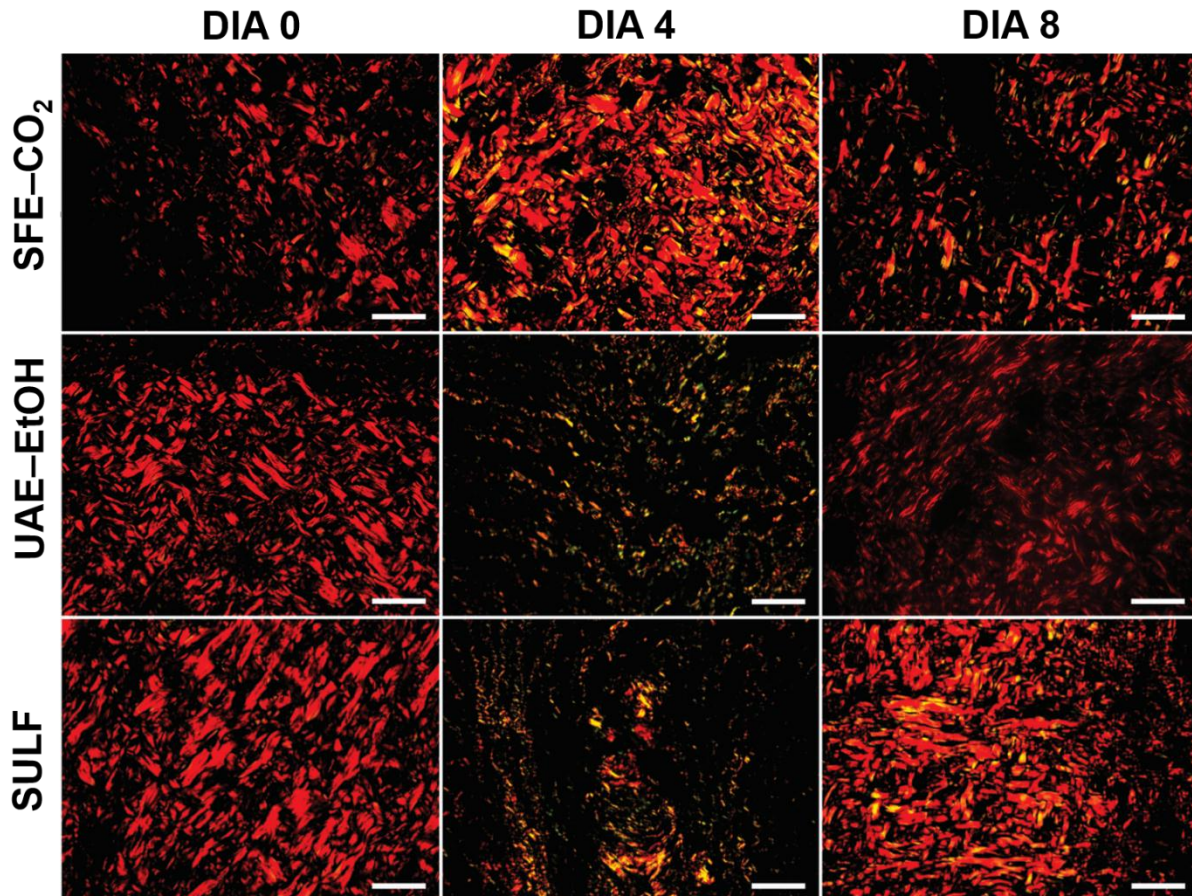
Figura 17 - Fotomicrografias representativas da celularidade tecidual no processo de cicatrização em cortes histológicos de pele de ratos observados ao microscópio de luz



Coloração em H&E, Barras = 200 μ m. Fragmentos teciduais coletados nos dias 0, 4 e 8 de tratamento com extrato UAE-EtOH, SFE-CO₂ e SULF- sulfadiazina de prata (Controle positivo).
Fonte: Autor.

De acordo com a Figura 16 (F) e figura 18, quando foi analisado a síntese de colágeno do tipo I, fundamental para o processo de cicatrização, verificou-se maior produção no 4º dia de tratamento no grupo tratado com UAE-EtOH, o qual difere estatisticamente do grupo controle ($p < 0,0001$), Sulf ($p < 0,001$) e SFE-CO₂ ($p < 0,05$). Pode-se concluir que em menor tempo de tratamento o grupo UAE-EtOH obtém quantidade de fibras superiores ao tecido integro (controle). Os grupos de tratamentos no 8º dia não apresentaram diferença estatística entre si, produzindo quantidades semelhantes de fibras tipo I até mesmo próximas a quantia presente na pele integra (controle- tempo 0).

Figura 18 - Fotomicrografias representativas da síntese de colágeno no processo de cicatrização dos animais.



Fragmentos teciduais coletados nos dias 0, 4 e 8 de tratamento com extrato UAE-EtOH, SFE-CO₂ e SULF-sulfadiazina de prata (Controle positivo). Coloração em picosirus, Barras = 200µm.

Fonte: Autor.

Embora a avaliação macroscópica da área da ferida apresente resultados mais satisfatórios no grupo de animais tratados com sulfadiazina, os dados da análise histomorfométrica do processo cicatricial revelaram o extrato UAE-EtOH como mais promissor. Esta análise se justifica pois, dentro deste processo, há várias fases fundamentais para reepitelização, sendo a visão macroscópica apenas uma análise superficial.

A cicatrização das lesões consiste em um processo complexo que tem início após a interrupção da integridade da pele e envolve diversos processos fisiológicos, podendo ser dividido em três fases: inflamatória, proliferativa e remodeladora. Na primeira ocorre os fenômenos vasculares, a hemostase e coagulação com a remoção de tecidos desvitalizados e a proteção contra a colonização e invasão dos micro-organismos, com uma duração média de 24 a 48

horas, podendo persistir por até 2 semanas (LAUREANO; RODRIGUES, 2011; BLANCK; GIANNINI, 2014).

Na segunda fase, que ocorre aproximadamente entre o 4º dia após o surgimento da lesão, observa-se a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese), produção de matriz extracelular, epitelização e a contração da ferida (fibroplasia) na reestruturação da integridade da derme. Por último, na fase de remodelação, o excesso de colágeno produzido na fase anterior será remodelado na matriz extracelular à medida que o coágulo de fibrina é substituído por tecido de granulação (LAUREANO; RODRIGUES, 2011; BLANCK; GIANNINI, 2014). Ressaltasse que o tratamento com UAE-EtOH proporcionou uma redução da vascularização ao 8º dia de tratamento, quando comparado ao grupo controle sulfadiazina, indicando uma redução no processo inflamatório, dando início a fase proliferativa no tecido cicatricial. Estes dados foram apoiados pela análise da síntese de colágeno, onde o tratamento com UAE-EtOH promoveu maior estimulação de fibroblastos e síntese de fibras colágenas do tipo I. Os ensaios revelaram a eficácia do extrato UAE-EtOH de *R. angustilfora* em relação a sulfadiazina de prata.

Os resultados encontrados para o extrato UAE-EtOH são apoiados pela presença de compostos bioativos (ácidos fenólicos e flavonoides) detectados. De acordo com Vieira e colaboradores (2008), os flavonoides são constituintes vegetais reconhecidos por estimular a cicatrização de feridas. Estudos realizados por Almeida e colaboradores (2012), envolvendo formulações dermatológicas contendo rutina demonstraram promover uma melhor cicatrização da pele em modelo animal. Ainda, segundo Mojzer e colaboradores (2016), o sinergismo das misturas polifenólicas vem contribuindo na terapêutica para uma cura mais rápida e eficaz. Dessa forma, a atividade observada pelo extrato pode ser atribuída ao flavonoide majoritário rutina, isolado ou em ação sinérgica com os demais compostos identificados.

Nejjari e colaboradores (2019), avaliaram a atividade cicatrizante de feridas, da formulação de aplicação tópica contendo extrato hidroalcoólico de *Telephium imperati* L. A redução da área da ferida no final (55 dias) de cada tratamento foi de 95,5%, 97,5% e 75,75% para os grupos teste (pomada formulada com extrato hidroalcoólico 5%), medicamento padrão (Madecassol[®]) e controle (vaselina), respectivamente. Quanto a avaliação tecidual o grupo tratado com pomada obteve maior efeito no processo de cicatrização de feridas com boa proliferação de fibroblastos, poucas células inflamatórias e colágeno bem organizado.

Trabalhos demonstrando a atividade cicatrizante de outras espécies de *Ruellia*, já foram reportados na literatura, respaldando a atividade observada (RANJANI; MANJULA, 2012;

PRAKASH, et al., 2005). Prakash e colaboradores (2005), utilizou extrato etanólico de *R. patula* na formulação de uma pomada, a fim de verificar a atividade cicatrizante da planta, esta demonstrou boa atividade quando comparada ao fármaco padrão (Framycetin Sulphate Cream 1% w/w). Ranjani e Manjula (2012), também mostram o efeito cicatrizante das folhas de *R. tuberosa*.

5 CONCLUSÃO

- As técnicas empregadas para extração do extrato polar e do extrato não polar permitiram extrair os compostos bioativos de *Ruellia angustiflora*;
- Foi possível traçar cromatograficamente os constituintes químicos dos extratos UAE-EtOH e SFE-CO₂ de *Ruellia angustiflora*;
- O extrato UAE-EtOH apresentou compostos de origem fenólica, como ácidos fenólicos e flavonoides;
- O extrato SFE-CO₂ apresentou constituintes como terpenos, tocoferóis, fitoesteróis e ácidos graxos;
- Investigou-se a atividade antirradicalar dos extratos de *Ruellia angustiflora*. O extrato UAE-EtOH apresentou maior potencial antioxidante que extrato SFE-CO₂.
- Tanto o extrato SFE-CO₂ como o UAE-EtOH não apresentaram citotoxicidade pelo teste de MTT, não demonstrando toxicidade aos linfócitos humanos, nem genotoxicidade no ensaio cometa, não resultando em danos ao DNA e indicando boa segurança no uso dos extratos.
- Avaliou-se a atividade antimicrobiana dos extratos de *Ruellia angustiflora* pelo método de disco-difusão. Apenas o extrato UAE-EtOH apresentou capacidade de inibir o crescimento bacteriano de *Aeromonas caviae* e *Acinetobacter baumannii*. Obteve-se a concentração mínima inibitória (MIC) para *Aeromonas caviae* e *Acinetobacter baumannii*;
- Determinou-se o momento (tempo) de ação bactericida do extrato através da curva de morte.
- O extrato UAE-EtOH de *R. angustiflora* pelo método de difusão com perfuração de poço apresentou capacidade de inibir o crescimento bacteriano de *Proteus vulgaris*, *Citrobacter freundii*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Citrobacter freundii* e *Escherichia coli*.
- Os extratos SFE-CO₂ e UAE-EtOH e as diluições eliminaram a maioria (mais de 70%) do nematoide *Meloidogyne javanica*.
- Os extratos SFE-CO₂ e UAE-EtOH levaram a morte total de *Trypanosoma evansi*.
- A avaliação do processo de cicatrização em modelo animal revelou a eficácia do extrato UAE-EtOH em relação à sulfadiazina de prata.
- O extato UAE-EtOH demonstrou resultados satisfatórios quanto a produção das fibras colágeno fundamental para uma cicatrização mais rígida, firme e eficaz, dessa forma apoiando seu uso como agente cicatrizante de feridas.

- Importantes fitocompostos foram identificados nos extratos de *R. angustiflora*, apoiando as atividades antioxidante, antimicrobiana, anti-trypanosoma, nematicida e cicatrizante observadas.
- O uso medicinal de *R. angustiflora* é justificável, podendo em estudos futuros ser utilizada como ingrediente ativo em formulação para aplicação clínica no desenvolvimento de novos medicamentos.
- Os resultados obtidos neste trabalho são de grande relevância em vista da falta de informações científicas que se tinha anteriormente para *R. angustiflora*.

REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, E. M. Antibacterial activity of *Hibiscus sabdariffa* L. calyces against hospital isolates of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Acute Disease**, v. 5, n. 6, p. 512-516, 2016.
- ACANTHACEAE. In: FLORA DO BRASIL 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB4195>>. Acesso em: 28 out. 2017.
- AFZAL, K et al. Genus *Ruellia*: pharmacological and phytochemical importance in ethnopharmacology. **Acta poloniae pharmaceutica**, v. 72, n. 5, p. 821-827, 2015.
- AGORAMOORTHY, G. et al. Antibacterial and antifungal activities of fatty acid methyl esters of the blind-your-eye mangrove from India. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 38, n. 4, p. 739-742, 2007.
- AHMAD, A. R.; ELYA, B.; MUN'IM, A. Antioxidant Activity and Isolation of Xanthine Oxidase Inhibitor from *Ruellia tuberosa* L. Leaves. **Pharmacognosy Journal**, v. 9, n. 5, p. 607-610, 2017.
- AJILA, C. M. et al. Extraction and Analysis of Polyphenols: Recent Trends. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 227-249, 2011.
- AKOMOLAFE, S. F. et al. Effect of caffeine, caffeic acid and their various combinations on enzymes of cholinergic, monoaminergic and purinergic systems critical to neurodegeneration in rat brain-*In vitro*. **Neurotoxicology**, v. 62, p. 6-13, 2017.
- ALBUQUERQUE, U. P. de. Medicinal plants of the *caatinga* (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p. 325-354, 2007.
- ALECRIM et al. Risk of not observing biosafety criteria in the production and use of phytotherapy: a bibliographical review. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 18, n.2, p.118-122, 2017.
- ALICE, C. B. et al. **Plantas medicinais de uso popular: Atlas Farmacognóstico**. 1.ed. Canoas: Editora da Ulbra, 1995. 138-139 p.
- AL-KADMY, I. M. S. et al. Molecular characterization of *Acinetobacter baumannii* isolated from Iraqi hospital environment. **New Microbes and New Infections**, v. 21, p. 51-57, 2018.
- AL-MARBY, A. et al. Nematicidal and antimicrobial activities of methanol extracts of 17 plants, of importance in ethnopharmacology, obtained from the Arabian Peninsula. **Journal of intercultural ethnopharmacology**, v. 5, n. 2, p. 114, 2016.
- ALMEIDA, J. S. et al. Hydrogels containing rutin intended for cutaneous administration: efficacy in wound healing in rats. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 38, n. 7, p. 792-799, 2012.

ALVES, C. F. dos S. et al. Antimicrobial, antitrypanosomal and antibiofilm activity of *Equisetum hyemale*. **Microbial Pathogenesis**, v. 101, p. 119-125, 2016.

ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

ALVIM, N. A. T. et al. O uso de plantas medicinais como recurso terapêutico: das influências da formação profissional às implicações éticas e legais de sua aplicabilidade como extensão da prática de cuidar realizada pela enfermeira. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 14, n. 3, p. 316-323, 2006.

AMINU, R. et al. Stigmasterol retards the proliferation and pathological features of *Trypanosoma congolense* infection in rats and inhibits *trypanosomal sialidase* in vitro and in silico. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 89, p. 482-489, 2017.

ANDRADE, M. A. et al. Essential oils of *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon nardus* and *Zingiber officinale*: composition, antioxidant and antibacterial activities. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 2, p. 399-408, 2012.

ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de alimentos**, v. 24, n. 2, p. 319-336, 2006.

ANGHEL, M. et al. Comparative study on the thermal behavior of two similar triterpenes from birch. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 113, n. 3, p. 1379-1385, 2013.

ANTOLOVICH, M., et al. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, v. 127, n. 1, p.183-198, 2002.

ANTUS, C. et al. Anti-inflammatory effects of a triple-bond resveratrol analog: structure and function relationship. **European Journal of Pharmacology**, v. 748, p. 61-67, 2015.

ARIRUDRAN, B.; SARASWATHY, A.; KRISHNAMURTHY, V. Antimicrobial activity of *Ruellia tuberosa* L. (whole plant). **Pharmacognosy journal**, v. 3, n. 23, p. 91-95, 2011.

AZZI, A. Many tocopherols, one vitamin E. **Molecular aspects of medicine**, v. 61, p. 92-103, 2018.

BABU, P. V. A.; DONGMIN. L.; GILBERT, E. R. J. Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, p. 1777-1789, 2013.

BABUJANARTHANAM, R.; KAVITHA. P.; RAO, M.; PADIAN, M. R. Quercitrin a bioflavonoid improves the antioxidant status in streptozotocin: induced diabetic rat tissues. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 358, p. 121-129, 2011.

BALDISSERA, M. D. et al. In vitro Trypanocidal activity of macela (*Achyrocline satureioides*) extracts against *Trypanosoma evansi*. **The Korean journal of parasitology**, v. 52, n. 3, p. 311, 2014.

BALDISSERA, M. D. et al. Trypanocidal action of *Lippia alba* and *Lippia origanoides* essential oils against *Trypanosoma evansi* in vitro and in vivo used mice as experimental model. **Journal of parasitic diseases**, v. 41, n. 2, p. 345-351, 2016.

BALDISSERA, M. D. et al. Trypanocidal action of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) against *Trypanosoma evansi* in vitro and in vivo used mice as experimental model. **Experimental parasitology**, v. 141, p. 21-27, 2014.

BALDISSERA, M. D. et al. Trypanocidal activity of the essential oils in their conventional and nanoemulsion forms: in vitro tests. **Experimental parasitology**, v. 134, n. 3, p. 356-361, 2013.

BALOUIRIN, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Review Paper Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n.2, p. 71-79, 2016.

BALTZ, T. BALTZ, D. GIROUD, C. CROCKETT, J. Cultivation in a semi-defined medium of animal infective forms of *Trypanosoma brucei*, *T. equiperdum*, *T. evansi*, *T. rhodesiense* and *T. gambiense*. **The EMBO Journal**. v. 4, n.5, p. 1273-1277, 1985.

BANERJEE, S.; RAJAMANI, P. **Cellular, Molecular, and Biological Perspective of Polyphenols in Chemoprevention and Therapeutic Adjunct in Cancer**. In: RAMAWAT, K. G.; MÉRILLON, J-M. Natural Products Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes; Berlin: Springer, 2013. cap. 71, p. 2173-2250.

BASA'AR, O. et al. Supercritical carbon dioxide extraction of *Triognella foenum graecum* Linn seeds: Determination of bioactive compounds and pharmacological analysis. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 12, p. 1085-1091, 2017.

BASAK, P.; PAUL, S.; MAJUMDER, R. In vitro cytotoxic study of *Aloe vera* whole leaf extract on PBMC and breast cancer cell line. In: **2017 2nd International Conference for Convergence in Technology (I2CT)**. IEEE, 2017. p. 124-127.

BATISTA, L. M.; VALENÇA, A. M. G. A fitoterapia no âmbito da atenção básica no SUS: realidades e perspectivas. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 12, n. 2, p. 293-296, 2012.

BATISTA, R. B. et al. Efeito da aplicação foliar de ácidos graxos na "via das lipoxigenases" de plantas de soja. **Química Nova**, v. 25, n. 6, 914-920, 2002.

BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

BENCKE, G. A.; CHOMENKO, L.; SANT'ANNA, D. M. O que é o Pampa. CHOMENKO, L.; BENCKE, GA **Nosso Pampa Desconhecido**. Porto Alegre: Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, p. 16-27, 2016.

BHAGWAT, S. S. et al. Levonadifloxacin, a Novel Broad-Spectrum Anti-MRSA Benzoquinolizine Quinolone Agent: Review of Current Evidence. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 13, p. 4351, 2019.

BLANCK, M.; GIANNINI, T. Úlceras e feridas, as feridas têm alma. Uma abordagem interdisciplinar do plano de cuidados e da reconstrução estética. **Rio de Janeiro: Dilivros**, 2014.

BOLZANI, V. da S. et al. Natural products from Brazilian biodiversity as a source of new models for medicinal chemistry. **International Union of Pure and Applied Chemistry**, v. 84, n. 9, p. 1837-1846, 2012.

BONETI, J. I. S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey and Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, n. 3, p. 553-553, 1981.

BOONYANUGOMOL, W. et al. In vitro synergistic antibacterial activity of the essential oil from *Zingiber cassumunar* Roxb. against extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains. **Journal of Infection and Public Health**, v. 10, p. 586-592, 2017.

BORGES, A. et al. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. **Microbial Drug Resistance**, v. 19, p. 256-265, 2013.

BOSTANGHADIRI, N. et al. Comprehensive review on the antimicrobial potency of the plant polyphenol Resveratrol. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 95, p. 1588, 2017.

BOURGAUD, F. et al. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, v. 161, n. 5, p. 839-851, 2001.

BOUSHAKI, D. et al. Epidemiological investigations on *Trypanosoma evansi* infection in dromedary camels in the South of Algeria. **Heliyon**, v. 5, n. 7, 2019.

BRAHMKSHATRIYA, P. P.; BRAHMKSHATRIYA, P. S. **Terpenes: General Biology and Biotechnology Applications**. In: RAMAWAT, K. G.; MÉRILLON, J-M. Natural Products Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes; Berlin: Springer, 2013. Cap 86, p. 2665-2691.

BRASIL. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. 2004. Mapa da vegetação do Brasil e Mapa de Biomas do Brasil. Disponível em: <<https://ww2.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm>> Acesso em 10 out. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS - PNPIC-SUS** / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. - Brasília:Ministério da Saúde, 2006. 92 p. - (Série B. Textos Básicos de Saúde), 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Manual de condutas para úlceras neurotróficas e traumáticas** / Ministério da Saúde,

Secretaria de Políticas de Saúde, Departamento de Atenção Básica. - Brasília: Ministério da Saúde, 2002. 56 p. (Série J. Cadernos de Reabilitação em Hanseníase; n. 2), 2002.

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). Pampa: pôlder pampa - conhecimentos e descobertas. 2014. Disponível em:

<<https://www.mma.gov.br/biomas/pampa.html>> Acesso em: 14 jan. 2020

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente-MMA. (2017). Pampa. Disponível em:

<<http://www.mma.gov.br/biomas/pampa>>. Acesso em: 15 jan. 2020.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BRITO, F. M. et al. Fitoterapia na atenção básica: estudo com profissionais enfermeiros
Phytotherapy in primary care: study with nurse professionals. **Revista de Pesquisa: Cuidado é Fundamental Online**, v. 9, n. 2, p. 480-487, 2017.

BROWN, J. et al. Antibacterial effects of grape extracts on *Helicobacter pylori*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 3, p. 848-852, 2009.

BRUM, T. F. de. et al. HPLC Analysis of Phenolics Compounds and Antioxidant Capacity of Leaves of *Vitex megapotamica* (Sprengel) Moldenke. **Molecules**, v. 18, p. 8342-8357, 2013.

BUNTE, K.; HENSEL, A.; BEIKLER, T. Polyphenols in the prevention and treatment of periodontal disease: A systematic review of in vivo, ex vivo and in vitro studies. **Fitoterapia**, v. 132, p. 30-39, 2019.

BURČOVÁ, Z. et al. Antibacterial and antifungal activity of phytosterols and methyl dehydroabietate of Norway spruce bark extracts. **Journal of biotechnology**, v. 282, p. 18-24, 2018.

CALDERÓN-MONTAÑO, J. M. et al. A review on the dietary flavonoid Kaempferol. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 4, p. 298-344, 2011.

CÁMARA, C. et al. **Toma y tratamiento de muestras**. Madrid: Síntesis, 2002. 334 p.

CARDOSO, C. A. L. et al. Avaliação da atividade antioxidante, toxicidade e composição química por CG-EM do extrato hexânico das folhas de *Campomanesia pubescens*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n.3, p. 297-301, 2008.

CARRILHO, E.; TAVARES, M. C. H.; LANÇAS, F. M. Fluidos supercríticos em Química Analítica.I. Cromatografia com fluido supercrítico: Conceitos Termodinâmicos. **Química Nova**, v. 24, n. 4, p. 509-515, 2001.

CARVALHO, C. A. et al. Aspectos químicos e atividade antibacteriana de *Piptadeniagonoacantha* (FABACEAE). **Ciência e Natura**, v. 36, p. 732-744, 2014.

CARVALHO, G. D. et al. Reparação de feridas experimentais em coelhos tratados oralmente com água-de-coco e água magnetizada. **Archives of Veterinary Science**, v. 18, n. 3, 2013.

CARVALHO, J. C.T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. **Compostos fenólicos simples e heterosídeos**. In: SIMÕES, C. M. O. et al. *Farmacognosia – da Planta ao Medicamento*. 5. ed. Porto Alegre: Editora da UFRG/Editora da UFSC, 2004. cap. 20, p. 519-528.

CHAKOLWA, G., et al. Carriage rate and antimicrobial resistance profiles of *Staphylococcus aureus* among healthcare workers at a large tertiary referral hospital in Lusaka, Zambia. **Scientific African**, v. 5, 2019.

CHANDRA, S. et al. Additive and synergistic effect of phytochemicals in prevention of oral cancer. **European Journal of General Dentistry**, v. 1, n. 3, p. 142-147, 2012.

CHAUHAN, A.; GOYAL, M. K.; CHAUHAN, P. GC-MS Technique and its Analytical Applications in Science and Technology. **Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques**, v.5, n. 6, p. 1-5, 2014.

CHERIF, A. O. **Phytochemicals Components as Bioactive Foods**. *Bioactive Compounds in Phytomedicine*, Prof. Iraj Rasooli (Ed.), 2012, p. 113-124.

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

CHOTHANI, D. L. et al. Review on *Ruellia tuberosa* (Cracker plant). **Pharmacognosy Journal**, v. 2, n. 12, p. 506-512, 2010.

CHOTHANI, D. L.; MISHRA, S. H. In vitro anti-oxidant activity of *Ruellia tuberosa* root extracts. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 2, n. 4, p. 38-44, 2012.

CINCIN, Z. B. et al. Molecular Mechanisms of Quercitrin-induced Apoptosis in Non-small Cell Lung Cancer. **Archives of Medical Research**, v. 45, p. 445-454, 2014.

CLSI. **Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved guideline**. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute, 1999:M26-A.

CLSI. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, ninth ed. Approved standard**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne (PA), 2008: M7-A6.

CORTEZ, D. A. G. et al. Atividade antibacteriana de extratos do caule de *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae). **Acta Scientiarum**, v. 20, n. 2, p. 43-245, 1998.

COTINGUIBA, G. G. et al. Methods of the Antioxidant Defense: A Literature Review. **Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 15, n. 3, p. 231-237, 2013.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoids: potential therapeutic agents for the inflammatory process. **Revista Virtual de Química**, v. 1, p. 241- 256, 2009.
DAL PRÁ, V et al. Ultrasound-assisted extraction and biological activities of extracts of *Brassica oleracea var. capitata*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 53, n.1, p. 102-109, 2015.

DAL PRÁ, V. *Brassica oleracea* var. *capitata*: **Extração, caracterização química e atividade biológica de metabólitos secundários**. 2013. 113 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

DAL PRÁ, V. et al. Supercritical CO₂ extraction, chemical characterization and antioxidant potential of *Brassica oleracea* var. *capitata* against HO•, O₂•- and ROO. **Food Chemistry**, v.141, n. 4, p. 3954-3959, 2013.

DAL PRÁ, V. et al. Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from palm pressed fiber with high antioxidant and photoprotective activities. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 36, p. 362-366, 2017.

DENIZOT, F; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of immunological methods**, v. 89, n. 2, p. 271-277, 1986.

DESQUESNES, M., et al. *Trypanosoma evansi* and surra: a review and perspectives on transmission, epidemiology and control, impact, and zoonotic aspects. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

DEVI, K. P. et al. Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine. **Pharmacological Research**, v. 99, p.1-10, 2015.

DINIZ, M. M. A; SANTOS, C. M. R; RIBEIRO, J. DE C. A. *Escherichia coli* resistente a ciprofloxacina em pacientes internados em hospital universitário de Manaus, 2015. **Revista epidemiologia e controle de infecção**, v. 7, n.1, 2017.

DONFACK, J. H. et al. In vitro hepatoprotective and antioxidant activities of the crude extract and isolated compounds from *Irvingia gabonensis*. **Asian Journal of Traditional Medicines**, v. 5, p. 79-88, 2010.

FACCIN, H. **Determinação de compostos fenólicos como marcadores analíticos em extratos de plantas medicinais da Amazônia por UHPLC-ESI-MS/MS**. 2016. 147 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.

FACCIN, H. et al. Study of ion suppression for phenolic compounds in medicinal plant extracts using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1427, p. 111-124, 2016.

FAJIR, L. G. H.; AL-NIAAME, A. E.; HUSSEIN, N. N. Detection of biofilm formation and its related with aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* isolates, isolated from some baghdad city hospitals. **European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 1, p. 84-91, 2017.

FARIA, R. R.; ARAUJO, A. C. Pollination ecology of *Ruellia angustiflora* (Nees) Lindau ex Rambo (Acanthaceae) in the Serra da Bodoquena, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Flora**, v. 205, n. 2, p. 106-111, 2010.

- FERNÁNDEZ-MARÍN, M. I. et al. **Functional Grapes**. In: RAMAWAT, K. G.; MÉRILLON, J-M. *Natural Products Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*; Berlin: Springer, 2013. Cap 83, p. 2581- 2606.
- FEY, P. D.; OLSON, M. E. Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. **Future microbiology**, v. 5, n. 6, p. 917-933, 2010.
- FIRMO, W da. C. A. et al. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de pesquisa**, v. 18, n. especial, 2011.
- FUHRO, D.; VARGAS, D.; LARocca, J. Levantamento florístico das espécies herbáceas, arbustivas e lianas da floresta de encosta da Ponta do Cego, reserva biológica do Lami (rbl), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Pesquisas, Botânica**, n. 56, p. 239-256, 2005.
- GADE, S. et al. Acetylcholinesterase inhibitory activity of stigmasterol & hexacosanol is responsible for larvicidal and repellent properties of *Chromolaena odorata*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1861, n. 3, p. 541-550, 2017.
- GADELHA, C. S. et al. Estudo bibliográfico sobre o uso das plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 8, n. 5, p. 208-212, 2013.
- GANESHPURKAR, A.; SALUJA, A. K. The pharmacological potential of rutin. **Saudi pharmaceutical journal**, v. 25, n. 2, p. 149-164, 2017.
- GARCÍA, O. et al. Sensitivity and variability of visual scoring in the comet assay: results of an inter-laboratory scoring exercise with the use of silver staining. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 556, n. 1-2, p. 25-34, 2004.
- GARDIANO, C. G. et al. Evaluation of plant aqueous extracts, added into the soil, on *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 3, p. 551-556, 2009.
- GEORGIEV, V. et al. **Plant In Vitro Systems as Sources of Tropane Alkaloids**. In: RAMAWAT, K. G.; MÉRILLON, J-M. *Natural Products Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*; Berlin: Springer, 2013. Cap 7, p. 173-204.
- GHITESCU, R. E. et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from spruce wood bark. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 22, p. 535-541, 2015.
- GHOSH, S. et al. New insights into the ameliorative effects of ferulic acid in pathophysiological conditions. **Food and Chemical Toxicology**, v. 103, p. 41-55, 2017.
- GIONGO, J. L. et al. Trypanocidal activity of the compounds present in *Aniba canelilla* oil against *Trypanosoma evansi* and its effects on viability of lymphocytes. **Microbial pathogenesis**, v. 103, p. 13-18, 2017.

GODÓI, A. A. et al. Avaliação da atividade antioxidante, antibacteriana e citotóxica de *Urera aurantiaca*. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 92, n. 3, p. 198-202, 2011.

GRAEL, C. F. F.; ALBUQUERQUE, S. de; LOPES, J. L. C. Chemical constituents of *Lychnophora pohlii* and trypanocidal activity of crude plant extracts and of isolated compounds. **Fitoterapia**, v. 76, n. 1, p. 73-82, 2005.

GRELA, E.; KOZŁOWSKA, J.; GRABOWIECKA, A. Current methodology of MTT assay in bacteria—A review. **Acta histochemica**, v. 120, n. 4, p. 303-311, 2018.

GUIMARÃES, T M. **Multiplicação do nematoide *Meloidogyne javanica* em plantas invasoras e seu efeito sobre o desenvolvimento do manjeriço**. 2012. 91 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Brasília, 2012.

GUINAZ, M. et al. Tocoferóis e tocotrienóis em óleos vegetais e ovos. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2098-2103, 2009.

GULLÓN, B. et al. Rutin: A review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability. **Trends in Food Science & Technology**, v. 67, p. 220-235, 2017.

HAMDI, A. et al. Polyphenolic contents, antioxidant activities and UPLC-ESI-MS analysis of *Haplophyllum tuberculatum* A. Juss leaves extracts. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 1071-1079, 2018.

HIDAYAT, M. A.; FITRI, A. KUSWANDI, B. Scanometry as microplate reader for high throughput method based on DPPH dry reagent for antioxidant assay. **Acta pharmaceutica sinica B**, v. 7, n. 3, p. 395-400, 2017.

HOET, S. et al. Antitrypanosomal activity of triterpenoids and sterols from the leaves of *Strychnos spinosa* and related compounds. **Journal of natural products**, v. 70, n. 8, p. 1360-1363, 2007.

HONGCHUAN, L.; WEI, Z.; HAISHENG, C. Low polar volatile constituents from *Isodon excise* by GC-MS. **Journal of Medical Colleges of PLA**, v. 27, p. 334-342, 2012.

HORINO, T.; HORI, S. Metastatic infection during *Staphylococcus aureus* bacteremia. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 26, n.2, 2019.

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

HUSSEY, R. S. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Plant Disease Reporter**, v. 57, p. 1025-1028, 1973.

IBRAHIM, M. A. et al. Effects of α -tocopherol on the in vivo antitrypanosomal effects of phenolics-rich fraction of *Khaya senegalensis* stem bark. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 5, n. 6, p. 441-444, 2015.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. **Analytical Methods of Phenolic Compounds**. In: RAMAWAT, K. G.; MÉRILLON, J-M. Natural Products Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes; Berlin: Springer, 2013. cap. 67, p. 2076-2082.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 13-25, 2010.

JOBIM, M. L. et al. Antimicrobial activity of Amazon *Astrocaryum aculeatum* extracts and its association to oxidative metabolism. **Microbiological Research**, v. 169, n. 4, p. 314-323, 2014.

JONSSON, P. et al. A Strategy for Identifying Differences in Large Series of Metabolomic Samples Analyzed by GC/MS. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 6, p. 1738-1745, 2004.

KAMDEM, J. P. et al. Antioxidant activity, genotoxicity and cytotoxicity evaluation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) ethanolic extract: Its potential role in neuroprotection. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 26-34, 2013.

KAPOOR, S. Luteolin and its inhibitory effect on tumor growth in systemic malignancies. **Experimental Cell Research**, v. 319, n. 6, p. 777-778, 2013.

KARTHIKA, C. et al. Phytochemical analysis of *Ruellia patula* using gas chromatography-mass spectrometry. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 9, n. 2, p. 111-113, 2016.

KAYIR, S. et al. The in vivo effects of *Verbascum speciosum* on wound healing. **South African journal of botany**, v. 119, p. 226-229, 2018.

KELLNER, et al. **Analytical Chemistry**. Alemanha: Wiley-VCH, 2004. 404 p.

KHAN, F. et al. **Alkaloids Derived from Tyrosine: Modified Benzyltetrahydroisoquinoline Alkaloids**. In: RAMAWAT, K. G.; MÉRILLON, J-M. Natural Products Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes; Berlin: Springer, 2013. Cap 15, p. 405-460.

KIM, H-B. et al. *p*-Coumaric acid enhances long-term potentiation and recovers scopolamine-induced learning and memory impairments. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 30, p. 1-7, 2017.

KIMBARIS, A. C. et al. Biocidal compounds from *Mentha sp.* essential oils and their structure-activity relationships. **Chemistry & biodiversity**, v. 14, n. 3, 2017.

KIMURA, M.; ARAOKA, H.; YONEYAMA, A. *Aeromonas caviae* is the most frequent pathogen amongst cases of *Aeromonas bacteremia* in Japan. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 45, p. 304-309, 2013.

KORB, A. et al. Perfil de resistência da bactéria *Escherichia coli* em infecções do trato urinário em pacientes ambulatoriais. **Rev Biologia e Ciências da Terra**, v. 13, n. 1, p. 72-9, 2013.

KULCZYŃSKI, B. et al. The role of carotenoids in the prevention and treatment of cardiovascular disease – Current state of knowledge. **Journal of Functional Foods**, v.38, Part A, p. 45-65, 2017.

KUMAR, S. et al. Necrotizing fasciitis caused by *Aeromonas caviae*. **Avicenna Journal of Medicine**, v. 2, n. 4, p. 94-96, 2012.

KWON, Y. Luteolin as a potential preventive and therapeutic candidate for Alzheimer's disease. **Experimental Gerontology**, v. 95, p. 39-43, 2017.

LACERDA, R. C. C. **Avaliação da composição química e atividade antioxidante da própolis orgânica de *Apis mellifera* visando a preservação ambiental do ecossistema envolvido**. 2012. 110 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/ Piracicaba, 2012.

LAKSHMI, P. T. V. et al. Exploring the Phyto-Constituents of *Ruellia patula* (Acanthaceae) as Antibacterial Agent. **EC Microbiology**, v. 7, n. 5, p. 133-148, 2017.

LAUREANO, A.; RODRIGUES, A. M. Cicatrização de feridas. **Journal of the Portuguese Society of Dermatology and Venereology**, v. 69, n. 3, p. 355-355, 2011.

LEE, K. S.; PARK, S.N. Cytoprotective effects and mechanisms of quercetin, quercitrin and avicularin isolated from *Lespedeza cuneata* G. Don against ROS-induced cellular damage. **Journal of industrial and engineering chemistry**, v. 71, p. 160-166, 2019.

LEE, S. R. et al. Determination of phytosterols in *Oryza sativa* L. cultivars by liquid chromatography atmospheric chemical ionization time-of-flight mass spectrometer (LCAPCI-TOF-MS) coupled with a modified QuEChERS method. **Journal of Agricultural Chemistry and Environmen**, v. 1, n. 1, p. 15-19, 2012.

LIMA, F. O. **Estudo comparativo da bioatividade de compostos fenólicos em plantas medicinais**. 2013. 145 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2013.

LIMA, R. A.; SILVA, A. C. Identificação das classes de metabólitos secundários no extrato etanólico dos frutos e folhas de *Eugenia uniflora* L. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 20, n. 1, p. 381-388, 2016.

LIU, Li-Hsiang et al. *Citrobacter freundii* bacteremia: Risk factors of mortality and prevalence of resistance genes. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 51, n. 4, p. 565-572, 2018.

LOMENICK, B. et al. Identification and Characterization of β -Sitosterol Target Proteins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 21, p. 4976–4979, 2015.

LOPES, A. C. A. **Enterotoxina citotóxica termo estável produzida por *Aeromonas caviae* isoladas de surto de diarreia aguda em crianças na cidade de São Bento do Una - PE**. 2009. 72 p. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

LOPES, L N. da S. et al. **Controle de *Meloidogyne javanica*: Efeito in vitro de Extratos de Plantas Nativas do Cerrado**. 2017. 47 f. Dissertação (Mestrado em Olericultura) Instituto Federal Goiano Campus Morrinho, 2017.

LUQUE DE CASTRO, M. D.; PRIEGO-CAPOTE, F. Ultrasound-assisted preparation of liquid samples. **Talanta**, v. 72, n. 2, p. 321-334, 2007.

MADUNIĆ, J. et al. Apigenin: A dietary flavonoid with diverse anticancer properties. **Cancer Letters**, v. 413, p. 11, 2018.

MALAR, J. L. et al. GC-MS analysis of bioactive compounds in the leaf extracts of *Capparis diversifolia* wight & arn. – an endemic taxon of southern western ghats. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 12, p. 1333-1340, 2016.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. UHPLC – Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 3, p. 97-207, 2012.

MALUF, S. W.; RIEGEL, M. **Citogenética Humana**. Grupo A, 2011.

MAMADALIEVA, N. Z. et al. Flavonoids in *Scutellaria immaculata* and *S. ramosissima* (Lamiaceae) and their biological activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, n. 10, p. 1346-1357, 2011.

MARCHIORETTO, M. S. Distribuição geográfica da família Acanthaceae no Rio Grande do Sul. **Pesquisas, Botânica**, n. 69, p. 141-156, 2016.

MARKOVIĆ, S. et al. Comparative study of the antioxidative activities of caffeoylquinic and caffeic acids. **Food Chemistry**, v. 210, p. 585-592, 2016.

MARTELANC, M., VOVK, I., SIMONOVSKA, B. Separation and identification of some common isomeric plant triterpenoids by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 6662-6670, 2009.

MARTINEZ-CORREA, H. A. et al Extracts from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves: Influence of extraction process on antioxidant properties and yield of phenolic compounds. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, n. 3, p. 998-1006, 2011.

MARTINS, M. da C.; SANTOS, C. D. G. Ação de extratos de plantas medicinais sobre juvenis de *Meloidogyne incognita* raça 2. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, p. 135-142, 2016.

MATEUS, E. P. et al. Análise de resíduos contaminados com creosoto por cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC×GC). Uma nova ferramenta analítica para amostras ambientais complexas. **Scientia Chromatographica**, v. 12, n.2, p. 57-68, 2010.

MATSUMURA, E. et al. **Microbial Production of Plant Benzylisoquinoline Alkaloids**. In: RAMAWAT, K. G.; MÉRILLON, J-M. Natural Products Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes; Berlin, Heidelberg: Springer, 2013. cap. 1, p. 3-24.

- MERINO, FJZ et al. Phytochemical analysis, antioxidant potential and toxicity of crude ethanol extract and fractions of the species *Senecio westermanii* Dusén against *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 1031-1040, 2015.
- MESQUITA, M. O. M. de. et al. Potencial antimicrobiano de extratos e moléculas isolados de plantas da Caatinga: uma revisão. **Revista Fitos**, v. 11, n. 2, p. 216-230, 2017.
- MEYER, J. Y.; LAVERGNET, C. Beautés fatales: Acanthaceae species as invasive alien plants on tropical Indo-Pacific Islands. **Diversity and Distributions**, v. 10, n. 5-6, p. 333-347, 2004.
- MEZZALIRA, B.; DA SILVA FUNCHAL, C.; DANI, C. ENSAIO COMETA: Avaliação da atividade dos calcogênios. **Ciência em Movimento**, v. 16, n. 33, p. 47-65, 2014.
- MOJZER, E. B. et al. Polyphenols: extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects. **Molecules**, v. 21, n. 7, p. 901, 2016.
- MOLDOVEANU, S. C.; DAVID, V. **Sample preparation in chromatography**. Elsevier, 2002. 930 p.
- MONTAGNER, C. **Atividades antifúngica, citotóxica (células tumorais humanas) e hemolítica de cumarinas naturais e semi-sintéticas**. 2007. 126 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.
- MORAES, M. N. et al. Obtaining Antioxidants from Botanic Matrices Applying Novel Extraction Techniques. **Food and Public Health**, v. 3, n. 4, p. 195-214, 2013.
- MOREIRA, F. J. C; FERREIRA, dos S., A. C. Controle Alternativo De Nematode Das GALHAS (*Meloidogyne enterolobii*) COM Cravo De Defunto (*Tagetes patula L.*), em Solo. **Holos**, v. 1, p. 99-110, 2015.
- MOREIRA, N. X.; CURI, R.; MANCINI FILHO, J. Ácidos graxos: uma revisão. Nutrire; **Revista Sociedade Brasileira Alimentação e Nutrição**, v.24, p.105-123, 2002.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- MOSSI, A.J. **Variabilidade genética e de compostos voláteis e semi-voláteis em *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss**. 2003. 101 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Curso de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013
- MUFFLER, K. et al. Biotransformation of triterpenes. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 1-15, 2001.

- MULLAN, K. et al. Serum concentrations of vitamin E and carotenoids are altered in Alzheimer's disease: A case-control study. **Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions**, v. 3, n. 3, p. 432-439, 2017.
- NABAVI, S. F. et al. Apigenin as neuroprotective agent: Of mice and men. **Pharmacological research**, v. 128, p. 359-365, 2018.
- NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 95-111, 2004.
- NANKAR, R. et al. Hybrid drug combination: Combination of ferulic acid and metformin as anti-diabetic therapy. **Phytomedicine**, v. 37, p. 10-13, 2017.
- NEJJARI, R. et al. Phytochemical screening and wound healing activity of *Telephium imperati* (L.) in rats. **South African journal of botany**, v. 123, p. 147-151, 2019.
- NETTO, B. H. T. **Avaliação do sinergismo de Polimixina B com outros antimicrobianos em isolados de *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos**. 2013. 68 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Universidade Federal do Rio do Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.
- NILE, S. H. et al. In vitro and in planta nematocidal activity of black pepper (*Piper nigrum* L.) leaf extracts. **Crop Protection**, v. 100, p. 1-7, 2017.
- NÓBREGA, H. do N. et al. Atividade antimicrobiana in vitro de produtos antissépticos por meio de técnica time kill. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 72, n. 3, p. 226-33, 2013.
- NORA, B.; IYNDA, R.; HENCHIRI, C. Analysis of bioactive minor compounds in three olive oils from varieties of olive tree eastern Algerian (Bouricha, Limli and Blanquette). **Journal of Natural Remedies**, v. 16, n. 4, p. 1-12, 2016.
- OHRI, P; PANNU, S. K. Effect of phenolic compounds on nematodes-A review. **Journal of Applied and Natural Science**, v. 2, n. 2, p. 344-350, 2010.
- OJHA, D.; PATIL, K. N. p-Coumaric acid inhibits the *Listeria monocytogenes* RecA protein functions and SOS response: An antimicrobial target. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 517, n. 4, p. 655-661, 2019.
- OLIVEIRA, F.; FRANÇA, Â.; CERCA, N. *Staphylococcus epidermidis* is largely dependent on iron availability to form biofilms. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 307, n. 8, p. 552-563, 2017
- OLIVEIRA, G. L. S. et al. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais *in vitro* pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.1, p.36-44, 2015.
- ORSAVOVÁ, J. et al. Contribution of phenolic compounds, ascorbic acid and vitamin E to antioxidant activity of currant (*Ribes* L.) and gooseberry (*Ribes uva-crispa* L.) fruits. **Food chemistry**, v. 284, p. 323-333, 2019.

- OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.
- OTTO, M **Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections**. In: *Seminars in immunopathology*. Springer-Verlag, 2012. p. 201-214.
- OVERBECK, G. E. et al. Brazil's neglected biome: the South Brazilian Campos. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 9, n. 2, p. 101-116, 2007.
- ÖZTÜRK, E. Resveratrol and diabetes: A critical review of clinical studies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 95, p. 230-234, 2017.
- PAREKH, J.; KARATHIA, N.; CHANDA, S. Evaluation of antibacterial activity and phytochemical analysis of *Bauhinia variegata* L. bark. **African Journal of Biomedical Research**, v. 9, p. 53-57, 2006.
- PARVEZ, M. K. et al. Analysis of antioxidative and antiviral biomarkers β -amyrin, β -sitosterol, lupeol, ursolic acid in *Guiera senegalensis* leaves extract by validated HPTLC methods. **Saudi pharmaceutical journal**, v. 26, n. 5, p. 685-693, 2018.
- PELEG, A. Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. L. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 3, p. 538-582, 2008.
- PEREIRA, C.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: Fundamentals, applications and economic perspectives. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n.3, p. 340-372, 2010.
- PEREIRA, C.G. et al. Extraction of índole alkaloids from *Tabernaemontana* using supercritical CO₂+ethanol: an evaluation of the process variables and the raw material origin. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 30, n.1, p. 51-61, 2004.
- PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. das G. Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.
- PETROVSKA, B. B. Historical review of medicinal plants' usage. **Review Pharmacognosy**, v. 6, n. 11, p. 1-5, 2012.
- PIETTA, P. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035, 2000.
- PILLAR, V. D.; VÉLEZ, Eduardo. Extinção dos Campos Sulinos em unidades de conservação: um fenômeno natural ou um problema ético. **Natureza & Conservação**, v. 8, n. 1, p. 84-86, 2010.
- POPOVIĆ, Z. et al. Ethnobotany and herbal medicine in modern complementary and alternative medicine: An overview of publications in the field of I & C medicine 2001–2013. **Journal of ethnopharmacology**, v. 181, p. 182-192, 2016.
- PORTO, da C.; PORRETTO, E.; DECORTI, D. Comparison of ultrasound-assisted extraction

with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n. 4, p. 1076-1080, 2013.

PORT'S, P.S.P. et al. The phenolic compounds and the antioxidant potential of infusion of herbs from the Brazilian Amazonian region. **Food Research International**, v. 53, n. 2, p. 875-881, 2013.

PRABHAKAR, P. K, DOBLE, M. Synergistic effect of phytochemicals in combination with hypoglycemic drugs on glucose uptake in myotubes. **Phytomedicine**, v. 16, p. 1119-1126, 2009.

PRAKASH, T. N. K. S. et al. Wound healing activity of *Ruellia patula*. **Hamdard Medicus (Pakistan)**, 2005.

QUEIROZ, Y. S. de. et al. Bioactive compounds, *in vitro* antioxidant capacity and Maillard reaction products of raw, boiled and fried garlic (*Allium sativum* L.). **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 5, p. 1308–1314, 2014.

QUÍLEZ, A. et al. Anti-secretory, anti-inflammatory and anti- *Helicobacter pylori* activities of several fractions isolated from *Piper carpubunya* Ruiz & Pav. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, p. 583–589, 2010.

RAMADEVI, S.; KALEESWARAN, B.; NATARAJAN, P. Phytochemicals analysis and antimicrobial activity of *Ruellia patula* L. against pathogenic microorganisms. **South Indian Journal of Biological Sciences**, v. 2, n. 2, p. 306-313, 2016.

RAMAN, V. et al. Antibacterial, antioxidant activity and GC-MS analysis of *Eupatorium odoratum*. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 5, n. 2, p. 99-106, 2012.

RANJANI, P.; MANJULA, P. *Ruellia tuberosa* and Wound Healing. **International Journal of Nursing Education**, v. 4, n. 2, p. 34-35, 2012.

REHMAN, S. et al. Synthesis and biological evaluation of novel isoxazoles and triazoles linked 6-hydroxycoumarin as potent cytotoxic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 17, p. 4243-4236, 2014.

REZENDE, F. M de. et al. Vias de síntese de metabólitos secundários em plantas. **Laboratório de Ensino de Botânica**, p. 93, 2016.

RIBEIRO, C. G. P. **Validação de formulações JACBIO® a base de extratos de *Piptadenia gonoacantha* (PAU JACARÉ) com atividade Cicatrizante.** 2018. 47 p. Dissertação (Mestrado em Ciência da Saúde) - Universidade Federal de Viçosa, MG, 2018.

ROCCO, P. R. M et al. LASSBio-596: da descoberta aos ensaios pré-clínicos. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 10-27, 2010.

RODRIGUES, M. J. Unlocking the *in vitro* anti-inflammatory and antidiabetic potential of *Polygonum maritimum*. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 1348-1357, 2017.

ROMANO, C. S. et al. Synergistic antioxidant and antibacterial activity of rosemary plus butylated derivatives. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p. 456-461, 2009.

ROUTRAY, W.; ORSAT, V. Preparative Extraction and Separation of Phenolic Compounds. In: RAMAWAT, K. G.; MÉRILLON, J-M. **Natural Products Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes**. Springer: Berlin, 2013. cap. 65, 2019-2020 p.

ROY, S. K. et al. Potential wound healing activity of the different extract of *Typhonium trilobatum* in albino rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 3, p. S1477-S1486, 2012.

Ruellia. In: FLORA DO BRASIL 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB4195>>. Acesso em: 28 out. 2017.

Ruellia. In: FLORA DO BRASIL 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB26252>>. Acesso em: 28 out. 2017.

SABINI, M. C. et al. Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and apoptotic induction of an aqueous extract of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. **Food and chemical toxicology**, v. 60, p. 463-470, 2013.

SAEIDNIA, S. et al. The Story of Beta-sitosterol- A Review. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 4, n. 5, p. 590-609, 2014.

SAFAVI, F. et al. Investigations on the wound healing properties of *Onosma dichroantha* Boiss root extracts. **South African Journal of Botany**, v. 125, p. 344-352, 2019.

SALAH, A. M.; GATHUMBI, J.; VIERLING, W. Estrogenic and cholinergic properties of the methanol extract of *Ruellia praetermis* Scenf. ex. Lindau (Acanthaceae) in female rats. **Phytomedicine**, v. 9, n.1, p. 52-55, 2002.

SALEEM, M. Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. **Cancer Letters**, v. 285, n. 2, p. 109-115, 2009.

SALMANI, J. M. M. et al. Apigenin's anticancer properties and molecular mechanisms of action: Recent advances and future prospectives. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 15, n. 5, p. 321-329, 2017.

SAMI, D. G.; HEIBA, H. H.; ABDELLATIF, A. Wound healing models: a systematic review of animal and non-animal models. **Wound Medicine**, v. 24, n. 1, p. 8-17, 2019.

SAMPAIO, L. da C.; ALMEIDA, C. F. Vitaminas Antioxidantes na Prevenção do Câncer do Colo Uterino. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.55, n. 3, p. 289-296, 2009.

SAMY, M. N. et al. Chemical constituents and biological activities of Genus *Ruellia*. **International Journal of Pharmacognosy**, v. 2, n. 6, p. 270-279, 2015.

SÁNCHEZ-ÁVILA, N. et al. Fast and selective determination of triterpenic compounds in olive leaves by liquid chromatography–tandem mass spectrometry with multiple reaction monitoring after microwave-assisted extraction. **Talanta**, v. 78, n. 1, p. 40-48, 2009.

SANTOS, A. L. dos et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SANTOS, A. P.; MORENO P. R. H. *Pilocarpus* spp.: a survey of its chemical constituents and biological activities. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, p. 115-137, 2004.

SANTOS, R. I. **Metabolismo básico e origem de metabólitos secundários**. In: SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia – da Planta ao Medicamento. 5. ed. Porto Alegre: Editora da UFRG/Editora da UFSC, 2004. cap. 16, p. 404-422.

SARANDY, M. M. et al. **Avaliação do efeito cicatrizante do extrato de repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*) em ratos wistar**. 59 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Federal de Viçosa, 2007.

SARANDY, M. M. et al. Ointment of *Brassica oleracea* var. *capitata* matures the extracellular matrix in skin wounds of wistar rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.

SARDI, J. de C. O. et al. Synthesis, antifungal activity of caffeic acid derivative esters, and their synergism with fluconazole and nystatin against *Candida* spp. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 86, n. 4, p. 387-391, 2016.

SCHAICH, K. M.; TIAN, X.; XIE, J. Reprint of “Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays”. **Journal of Functional Foods**, v. 18, Part B, p.782-796, 2015.

SCHMIDT, M. E. P. et al. Some triterpenic compounds in extracts of *Cecropia* and *Bauhinia* species for different sampling years. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, n. 1, p. 21-26, 2018.

SENTHILKUMAR, P.; SAMBATH, R., VASANTHARAJ, S. Antimicrobial Potential and Screening of Antimicrobial compounds of *Ruellia tuberosa* Using GC-MS. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 20, n. 31, p. 184-188, 2013.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 820-897, 2015.

SHAHZAD, N. et al. Phytosterols as a natural anticancer agent: Current status and future perspective. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 88, p. 786-794, 2017.

SHARMA, A.; BAJPAI, V. K.; SHUKLA, S. **Sesquiterpenes and Cytotoxicity**. In: RAMAWAT, K. G.; MÉRILLON, J-M. Natural Products Phytochemistry, Botany and

Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes; Berlin: Springer, 2013. cap. 116, p. 3515-3550.

SHARMA, D. et al. Kaempferol attenuates diabetic nephropathy by inhibiting RhoA/Rho-kinase mediated inflammatory signalling. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 1610-1619, 2019.

SHARMA, P. et al. In silico screening of potential antidiabetic phytochemicals from *Phyllanthus emblica* against therapeutic targets of type 2 diabetes. **Journal of ethnopharmacology**, v. 248, p. 112268, 2020.

SHARMA, S. H. et al. Protective effect of *p*-coumaric acid against 1,2 dimethylhydrazine induced colonic preneoplastic lesions in experimental rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 94, p. 577-588, 2017.

SHUKLA, P. et al. Synergistic pharmacological effects of phytochemicals derived from ginger, garlic and tulsi. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 1, n.11, 2015.

SILVA, A. B da. et al. The flavonoid rutin and its aglycone quercetin modulate the microglia inflammatory profile improving antiglioma activity. **Brain, behavior, and immunity**, 2019.

SILVA, A. C.; JORGE, N. Cogumelos: compostos bioativos e propriedades antioxidantes. **Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 13, p. 375-84, 2011.

SILVA, A. F., dos SANTOS, A. P., & RABELO, M. F. R. Identificação botânica das plantas medicinais. Plantas medicinais e aromáticas. **Informe agropecuário**, v. 31, n, 255, 2010.

SILVA, E. M. F. et al. Estudo *in vitro* do potencial citotóxico da *Annona muricata* L. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 36, n. 2, 2015.

SILVA, L. L. et al. Parametrização das condições de obtenção do extrato do café verde e torrado com CO₂ supercrítico. **Coffee Science**, v. 10, n. 1, p. 65 - 75, 2015.

SILVA, R. P. F. F.; ROCHA-SANTOS, T. A. P.; DUARTE, A. C. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 76, p. 40-51, 2016.

SILVA, V. A. et al. Antibacterial activity of *Ocimum basilicum* essential oil and linalool on bacterial isolates of clinical importance. **International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research**, v. 7, n. 6, p. 1066-1071, 2015.

SILVEIRA, L. M. da S. et al. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 90, n. 2, p. 124-128, 2009.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/ Florianópolis: UFRGS Editora/ Editora da UFSC, 2004. 528 p.

SINDHU, G.; NISHANTHI, E.; SHARMILA, R. Nephroprotective effect of vanillic acid against cisplatin induced nephrotoxicity in wistar rats: A biochemical and molecular study. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 39, n. 1. p. 392-404, 2015.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental cell research**, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to modern liquid chromatography**. 3rd Ed. John Wiley & Sons, 2009. 960 p.

SOPIRALA, M. M. et al. Synergy Testing by Etest, Microdilution Checkerboard, and Time-Kill Methods for Pan-Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 11, p. 678-683, 2010.

SOUZA, C. F. et al. Xanthine oxidase activity affects pro-oxidative and pro-inflammatory profiles in spleen of silver catfish experimentally infected with *Aeromonas caviae*. **Microbial Pathogenesis**, v. 113, p. 25-28, 2017.

SPAGNOL, C. M. et al. *In vitro* methods to determine the antioxidant activity of caffeic acid. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 219, p. 358-366, 2019.

SRINIVASAN, M.; SUDHEER, A. R.; VENUGOPAL, P. M. Ferulic Acid: therapeutic potential through its antioxidant property. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 40, p. 92-100, 2007.

STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal Separation Science**, v.30, n. 18, p. 3268-3295, 2007.

STOJKOVIĆ, D. et al. In situ antioxidant and antimicrobial activities of naturally occurring caffeic acid, *p*-coumaric acid and rutin, using food systems. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 13, p. 3205-3208, 2013.

SUHAIJ, M. Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 6-7, p. 531-537, 2006.

SUN, T. et al. Carotenoid Metabolism in Plants: The Role of Plastids. **Molecular plant**, v. 11, n. 1, p. 58-74, 2018.

SUPELCO. **Guide to solid phase extraction**. 1998.

SVOBODA, P.; VLČKOVÁ, H.; NOVÁKOVÁ, L. Development and validation of UHPLC-MS/MS method for determination of eight naturally occurring catechin derivatives in various tea samples and the role of matrix effects. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 114, p. 62-70, 2015.

TAKSHAK, Swabha; AGRAWAL, S. B. Defense potential of secondary metabolites in medicinal plants under UV-B stress. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 193, p. 51-88, 2019.

TASDEMIR, D. et al. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: *in vitro*, *in vivo*, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1352-1364, 2006.

TELANG, D. R. et al. Formulation and characterization of an apigenin-phospholipid phytosome (APLC) for improved solubility, *in vivo* bioavailability, and antioxidant potential. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 108, p. 36-49, 2017.

TEO, B. S. et al. A potential tocopherol acetate loaded palm oil esters-in-water nanoemulsions for nanocosmeceuticals. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 8, n. 4, p. 1-11, 2010.

TIVERON, A. P. Antioxidant Activity of Brazilian Vegetables and Its Relation with Phenolic Composition. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 7, p. 8943-8957, 2012.

ULLAH, R. et al. Pharmacognostic and Pharmacological evaluation of *Ruellia tuberosa* L. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 29, n. 6, p. 2099-2102, 2016.

VASCONCELOS, A. A. **Composição química e avaliação do potencial antimicrobiano dos óleos essenciais de *Ruellia asperula* (Mart. ex Nees) Lindau e *Ruellia paniculata* L. (Acanthaceae)**. 2014. 90 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) -Universidade Federal do Ceará, Sobral, 2014.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VEGGI, P.C. **Obtenção de compostos fenólicos de plantas brasileiras via tecnologia supercrítica utilizando co-solventes e extração assistida por ultrassom**. 2013. 235 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, SP, 2013.

VEIGA, V. F. J.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: Cura segura? **Química Nova**, v. 28, n.3, p. 519-528, 2005.

VERA, E. A. V. et al. Resveratrol inhibits *Trypanosoma cruzi* arginine kinase and exerts a trypanocidal activity. **International journal of biological macromolecules**, v. 87, p. 498-503, 2016.

VIEIRA, A. P. et al. Ação dos flavonóides na cicatrização por segunda intenção em feridas limpas induzidas cirurgicamente em ratos Wistar Flavonoid action in second intention healing in surgically-induced clean wounds in Wistar rats. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 29, n.1, 65-74, 2008.

VIEIRA, C. S. C. A; MAGALHÃES, E. S. B.; BAJAH, H. M. **Manual de condutas para úlceras neurotróficas e traumáticas**. Cadernos de reabilitação em hanseníase. n. 2, p. 52, 2002.

VIEIRA, G. T. et al. Efeito cicatrizante do extrato da casca de *Pseudopiptadenia contorta* (DC.) G.P. Lewis & M.P. Lima feridas cutâneas de segunda intenção. **Revista cubana de plantas medicinais**, v. 20, n. 4, 1-12, 2015.

VILKHU, K. et al. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry - A review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, n. 2, p. 161-169, 2008.

VINATORU, M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, p. 303-313, 2001.

VINOTHIYA, K.; ASHOKKUMAR, N. Modulatory effect of vanillic acid on antioxidant status in high fat diet-induced changes in diabetic hypertensive rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 87, p. 640-652, 2017.

VOGT, R. L.; DIPPOLD, L. Escherichia coli O157: H7 outbreak associated with consumption of ground beef, June–July 2002. **Public health reports**, v. 120, n. 2, p. 174-178, 2005.

WANG, S. et al. Effect of luteolin on inflammatory responses in RAW264.7 macrophages activated with LPS and IFN- γ . **Journal of Functional Foods**, v. 32, p. 123–130, 2017.

WANG, Z. et al. Synthesis, antiviral activity, and molecular docking study of trans-ferulic acid derivatives containing acylhydrazone moiety. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 27, n. 17, p. 4096, 2017.

WELLS, S. R. α -, γ - and δ -tocopherols reduce inflammatory angiogenesis in human microvascular endothelial cells. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, n. 7, p. 589-597, 2010.

WILMS, L. C. et al. Protection by quercetin and quercetin-rich fruit juice against induction of oxidative DNA damage and formation of BPDE-DNA adducts in human lymphocytes. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 582, n. 1-2, p. 155-162, 2005.

WORTLEY, A. H. et al. How much data are needed to resolve a difficult phylogeny? Case study in Lamiales, **Systematic Biology**, v. 54, n. 5, p. 687-709, 2005.

WU, B. et al. Succinate-induced neuronal mitochondrial fission and hexokinase II malfunction in ischemic stroke: Therapeutical effects of kaempferol. **Molecular Basis of Disease**, v. 1863, n. 9, p. 2307-2318, 2017.

WU, C. et al. A comparison of volatile fractions obtained from *Lonicera macranthoides* via different extraction processes: ultrasound, microwave, soxhlet extraction, hydrodistillation, and cold maceration. **Integrative Medicine Research**, v. 4, n. 3, p. 171-177, 2015.

XIA, N. et al. Antioxidant effects of resveratrol in the cardiovascular system. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 174, n. 12, p. 1633–1646, 2017.

YANG, Y.; MCCLEMENTS, D. J. et al. Vitamin E bioaccessibility: Influence of carrier oil type on digestion and release of emulsified α -tocopherol acetate. **Food Chemistry**, v. 141, p. 473-481, 2013.

YAO, L. H. et al. Flavonoids in food and their health benefits. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 59, p. 113-122, 2004.

YIN, L. et al. Flavonoids analysis and antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of crude and purified extracts from *Veronicastrum latifolium*. **Industrial crops and products**, v. 137, p. 652-661, 2019.

YRBAS, M. L. et al. Pharmacological mechanism underlying the antinociceptive activity of vanillic acid. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 132, p. 88-95, 2015.

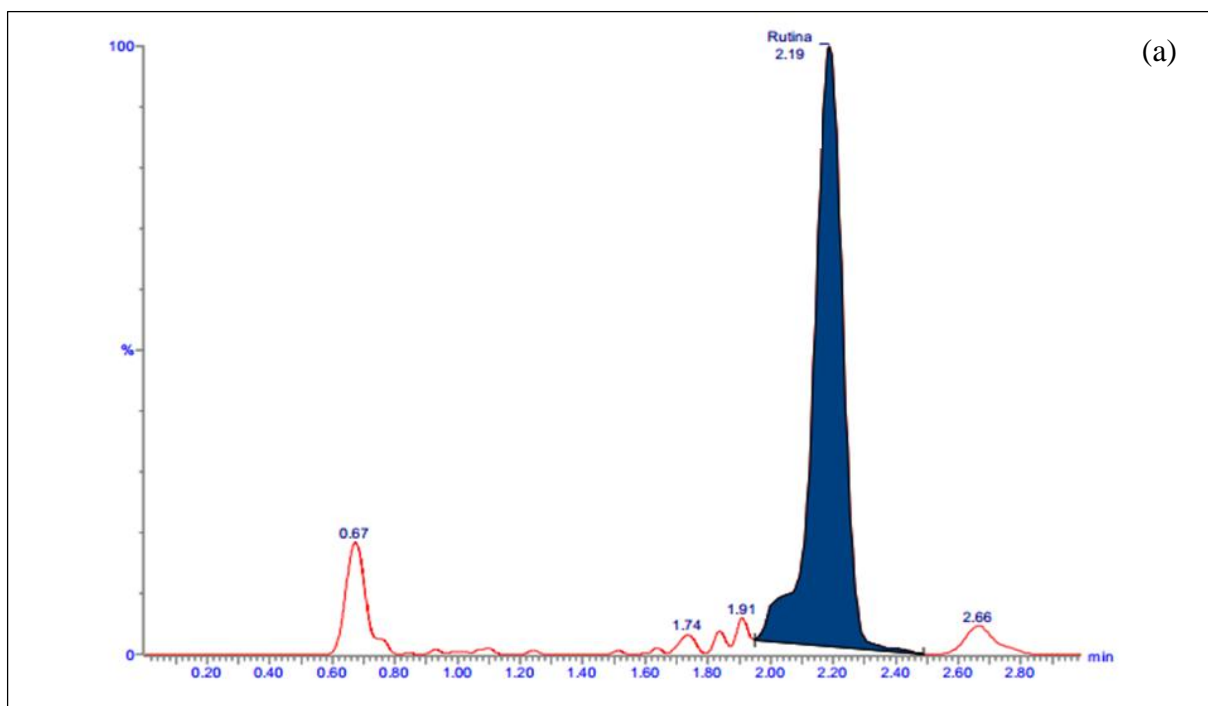
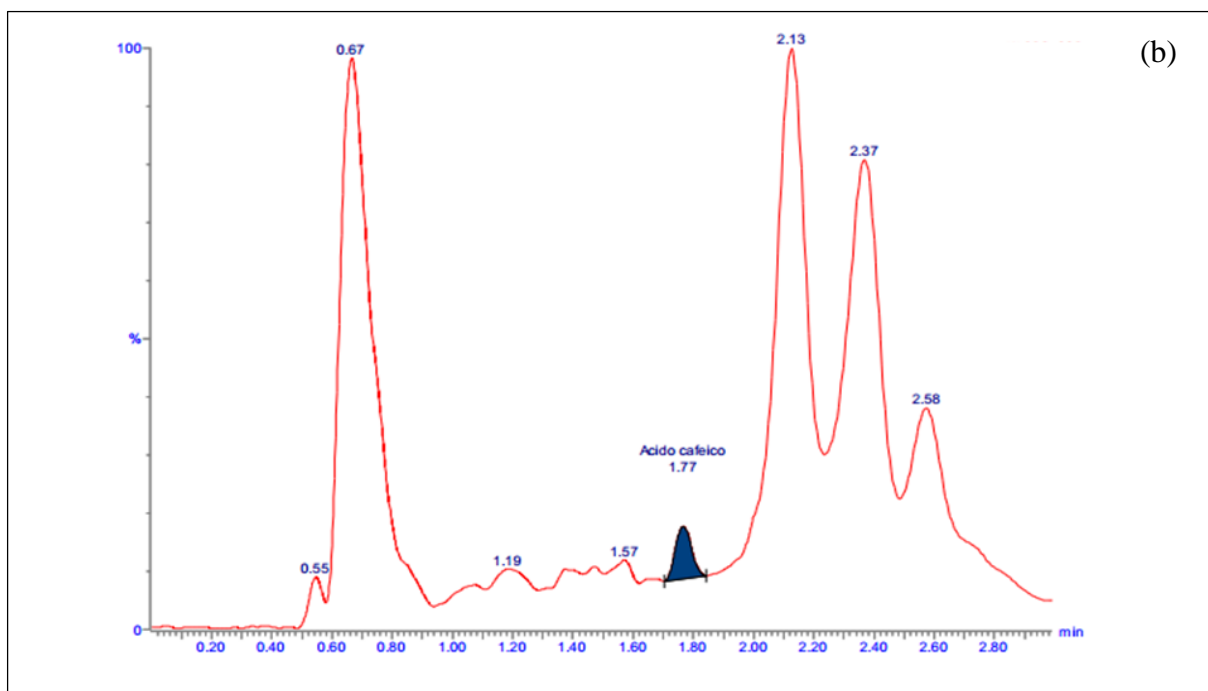
ZAPPA, V. **Índice de resistência múltipla aos antimicrobianos, concentração inibitória e beta-lactamases de espectro estendido em linhagens de *Proteus mirabilis* e *Proteus vulgaris* isoladas de diferentes afecções em animais domésticos**. 2015. 96 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Universidade Estadual Paulista, 2015.

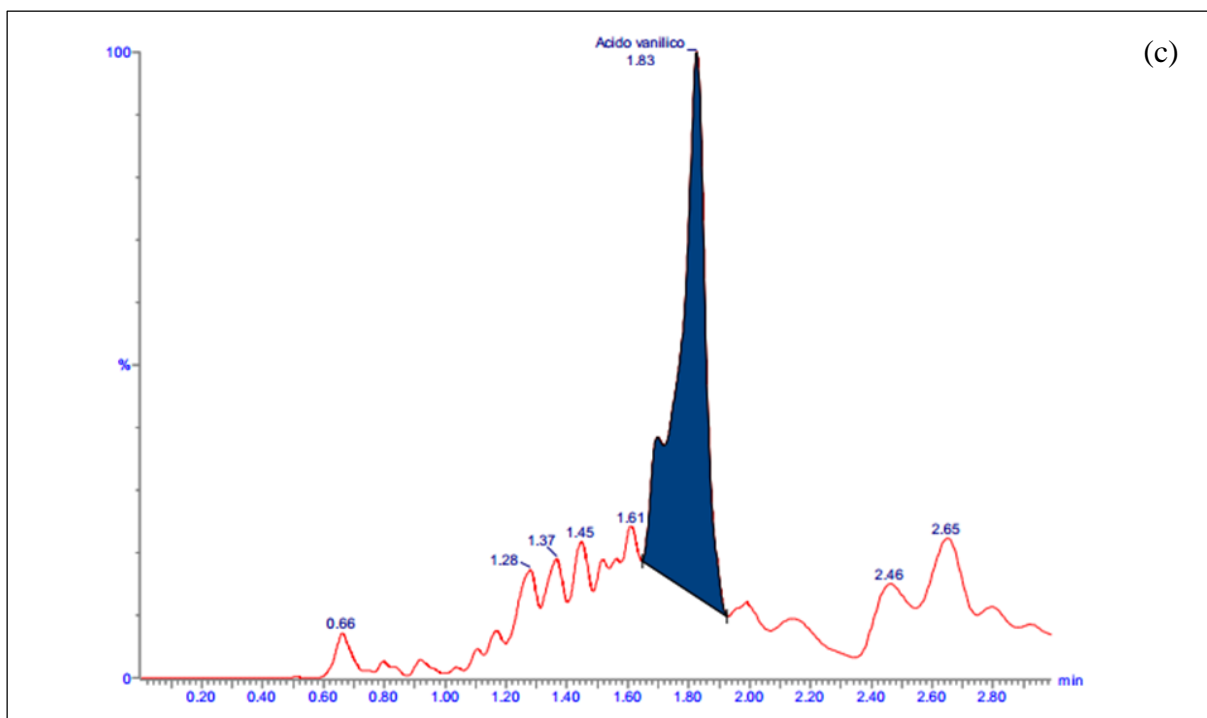
ZHANG, L. et al. Effects of interaction between α -tocopherol, oryzanol, and phytosterol on the antiradical activity against DPPH radical. **LWT**, v. 112, p. 108206, 2019.

ZHANG, Y.; LEI, Chang-Wei; WANG, Hong-Ning. Identification of a novel conjugative plasmid carrying the multiresistance gene *cfr* in *Proteus vulgaris* isolated from swine origin in China. **Plasmid**, v. 105, p. 102440, 2019.

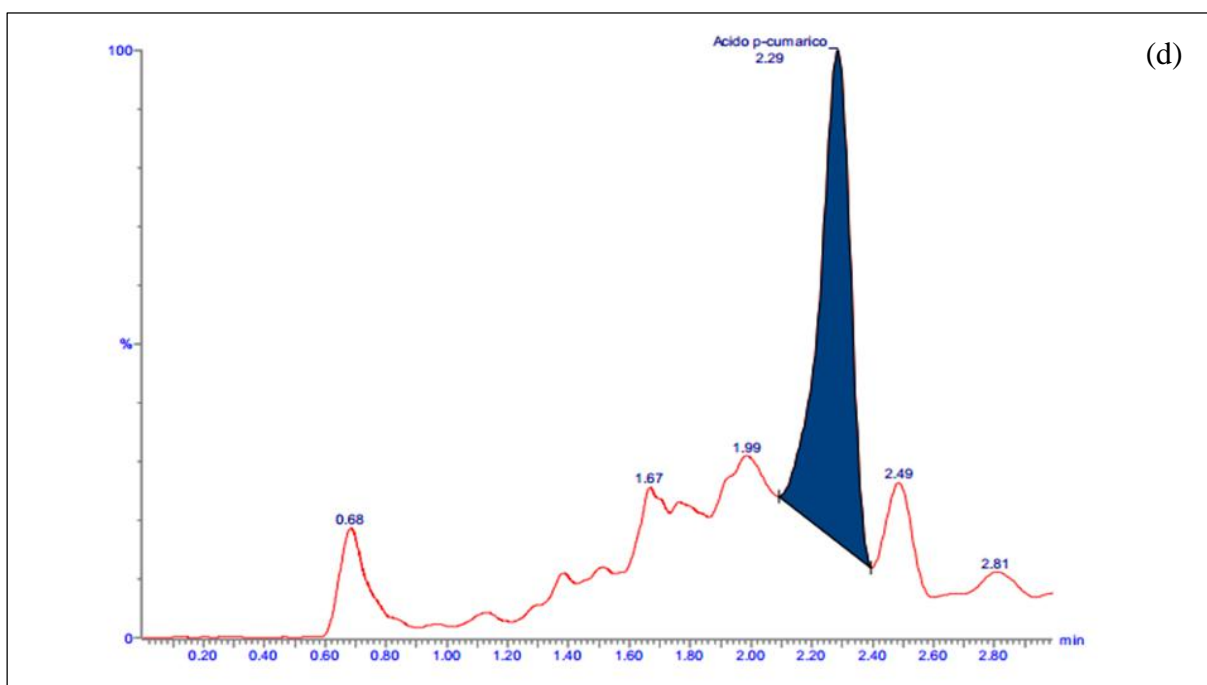
ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. **Flavonoides**. In: SIMÕES, C. M. O. et al. *Farmacognosia – da Planta ao Medicamento*. 5. ed. Porto Alegre: Editora da UFRG/Editora da UFSC, 2004. cap. 23, p. 577, 601-607.

APÊNDICE A – CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR UPLC-MS

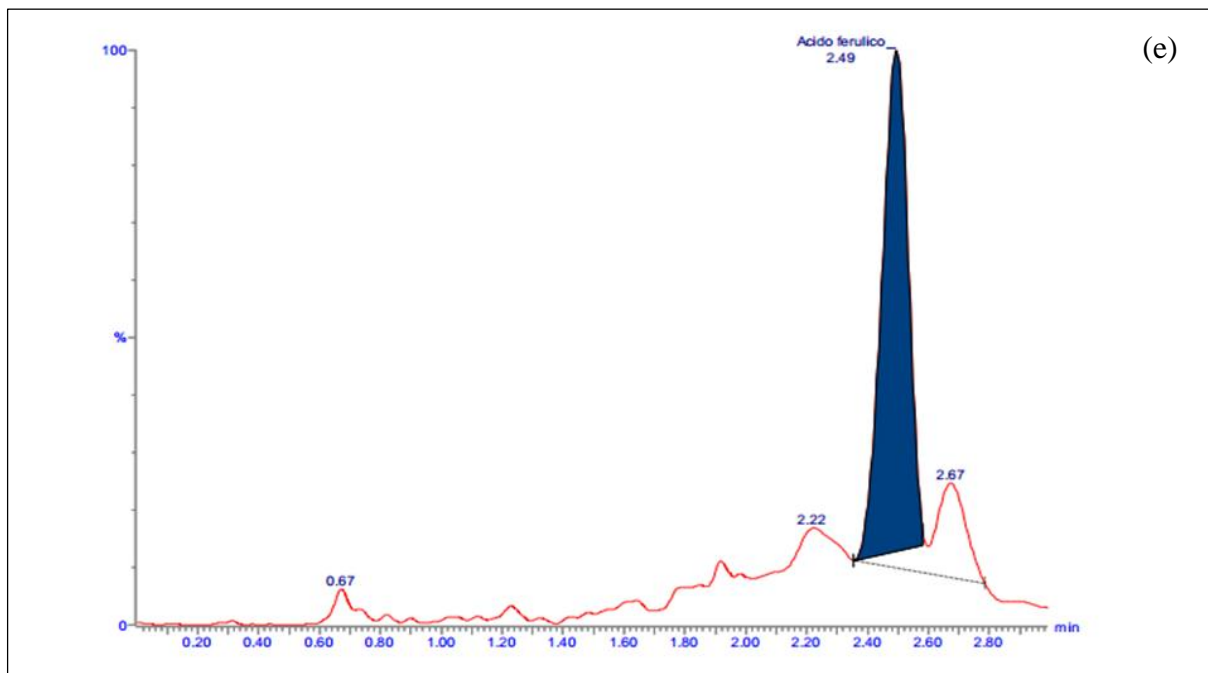
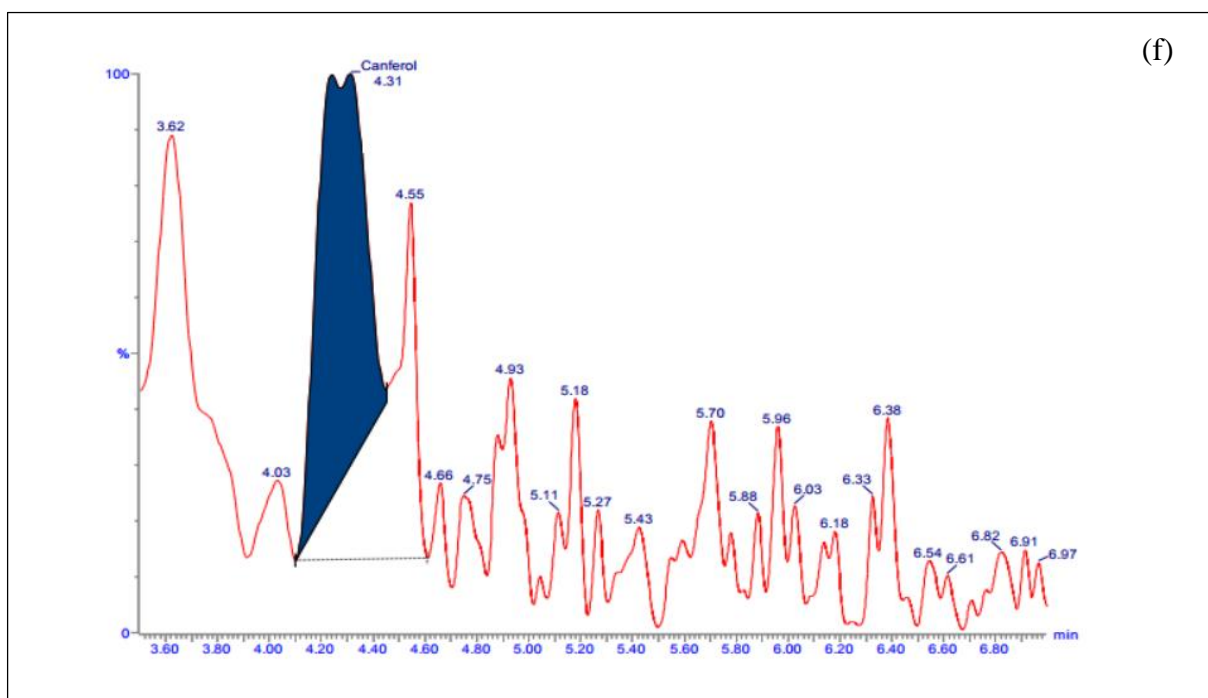
Apêndice A - (a) Rutina em *Ruellia angustiflora*Apêndice A - (b) Ácido Cafeico em *Ruellia angustiflora*

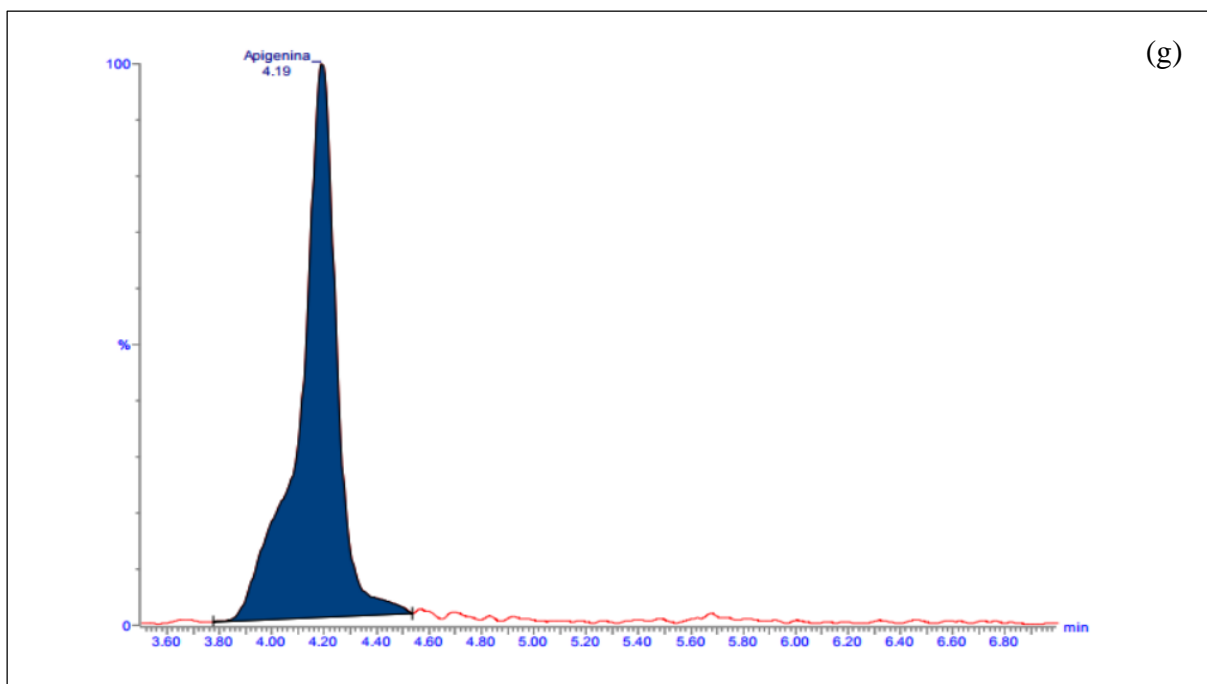
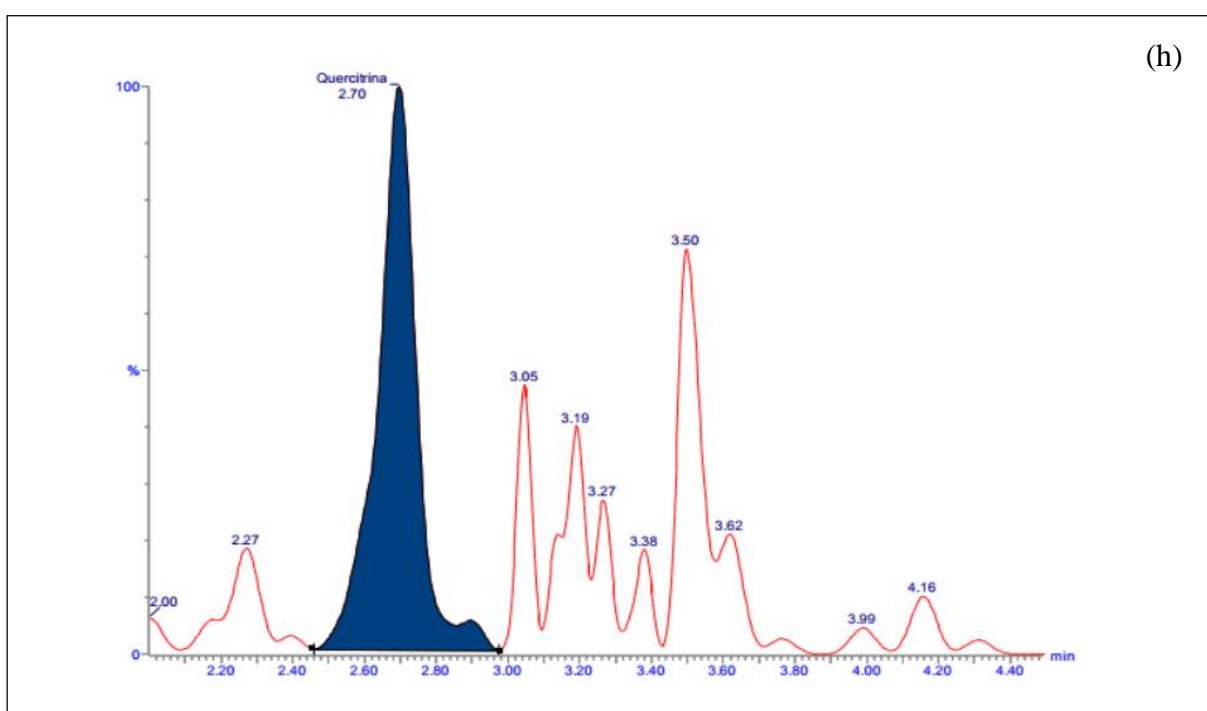


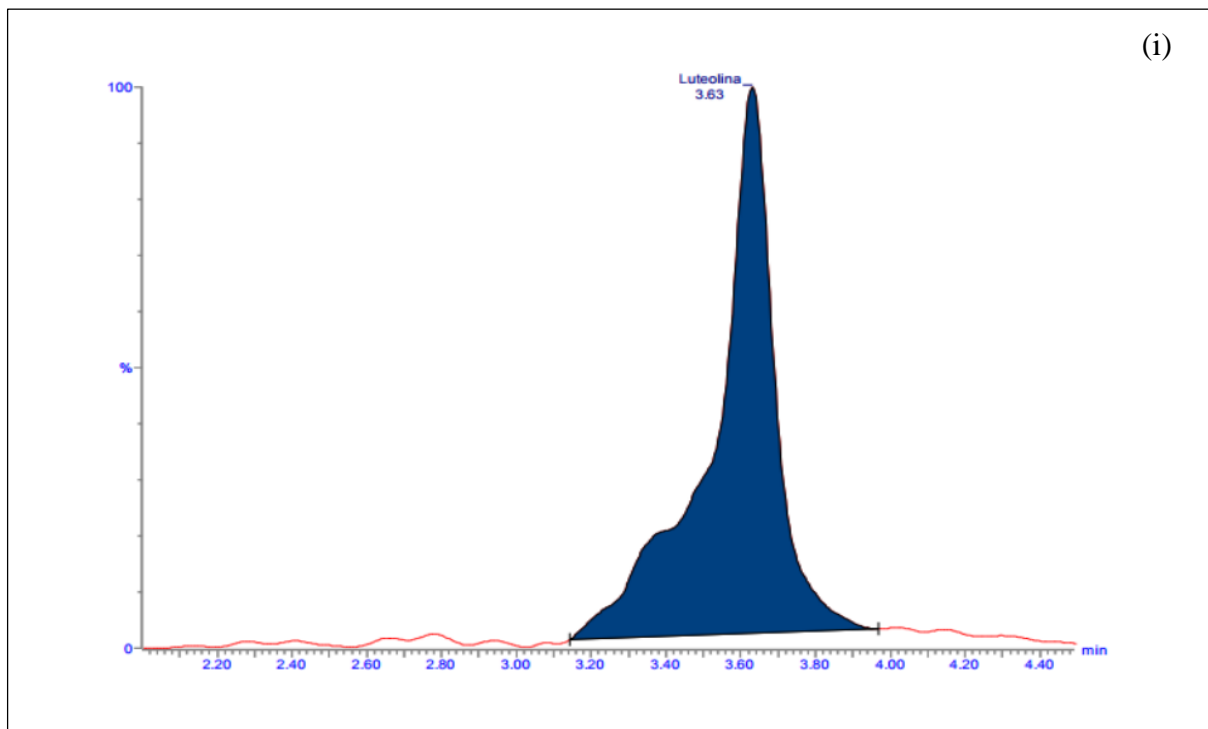
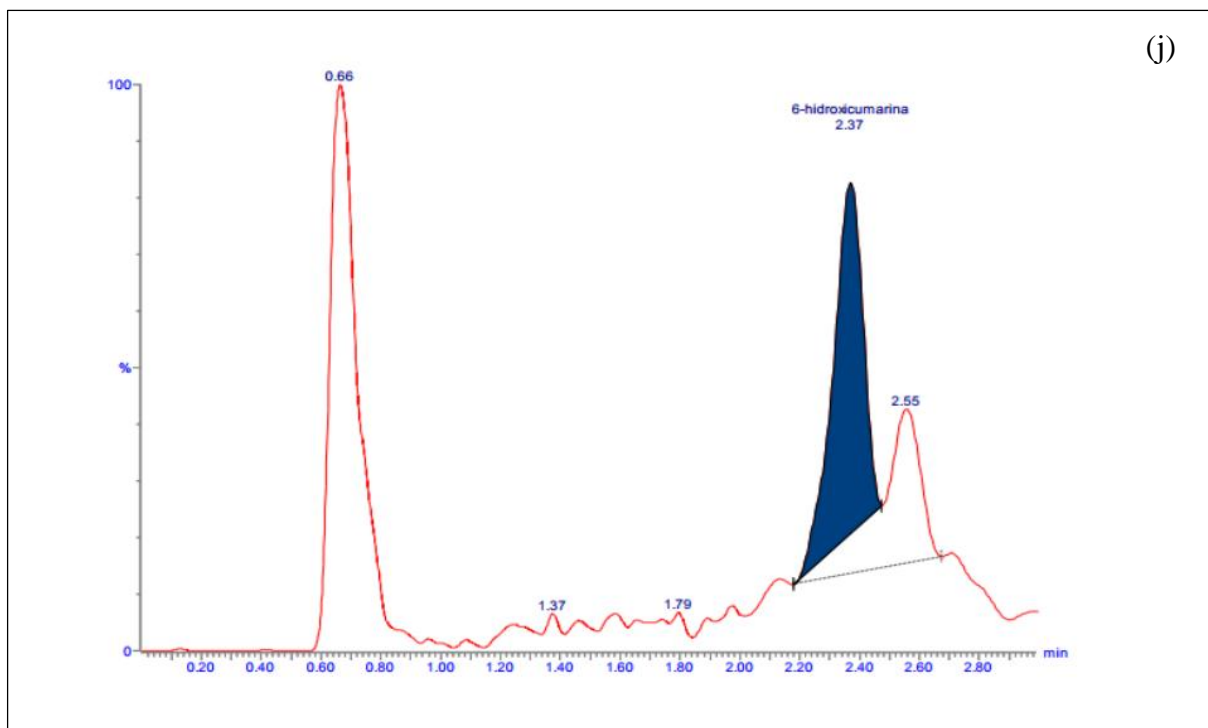
Apêndice A – (c) Ácido Vanílico em *Ruellia angustiflora*

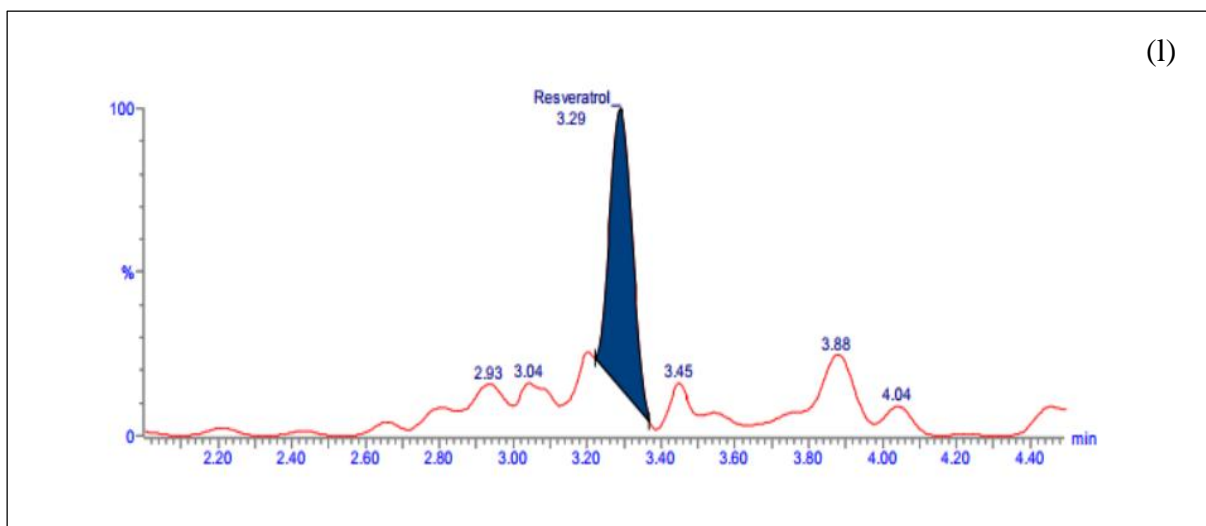


Apêndice A – (d) Ácido *p*-cumárico em *Ruellia angustiflora*

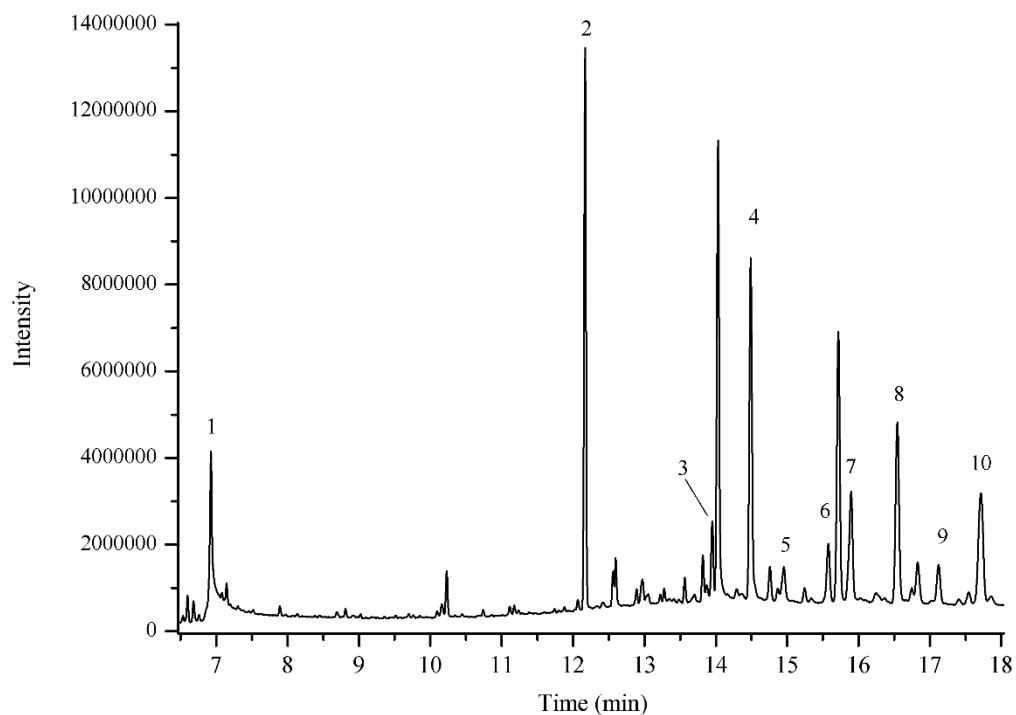
Apêndice A – (e) Ácido Ferúlico em *Ruellia angustiflora*Apêndice A – (f) Canferol em *Ruellia angustiflora*

Apêndice A – (g) Apigenina em *Ruellia angustiflora*Apêndice A – (h) Quercitrina em *Ruellia angustiflora*

Apêndice A – (i) Luteolina em *Ruellia angustiflora*Apêndice A – (j) 6- Hidroxicumarina em *Ruellia angustiflora*

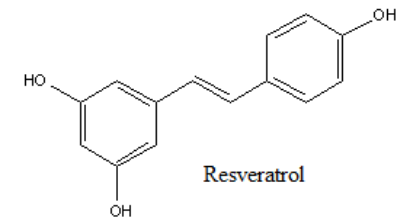
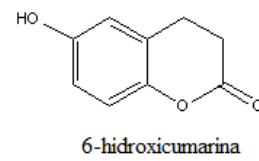
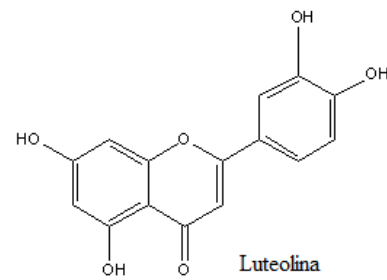
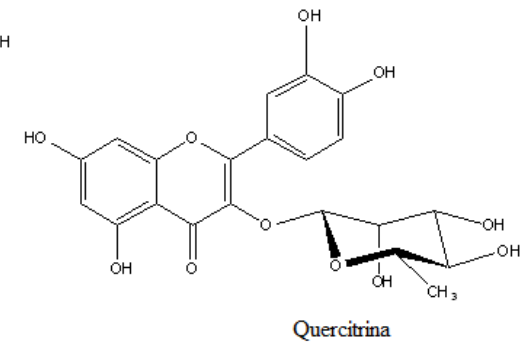
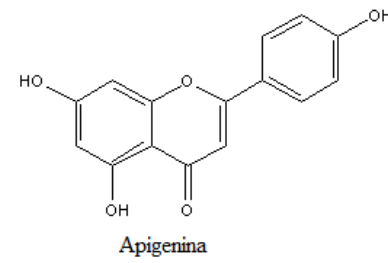
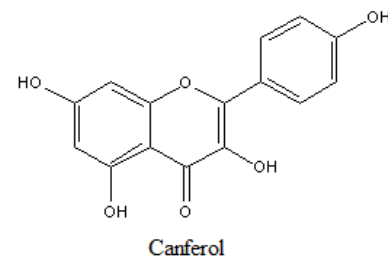
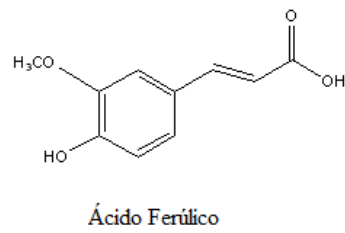
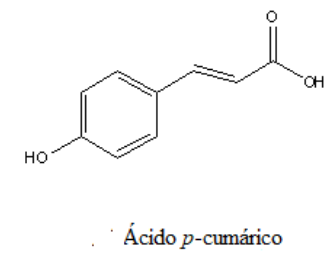
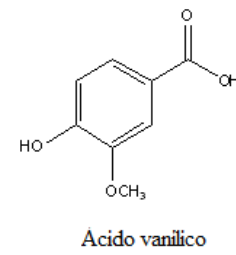
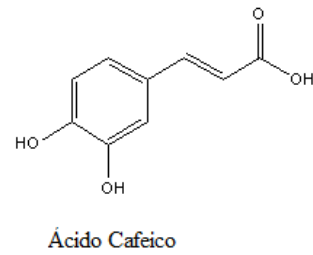
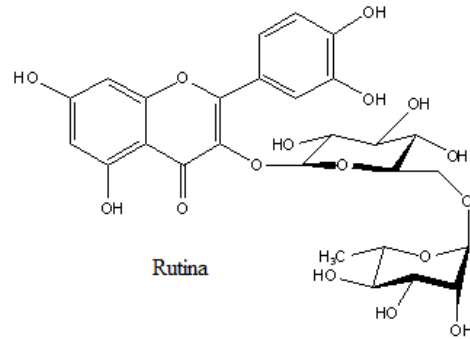


Apêndice A – (1) Resveratrol em *Ruellia angustiflora*

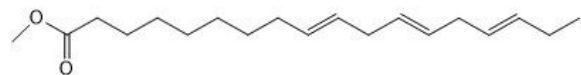
APÊNDICE B – CROMATOGRAMA OBTIDO POR GC-MS

Apêndice B - 1) Ácido Linolênico (éster metílico), 2) Licoperseno, 3) γ -Tocoferol, 4) α -Tocoferol, 5) Vitamina E (acetate), 6) Campesterol, 7) β -Estigmasterol, 8) β -Sitosterol 9) Metil commate A, 10) Metil commate D.

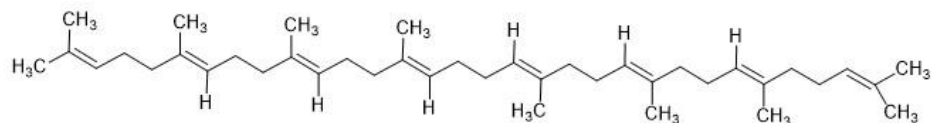
ANEXO A- ESTRUTURAS QUÍMICAS: COMPOSTOS OBTIDOS POR UPLC-MS



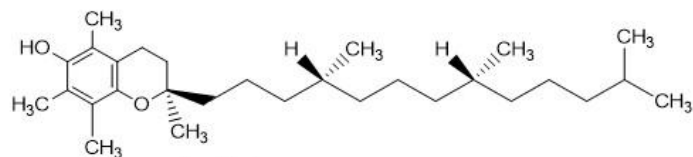
ANEXO B – ESTRUTURAS QUÍMICAS: COMPOSTOS OBTIDOS POR GC-MS



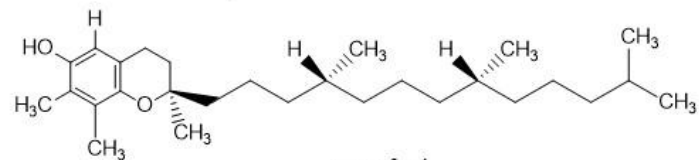
Ácido Linolênico



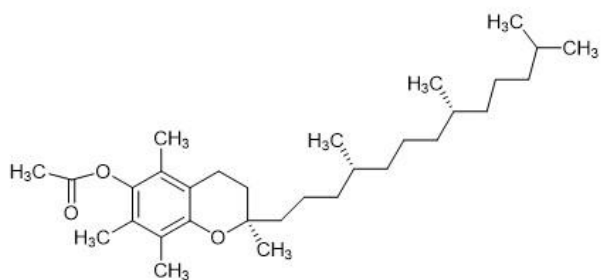
Licoperseno



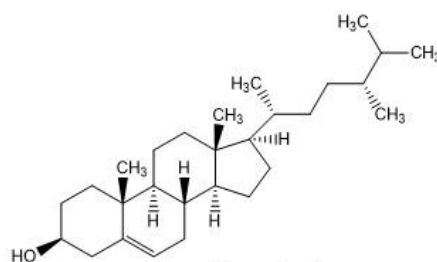
α-tocoferol



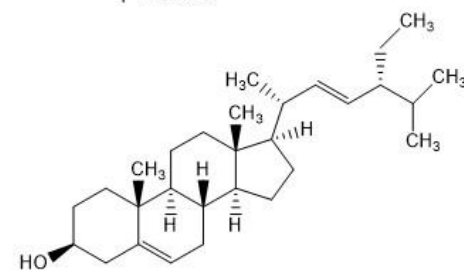
γ-tocoferol



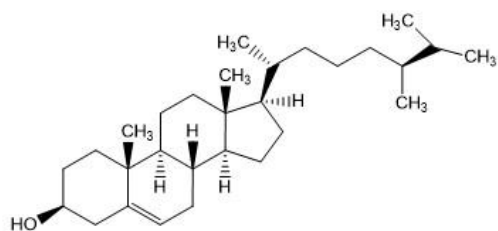
Vitamina E acetato



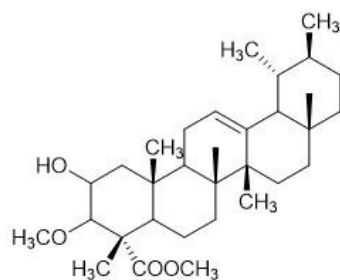
Campesterol



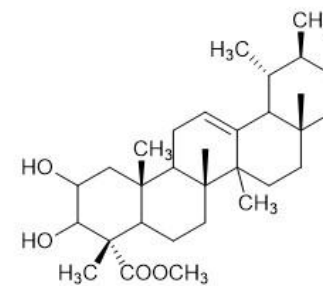
β-estigmasterol



β-sitosterol



Metil Comate A



Metil Comate D