

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

Maiara Maziero

**ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DE *Inga marginata* WILLD**

Santa Maria, RS
2019

Maiara Maziero

ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE
***Inga marginata* WILLD**

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Melânia Palermo Manfron

Santa Maria, RS
2019

MAZIERO, MAIARA
ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DE *Inga marginata* WILLD. / MAIARA MAZIERO.
2019.
97 p.; 30 cm

Orientadora: MELÂNIA PALERMO MANFRON
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2019

1. Extrato bruto de folhas 2. *Inga marginata* 3.
Caracterização química 4. Potencial terapêutico 5.
Fitoquímica I. PALERMO MANFRON, MELÂNIA II. Título.

Maiara Maziero

**ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE
Inga marginata WILLD.**

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


Aprovado em 21 de fevereiro de 2019:



Melânia Palermo Manfron, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Gilberti Helena Hübscher Lopes, Dr^a. (UFSM)
(Membro Avaliador Interno)



Ricardo Bizogne Souto, Dr. (URI)
(Membro Avaliador Externo)

DEDICATÓRIA

Dedico esta Dissertação de Mestrado a Deus e a minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me guiar nesse caminho e me conceder saúde e força.

Agradeço meus pais, Sirlei e Aloisio, por todo amor concedido, dedicação, conselhos, apoio e incentivo para eu continuar estudando e buscando meus ideais. Vocês sempre serão meu alicerce e meu exemplo! Amo vocês!

A minha irmã Estefania, por todo carinho e incentivo, mesmo longe você nunca deixou de estar presente em cada momento da minha vida. Obrigada por tudo! Te amo!

A minha orientadora, Melânia Palermo Manfron, por todo conhecimento transmitido, pela confiança em mim depositada, pelo carinho e atenção. Muito obrigada por tudo!

A minha grande amiga Marina Ortiz Lovatto, agradeço por tudo, pela parceria dentro e fora do laboratório, pelos dias exaustivos de experimento, pelas conversas, conselhos, convivência diária que deixou tudo mais leve. Você com certeza é uma das pessoas que quero ter por perto em toda a minha vida!

A Jocelene Cossetin por toda ajuda e apoio. Muito obrigada!

Ao Laboratório de Investigações Fitoquímicas (LABINFITO), o qual tornou-se minha segunda casa nesses seis últimos anos entre a graduação e o mestrado. Especialmente as meninas, Rafaela Castro Dornelles, Greice Moraes, Marianne Teixeira, Vanessa Ribeiro e Grace Panno por todo conhecimento compartilhado, pela convivência diária, pelas risadas... muito obrigada!

Ao Laboratório de Bacteriologia da UFSM (LABAC) pela disponibilidade e parceria. Em especial ao amigo Vinícius Victor Lorenzoni, por toda ajuda e paciência.

Ao Laboratório de Cultura Celular da Universidade Franciscana, em especial a Prof^ª. Dr^ª. Michele Sagrillo pela disponibilidade e atenção.

Ao LABIBIO, em especial ao Pedro Henrique Doleski, por toda ajuda e paciência no experimento in vivo. Muito obrigada!

Ao LAPAVET, por gentilmente cederem espaço físico em seu biotério.

A CAPES, por me conceder a bolsa de estudos, essencial para minha dedicação exclusiva para a execução deste trabalho.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram na execução deste trabalho e na minha caminhada acadêmica. Muito obrigada!

“As ideias das pessoas são pedaços da sua felicidade.”

William Shakespeare

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima.”

Louis Pasteur

RESUMO

ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Inga marginata* WILLD

AUTORA: Maiara Maziero

ORIENTADORA: Melânia Palermo Manfron

As plantas medicinais são usadas desde a antiguidade pelo homem para curar diversas enfermidades. Ainda hoje, são muito utilizadas pela população de forma paliativa, para a cura e também associadas aos medicamentos convencionais. *Inga marginata* pertence à família Fabaceae, gênero *Inga*, possui diversas nomenclaturas populares como ingá e ingá-mirim, é uma planta leguminosa, com ampla distribuição na América Latina. Possui propriedades antidiarreica, antimicrobiana, antinociceptiva, anti-inflamatória, dentre outras. O presente trabalho teve por objetivo obter o extrato bruto das folhas de *I. marginata* pelo processo de maceração, realizar caracterização fitoquímica, identificar e quantificar compostos presentes no extrato, avaliar atividades biológicas, como a atividade antinociceptiva e antimicrobiana, bem como, avaliar a citotoxicidade, genotoxicidade e potencial antioxidante frente a espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. A partir da caracterização fitoquímica de *I. marginata* foram encontradas as seguintes concentrações 110,60; 100,38 e 27,04 mg/g para polifenóis totais, flavonoides e taninos, respectivamente. Utilizando HPLC foram identificados e quantificados os seguintes compostos ácido gálico (1,837 mg/g), epicatequina (22,493 mg/g) e rutina (5,217 mg/g). O extrato hidroalcoólico não apresentou citotoxicidade e genotoxicidade. Por meio de testes antioxidantes (DPPH – IC₅₀ 17,306 µg/mL; DCFH-DA – 10 e 60 µg/mL; ORAC – 2952,944 µmol Trolox/g e Óxido nítrico – 15 µg/mL) foi demonstrado o alto poder antioxidante do extrato em análise. A atividade antimicrobiana foi avaliada frente as cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* e *Pseudomonas aeruginosa*, sendo que os melhores resultados obtidos foram para *S. epidermidis* (128 µg/mL), *S. aureus* (128 µg/mL), *M. luteus* (256 µg/mL) e *K. pneumoniae* (256 µg/mL). A avaliação antinociceptiva também demonstrou resultados promissores, sendo a concentração de 100 mg/Kg a mais efetiva. Dessa forma, devido aos resultados favoráveis, pode-se sugerir o uso de *I. marginata* de maneira segura e eficaz.

Palavras-chave: Extrato Bruto de Folhas. *Inga marginata*. Caracterização Química. Potencial Terapêutico.

ABSTRACT

PHYTOCHEMICAL AND BIOLOGICAL STUDY OF THE HYDROALCOOLIC EXTRACT OF *Inga marginata* WILLD

AUTHOR: Maiara Maziero

ADVISOR: Melânia Palermo Manfron

Medicinal plants have been used since antiquity by man to cure various diseases. Even today, they are widely used by the population in a palliative way, for healing and also associated with conventional medicines. *Inga marginata* belongs to the family Fabaceae, genus *Inga*, has several popular nomenclatures such as *ingá* and *ingá-mirim* is a leguminous plant, with a wide distribution in Latin America. It has antidiarrheal, antimicrobial, antinociceptive, anti-inflammatory properties, among others. The objective of the present work was to obtain the crude extract of the leaves of *I. marginata* by the maceration process, perform phytochemical characterization, identify and quantify compounds present in the extract, evaluate biological activities, such as antinociceptive and antimicrobial activity, as well as evaluate cytotoxicity, genotoxicity and antioxidant potential against reactive oxygen and nitrogen species. From the phytochemical characterization of *I. marginata*, the following concentrations were found: 110.60; 100.38 and 27.04 mg/g for total polyphenols, flavonoids and tannins, respectively. Using HPLC, the following compounds were identified and quantified as gallic acid (1,837 mg/g), epicatechin (22.493 mg/g) and rutin (5.217 mg/g). The hydroalcoholic extract did not present cytotoxicity and genotoxicity. The high antioxidant power of the extract was demonstrated by means of antioxidant tests (DPPH – IC₅₀ 17,306 µg/mL; DCFH - DA - 10 and 60 µg/mL; ORAC - 2952,944 µmol Trolox/g and nitric oxide - 15 µg/mL) under analysis. The antimicrobial activity was evaluated against bacterial strains of *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* and *Pseudomonas aeruginosa*. The best results were obtained for *S. epidermidis* (128 µg mL), *S. aureus* (128 µg/mL), *M. luteus* (256 µg/mL) and *K. pneumoniae* (256 µg/mL). The antinociceptive evaluation also showed promising results, with a concentration of 100 mg/kg more effective. Thus, due to the favorable results, it is possible to suggest the use of *I. marginata* in a safe and effective way.

Keywords: Gross Extracts of Leaves. *Inga marginata*. Chemical Characterization. Therapeutic Potential.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Ilustração 1 - Folhas e frutos de <i>Inga marginata</i> Willd.....	22
Ilustração 2 – Cromatograma do extrato bruto de <i>I. marginata</i> obtido por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	46
Ilustração 3 - Gráfico que relaciona a porcentagem de inibição do radical DPPH com a concentração do padrão responsável por esta inibição.....	47
Ilustração 4 - Gráfico que relaciona a porcentagem de inibição do radical DPPH com a concentração do extrato de <i>I. marginata</i> responsável por esta inibição.....	48
Ilustração 5 - Ensaio DCFH-DA para o extrato bruto de <i>I. marginata</i>	50
Ilustração 6 - Decaimento da fluoresceína para o extrato bruto de <i>I. marginata</i>	51
Ilustração 7 - Ensaio do Óxido Nítrico para o extrato bruto de <i>I. marginata</i>	53
Ilustração 8 - Resultados do Ensaio do MTT (avaliação da viabilidade celular) para o extrato bruto de <i>I. marginata</i>	54
Ilustração 9 - Ensaio do Cometa para avaliação da genotoxicidade do extrato de <i>I. marginata</i>	56
Ilustração 10 - Teste antinociceptivo das contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Esquema da placa de Elisa de 96 poços: técnica em triplicata + controle do extrato (CE).....	42
Tabela 2 - Equação da reta e valor de “r” para cada metabólito secundário pesquisado.....	44
Tabela 3 - Teores de polifenóis, flavonoides e taninos no extrato hidroalcoólico de <i>I. marginata</i>	44
Tabela 4 – Quantificação de substâncias rutina, epicatequina e ácido gálico no extrato hidroalcoólico de <i>I. marginata</i>	46
Tabela 5 - Resultados do teste do DPPH para o padrão e a amostra.....	48
Tabela 6 - Avaliação do potencial antioxidante pelo ORAC.....	52
Tabela 7 - Resultados da CIM para o extrato de <i>I. marginata</i>	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAPH: Dicloridrato de 2,2'- azobis (2-amidinopropano);

Abs: Absorbância;

AUC: Área sob a curva;

CIM: Concentração Inibitória Mínima;

CIT: Centro de Informações Toxicológicas;

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute;

CN: Controle negativo;

CO₂: Dióxido de carbono;

COX: Cicloxigenase;

CP: Controle positivo;

DAD: Detector de diodo;

DFC: Diclorofluoresceína;

DCFH-DA: Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína;

DMSO: Dimetilsulfóxido;

DNA: Ácido desoxirribonucleico;

DPPH: Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil;

EB: Extrato Bruto;

EDTA: Etilenodiaminotetracético;

ERN: Espécies reativas de nitrogênio;

EROs: Espécies reativas de oxigênio;

EUA: Estados Unidos da América;

HCl: Ácido clorídrico;

IC₅₀: Concentração inibitória de 50%;

I. marginata: *Inga marginata*;

LOX: Lipoxigenase;

MTT: Reagente brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium;

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato;

NaOH: Hidróxido de sódio;

NMDA: N-metil-D-aspartato;

NO₂: Dióxido de nitrogênio;

OMS: Organização Mundial da Saúde;

ORAC: Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio;

PBS: Tampão fosfato salino;

PNPMF: Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos;

RENAME: Relação Nacional de Medicamentos Essenciais;

SUS: Sistema Único de Saúde;

TBARS: Thiobarbituric acid reactive substances;

TRIS: tris-(hidroximetil)-aminometano;

TROLOX: ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico;

UFSM: Universidade Federal de Santa Maria.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 OBJETIVO GERAL.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
3.1 PLANTAS MEDICINAIS.....	20
3.2 <i>Inga marginata</i> WILLD: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E USOS TERAPÊUTICOS.....	21
3.2.1 Grupos bioativos presentes no extrato de <i>Inga marginata</i>.....	22
3.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	24
3.4 ESPÉCIES REATIVAS E ANTIOXIDANTES.....	25
3.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE.....	27
3.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE <i>Inga marginata</i>	29
3.7 ASPECTOS GERAIS DA DOR.....	31
4 METODOLOGIA.....	35
4.1 MATERIAIS.....	35
4.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO.....	35
4.3 DETERMINAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	36
4.3.1 Determinação do teor de Polifenóis Totais.....	36
4.3.2 Determinação de Flavonoides.....	36
4.3.3 Determinação de Taninos.....	36
4.4 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ATIVAS NO EXTRATO VEGETAL POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	37
4.5 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE <i>I. marginata</i>	37
4.5.1 Ensaio do sequestro do radical DPPH.....	37
4.5.2 Teste do diacetato diclorofluoresceína (DCFH-DA).....	38
4.5.3 Ensaio da Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (ORAC).....	39
4.5.4 Teste do Óxido Nítrico.....	39
4.6 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE.....	40

4.6.1 Avaliação da Citotoxicidade pelo Ensaio do MTT.....	40
4.6.2 Avaliação da Genotoxicidade através do Ensaio do Cometa.....	40
4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO DE <i>I. marginata</i> ATRAVÉS DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).....	41
4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO EXTRATO DE <i>I.</i> <i>marginata</i>	42
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO.....	44
5.2 DETERMINAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	44
5.3 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ATIVAS NO EXTRATO VEGETAL POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	45
5.4 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE <i>I. marginata</i>	47
5.4.1 Ensaio do sequestro do radical DPPH.....	47
5.4.2 Teste do diacetato diclorofluoresceína (DCFH-DA).....	49
5.4.3 Ensaio da Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (ORAC).....	51
5.4.4 Teste do Óxido Nítrico.....	52
5.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE.....	54
5.5.1 Avaliação da Citotoxicidade pelo Ensaio do MTT.....	54
5.5.2 Avaliação da Genotoxicidade através do Ensaio do Cometa.....	55
5.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO DE <i>I. marginata</i> ATRAVÉS DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).....	57
5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO EXTRATO DE <i>Inga</i> <i>marginata</i>	58
6 CONCLUSÃO.....	60
REFERÊNCIAS.....	61
APÊNDICE.....	70
APÊNDICE A - MANUSCRITO 1.....	72
APÊNDICE B - MANUSCRITO 2.....	90

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são elementos constituintes da biodiversidade e, desde os primórdios da vida na Terra, são utilizadas para a cura e tratamento das mais diversas enfermidades. De acordo com Lopes et al. (2005), planta medicinal é aquela que, administrada ao homem ou animal, por qualquer forma ou via, exerce algum tipo de ação terapêutica. O tratamento feito com o uso de plantas medicinais é denominado fitoterapia e os medicamentos produzidos a partir dessas plantas são chamados de fitoterápicos.

O uso de plantas medicinais no tratamento de enfermidades é recorrente devido ao fácil acesso, baixo custo e a ideia, por grande parte da população, de que as plantas são inofensivas à saúde. Cerca de 80% da população mundial faz uso de algum tipo de planta em busca de alívio para sua sintomatologia, e aproximadamente 25% de todas as prescrições médicas são formulações baseadas em substâncias derivadas de plantas ou análogos sintéticos (ZENI et al., 2015), o que evidencia a importância das plantas medicinais no tratamento terapêutico.

Inga marginata Willd é uma leguminosa pertencente à família Fabaceae, conhecida popularmente como ingá, ingá-mirim, ingá-dedo, angá, ingá-feijão, dentre outros (LORENZI; MATOS, 2002). Possui uma ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrado em toda América Latina, adaptando-se principalmente ao clima tropical. As árvores de *I. marginata* podem chegar a 17 metros de altura, possuem ramos longos e modificados, com folhas compostas de pares de folíolos de formato elíptico, com variação de cor (verde-claro a verde-escuro). Já os frutos são caracterizados por serem vagens cilíndricas, indeiscentes com coloração da casca verde-oliva (PENNINGTON, 1997).

As folhas de *I. marginata* são utilizadas na medicina popular devido às suas diversas atividades biológicas, dentre elas: antimicrobiana, anti-inflamatória, antidiarreica, antinociceptiva e antioxidante (POMPEU et al., 2012). A composição dos extratos de uma mesma espécie pode variar, assim como a porcentagem de cada constituinte e, como consequência, a sua atividade farmacológica pode expressar-se de forma mais ou menos acentuada. Os fatores que determinam a composição química qualitativa e quantitativa dos extratos vegetais se deve ao cultivo em diferentes locais, posições geográficas, época de coleta, genótipo, condições climáticas, métodos de obtenção do extrato vegetal, dentre outros (OLIVEIRA; AKISSUE; AKISSUE, 2005).

A descoberta de novas alternativas terapêuticas para as mais diferentes patologias é de extrema importância, pois surge como uma alternativa terapêutica, muitas vezes com vantagens tecnológicas, terapêuticas, de produção e de custo do tratamento. Em relação à atividade

antimicrobiana, por exemplo, com a crescente resistência bacteriana aos mais diversos antibióticos, é fundamental o desenvolvimento de novos fármacos capazes de inibir o seu crescimento ou de destruí-los. Dessa forma, as plantas medicinais surgem como uma boa opção terapêutica. Dentre elas, destaca-se o *I. marginata*, utilizado popularmente devido aos diversos benefícios à saúde, por isso, é de suma importância estudar estas ações terapêuticas, bem como sua toxicidade, a fim de garantir seu uso de forma segura e eficaz.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar estudos de caracterização fitoquímica e avaliar atividades biológicas do extrato bruto de *Inga marginata* W.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter o extrato bruto de *Inga marginata*;
- Determinar metabólitos secundários (polifenóis totais, flavonoides e taninos);
- Identificar e quantificar os principais constituintes presentes no extrato de *I. marginata*;
- Determinar o potencial antioxidante do extrato vegetal;
- Avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade do extrato;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato;
- Determinar a atividade antinociceptiva do extrato de *I. marginata*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PLANTAS MEDICINAIS

Desde os primórdios da vida na Terra, o homem faz uso de elementos da natureza para tratar e curar as diversas enfermidades que o acometem. As plantas medicinais são um desses elementos e, ainda hoje, são muito utilizadas pela população, passando o conhecimento acerca de seu uso de geração em geração (STASI, 1996a).

A pesquisa de plantas medicinais é considerada multidisciplinar, pois abrange sociólogos, antropólogos, biólogos (estudos de etnobotânica e etnofarmacologia); taxonomistas e botânicos (identificação de espécies); agrônomos e biólogos (estudos de ecologia e cultivo); químicos, farmacêuticos e médicos (estudos de toxicologia, ação farmacológica, isolamento e purificação de produtos, farmacologia pré-clínica e clínica, controle de qualidade, entre outros) (STASI, 1996c).

A fitoterapia é uma terapêutica caracterizada pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas, sem a utilização de princípios ativos isolados. Os fitoterápicos são medicamentos fabricados a partir de substâncias ativas de origem vegetal. Planta medicinal é caracterizada como uma espécie vegetal utilizada com o objetivo de prevenção, tratamento e cura de sintomas e doenças (STASI, 1996b). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), planta medicinal é todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos (OMS, 2011).

Em junho de 2006, por meio de um decreto, foi regulamentada a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), a qual justifica-se pela inserção da fitoterapia no cotidiano das pessoas, aliada ao fato de que o Brasil detém a maior parcela da biodiversidade vegetal (BRASIL, 2009). Espera-se também amplificar as opções terapêuticas e aprimorar a atenção à saúde dos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS), sem desvalorizar o conhecimento dos povos tradicionais e das comunidades (BRASIL, 2009).

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) relatam que, tanto em nível mundial, quanto nacional, cerca de 80% da população responde pelo consumo de plantas medicinais através da medicina popular, sendo, às vezes, o único recurso terapêutico disponível (BRASIL, 2009). O uso de fitoterápicos também está presente no Sistema Único de Saúde (SUS), sendo que doze fitoterápicos compõem a Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) (BRASIL, 2018). Porém, ainda existem muitas controvérsias acerca do uso de plantas

medicinais, pois os estudos realizados, muitas vezes, são insuficientes, ou até mesmo, inexistentes. Esse fato faz com que muitos casos de intoxicação por plantas aconteçam. Segundo o último levantamento publicado pelo Centro de Informações Toxicológicas (CIT-RS), 366 casos de intoxicação por plantas ocorreram apenas no estado do Rio Grande do Sul, no ano de 2016 (CIT, 2016).

3.2 *Inga marginata* WILLD: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E USOS TERAPÊUTICOS

Dentre as plantas medicinais, destaca-se o *Inga marginata*, o qual pertence à família Fabaceae, sub família Mimosoideae, é uma planta leguminosa, conhecida popularmente no Brasil como ingá, ingá-mirim, ingá-dedo, ingá-miúdo, ingá-feijão e angá. Já em países como Venezuela, Colômbia e Costa Rica é conhecido popularmente como guano, guamo e guaba (LORENZI; MATOS, 2002). Ingá, do tupi, significa “que tem semente envolvida”, esse envolvimento é chamado de sarcotesta, polpa branca adocicada que envolve as sementes (PENNINGTON, 1997). Possui uma ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrado em toda América Latina, adaptando-se principalmente ao clima tropical. As árvores de *I. marginata* podem chegar a 17 metros de altura, possuem ramos longos e modificados, com folhas compostas de pares de folíolos de formato elíptico, com variação de cor (verde-claro a verde-escuro). Já os frutos são caracterizados por serem vagens cilíndricas, indeiscentes com coloração da casca verde-oliva (PENNINGTON, 1997).

Ilustração 1- Folhas e frutos de *Inga marginata* Willd.

(continua – próxima página)

Ilustração 1- Folhas e frutos de *Inga marginata* Willd.



Fonte: Autor

Sua distribuição é exclusivamente neotropical, presente de um extremo ao outro da zona tropical úmida, desde 24 °N, no México, até 34 °S, no Uruguai, com representantes nas Antilhas Maiores e Menores (PENNINGTON, 1997). Esta ampla distribuição geográfica permite que um número maior de pessoas conheça e utilize as propriedades curativas associadas a essa planta.

As folhas de *I. marginata* são utilizadas na medicina popular devido às suas propriedades terapêuticas, como a antimicrobiana (possuindo efetivo potencial no combate a diversas bactérias associadas a infecções clínicas importantes), anti-inflamatória, antidiarreica, antioxidante e antinociceptiva/analgésica (SOUZA et al., 2007; SILVA; ROGEZ; LARONDELLE, 2007), (POMPEU et al., 2012). O conhecimento acerca de propriedades terapêuticas de plantas medicinais, muitas vezes é transmitido de geração em geração, sem ser apoiado por estudos científicos. Por isso, é importante realizar estudos sobre estas plantas e que estes sejam de conhecimento da população que as utiliza como forma de tratamento.

3.2.1 Grupos bioativos presentes no extrato de *Inga marginata*

As plantas medicinais produzem metabólitos secundários, substâncias que, agrupadas ou isoladas, exercem algum tipo de ação biológica, seja em outros organismos ou na própria planta. Essas substâncias fazem parte de grandes grupos bioativos, como polifenóis totais, flavonoides e taninos.

Os polifenóis ou compostos fenólicos apresentam uma estrutura química comum, derivada do benzeno, ligada a um grupo hidrofílico. Possuem em sua estrutura pelo menos um anel aromático, ao qual estão acopladas hidroxilas (SROKA; CISOWSKI, 2003). São produtos do metabolismo secundário das plantas e exercem diversas funções sensoriais (adstringência e cor) e de proteção. A bioatividade das substâncias fenólicas está relacionada com a capacidade de quelar metais, sequestrar radicais livres e inibir a peroxidação lipídica. Essa atividade antioxidante é atribuída à habilidade de doar elétrons ou hidrogênio, ou ainda, devido aos seus radicais intermediários estáveis que evitam a oxidação de vários componentes como os lipídeos (KAUR; KAPOOR, 2001). Com base em sua estrutura molecular, podem ser classificados em quatro grupos: flavonoides, ácidos fenólicos, lignanas e estilbenos (BEHLING et al., 2004).

Flavonoides são uma classe de compostos fenólicos que diferem entre si por sua estrutura química. Consistem em um esqueleto de difenil propano ($C_6C_3C_6$) com dois anéis benzênicos ligados a um anel pirano (BEHLING et al., 2004). Os flavonoides podem se apresentar como agliconas, glicosídeos ou como flavolignanas. Podem ser subdivididos em 13 classes, com mais de 5000 compostos descritos até 1990 (BEHLING et al., 2004). Estão amplamente distribuídos em vegetais e frutas, apresentando diversas atividades biológicas como antioxidante, efeito inibitório de tumores em vários estágios e efeito protetor de capilares (PODSEDEK, 2007).

Os taninos são compostos fenólicos presentes na maioria das plantas, podendo apresentar concentração variável de acordo com os tecidos vegetais, tamanho, idade da planta, parte coletada, época, ou ainda, local de coleta (MONTEIRO et al., 2005). São substâncias fenólicas solúveis em água, com massa molecular entre 500 e 3000 Da, formam complexos insolúveis em água com alcaloides, gelatina e outras proteínas. Historicamente usados para transformar a pele animal em couro (SIMÕES et al., 2004).

São classificados em dois grupos principais com características estruturais diferentes (BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, 2004). Os taninos hidrolisáveis incluem os galotaninos e os elagitaninos, polímeros derivados dos ácidos gálico e elágico, caracterizados por possuírem um poliol central (MUELLER-HARVEY, 2010).

O segundo grupo de taninos envolve os condensados, quimicamente compreendem um grupo de polihidroxi-flavan-3-ol e apresentam uma estrutura semelhante aos flavonoides,

(SCHOFIELD et al., 2001a). Possuem importância marcante em alimentos, pois podem conferir características sensoriais agradáveis ou adstringentes, dependendo da sua concentração nas plantas (DEGÁSPARI et al., 2005).

O extrato das folhas de *I. marginata* é rico em compostos fenólicos, principalmente flavan-3-óis, catequinas, epicatequinas, quercetina, mircetina e ácido gálico (SILVA, ROGEZ, LARONDELLE, 2007). A esses compostos, e outros minoritários, são atribuídas as diversas atividades biológicas da planta, justificando assim seus usos na medicina popular.

Para realizar a quantificação do teor de metabólitos secundários presente em extratos de plantas existem diversas metodologias que podem ser empregadas, como por exemplo, o método de Folin-Ciocalteu para determinação de polifenóis totais, método de Rio para determinação de flavonoides e método de Agostini-Costa para a determinação de taninos. Todas estas metodologias empregadas para quantificação de metabólitos secundários estão baseadas no princípio da espectrofotometria. Em estudo realizado por Lima Neto et al. (2015) com plantas do Cerrado de Mato Grosso e em estudo realizado por De Lima (2013), estas mesmas metodologias foram empregadas, demonstrando seu amplo uso nestas determinações.

3.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A cromatografia é uma técnica de separação e análise de misturas por interação dos seus compostos entre uma fase estacionária e uma fase móvel. Existem diferentes tipos de cromatografia, como por exemplo, cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida em coluna aberta, cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gasosa (VALENTE; COLLINS; MANFREDI, 1983). Estas técnicas são amplamente utilizadas para identificação e quantificação de substâncias ativas presentes em extratos brutos de plantas.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utiliza pequenas colunas, com materiais previamente preparados e uma fase móvel que é eluída sob altas pressões. Tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma gama de compostos presentes em vários tipos de amostras, e em um curto período de tempo, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (VALENTE; COLLINS; MANFREDI, 1983).

A CLAE é a técnica analítica de separação mais utilizada atualmente. As vantagens desse método são a sensibilidade, fácil adaptação para determinações quantitativas, adequação à separação de espécies não voláteis e a sua aplicabilidade a substâncias de expressivo interesse

para a indústria e ciência. Compostos que podem ser estudados utilizando a técnica CLAE: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarbonetos, drogas, extratos vegetais, pesticidas, antibióticos, esteróides, espécies organo-metálicas e substâncias inorgânicas (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

A separação de misturas por meio da cromatografia a líquido é realizada associando uma fase móvel adequada a uma fase estacionária condizente com a mesma. Na CLAE a fase móvel deve ser um líquido e a fase estacionária é um composto orgânico, química ou fisicamente ligado a superfície suporte (AQUINO-NETO; NUNES, 2003). Existem diversos tipos de CLAE, como cromatografia por partição, cromatografia por partição líquido-líquido, cromatografia por partição com fase ligada, cromatografia por adsorção, cromatografia por troca iônica e por exclusão. A escolha do tipo de CLAE é realizada de acordo com o analito de interesse e com o objetivo do trabalho (AQUINO-NETO; NUNES, 2003).

A utilização da cromatografia líquida de alta eficiência é uma ferramenta bastante útil na caracterização do perfil químico de plantas, permitindo analisar as substâncias nelas presente. Em estudo realizado por Lopes et al. (2009) com espécies de *Stryphnodendron* foram quantificados taninos presentes em seus extratos brutos utilizando CLAE. Estudo realizado por Cossetin (2016), também identificou e quantificou substâncias ativas presentes no extrato bruto de *Cinnamomum zeylanicum* Blume utilizando a cromatografia líquida. Estes estudos e tantos outros demonstram a importância e a aplicabilidade desta metodologia na identificação e quantificação de compostos em plantas.

3.4 ESPÉCIES REATIVAS E ANTIOXIDANTES

Os radicais livres são formados a partir da energia recebida por um átomo extremamente reativo, o qual perde um elétron da sua camada mais externa, e devido a essa nova configuração, torna-se quimicamente reativo. De modo geral, os radicais livres agem de forma rápida, atacando outras moléculas e podendo transformá-las também em espécies reativas. Os danos provocados por essas substâncias são provenientes da reação química de oxidação, a qual resulta no chamado estresse oxidativo (CHORILLI; LEONARDI; SALGADO, 2007).

Tendo em vista que a oxidação é uma reação essencial do metabolismo e da vida aeróbica, os radicais livres são formados naturalmente no organismo. O excesso de radicais livres provoca efeitos nocivos ao organismo, como agressão as proteínas, carboidratos,

enzimas, DNA e, também, peroxidação lipídica. O equilíbrio entre a formação e a eliminação de espécies reativas no organismo deve ocorrer, de maneira que os processos metabólicos possam acontecer adequadamente, garantindo a manutenção da fisiologia celular (CHORILLI; LEONARDI; SALGADO, 2007).

O organismo sofre ação dos radicais livres constantemente. Essas espécies reativas são provenientes de alimentos, processos inflamatórios, disfunções biológicas, hábitos de vida inapropriados (tabagismo, dieta inadequada, alcoolismo, exposição à radiação ionizante, dentre outros), condições ambientais impróprias, envelhecimento, estado psicológico e doenças crônicas (CHORILLI; LEONARDI; SALGADO, 2007). As espécies reativas mais importantes são as EROs (espécies reativas de oxigênio, como por exemplo, hidroxila, superóxido e peroxila), ERN (espécies reativas de nitrogênio, como por exemplo, óxido nítrico, nitratos e nitritos), espécies reativas do cloro, radicais derivados de tióis, espécies reativas de carbono e complexos de metais de transição (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Para controlar a formação de radicais livres existem os antioxidantes, substâncias endógenas ou exógenas que retardam ou inibem a oxidação do substrato, impedindo danos severos. Os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que eles ataquem os alvos biológicos. Segundo Ramalho e Jorge (2006) os antioxidantes podem ser classificados em antioxidantes primários (compostos fenólicos que doam átomos de hidrogênio aos radicais livres formados durante a iniciação ou propagação da reação), antioxidantes sinergistas (aumentam a ação dos antioxidantes primários quando usados em associação), antioxidantes removedores de oxigênio (capturam o oxigênio presente no meio, tornando-o indisponível para atuar na auto-oxidação), antioxidantes biológicos (removem oxigênio ou compostos altamente reativos de um sistema alimentício, como por exemplo, catalases e superóxido dismutase), antioxidantes quelantes/sequestradores (complexam íons metálicos que catalisam a oxidação lipídica, são exemplos, ácido cítrico e seus sais, sais de EDTA e fosfatos) e antioxidantes mistos (compostos provenientes de plantas e animais). Além desta classificação, existe outra que classifica os antioxidantes conforme a afinidade química, em lipofílicos e hidrofílicos (CHORILLI; LEONARDI; SALGADO, 2007).

O uso de antioxidantes naturais está crescendo, tendo em vista o aumento da preocupação da população com essa temática. Nos últimos anos, diversas pesquisas têm descrito antioxidantes com atividade sequestradora de radicais livres presentes em frutas, ervas e extratos vegetais. Entre os principais antioxidantes naturais, encontram-se os compostos fenólicos, tocoferóis, extratos de plantas e óleos essenciais (WANG et al., 2008). Por isso, é

importante pesquisar o potencial antioxidante de plantas medicinais, podendo utilizá-las como antioxidantes naturais.

Os compostos fenólicos possuem atividade antioxidante considerável, devido as suas propriedades de oxirredução. O potencial antioxidante das folhas aromáticas é atribuído aos grupamentos hidroxila em seus compostos fenólicos e, entre as classes de compostos com essa atividade, destacam-se os polifenóis, flavonoides e taninos (MORAIS et al., 2009).

A eficiência de uma metodologia para avaliar o potencial antioxidante depende de diversos fatores, como solvente, tipo de extração utilizada, tempo e temperatura. Além disso, em extratos vegetais, a quantidade dos compostos antioxidantes é afetada por diversos fatores, como por exemplo, condições ambientais, fatores genéticos, grau de maturação, variedade da planta, dentre outros. Há uma diversidade de métodos para avaliar a capacidade antioxidante de um composto e esse fato impõe a necessidade de avaliar o potencial antioxidante por diferentes ensaios, com fundamentos e mecanismos de ação diferentes (OLIVEIRA et al., 2009). Os principais ensaios utilizados para avaliar o potencial antioxidante de compostos são o sistema de cooxidação do beta caroteno/ácido linoleico, método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), ensaio do sequestro do radical DPPH, ensaio do óxido nítrico, proteína carbonila, butiril, teste do dicloro, teste ORAC (Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio), dentre outros (KULISIC et al., 2004).

Para avaliar o potencial antioxidante do extrato bruto de *Inga laurina*, Furtado (2014), utilizou o ensaio do DPPH. Já Yamaguichi (2015) utilizou o ensaio da diclorofluoresceína para avaliar o potencial antioxidante dos extratos de *Platonia insignis* e *Caryocar villosum*. Sobrinho (2016) e De Sousa et al. (2017), aplicaram os métodos ORAC e teste do óxido nítrico, respectivamente, para avaliar os potenciais antioxidantes de *Inga edulis* e *Baunhia pulchella*, demonstrando assim, a importância e aplicabilidade desses testes para investigação da capacidade antioxidante de extratos vegetais.

3.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE

Os estudos de Citotoxicidade e Genotoxicidade têm um importante papel no desenvolvimento de novos fármacos, devendo ser realizados no início do processo de desenvolvimento, a fim de obter novos compostos ativos com menor toxicidade (GOLLAPUDI; KRISHNA, 2000; HARTMANN et al., 1997). Os agentes genotóxicos

possuem a habilidade de alterar a replicação de DNA e a transmissão genética. Assim, as medidas de genotoxicidade incluem, principalmente, danos no DNA, mutações e aberrações cromossômicas (COMBES, 1992).

A avaliação da genotoxicidade *in vitro* pode ser realizada pelas seguintes metodologias: Teste de Ames (ensaio mutagênico de curto tempo utilizando bactérias e que visa identificar substâncias com potencial para indução de mutações genéticas), Teste de Micronúcleos (teste primário, simples e rápido que detecta danos cromossômicos induzidos e permite estabelecer correlações entre sistemas de avaliação biológica) e o Ensaio do Cometa. O Ensaio do Cometa ou “Single Cell Gel Assay” é um método de eletroforese em microgel, utilizado para a detecção e quantificação de quebras das fitas do DNA, em células individuais, usando microscopia (SINGH et al., 1988).

As vantagens dessa técnica incluem sensibilidade para a detecção de baixos níveis de dano ao DNA, simplicidade e baixo custo; uso de pequeno número de células por amostra; coleta de dados de células individuais, permitindo análises estatísticas mais robustas; virtualmente, qualquer população de células eucarióticas pode ser analisada; uso de pequenas quantidades do material teste; fácil aplicação e curto período de tempo para concluir o experimento; capacidade para avaliar o dano ao DNA de células não proliferativas e, sendo um ensaio de células individuais, pode-se detectar respostas não uniformes numa população mista de células; capacidade para avaliar a genotoxicidade em ensaios *in vivo* e *in vitro* (TICE et al., 1991). A população de células mais adequada dependerá das características da exposição, da amostra, do acesso e do objetivo do estudo (ALBERTINI et al., 2000). Como desvantagens, tem-se a necessidade de suspensões de células individuais, e o fato de que pequenas amostras celulares podem não ser representativas da população celular total (TICE et al., 1991). Estudos realizados por Sousa (2017) com extrato de *Caesalpinia ferrea*, Polleto et al. (2011) com extrato de *Derris rariflora* e estudo conduzido por Silva (2015) com extrato de *Mimosa caesalpiniiifolia*, utilizaram o ensaio do cometa para avaliar a genotoxicidade destas plantas.

Citotoxicidade é a capacidade intrínseca de um material em promover alteração metabólica nas células em cultura, podendo culminar ou não em morte celular. Substâncias solúveis num determinado meio extracelular com capacidade de influenciarem os mecanismos de quimiotaxia ou quimiorrepulsão nas células migratórias, através da ação de agentes tóxicos como substâncias químicas ou células imunes.

Testes *in vitro* vêm substituindo os ensaios *in vivo*, principalmente pelo seu custo reduzido, alta reprodutibilidade, facilidade de realização e demanda sustentável do mercado consumidor. Existem diversas metodologias para a avaliação da citotoxicidade, como por exemplo, difusão em ágar, método de extração, método do vermelho neutro e ensaio do MTT, e sua utilização depende da categoria de citotoxicidade a ser avaliada e do produto em questão (OLIVEIRA, 2009).

Um método bastante utilizado para a avaliação da citotoxicidade *in vitro* é o ensaio do MTT, teste colorimétrico capaz de avaliar a viabilidade celular. Desidrogenases mitocondriais, as quais estão presentes somente em células metabolicamente viáveis, quebram o anel tetrazólico, transformando-o de um composto de coloração amarela em um composto de coloração azul escuro chamado de formazan (cristais insolúveis em soluções aquosas). O parâmetro final de avaliação é o estabelecimento da IC₅₀ (concentração da substância teste que inibe 50% do crescimento celular) (OLIVEIRA, 2009). Estudo realizado por Arini (2010) com extrato de *Bauhinia rufa*, estudo de Moura et al. (2014) com extrato de *Piptadenia moniliformis* e estudo de Sousa et al. (2017) com extrato de *Bauhinia pulchella*, utilizaram o ensaio do MTT para avaliar a citotoxicidade destes extratos, demonstrando sua grande aplicabilidade neste tipo de avaliação.

3.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Inga marginata*

O uso desenfreado de antimicrobianos estabelece um processo de seleção de microrganismos patogênicos que possuem resistência a compostos químicos utilizados na medicina e na agropecuária. Uma alternativa com custo-benefício desejável tem sido o desenvolvimento e o uso de produtos naturais com propriedades antimicrobianas.

O extrato hidroalcoólico de *I. marginata* possui diferentes propriedades terapêuticas, dentre elas, a antimicrobiana. Diferenças na composição química da planta tornam o extrato mais efetivo contra determinadas espécies de microrganismos, direcionando assim, o seu uso terapêutico.

Os antibióticos de origem vegetal, com uma estrutura química diferente dos antibióticos derivados de microrganismos, podem agir regulando o metabolismo intermediário de patógenos, bloqueando ou ativando reações e síntese enzimática, ou até mesmo, alterando a

estrutura de membranas. Além disso, os fitoterápicos têm baixo custo e podem ser usados conjuntamente à medicina tradicional (CAPASSO et al., 2004).

Com o aumento da resistência microbiana, os compostos vegetais surgem como uma alternativa para o combate de diferentes doenças infecciosas causadas por diversos microrganismos. É relatada atividade antimicrobiana do extrato de ingá frente as bactérias, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis* e *Salmonella* (BAKKALI et al., 2008).

O *Staphylococcus aureus* é responsável por causar infecções em tecidos do corpo humano. É resistente a antibióticos e sobrevive em condições ambientais adversas (MURRAY et al., 2014). A *Klebsiella pneumoniae* é caracterizada por ser um bastonete Gram-negativo, imóvel, não esporulado, aeróbio facultativo, tem seu crescimento favorecido em condições aeróbias. Microrganismos do gênero *Klebsiella* são encontrados em diferentes ambientes, como solo, água e plantas. Essa bactéria é o principal agente etiológico de infecções relacionadas à assistência à saúde, tanto no meio hospitalar quanto no comunitário (MURRAY et al., 2014).

Pseudomonas aeruginosa está presente, principalmente em ambientes hospitalares, é caracterizada por ser um patógeno nosocomial que acomete especialmente pacientes imunocomprometidos. Essa bactéria tem a capacidade de sobreviver em ambientes hostis ao seu crescimento por longos períodos de tempo, conferindo-lhe uma alta capacidade de resistência a diferentes antimicrobianos (MURRAY et al., 2014).

A *Escherichia coli* também pertence à família das Enterobactérias, Gram-negativa, anaeróbia facultativa e fermentadora de açúcares, normalmente é encontrada na microbiota entérica de aves e mamíferos (MURRAY et al., 2014). Já o *Staphylococcus epidermidis* é caracterizado por ser coagulase negativa, catalase positiva e formador de biofilme. É uma espécie comensal da pele e mucosas, causadora de infecções hospitalares, principalmente através de materiais médico-hospitalares (sondas, cateteres, etc.) (MURRAY et al., 2014).

Bacillus cereus é um microrganismo capaz de produzir uma grande quantidade de metabólitos potencialmente patogênicos. Encontrado em alimentos, especialmente no leite, demonstra propriedades patogênicas perigosas à saúde, causando as chamadas “Síndrome Diarreica” e “Síndrome Emética”. O gênero *Bacillus* compreende patógenos extracelulares, ou seja, seu mecanismo de patogenicidade ocorrerá fora da célula do hospedeiro. As bactérias se multiplicam no sistema circulatório, espaço intersticial e no trato gastrointestinal (BHUNIA, 2008).

Enterobacter aerogenes é uma bactéria gram negativa, nosocomial e patogênica, responsável por diversas infecções oportunistas. Encontrada principalmente no trato gastrointestinal, normalmente, não causa dano a saúde de indivíduos saudáveis (MURRAY et al., 2014). *Micrococcus luteus* é uma bactéria gram positiva, encontrada no solo e na água. Também coloniza a mucosa oral humana, orofaringe e o trato respiratório, causando danos à saúde geralmente em pacientes imunocomprometidos (MURRAY et al., 2014).

Enterococcus faecalis é composto por cocos gram positivos, encontrado principalmente no trato gastrointestinal, porém, pode ser encontrado com menor frequência na uretra, vagina, cavidade oral e vesícula biliar. Faz parte da microbiota intestinal, mas pode tornar-se patogênico, causando endocardites, bacteremia, infecção do trato urinário e infecções hospitalares (HARBARTH et al., 2002). A *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae, é classificada como gram negativa, anaeróbica facultativa, não fermentadora de lactose e é responsável pelas chamadas salmoneloses, infecção que pode causar vômitos, diarreia e gastroenterite. É indispensável ter uma grande quantidade do patógeno para causar uma infecção, sendo necessários cerca de 100.000 microrganismos para que haja a efetiva contaminação (SHINOHARA et al., 2008; LEVINSON, 2005). Na maioria dos casos as salmoneloses são infecções autolimitantes, ou seja, duram um determinado período de tempo, variando entre um a quatro dias dependendo do organismo (LEVINSON, 2005).

Muitos estudos que avaliam a atividade antimicrobiana de extratos vegetais utilizam a concentração inibitória mínima como metodologia para esta avaliação. Como por exemplo, em estudo realizado por Furtado (2014) com extrato de *Inga laurina*, estudo de Álvarez et al. (1998) com extrato das cascas de *Inga marginata* e estudo de De Lima (2013) com extrato de *Verbena litoralis*, os quais utilizaram a CIM para avaliação da atividade antimicrobiana.

3.7 ASPECTOS GERAIS DA DOR

O termo dor foi conceituado pela primeira vez, em 1986, pela Associação Internacional para o Estudo da Dor, como uma experiência emocional e sensorial desagradável associada a lesões reais ou potenciais. Nocicepção está relacionada com o reconhecimento de sinais dolorosos pelo sistema nervoso, o qual formula informações relacionadas à lesão (HELLEBREKERS, 2002). Segundo LUNA (2006), dor é o quinto sinal vital, juntamente com a função térmica e cardiorrespiratória.

Diferente de nocicepção, a dor é mais que uma sensação, é uma experiência, podendo incorporar componentes sensoriais com influências pessoais e ambientais. Enquanto que, o

termo nocicepção refere-se ao estímulo doloroso propriamente dito, sem levar em consideração o componente emocional, ou seja, engloba as vias neuroanatômicas, bem como os mecanismos neurológicos e os receptores específicos que detectam o estímulo lesivo. O termo nocicepção do latim “*nocere*”, significa doer, relacionando-se ao processo sensorial desencadeado, enquanto que o termo dor está relacionado à percepção em que o indivíduo a descreve (pungente, dolorosa, irritativa, intolerável ou persistente) (PATEL, 2010).

Sendo assim, uma vez que os animais não são capazes de expressar verbalmente os componentes subjetivos da dor, neles não se avalia dor, e sim, nocicepção. Logo, termos como dor e analgesia são empregados para estudos em humanos, enquanto que nocicepção e antinocicepção são mais utilizados para estudos pré-clínicos, envolvendo animais de laboratório (KANDEL et al., 2003).

A dor pode ser patológica ou fisiológica, e está relacionada com a exposição de qualquer órgão a estímulos potencialmente nocivos que induzem a sensação desagradável, alertando o organismo que há algo errado (FANTONI, CORTOPASSI, 2002; ALMEIDA et al., 2006). Dor fisiológica é aquela que induz respostas protetoras, como o reflexo de retirada, com o objetivo de interromper a exposição ao estímulo nocivo. A dor somática profunda e a dor visceral são causadas por estímulos inevitáveis e apresentam respostas adaptativas específicas (MASTROCINQUE, 2001; FANTONI, CORTOPASSI, 2002; HELLEBREKERS, 2002).

Estados dolorosos prolongados estimulam de forma persistente os aferentes nociceptivos, induzindo alterações que aumentam os efeitos deletérios da dor crônica, introduzindo então o conceito de dor patológica (FANTONI, CORTOPASSI, 2002; MASTROCINQUE, 2001; HELLEBREKERS, 2002). Segundo sua origem, a dor persistente pode ser subdividida em neuropática ou nociceptiva. A dor nociceptiva resulta da ativação direta de nociceptores da pele e outros tecidos em resposta a uma lesão tecidual, acompanhada de inflamação. A dor neuropática ou neurogênica origina-se devido a lesões de nervos periféricos ou do sistema nervoso central (FANTONI, CORTOPASSI, 2002; MASTROCINQUE, 2001).

Os sistemas de modulação nociceptiva mais importantes são mediados por receptores NMDA (N-Metil-D-Aspartato) e opioides, localizados em toda extensão do sistema nervoso central. Entre os três principais subtipos de receptores opioides, os receptores μ e δ podem inibir ou potencializar eventos mediados pelos receptores NMDA, enquanto o receptor κ antagoniza a atividade mediada por este receptor (RIEDEL, NEECK, 2001). A decodificação de sensações

mecânicas, térmicas e químicas em impulsos elétricos é o primeiro processo da nocicepção (PISERA, 2005). Os nociceptores são terminações nervosas livres, não especializadas, que respondem a estímulos nociceptivos, detectando desse modo, lesões nos tecidos, onde os estímulos desencadeantes podem ser mecânicos, térmicos ou químicos (MILLAN, 2002). Assim, o potencial antinociceptivo de um produto natural, por exemplo, pode ser avaliado pelo seu poder de aumentar o limiar de excitação dessas terminações nervosas ao estímulo doloroso, ou então, fazer com que os nociceptores não respondam ou não percebam o estímulo doloroso promovido (MILLAN, 2002).

Considerando o envolvimento de diferentes vias de sinalização no processo da dor, faz-se necessária a utilização de modelos experimentais que diferenciem uma possível atividade antinociceptiva de um produto natural por mecanismos centrais ou por mecanismos periféricos (SILVA et al., 2013). Os principais modelos experimentais *in vivo* utilizados para avaliar a atividade antinociceptiva de fármacos ou drogas vegetais são: contorções abdominais induzidas por ácido acético, teste da formalina, teste de Randall-Selitto, teste de Von Frey, dor orofacial induzida pela formalina, teste da placa quente e teste de retirada da cauda (SILVA et al., 2013).

O teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético é um modelo químico de nocicepção. Baseia-se na contagem de contorções abdominais seguidas da extensão dos membros posteriores como resposta à irritação peritoneal e à peritonite desenvolvidas pela injeção intraperitoneal de uma solução de ácido acético (WHITTLE, 1964). Este teste é sensível à avaliação de drogas analgésicas, porém, pode ser visto como um modelo geral, não seletivo, tendo em vista que a irritação local, produzida pelo ácido acético estimula a liberação de diversos mediadores inflamatórios (COUTO et al., 2011).

O teste da formalina está associado à lesão tecidual, no qual é possível quantificar a resposta comportamental provocada pela injeção subcutânea de formalina diluída na pata traseira do animal (DUBUISSON; DENNIS, 1977; MARTINS et al., 2006). Uma vantagem deste teste é a possibilidade de avaliar dois diferentes tipos de dor durante um determinado período de tempo e, assim, possibilita o teste de analgésicos com diferentes mecanismos de ação (RANDOLPH; PETERS, 1997).

O ensaio de Randall-Selitto está fundamentado na indução de hiperalgesia por meio de pressão crescente na pata do animal. Este modelo baseia-se no princípio de que a inflamação reduz o limiar de reação à dor e que essa diminuição pode ser alterada por analgésicos narcóticos e não-narcóticos (RANDALL; SELITTO, 1957). O teste de Von Frey é um método utilizado para avaliar a sensibilidade tecidual ao estímulo mecânico, sendo bastante utilizado

cl clinicamente. Os modelos experimentais baseados em testes mecânicos permitem a avaliação do aumento da sensibilidade do nociceptor a estímulos inócuos (alodinia) ou nocivos (hiperalgesia). O método de Von Frey é usado para avaliar através do estímulo mecânico inócuo e crescente (alodinia mecânica) a sensibilidade tecidual provocada pela incisão (LE BARS et al., 2001).

O modelo de dor orofacial induzida por formalina avalia a nocicepção trigeminal por meio da aplicação de estímulo químico (administração subcutânea de formalina) na região orofacial. Este modelo constitui uma adaptação do teste da formalina administrada na superfície plantar de animais (DUBUISSON; DENNIS, 1977; RABOISSON; DALLEL, 2004). Para avaliar melhor os receptores envolvidos no mecanismo de ação do produto podem ser utilizados outros agentes químicos, como por exemplo, capsaicina e glutamato (SILVA, 2013).

O método da placa quente avalia o tempo em que os animais permanecem sobre uma chapa metálica aquecida até reagirem ao estímulo térmico com o comportamento de levantar ou lamber as patas (TITA et al., 2011). As aferições são realizadas nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração das substâncias a serem analisadas. O teste de retirada da cauda é utilizado para identificar a atividade de extratos vegetais ou de isolados, além de compostos sintéticos, cujos mecanismos sejam semelhantes aos promovidos pelos analgésicos opioides (OLIVEIRA et al., 2008). Este teste fundamenta-se na aplicação de uma fonte radiante de calor na cauda do animal como estímulo nociceptivo térmico, provocando seu movimento de retirada (OLIVEIRA et al., 2009). Um aumento no tempo de reação é normalmente considerado parâmetro importante para avaliar a atividade antinociceptiva central.

O teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético é uma metodologia bastante utilizada para avaliar o potencial analgésico de drogas, por ser um modelo químico e geral. Estudo realizado por Queiroz (2010) com extrato de *Piptadenia stipulaceae* e estudo realizado por Rodrigues, Duarte-Almeida e Pires com plantas indicadas por caboclos do Parque Nacional do Jaú (AM) utilizaram esta técnica, ratificando sua aplicabilidade neste tipo de avaliação terapêutica.

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS

Reativo Folin-Ciocalteu – Dinamica Química Contemporanea Ltda;

Carbonato de sódio – Dinamica Química Contemporanea Ltda;

Ácido gálico – Merck;

Rutina – Merck;

Cloreto de alumínio – Labsynth;

Vanilina – Proquimios;

Catequina – Dinamica Química Contemporanea;

Epicatequina – Merck;

DPPH – Merck;

Ácido ascórbico – Dinamica Química Contemporanea;

DCFH-DA – Sigma Aldrich;

Trolox – Sigma Aldrich;

Fluoresceína – Sigma Aldrich;

AAPH – Sigma Aldrich;

MTT – Ludwig Biotecnologia;

DMSO – Labsynth;

Diclofenaco sódico – EMS;

Espectrofotômetro – Global Trade Technology;

Cromatógrafo líquido – Shimadzu;

Espectrofluorímetro - Fluoromax® Series, Horiba Scientific;

Leitor de microplacas - SpectraMax® M5, Molecular Devices;

Microscópio óptico – Microscópio ECO, Kasvi.

4.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO

Inga marginata foi coletado na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), em seu campus sede, localizado na cidade de Santa Maria, RS (coordenadas geográficas: altitude - 29.7133 S e longitude -53.7059 O) em março de 2017. A planta foi identificada pelo professor Dr. Renato Aquino Záchia do Departamento de Biologia, CCNE, UFSM. Uma exsicata da espécie foi depositada no Herbário do Departamento de Biologia sob o registro SMDB S13965.

As folhas foram secas em estufa de ar circulante (45 °C) durante sete dias, e posteriormente, foram moídas em moinho de facas. O processo de extração ocorreu por maceração, utilizando solução hidroalcoólica 70% e uma proporção planta/solvente 1:5. O extrato hidroalcoólico foi filtrado e concentrado sob baixa pressão em rotaevaporador, a fim de eliminar todo o solvente orgânico. Em seguida, foi liofilizado sendo obtido um pó, o extrato bruto (EB), que foi devidamente acondicionado e armazenado para as análises posteriores.

4.3 DETERMINAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

4.3.1 Determinação do teor de Polifenóis Totais

A determinação do teor de polifenóis totais foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Folin-Ciocalteu com modificações (CHANDRA; MEJIA, 2004). Na amostra, previamente diluída em água (0,01 %), adicionou-se reagente de Folin-Ciocalteu e, em seguida, a solução foi incubada no escuro por cinco minutos. Ao final desse período, acrescentou-se carbonato de sódio a 20% e nova incubação foi realizada no escuro durante dez minutos. Em seguida, foi realizada a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro, utilizando o comprimento de onda de 760 nm. A concentração da amostra foi de 0,01%.

O mesmo procedimento foi realizado com a substância padrão (ácido gálico) nas concentrações de 5; 8; 10; 15; 20; 25; 30 e 35 µg/mL, construindo assim, uma curva de calibração, obtendo uma equação da reta. A partir desta equação da reta, calculou-se o teor de polifenóis totais presentes na amostra.

4.3.2 Determinação de Flavonoides

A determinação de flavonoides foi realizada segundo Rio (1996) modificado. As amostras foram preparadas na concentração de 0,4% em metanol. Como padrão foi utilizada rutina e como solução reagente cloreto de alumínio 5%. A leitura foi realizada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 425 nm. O conteúdo total de flavonoides foi expresso em miligramas equivalentes de rutina por grama de extrato, o qual é calculado a partir da curva de calibração da rutina, utilizando-se concentrações crescentes (25; 50; 75; 100; 125 e 150 µg/mL) do padrão.

4.3.3 Determinação de Taninos

O teor de taninos foi obtido pelo método da vanilina, seguindo metodologia proposta por Agostini-Costa et al. (1999). Como padrão utilizou-se a catequina e como reagente a vanilina 4%. A amostra foi preparada em concentração de 0,4%, utilizando como solventes metanol 20% e ácido clorídrico 1%, sendo, em seguida, incubada em temperatura ambiente e sob proteção da luz, durante oito horas. Posteriormente a este pré-preparo da amostra, adicionou-se reagente de solução de vanilina 4% e a amostra foi novamente incubada durante quinze minutos. Após, realizaram-se as leituras em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 490 nm. O conteúdo total de taninos foi expresso em miligramas equivalentes de catequina por grama de extrato.

4.4 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ATIVAS NO EXTRATO VEGETAL POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A análise qualitativa e quantitativa de compostos fenólicos foi realizada pelo método da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplado a um detector de Diodo (DAD), seguindo metodologia proposta por Evaristo e Leitão (2001), com adaptações. Utilizou-se cromatógrafo líquido (SHIMADZU, Kyoto/Japão), composto de bomba modelo LC-20AT, injetor automático SIL-20A, detector DAD SPD-M20A e comunicador CBM 20A, controlado por Software LC SP1. A coluna analítica utilizada foi Shim-pack CLC-ODS (M) de fase reversa, com fase estacionária sílica C 18, partícula com 5 µm de diâmetro, dimensões de 4,6 mm por 150 mm. A eluição ocorreu por gradiente com fluxo de 0,9 mL/min, como fase móvel ácido acético 2% em água ultrapura.

As amostras foram preparadas na concentração de 10 mg/mL, sendo o volume de injeção 40 µL e a detecção acompanhada em sistema de fotodiodo entre 230-400 nm, durante 55 minutos. A identificação dos compostos fenólicos, fez-se através de comparação do tempo de retenção das amostras com os padrões (ácido gálico, epicatequina e rutina com procedência Merck).

Curvas das substâncias padrões foram realizadas com as concentrações de 200, 100, 50, 35, 25, 10 e 5 µg/mL para quantificar as substâncias identificadas. O teor de cada substância presente na amostra foi calculado de acordo com a área sob a curva do padrão.

4.5 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE *I. marginata*

4.5.1 Ensaio do sequestro do radical DPPH

A avaliação da atividade antioxidante pelo método fotocolorimétrico do DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila), segue a metodologia de Choi e colaboradores (2002). Foram preparadas curvas de calibração nas concentrações de 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,562 µg/mL do extrato e do padrão (ácido ascórbico) em etanol. Preparou-se também uma solução 0,03 mM de DPPH em etanol, a qual foi devidamente armazenada sob proteção da luz.

Em tubos de ensaio, adicionou-se 1 mL da solução de DPPH 0,03 mM em etanol e 2,5 mL das amostras diluídas. Após trinta minutos em ambiente escuro, realizou-se a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro a 518 nm. Como branco foi utilizado extrato sem adição de DPPH. Para o controle negativo foi utilizado 1 mL da solução de DPPH e 2,5 mL de etanol em tubo de ensaio. A técnica foi realizada em triplicata.

A porcentagem de inibição do radical DPPH pelas amostras é calculada de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ inibição} = 100 - [(Abs. Amostra - Abs. Branco) \times 100 / Abs. Controle negativo]$$

4.5.2 Teste do diacetato diclorofluoresceína (DCFH-DA)

O teste do diacetato diclorofluoresceína utiliza o reagente diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA), seguindo metodologia proposta por Esposti e colaboradores (1999). Este composto tem a capacidade de permear a membrana celular quando desacetilado por enzimas mitocondriais, dando origem a 2',7'-dicloro-dihidrofluoresceína que reage com espécies reativas de oxigênio (EROs), principalmente peróxido de hidrogênio (H₂O₂), produzindo a 2',7'-diclorofluoresceína, a qual emite fluorescência.

Uma curva padrão nas concentrações de 0,4; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 µM foi preparada, utilizando placa de Elisa de 96 poços e os reagentes TRIS HCl (10 mM) pH 7,4, DFC (10 µM) e DCFH-DA (0,1 mM). Para o preparo da amostra foram pipetados 100 µL do extrato bruto, 130 µL de solução TRIS HCl (10 mM) pH 7,4 e 20 µL de DCFH-DA (0,1 mM). O ensaio foi realizado em triplicata. Após uma hora de repouso no escuro e a temperatura ambiente, realizou-se leitura em espectrofluorímetro.

A fluorescência foi determinada com base nos comprimentos de onda de excitação (488 nm) e de emissão (525 nm) no espectrofluorímetro. Quanto maior a fluorescência emitida, maior a quantidade de espécies reativas de oxigênio.

4.5.3 Ensaio da Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (ORAC)

O ensaio da capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC) baseia-se na medida da capacidade de eliminação de radicais livres, principalmente radicais peroxila, pelo extrato vegetal. O ensaio foi realizado de acordo com OU et al. (2001). Foram adicionados 25 µL do extrato bruto diluído em etanol e tampão fosfato pH 7,4 (10 mg/L) ou 25 µL de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox - padrão utilizado no experimento – Sigma Aldrich, EUA) em microplaca. Ao padrão e a amostra foram adicionados 150 µL de solução de fluoresceína (indicador) e 25 µL de 2,2'-azobis-2-amidinopropano dihidroclorato (AAPH – gerador de radicais peroxila – Sigma Aldrich, EUA), sendo, posteriormente, incubada por 10 minutos a 37 °C. A fluorescência foi então medida a cada minuto (comprimentos de onda de 485 nm e 528 nm para excitação e emissão, respectivamente) a 37 °C durante 70 minutos em leitor de microplacas SpectraMax® M5 (Molecular Devices, Califórnia, EUA).

A atividade antioxidante foi determinada usando área sob a curva (AUC) e os resultados foram comparados com uma curva de referência do padrão Trolox (0 - 96 µmol L⁻¹) e expressos como µmol Trolox/g amostra. A AUC é dada pela seguinte fórmula

$$AUC = 1 + \frac{f1}{f0} + \frac{f2}{f0} + \frac{f3}{f0} + \dots + \frac{fn}{f0}$$

Onde:

fn = fluorescência em um ciclo de leitura (1 min);

f0 = fluorescência no tempo zero.

4.5.4 Teste do Óxido Nítrico

O teste do óxido nítrico detecta a presença de nitrito orgânico em amostras. O nitrito é detectado e analisado através da formação de coloração rosada quando o reagente de Griess é adicionado nas amostras que contêm NO₂. A sulfanilamida presente no reagente de Griess é responsável pela formação de diazônio do nitrito da amostra. Quando o composto azo (N-1-naftilenodiamino-bicloridrato) interage com os sais de diazônio, a coloração rosa aparece na amostra.

Após incubação dos tratamentos (10, 15, 30 e 60 µg/mL de EB) em células viáveis, a placa de cultura foi centrifugada e o sobrenadante foi separado para a realização do ensaio, seguindo metodologia proposta por Choi et al. (2012). Em seguida foram transferidos 100 µL dos respectivos sobrenadantes dos testes para outra placa de Elisa de 96 poços. Após, 100 µL do reagente de Griess foram incorporados ao sobrenadante. Esse reagente é composto por uma solução I (Sulfanilamida 1%) + solução II (N-1-naftilenodiamino-bicloridrato), na proporção 1:1 (v/v). As placas ficaram sob temperatura ambiente por 15 minutos para posterior leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm. Os resultados foram calculados em porcentagem em relação ao controle negativo.

4.6 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE

4.6.1 Avaliação da Citotoxicidade pelo Ensaio do MTT

O ensaio do reagente brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) foi realizado conforme protocolo descrito por Mossman (1983). Nesse ensaio, o reagente brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, solúvel em água e de coloração amarela, foi incorporado em células viáveis (20 µL na concentração de 5 mg/mL em PBS). As placas foram homogeneizadas e mantidas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂, por 4 horas. A atividade mitocondrial das células viáveis reduz o MTT por meio da enzima succinato desidrogenase. O MTT é convertido em cristais azul de formazam, os quais são insolúveis em água e apresentam coloração azul-púrpura. O azul de formazam, presente no citoplasma da célula, foi ressuspenso com a adição de 200 µL de DMSO (dimetilsulfóxido) e quantificado colorimetricamente por espectrofotometria no comprimento de onda de 570 nm. O valor de absorbância obtido foi proporcional ao número de células viáveis em comparação ao controle negativo.

Foram testadas quatro concentrações do extrato de *I. marginata* (60, 30, 15 e 10 µg/mL). Essas concentrações foram selecionadas a partir do resultado do IC₅₀ do extrato vegetal obtido no ensaio do DPPH.

4.6.2 Avaliação da Genotoxicidade através do Ensaio do Cometa

O ensaio cometa foi realizado conforme o protocolo de Singh e colaboradores (1988). O teste apresenta uma alta sensibilidade e possibilita quantificar os níveis de quebras da fita simples do DNA.

Em uma lâmina de vidro, previamente coberta com uma camada de agarose de baixo ponto de fusão 5%, a amostra foi suspensa. O material foi imerso em solução de lise (89 mL de solução de lise para 10 mL de DMSO e 1 mL Triton X-100), para a remoção das membranas e citoplasmas das células. As lâminas foram então incubadas em tampão alcalino de eletroforese (300 mM NaOH e 1 mM EDTA em água destilada), e realizou-se corrida eletroforética por 30 minutos a 25 V e 300 mA. Após, realizaram-se os processos de neutralização, fixação e coloração para possibilitar a análise do material genético.

A análise de cada lâmina foi feita com o auxílio de um microscópio óptico, e as células foram comparadas com o controle negativo (células viáveis sem nenhum tipo de tratamento). O extrato bruto de *I. marginata* foi avaliado em quatro diferentes concentrações (10, 15, 30, e 60 µg/mL) pré-estabelecidas a partir do IC₅₀ da planta obtido no ensaio do DPPH.

4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO DE *I. marginata* ATRAVÉS DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

Para a realização da Concentração Inibitória Mínima (CIM) seguindo a CLSI 2015, foram pesados 16,38 mg do extrato de *I. marginata*, e este foi diluído em 1 mL de álcool etílico absoluto, obtendo-se uma concentração inicial de 16,38 mg/mL. A suspensão bacteriana foi preparada na escala 0,5 de Mc Farland, com solução salina 0,9% e auxílio de espectrofotômetro (absorbâncias na faixa de 0,08 a 0,1). Transferiram-se 40 µL da suspensão bacteriana para tubo de ensaio contendo 3960 µL de caldo Muller-Hinton.

Em uma placa de Elisa de 96 poços, foram adicionados aos poços P1 a P8 100 µL de caldo Muller-Hinton. No poço P1 foram adicionados também 50 µL do extrato diluído. Posteriormente, iniciaram-se as diluições seriadas até o poço P8, desprezando-se, por fim, 100 µL. Em todos os poços foram adicionados 100 µL de inóculo, obtendo concentração final de 2048 µg/mL no poço P1; 1024 µg/mL em P2; 512 µg/mL em P3; 256 µg/mL em P4; 128 µg/mL em P5; 64 µg/mL em P6; 32 µg/mL em P7 e 16 µg/mL em P8.

Para o controle negativo (poço P9), foram utilizados 200 µL de caldo Muller-Hinton. No controle positivo (poço P10) foram adicionados 100 µL de caldo Muller-Hinton e 100 µL de inóculo. Para o controle do extrato foram utilizados 100 µL de caldo Muller-Hinton e 100

μ L de extrato. Foram realizadas as mesmas diluições feitas com a amostra para os controles. Todas as análises foram realizadas em triplicata (Tabela 1).

Tabela 1- Esquema da placa de Elisa de 96 poços: técnica em triplicata + controle do extrato (CE).

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
L1	2048	1024	512	256	128	64	32	16	C -	C +
L2	2048	1024	512	256	128	64	32	16	C -	C +
L3	2048	1024	512	256	128	64	32	16	C -	C +
L4	CE	CE	CE	CE	CE	CE	CE	CE	CE	CE

P1 a P10: número de poços da placa de Elisa utilizados no experimento; L1 a L4: número de linhas da placa de Elisa utilizadas no experimento; C-: controle negativo; C+: controle positivo; CE: controle do extrato.

4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO EXTRATO DE *Inga marginata*

Foram utilizados trinta ratos machos adultos, espécie Wistar (220g-280g), provenientes do Biotério Central da UFSM, com projeto devidamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), registrado sob o número CEUA N° 9666180118. Estes foram divididos em cinco grupos com seis ratos em cada grupo, mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas cada, com livre acesso à alimentação e água.

O teste de nocicepção foi realizado conforme metodologia adaptada de KOSTER et al. (1959). Os animais foram divididos em cinco grupos, sendo Grupo 1: controle negativo; Grupo 2: controle positivo; Grupos 3, 4 e 5: grupos teste. O controle negativo recebeu água destilada (10 mL/Kg), o controle positivo, diclofenaco sódico (100 mg/Kg) e os grupos testes (100 mg/kg, 250 mg/kg e 500 mg/kg de extrato bruto, respectivamente) 60 minutos antes da indução de nocicepção por meio de injeção intraperitoneal de 450 μ L de solução de ácido acético 1,2%. Os animais foram colocados em acrílicos transparentes individuais (13x13x8 cm) e o indicativo de nocicepção foi determinado pelo número de contrações da musculatura abdominal associadas ao alongamento dos membros posteriores, observado durante um período de 30 minutos.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados através dos testes de Student e ANOVA (seguida do teste de Dunnett). Valores de $p \leq 0,05$ são considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO

Após o processo de coleta do material vegetal, secagem e moagem, obteve-se 1480 g de droga vegetal. A partir disso, foi realizado preparo do extrato pelo método da maceração, seguindo a proporção planta/solvente 1:5. Posteriormente ao processo de evaporação do solvente em rotaevaporador e liofilização, obteve-se 212,027 g de extrato bruto utilizado para as análises subsequentes.

5.2 DETERMINAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Os metabólitos secundários polifenóis totais, flavonoides e taninos foram quantificados no EB de *Inga marginata*. A partir da curva de calibração dos padrões foi mensurada a quantidade de cada metabólito presente na amostra.

A tabela 2 mostra a equação da reta obtida para cada um dos compostos testados.

Tabela 2- Equação da reta e valor de “r” para cada metabólito secundário pesquisado.

Metabólito Secundário	Equação da Reta	Valor do “r”
Polifenóis Totais	$y = 0,0386x - 0,0179$	0,9987
Flavonoides	$y = 0,0059x - 0,0069$	0,9999
Taninos	$y = 0,0238x - 0,0319$	0,9823

Fonte: Autor

A partir dessas equações pode-se calcular a quantidade de cada metabólito secundário presente na amostra. A tabela a seguir demonstra esses resultados.

Tabela 3- Teores de polifenóis, flavonoides e taninos no extrato hidroalcoólico de *I. marginata*.

Extrato de <i>I. marginata</i>	Polifenóis Totais (mg/g)	Flavonoides (mg/g)	Taninos (mg/g)
--------------------------------	--------------------------	--------------------	----------------

Extrato Bruto das Folhas	110,60	100,38	27,04
--------------------------	--------	--------	-------

Os resultados das dosagens de polifenóis totais, flavonoides e taninos obtidos a partir do EB de *I. marginata* foram comparados com outras espécies do mesmo gênero e/ou família botânica, pois não há na literatura dados de avaliação dos mesmos.

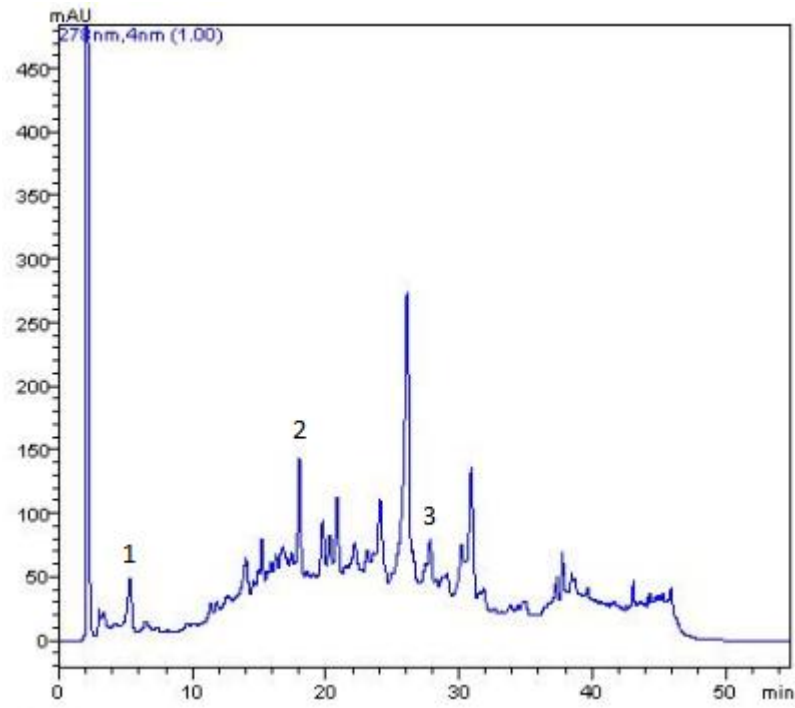
As folhas de *Inga laurina* apresentaram concentrações de polifenóis totais de 255,38 mg/g, valor 2,3 vezes superior ao obtido para o EB de *I. marginata* (FURTADO, 2014). Outra pesquisa realizada por Sobrinho (2016), usando extrato bruto de *Inga edulis* verificou uma concentração menor de polifenóis totais, 59,49 mg/g (valor 1,86 vezes inferior ao obtido neste trabalho). Em estudo com a fração etanólica de *Bauhinia unguolata* (PAULA, 2014), obteve-se um teor de 658 mg/g de polifenóis totais, valor 5,9 vezes maior que o obtido para *I. marginata*. Pesquisa realizada por Simões e Almeida (2011) com cascas de *Bauhinia forficata*, demonstraram qualitativamente, presença de flavonoides, polifenóis totais e taninos em seu extrato bruto. Não foram encontrados estudos similares quantificando flavonoides e taninos abordando plantas da família Fabaceae.

Vários fatores afetam a concentração desses metabólitos secundários nos vegetais, como por exemplo, local da coleta, época da coleta, constituintes do solo, preparo do extrato vegetal, método utilizado para quantificação dos metabólitos, dentre outros.

5.3 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ATIVAS NO EXTRATO VEGETAL POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

As substâncias fenólicas rutina, epicatequina e ácido gálico foram identificadas no EB de *I. marginata* por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) conforme mostra a ilustração 2.

Ilustração 2- Cromatograma do extrato bruto de *I. marginata* obtido por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).



1: pico do ácido gálico; 2: pico da epicatequina; 3: pico da rutina.

Ácido gálico, epicatequina e rutina foram identificados por meio dos tempos de retenção em CLAE-DAD obtidos pela análise em comparação com o tempo de retenção dos respectivos padrões. O método escolhido foi o que melhor conseguiu separar os picos cromatográficos, bem como, obteve os melhores parâmetros cromatográficos.

A quantificação das substâncias identificadas foi realizada pelo cálculo da área sob a curva. Os resultados obtidos estão expressos na tabela 4.

Tabela 4 - Quantificação das substâncias rutina, epicatequina e ácido gálico no extrato bruto de *I. marginata*.

Substância Identificada	Teor (mg/g)
Rutina	5,217
Epicatequina	22,493
Ácido gálico	1,837

Esses valores demonstram que a substância presente em maior concentração no EB de *I. marginata* é a epicatequina, seguida da rutina e do ácido gálico. Esses compostos podem ser relacionados com as atividades biológicas atribuídas a *I. marginata*, como por exemplo, atividade anti-inflamatória e antioxidante. Estas atividades biológicas podem ser delegadas a uma dessas substâncias ou ao sinergismo de ações das mesmas. A associação das ações dessas substâncias com outras não identificadas e quantificadas pela metodologia CLAE, também podem ser responsáveis pelas atividades terapêuticas de *I. marginata*.

5.4 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE *I. marginata*

5.4.1 Ensaio do sequestro do radical DPPH

O potencial antioxidante foi analisado pela capacidade da amostra em sequestrar o radical livre do composto 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). A partir da construção de uma curva de calibração para o DPPH e para o padrão (ácido ascórbico) foram calculadas as IC₅₀ (concentração inibitória capaz de sequestrar 50% do radical DPPH) do padrão e do extrato bruto de *I. marginata*, conforme demonstram as ilustrações 3 e 4, respectivamente.

Ilustração 3- Gráfico que relaciona a porcentagem de inibição do radical DPPH com a concentração do padrão responsável por esta inibição.

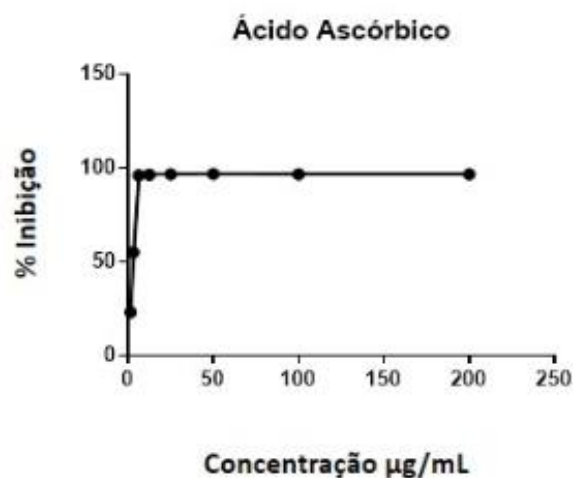
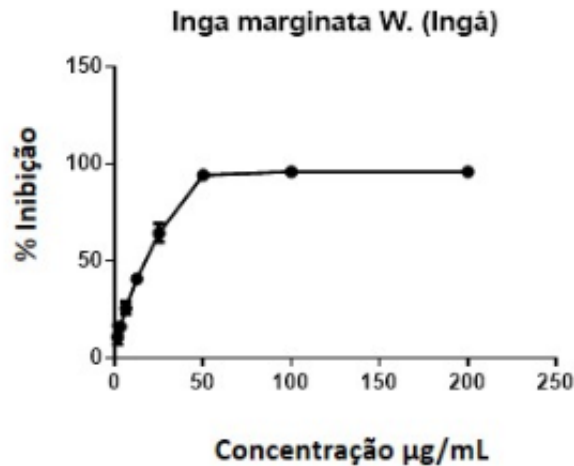


Ilustração 4- Gráfico que relaciona a porcentagem de inibição do radical DPPH com a concentração de extrato de *I. marginata* responsável por esta inibição.



A tabela 5 demonstra os resultados obtidos neste ensaio.

Tabela 5- Resultados do teste do DPPH para o padrão e a amostra.

Substância Analisada	IC₅₀ (µg/mL)
Ácido ascórbico (padrão)	3,423
<i>Inga marginata</i> (amostra)	17,306

Fonte: Autor

Quanto menor a IC₅₀ maior a capacidade antioxidante da amostra. Tendo em vista este conceito, pode-se observar que o extrato bruto de *I. marginata* apresenta um potencial antioxidante considerável, porém, 5,05 vezes menor que o padrão, ácido ascórbico.

Em estudo realizado por Furtado (2014) com extrato bruto das folhas de *Inga laurina* foi obtido um valor de 10,43 µg/mL para a sua IC₅₀ (1,65 vezes maior que o potencial antioxidante de *I. marginata*). O mesmo ensaio foi realizado para as frações butanólica e acetato de etila de *Baunhinia longifolia* (Fabaceae), obtendo resultados para a IC₅₀ de 16,1 µg/mL (1,07 vezes maior que *I. marginata*) e 21,2 µg/mL (1,22 vezes menor que o potencial de *I. marginata*), respectivamente (SANTOS; JUNIOR; KUSTER, 2017).

Pesquisa realizada por Lima (2011) com extratos brutos de *Caesalpinia ferrea* (Fabaceae), *Erythrina velutina* (Fabaceae) e *Mimosa tenuiflora* (Fabaceae) para avaliação do

potencial antioxidante obtiveram os IC₅₀ de 34,8; 1166,91 e 22,23 µg/mL, respectivamente. As IC₅₀ obtidas nos estudos mencionados acima, com plantas do mesmo gênero e/ou família de *I. marginata* possuem, de modo geral, proximidade de valores.

O potencial antioxidante de extratos vegetais pode ser atribuído a vários mecanismos, como a capacidade sequestrante de radicais livres e a prevenção da peroxidação lipídica (KAUR; GEETHA, 2006). O mecanismo de redução de radicais livres DPPH engloba a doação de hidrogênio, por isso, a estrutura do composto antioxidante é importante. Compostos fenólicos presentes em plantas têm considerável importância por serem os principais componentes com atividade antioxidante. O potencial antioxidante de compostos fenólicos tem sido atribuído às suas propriedades de óxido-redução, as quais possuem importante papel na neutralização ou adsorção de radicais livres (BASILE et al., 2005). O EB de *I. marginata* possui compostos fenólicos, o que pode contribuir, pelo menos de maneira parcial, para o potencial antioxidante demonstrado neste estudo.

5.4.2 Teste do diacetato diclorofluoresceína (DCFH-DA)

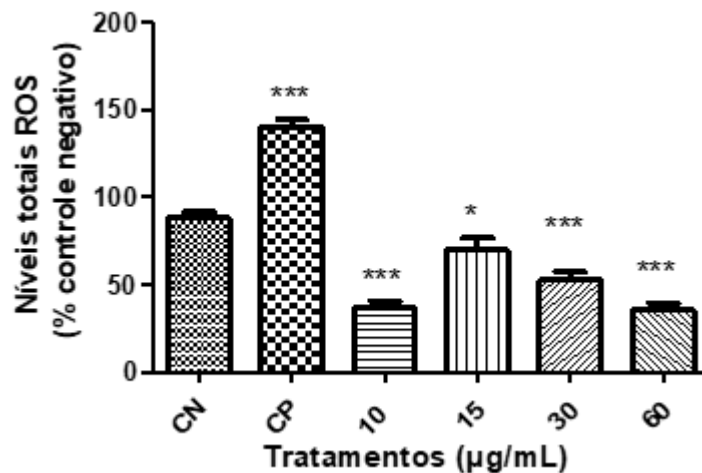
O ensaio do diacetato diclorofluoresceína (DCFH-DA) é outro método que permite a avaliação da capacidade antioxidante, especialmente de espécies reativas de oxigênio (EROs). Para este teste foram utilizadas concentrações da amostra de 10, 15, 30 e 60 µg/mL, as quais foram determinadas a partir do resultado do IC₅₀ obtido pelo ensaio do DPPH.

A ilustração 5 ilustra os resultados obtidos.

Ilustração 5- Ensaio DCFH-DA para o extrato bruto de *I. marginata*.

(continua – próxima página)

Ilustração 5- Ensaio DCFH-DA para o extrato bruto de *I. marginata*.



Ensaio DCFH-DA após 24 h de incubação. Os resultados foram expressos em porcentagem do controle negativo (100%). Sendo CN o controle negativo: células em meio de cultura. Os dados foram expressos com média \pm desvio padrão (D.P.). As análises foram realizadas por variância (ANOVA) de 1 via, seguida por teste *post hoc* de Dunnett. Os valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Sendo * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. CN: controle negativo (células viáveis + meio de cultura) e CP: controle positivo (células viáveis + peróxido de hidrogênio + meio de cultura).

A ilustração 5 demonstra que todas as concentrações do extrato apresentaram resultados satisfatórios (CN: 87,92%; CP: 139,68%; 10 µg/mL: 36,45%; 15 µg/mL: 69,73%; 30 µg/mL: 52,41% e 60 µg/mL: 35,27%), sendo melhores que o controle negativo. Ressalta-se que as concentrações de 10 e 60 µg/mL apresentaram os potenciais antioxidantes mais satisfatórios. Esses resultados são chamados de horméticos, pois não seguem uma proporção (maior concentração – maior ação). Sendo assim, as concentrações de 10 e 60 µg/mL apresentaram capacidade antioxidante para EROs similar.

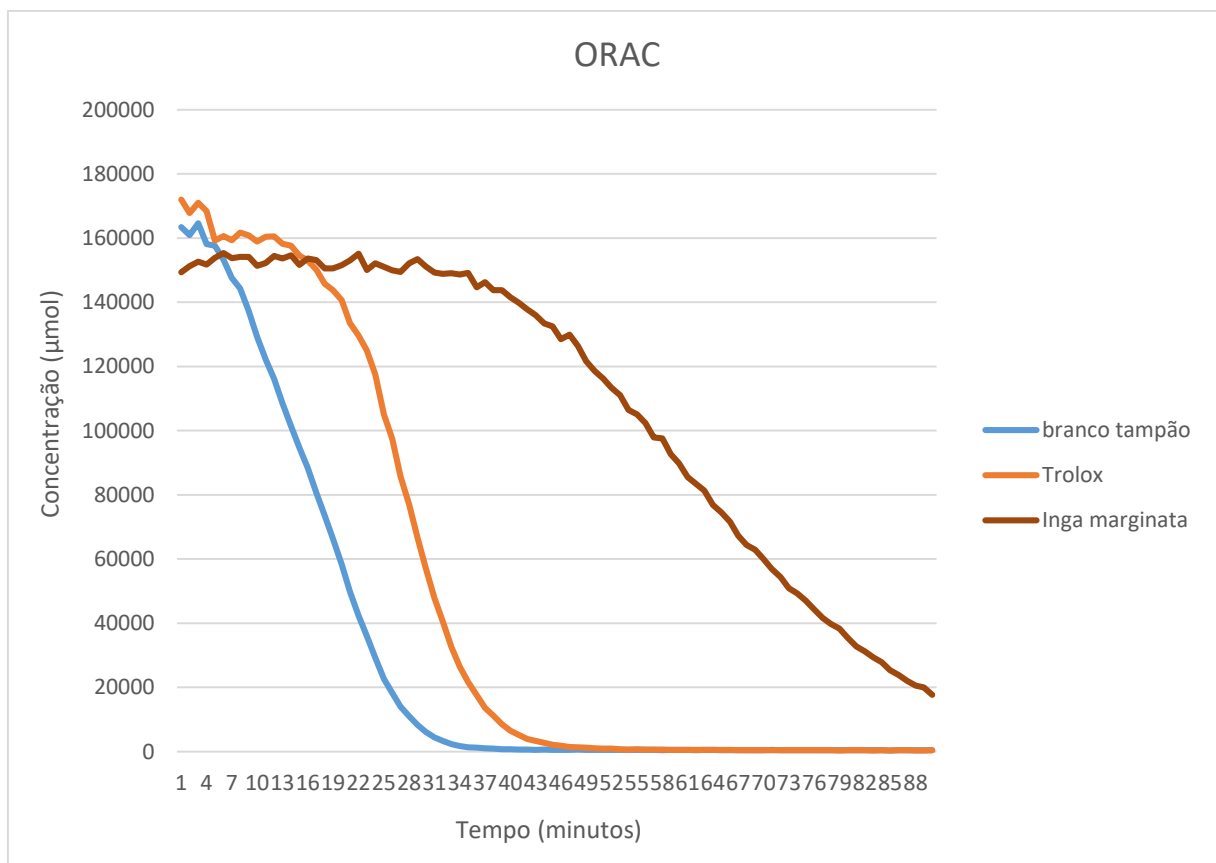
Em estudo realizado por Yamaguichi (2015), com frutas amazônicas ricas em compostos fenólicos, foram preparadas amostras de *Platonia insignis* (bacuri) e *Caryocar villosum* (piquia) na concentração de 20 µg/mL, conseguindo inibir de 79 a 84% a formação de espécies reativas de oxigênio. Esses resultados assemelham-se com os obtidos no presente estudo, pois utilizou-se uma concentração próxima da amostra e os resultados foram promissores. Porém, uma melhor correlação entre o resultado obtido neste estudo e os apresentados na literatura, não pode ser realizada, pois não foram encontrados trabalhos utilizando o teste do diacetato diclorofluoresceína com plantas do mesmo gênero ou da mesma família de *I. marginata*.

5.4.3 Ensaio da Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (ORAC)

O ensaio ORAC avalia o potencial de substâncias absorverem radicais de oxigênio. Normalmente, a fluoresceína é utilizada como marcador de fluorescência, medindo a redução da emissão de fluorescência na presença de um produtor de radical, como por exemplo, 2,2-azobis-2-amidinopropano-dihidroclorato (AAPH) (ALVES et al., 2010).

A ilustração mostra o decaimento da fluoresceína para o EB de *I. marginata* correlacionando com o padrão Trolox e o branco.

Ilustração 6- Decaimento da fluoresceína para o extrato bruto de *I. marginata*.



A partir do gráfico acima e da fórmula $AUC = 1 + \frac{f_1}{f_0} + \frac{f_2}{f_0} + \frac{f_3}{f_0} + \dots + \frac{f_n}{f_0}$ obteve-se o seguinte resultado para a amostra.

Tabela 6- Avaliação do potencial antioxidante pelo ORAC.

<i>Potencial Antioxidante</i>	
Amostra	ORAC ($\mu\text{mol Trolox/g}$)
Extrato Bruto de <i>I. marginata</i>	2952, 944

Fonte: Autor

Analisando os resultados obtidos, pode-se verificar que o extrato bruto de *I. marginata* apresenta capacidade antioxidante frente a EROs. Em estudo realizado por Sobrinho (2016) foi obtido um valor para ORAC de 942 $\mu\text{mol Trolox/g}$ para a espécie *Inga edulis*. Comparando os dois resultados, verifica-se a maior capacidade antioxidante de *I. edulis*. Essas diferenças podem estar relacionadas ao método de extração, purificação ou forma de expressar os resultados obtidos, além de não se tratar da mesma espécie botânica.

5.4.4 Teste do Óxido Nítrico

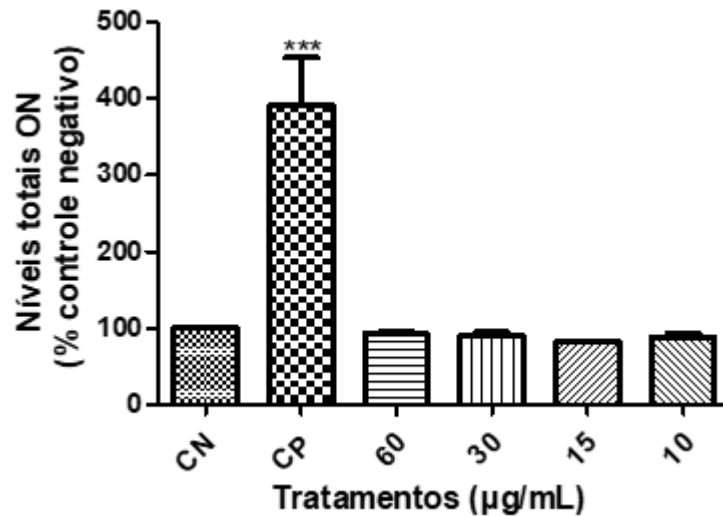
O ensaio do óxido nítrico avalia a capacidade de compostos inibirem a produção de espécies reativas de nitrogênio. Para avaliar esse potencial foram usadas quatro diferentes concentrações do extrato bruto (10, 15, 30 e 60 $\mu\text{g/mL}$ obtidas por meio do resultado do IC_{50} do ensaio do DPPH).

A ilustração 7 demonstra os resultados obtidos para o teste.

Ilustração 7- Ensaio do Óxido Nítrico para o extrato bruto de *I. marginata*.

(continua – próxima página)

Ilustração 7- Ensaio do Óxido Nítrico para o extrato bruto de *I. marginata*.



Ensaio Óxido Nítrico após 24 h de incubação. Os resultados foram expressos em porcentagem do controle negativo (100%). Sendo CN o controle negativo: células em meio de cultura. Os dados foram expressos com média \pm desvio padrão (D.P.). As análises foram realizadas por variância (ANOVA) de 1 via, seguida por teste *post hoc* de Dunnett. Os valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Sendo * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. CN: controle negativo (células viáveis + meio de cultura) e CP: controle positivo (células viáveis + peróxido de hidrogênio + meio de cultura).

Analisando a ilustração 7, pode-se observar que todas as concentrações testadas do extrato foram eficientes no combate à produção de espécies reativas de nitrogênio (CN: 100%; CP: 391,31%; 60 µg/mL: 91,69%; 30 µg/mL: 90,36%; 15 µg/mL: 81,05% e 10 µg/mL: 88,36%). Sendo que as concentrações de 60, 30 e 10 µg/mL apresentaram resultados semelhantes ao controle negativo e a concentração de 15 µg/mL apresentou uma atividade ainda melhor, quando comparada ao controle, pois promoveu a formação de 81,05% de espécies reativas de nitrogênio, enquanto que o controle negativo promoveu a formação de 100% destas espécies. Estes resultados também seguem hormese, pois não é observada a correlação, maior concentração, maior efeito.

Em estudo realizado por De Sousa et al. (2017), extrato de *Bauhinia pulchella* (Fabaceae) nas concentrações de 62,5; 31,25; 15,6 e 7,8 µg/mL apresentou significativa redução na produção de óxido nítrico. Correlacionando os resultados obtidos com estes, pode-se verificar que há similaridade nas concentrações testadas, família botânica e resultados.

Pesquisa desenvolvida por Nascimento (2017) com extrato bruto e frações de *Plukenita volubilis* (Euphorbiaceae) na concentração de 100 µg/mL também demonstrou atividade promissora. Em estudo realizado por Ferreira (2016) com extrato de *Pouteria pulchella*

(Sapotaceae) nas concentrações de 0,078; 0,039; 0,020 mg/mL foram obtidos resultados positivos em relação a inibição da produção de espécies reativas de nitrogênio. Quando comparamos estes resultados com os obtidos no presente trabalho, pode-se observar que o extrato de *I. marginata* apresenta um potencial de captura de radicais nitrogênio maior que as demais plantas, demonstrando assim, seu uso promissor.

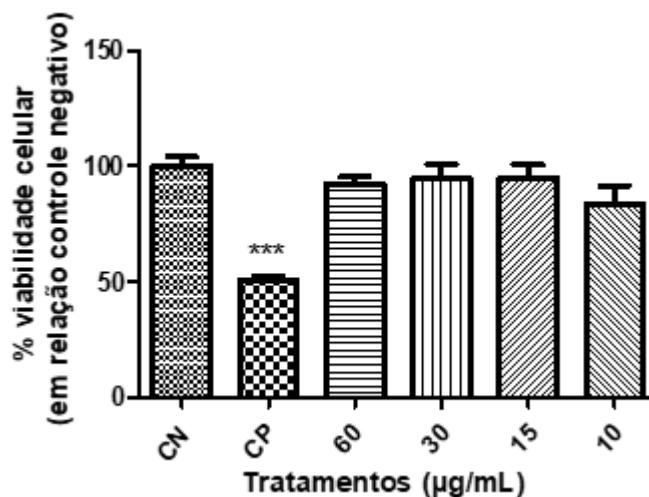
5.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE

5.5.1 Avaliação da Citotoxicidade pelo Ensaio do MTT

O ensaio do MTT foi realizado para avaliar a citotoxicidade do extrato bruto de *I. marginata*. Para isso, foram testadas quatro diferentes concentrações do extrato vegetal (10, 15, 30 e 60 µg/mL). Estas foram determinadas a partir do resultado do IC₅₀ da planta (IC₅₀ = 17,306 µg/mL) obtido por meio do teste do DPPH já exposto neste trabalho.

A ilustração 8 demonstra os resultados obtidos neste ensaio.

Ilustração 8- Resultados do Ensaio do MTT (avaliação da viabilidade celular) para o extrato bruto de *I. marginata*.



Ensaio MTT após 24 h de incubação. Os resultados foram expressos em porcentagem do controle negativo (100%). Sendo CN o controle negativo: células em meio de cultura. Os dados foram expressos com média ± desvio padrão (D.P.). As análises foram realizadas por variância (ANOVA) de 1 via, seguida por teste *post hoc* de Dunnett. Os valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Sendo * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. CN: controle negativo (células viáveis + meio de cultura) e CP: controle positivo (células viáveis + peróxido de hidrogênio + meio de cultura).

Todas as concentrações do extrato testadas apresentaram resultados próximos ao controle negativo (CN: 99,99%; 60 µg/mL: 92,20%; 30 µg/mL: 94,59%; 15 µg/mL: 94,90% e 10 µg/mL: 83,49%), não afetando a viabilidade celular, ou seja, não foram citotóxicas. Não existem pesquisas, até o momento, que avaliam a citotoxicidade do extrato hidroalcoólico de *I. marginata*. Esse tipo de estudo foi pouco explorado até mesmo dentro do gênero *Inga*, por isso, os resultados obtidos foram comparados com outras pesquisas abrangendo plantas pertencentes à família Fabaceae.

Em estudo realizado por Arini (2010) utilizando extrato etanólico bruto de *Bauhinia rufa* na concentração de 50 µg/mL não foi observada citotoxicidade. O mesmo foi relatado por Moura et al. (2014), avaliando os extratos hexânico, metanólico, etanólico e acetato de etila de *Piptadenia moniliformis* na concentração de 50 µg/mL não foi observada citotoxicidade. Em pesquisa realizada por Sousa et al. (2017) com extrato etanólico bruto do caule de *Bauhinia pulchella*, as concentrações de 62,5; 31,25; 15,6; 7,8 µg/mL não afetaram a viabilidade celular.

Analisando os resultados obtidos com os referentes a plantas pertencentes à família Fabaceae, pode-se notar que as concentrações dos extratos em análise foram próximas as testadas no presente estudo, demonstrando assim, a similaridade dos testes e a não citotoxicidade das plantas abordadas. A comparação entre os resultados não pode ser mais fidedigna pois não se trata da mesma espécie e do mesmo gênero.

5.5.2 Avaliação da Genotoxicidade através do Ensaio do Cometa

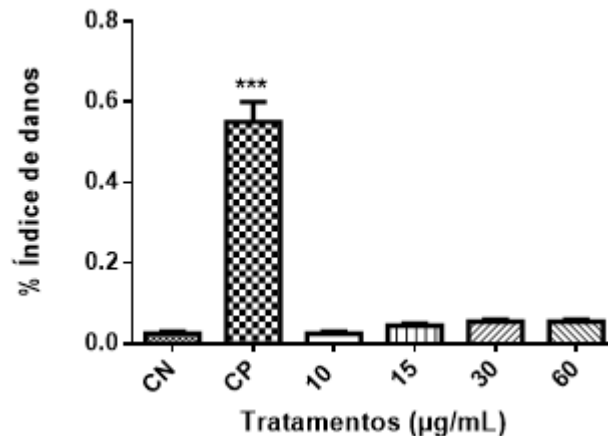
O Ensaio do Cometa foi realizado para avaliar a capacidade de causar danos em nível de DNA do extrato de *I. marginata*. Para isso, da mesma forma que no ensaio do MTT, foram utilizadas quatro concentrações diferentes do extrato vegetal (10, 15, 30 e 60 µg/mL) obtidas a partir do IC₅₀ da planta.

O Ensaio do Cometa tem sido amplamente utilizado para avaliar danos genéticos induzidos por substâncias potencialmente genotóxicas. Teste rápido e sensível é uma ferramenta para estudos de medicina diagnóstica, terapêutica e genética toxicológica, além de ser um dos testes realizados nas indústrias farmacêuticas para investigar novas drogas (OLIVEIRA, 2012).

A ilustração 9 demonstra os resultados obtidos neste ensaio.

Ilustração 9- Ensaio do Cometa para avaliação da genotoxicidade do extrato de *I. marginata*.
(continua – próxima página)

Ilustração 9- Ensaio do Cometa para avaliação da genotoxicidade do extrato de *I. marginata*.



Ensaio Cometa após 24 h de incubação. Os resultados foram expressos em porcentagem do controle negativo (100%). Sendo CN o controle negativo: células em meio de cultura. Os dados foram expressos com média \pm desvio padrão (D.P.). As análises foram realizadas por variância (ANOVA) de 1 via, seguida por teste *post hoc* de Dunnett. Os valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Sendo * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. CN: controle negativo (células viáveis + meio de cultura) e CP: controle positivo (células viáveis + peróxido de hidrogênio + meio de cultura).

Analisando a ilustração 9 pode-se observar que todas as concentrações testadas do extrato bruto não apresentaram dano significativo ao DNA (CN: 0,025%; CP: 0,55%; 10 µg/mL: 0,025%; 15 µg/mL: 0,045%; 30 µg/mL: 0,055% e 60 µg/mL: 0,055%). Dentre as concentrações testadas, a de 10 µg/mL apresentou o melhor resultado, equiparando-se ao controle negativo.

Em estudo realizado por Sousa (2017) foi avaliado o potencial genotóxico do extrato de *Caesalpinia ferrea* (Fabaceae), nas concentrações de 5, 10 e 20 mg/L. Pelo teste Cometa todas estas amostras apresentaram potencial genotóxico. Pesquisa com extrato das folhas e das raízes de *Derris rariflora* (Fabaceae) realizado por Poletto et al. (2011) demonstrou que todas as concentrações testadas dos dois extratos apresentaram genotoxicidade.

Estudo realizado por Silva (2015) em extrato de *Mimosa caesalpiniiifolia* (Fabaceae) nas concentrações de 10, 25 e 50 µg/mL, apresentou potencial genotóxico apenas na maior concentração. As concentrações dos extratos das plantas da Família Fabaceae acima mencionadas foram próximas ou iguais as utilizadas para o extrato de *I. marginata*.

Assim, podemos observar que *I. marginata*, se comparada as demais plantas, apresenta uma maior segurança para uso, tendo em vista que, em todas as concentrações analisadas não houve dano em nível de DNA.

5.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO DE *I. marginata* ATRAVÉS DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A partir da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada a atividade antimicrobiana do extrato bruto de *I. marginata*.

A tabela 7 apresenta os resultados obtidos no teste.

Tabela 7- Resultados da CIM para o extrato de *I. marginata*.

Bactéria analisada	ATCC	CIM (µg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	128
<i>Bacillus cereus</i>	14579	512
<i>Enterobacter aerogenes</i>	21/10/15	512
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	128
<i>Micrococcus luteus</i>	7468	256
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	128
<i>Escherichia coli</i>	25922	1024
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	700603	256
<i>Salmonella</i>	52117	512
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	1024

Fonte: Autor

Observando os resultados acima expostos, pode-se notar que o extrato bruto apresentou atividade para todas as cepas bacterianas testadas, sendo que os melhores resultados obtidos foram para *S. aureus*, *S. epidermidis*, *M. luteus* e *K. pneumoniae*, onde obtiveram-se as menores concentrações bactericidas. A atividade antimicrobiana do extrato de *I. marginata* pode ser atribuída à presença de flavonoides, os quais apresentam grupos fenólicos hidroxila que possuem afinidade com proteínas, e por isso, atuam como inibidores de enzimas bacterianas, alterando suas vias de síntese. Outro possível mecanismo de ação estaria associado a substituição do conjunto de anéis dos flavonoides com grupos prenilo, realizada, de modo geral,

com a finalidade de aumentar a lipofilicidade, aumentando assim, a atividade antibacteriana através da interação com as membranas celulares (LI et al., 2012).

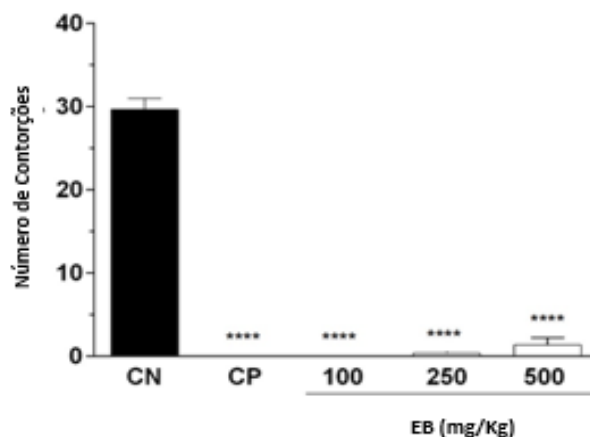
Em estudo realizado por Furtado (2014) com extrato bruto das folhas de *I. laurina*, a CIM encontrada para o gênero *Staphylococcus* variou de 200 a 400 µg/mL, demonstrando assim, uma atividade menor que a encontrada no presente trabalho. Álvarez et al. (1998) pesquisaram a atividade antimicrobiana do extrato das cascas de *I. marginata*, e notaram que o mesmo não possui atividade para *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* e *P. aeruginosa*. O extrato bruto de *I. vera* apresentou atividade contra as cepas de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *S. aureus* pelo método da difusão em disco (LOZANO et al., 2013). Assim, pode-se verificar que existem divergências em resultados, devido à falta de similaridade da espécie, parte da planta utilizada, microrganismo e metodologia empregadas. Todos esses parâmetros interferem de modo direto no resultado final.

5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO EXTRATO DE *Inga marginata*

Existem muitas metodologias capazes de avaliar a atividade antinociceptiva *in vivo*. A técnica das contorções abdominais induzidas por ácido acético, realizada no presente estudo, foi escolhida por ser um modelo geral para estudo de drogas antinociceptivas, sendo amplamente utilizada para avaliar a atividade antinociceptiva periférica (DU et al., 2007).

A ilustração 10 ilustra os resultados obtidos no presente trabalho.

Ilustração 10- Teste antinociceptivo das contorções abdominais induzidas por ácido acético



CN: Controle negativo; CP: controle positivo; EB: extrato bruto de *I. marginata*.

Analisando a ilustração acima, pode-se observar que todas as concentrações testadas do extrato foram efetivas na redução da nocicepção (100 mg/kg: 0 contorções; 250 mg/kg: 2 contorções; 500 mg/kg: 4 contorções), ressaltando-se a concentração de 100 mg/kg, a qual inibiu totalmente a nocicepção no “n” e tempo avaliados. Da mesma forma que outros resultados já expostos neste trabalho, os resultados supracitados seguem hormese, ou seja, a concentração não é diretamente proporcional ao efeito.

Pode-se sugerir que o extrato de *I. marginata* possui atividade antinociceptiva de curta duração, pois o tempo de avaliação foi de 30 minutos. Esta atividade biológica tem sido relacionada com a presença de polifenóis e flavonoides no extrato bruto. Os flavonoides estão associados ao efeito antinociceptivo por inibirem COX, LOX, glutathione S-transferase, NADPH oxidase, monooxigenases microsossomais e succinoxidase mitocondrial (ODONTUYA et al., 2005).

Em estudo realizado por Pompeu et al. (2012) com extrato bruto de *I. edulis* (125, 250 e 500 mg/Kg) foi testada a atividade antinociceptiva pelo teste da placa quente, obtendo resultados antinociceptivos de curta duração (máximo 60 minutos) promissores. Pesquisa realizada por Queiroz (2011) utilizando fração aquosa e acetato de etila de *Piptadenia stipulaceae* (Fabaceae) na concentração de 100 mg/Kg apresentou significativa redução nas contorções abdominais.

Analisando os resultados obtidos no presente estudo com os demais apresentados, pode-se notar que há similaridade nas doses de extrato testadas, bem como, nos resultados obtidos. Ressalta-se também, que o extrato de *I. marginata* (100 mg/Kg) conseguiu reduzir 100% da nocicepção no tempo analisado, apresentando-se como um resultado bastante relevante e promissor.

6 CONCLUSÃO

O uso de plantas medicinais ocorre desde os primórdios da vida na Terra e, ainda hoje, são muito utilizadas pela população, sendo que seu conhecimento é transmitido de geração em geração. O presente trabalho teve por objetivo caracterizar e avaliar atividades biológicas do extrato bruto de *I. marginata*.

Foram obtidos resultados promissores e relevantes que certificam a segurança e eficácia deste extrato. Foram identificadas e quantificadas as substâncias ativas, ácido gálico, epicatequina e rutina, no extrato bruto de *Inga marginata*. Demonstrou-se que a amostra não apresenta citotoxicidade e genotoxicidade, garantindo assim sua segurança. Também foi comprovado bom poder antioxidante, com capacidade de capturar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.

A eficácia antimicrobiana contra várias cepas bacterianas também foi comprovada, sendo assim, uma alternativa favorável, tendo em vista a crescente resistência dos microrganismos a diversos antibióticos disponíveis no mercado. A atividade antinociceptiva foi demonstrada, sendo que a melhor concentração do extrato testada foi a de 100 mg/Kg, cuja inibição da nocicepção foi de 100%, equiparando-se ao fármaco de referência utilizado no experimento (Diclofenaco sódico).

Dessa forma, com esses resultados promissores, que elucidam a presença de compostos ativos no EB e também a ação terapêutica do mesmo, pode-se sugerir o uso de *I. marginata* de forma segura e eficaz para diversos fins.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINI-COSTA, T. S.; GARRUTI, D. S.; LIMA, L.; FREIRE, S.; ABREU, F. A. P.; FEITOSA, T. **Avaliação de metodologias para determinação de taninos no suco de caju.** Boletim CEPPA, Curitiba, v. 17, n. 2, p. 167-176, 1999.
- ALBERTINI, R. J.; ANDERSON, D.; DOUGLAS, G. R.; HAGMAR, L.; HEMMINKI, K.; MERLO, F.; NATARAJAN, A.T.; NORPPA, H.; SHUKER, D. E. G.; TICE, R.; WATER, M. D.; AITIO, A. **IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans.** Mutation Research, v. 463, p.111-172, 2000.
- ALMEIDA, E. R.; GUEDES, M. C.; ALBUQUERQUE, J. F.; XAVIER, H. **Hypoglycemic effect of *Bauhinia cheilandra* in rats.** Fitoterapia, v. 77, p. 276–278, 2006.
- ALVAREZ, J. C.; SERRANO, R. P.; OSPINA, L. F.; TORRES, L. A. A. **Biological activity of saponins from the bark of *Inga marginata* Willd.** Revista Colombiana de Ciências Químico-Farmacêuticas, v. 27, p. 17-19, 1998.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. **Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos.** Química Nova, São Paulo, v.33, n.10, p.2202-2210, 2010.
- ARINI, L. E. S.; DUARTE, G. K. G. F.; DA SILVA, J. M. W.; MENEZES, A. C. S. **Avaliação da atividade citotóxica de extratos obtidos das folhas de *Bauhinia rufa* (Fabaceae).** IV Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão da UEG. Universidade Estadual de Goiás, 2010.
- AQUINO-NETO, F. R.; NUNES, D. S. S. **Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins.** Rio de Janeiro: Interciência, p.187, 2003.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. **Biological effects of essential oils– A review.** Food and Chemical Toxicology.46: 446–475, 2008.
- BARREIROS, A.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. **Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo.** Química Nova, São Paulo, v.29, n.1, p.113-123, jan./fev. 2006.
- BASILE, A.; FERRARA, L.; DEL POZZO, M.; MELE, G.; SORBO, S.; BASSI, P.; MONTESANO, D. **Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* mart.** Journal Ethnopharmacol 102: 32-36, 2005.
- BATTESTIN, V.; MATSUDA, L.K.; MACEDO, G.A. **Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos.** Alim. Nutr. Araraquara, v.15, n.1, p.63-72, 2004.
- BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. **Flavonoid quercetin: general aspects and biological actions.** Alim. Nutr. Araraquara, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BHUNIA, A. K. *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis*. Food borne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis. West Lafayette, Springer, 2008.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília, 2009.

CAPASSO, F.; GAGINELLA, T. S.; GRANDOLI, G.; IZZO, A. A. **Phytoterapy: a quick reference to herbal medicine**. Berlin: Springer, p. 424, 2004.

CENTRO DE INFORMAÇÕES TOXICOLÓGICAS – RS. Disponível em <<https://drive.google.com/file/d/12aogZInHSI-E4cjdKgbhte4iVz42CgtQ/view>>. Acesso em 18 de dezembro de 2018.

CHANDRA, S.; MEJIA, E. G. **Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinonereductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas**. Journal of Agriculture and Food Chemistry, n. 52, p. 3583-3589, 2004.

CHOI, C. W.; KIM, S. C.; HWANG, S. S.; CHOI, B. K.; AHN, H. J.; LEE, M. Y.; PARK, S. H.; KIM, S.K. **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.

CHOI, W. S.; SHIN, P. G.; LEE, J. H.; KIM, G. D. **The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells**. Cell Immunol. Dec; 280(2): 164-70. doi: 10.1016/j. cellimm, 2012.

CHORILLI, M.; LEONARDI, G. R.; SALGADO, H. R. N. **Radicais livres e antioxidantes: conceitos fundamentais para aplicação em formulações farmacêuticas e cosméticas**. Revista Brasileira de Farmacognosia, João Pessoa, v.88, n.3, p. 113-118, jul./set. 2007.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. CLSI. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; M7-A6, 2015.

COMBES, R. D. **Genotoxicity testing: recent advances and future trends**. Chemistry & Industry, v. 24, p. 950-954, 1992.

COSSETIN, J. F. **Caracterização fitoquímica e avaliação da atividade biológica de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Maria, 2016.

COUTO, V. M.; VILELA, F. C.; DIAS, D. F.; NASCIMENTO, C. G.; GIUSTI-PAIVA, A. **Antinociceptive effect of extract of *Emilia sonchifolia* in mice**. Journal of Ethnopharmacology. V.134, p. 348-353, 2011.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N.; PRADO, M. R. M. **Atividade antimicrobiana de *Schinus terebinthifolius* Raddi**. Ciência agrotécnica, v. 29, p. 617-622, 2005.

DE LIMA, R. **Controle de qualidade e atividade antimicrobiana de *Verbena litoralis* Kunth**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Maria, 2013.

DE SOUSA, B. J. M. **Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de extratos padronizados de *Caesalpinia ferrea* (jucá) e *Brosimum gaudichaudii* (inharé)**. Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica de Goiás, 2017.

DU, J.; YU, Y.; WANG, C.; ZHU, L.; QIAN, Z.M. **Ligustilide attenuates pain behavior induced by acetic acid or formalin**. *Journal of Ethnopharmacology*, v.112, p.211-214, 2007.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. **The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats**. *Pain* 4:161-174, 1977.

DWYER, D. J.; KOHANSKI, M. A.; COLLINS, J. J. **Role of reactive oxygen species in antibiotic action and resistance**. *Curr. Opin. Microb.* 12:482-489, 2009.

ESPOSTI, M. D.; HATZINISIRIOU, I.; MCLENNAN, H.; RALPH, S. **Bcl-2 and mitochondrial oxygen radicals. New approaches with reactive oxygen species sensitive probes**. *J. Biol. Chem.*, 274: 29831-29837, 1999.

EVARISTO I. M.; LEITÃO M. C. **Identificação e quantificação por DAD-HPLC da fração fenólica contida em folhas de *Quercus suber* L.** *Silva Lusitana* 9: 135-141, 2001.

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; O'NEIL, K. L. **The Comet assay: a comprehensive review**. *Mutation Research*, v. 339, p. 37-59, 1995.

FANTONI, D. T.; CORTOPASSI, S. R. G. **Anestesia em Cães e Gatos**. São Paulo: Rocca, p. 323-334, 2002.

FERREIRA, G. G. **Avaliação *in vitro* de efeitos anti-inflamatórios de extratos de *Pouteria torta* (mart.) radlk e *Pouteria ramiflora* (mart.) radlk**. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, 2016.

FURTADO, B. F. **Estudo químico, análise do óleo essencial e atividades biológicas de *Inga laurina* Willd.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia, 2014.

GOLLAPUDI, B. B.; KRISHNA, G. **Practical aspects of mutagenicity testing strategy: an industrial perspective**. *Mutation Research*, v. 455, p. 21-28, 2000.

GURIB-FAKIM, A. **Medicinal plants: traditions of yesterday**. *Molecular Aspect of Medicine*, n. 27, p. 1-93, 2006.

HARBARTH, S.; COSGROVE, S.; CARMELI, Y. **Effects of Antibiotics on Nosocomial Epidemiology of Vancomycin-Resistant Enterococci**. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.46, n.6, p.1619-1628, 2002.

HARTMANN, A.; SPEIT, G. **The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (Comet assay)**. *Toxicology Letters*, v. 90, p. 183-188, 1997.

HELLEBREKERS, L. J. **Dor em Animais**. São Paulo, p. 69-79, 2002.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M. **Princípios de Neurociência**. São Paulo: Manole, 2003.

KAUR, I. P.; GEETHA, T. **Screening methods for antioxidants- a review**. Mini revista medicinal chemical 6: 305-312, 2006.

KAUR, C.; KAPOOR, H. C. **Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium’s health**. International Journal of Food Science & Technology, n. 36, 703-725, 2001.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DeBEER, E. J. **Acetic acid for analgesic screening**. Federation Proceedings 18: 418-420, 1959.

KULISIC, T. et al. **Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil**. Food Chemistry, Oxford, v.85, n.4, p.633-640, May, 2004.

LAMONT, L. A.; TRANQUILLI, W. J. **Physiology of Pain. The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. Philadelphia: Saunders, v.30, n.4, p. 703-728, 2000.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. **Animal models of nociception**. Pharmacological Reviews, v. 53, p.597-652, 2001.

LEVINSON, W.; JAWETZ, E. **Microbiologia médica e imunologia**. 7 ed. Porto Alegre. Artmed. p. 133 – 136, 2005.

LI, Y.; HU, Y.; ZHU, D.D.; ZHANG, S.; LIU, Z. J.; GONG, H. B.; ZHU, H. L. **Design, synthesis and antimicrobial activities of nitroimidazole derivatives containing 1,3,4 – oxadiazole scaffold as FabH inhibitors**. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 20, pp. 4316 – 4322, 2012.

LIMA, A. C. D. **Estudo comparativo da atividade antioxidante de plantas medicinais da caatinga utilizadas como antiinflamatórias**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, 2011.

LIMA- NETO, G. A.; KAFFASHI, S.; LUIZ, W.T.; FERREIRA, W. R.; DIAS, S. Y. S. A.; PAZIN, G. V.; VIOLANTE, I. M. P. **Quantificação de metabólitos secundários e avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de algumas plantas selecionadas do Cerrado de Mato Grosso**. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. p. 1069-1077, 2015.

LOPES, C.R.; ALMASSY, J. A. A.; ARMOND, C.; SILVA, F.; CASALI, V. W. D. **Folhas de chá**. Viçosa: UFV, 2005.

LOPES, C. G.; SANCHES, C. C. A.; DE TOLEDO, M. E.; ISLER, C. A.; DE MELLO, P. C. J. **Determinação quantitativa de taninos em três espécies de Stryphnodendron por cromatografia de alta eficiência**. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, P. 512, 2002.

LUNA, S. P. L. **Dor, analgesia e bem estar animal**. ANAIS - I Congresso Internacional de Conceitos em Bem-estar Animal, p. 16-18, 2006.

MARTINS, M. A.; DE CASTRO, B. L.; TONUSSI, C. R. **Formalin injection into knee joints of rats: pharmacologic characterization of a deep somatic nociceptive model**. J Pain. 7(2): 100 – 107, 2006.

MASTROCINQUE, S.; FANTONI T. D. **Modulação da resposta neuroendócrina à dor pós-operatória em cães**. Clínica Veterinária, n. 31, p. 25-29, 2001.

MESSLINGER, K. **What is a nociceptor?**. Anaesthesist, v. 46, n. 2, p. 142-53, 1997.

MICHELIN, D. C.; MORESCHI, P. E.; LIMA, A. C.; NASCIMENTO, G. G. F.; PAGANELLI, M. O.; CHAUD, M. V. **Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais**. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.15, n.4, p.316-320, 2005.

MILLAN, M. J. **Descending control of pain**. Prog Neurobiol 66(6): 355 – 474, 2002.

MONTEIRO, J. M.; DE ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L.; AMORIM, L.C. **Taninos: uma abordagem da química à ecologia**. Química Nova, v. 28, p. 892-896, 2005.

MONTEIRO, J. M.; DE ALBUQUERQUE, U. P.; LINS-NETO, E. M. F.; ARAÚJO, E. L.; ALBUQUERQUE, M. M.; AMORIM, E. L. C. **The effects of seasonal climate changes in the caatinga on tannin levels in Myracrodruon urundeuva (Engl.) Fr. All. And Anadenanthe racolubrine (Vell.) Brenan**. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.16, p. 338-344, 2006.

MORAIS, S. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; COSTA, S. M.; AGUIAR, L. A. **Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil**. Revista Brasileira de Farmacognosia, João Pessoa, v.19, n.1, p.315-320, jun./mar. 2009.

MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays**. Journal of Immunological Methods, v. 65, v. 1–2, p. 55–63, 1983.

MOURA, D. F.; ROCHA, T. A.; BARROS, D. M.; FERREIRA, S. A. O.; DA SILVA, M. B. **Estudo do efeito citotóxico de extratos orgânicos da catanduva frente a linhagens de células tumorais**. III Conbracis. Universidade Federal de Pernambuco, 2014.

MÜLLER, D. B. J.; **Avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e antinoceptiva das folhas da *Luehea divaricata* Martus**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, 2006.

MUELLER-HARVEY, I. **Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health**. Journal of the Science of Food and Agriculture [online], v.86, n.13, p.1097-0010, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.2577>. Acesso em: 09 ago. 2018.

MURRAY, R. P.; PFALLER, A. M.; ROSENTHAL, S. K. **Microbiologia Médica**. 7 ed. São Paulo, 2014.

- NASCIMENTO, L. K. A. **Atividade imunomoduladora de diferentes extratos obtidos da espécie *Plukenetia volubilis* Linneo (Euphorbiaceae stricto sensu)**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2017.
- OLIVEIRA, R. B.; NASCIMENTO, M. V. M.; VALADARES, M. C.; PAULA, J. R.; COSTA, E. A.; CUNHA, L. C. **Avaliação dos efeitos depressores centrais do extrato etanólico das folhas de *Synadenium umbellatum* Pax. e de suas frações em camundongos albinos**. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 44, n.3, p. 485-491, 2008.
- OLIVEIRA, R. C. **Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) em célula tumoral**. Tese de Doutorado, USP, 2009.
- OLIVEIRA, F.; AKISSUE, G.; AKISSUE, M. K. **Farmacognosia**. São Paulo: Atheneu, 412p, 2005.
- OLIVEIRA et al. **An ethnomedicinal survey on phytotherapy with professionals and patients from Care Units in the Brazilian Unified Health System**. Journal Ethnopharmacology;140(2):428-437, 2012.
- OMS, 2011. **Organização Mundial da Saúde**. Disponível em: <<http://www.who.int/en/>>. Acesso em 28 de setembro de 2018.
- OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R.L. **Development and validation of an improved oxygen absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe**. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49, 4619–4626, 2001.
- PATEL, N. B. **Guia para o tratamento da dor em contextos de poucos recursos: Fisiologia da Dor**. International Association for Study of Pain. p.9-13, 2010.
- PAULA, S. C. **Estudo Fitoquímico e Propriedades Biológicas das folhas de *Bauhinia unguolata* L., Fabaceae**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná, 2014.
- PENNINGTON, T. D. **The genus Inga Botany**. London, The Royal Botanic Gardens, Kew. 844 p., 1997.
- PISERA, D. **Fisiologia da dor. In: Dor Avaliação e Tratamento em Pequenos Animais**. São Paulo: Interbook, p. 30-74, 2005.
- PODSEDEK, A. **Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review**. LWT-Food Science Technology, v. 40, p. 1-11, 2007.
- POLETTO, P. O.; DINIZ, A. D.; BERNARDON, B.; ZAN, R. A.; RAMOS, L. J.; MENEGUETTI, D. U. O. **Análise da mutagenicidade do extrato hidrossolúvel de *Derris rariflora* (mart. ex benth. j. f. macbr: fabaceae), timbó amazônico, através do teste micronúcleo em *Allium cepa***. Revista Pesquisa & Criação, v.10, n.1, jan./jun. 2011.
- POMPEU, D. R.; ROGEZ, H.; MONTEIRO, K. M.; TINTI, S. V.; CARVALHO, J. E. **Capacidade antioxidante e triagem farmacológica de extratos brutos de folhas de *Byrsonima crossifolia* e de *Inga edulis***. Acta Amazônica. 42(1): 165-172, 2012.
- QUEIROZ, A. C. **The antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Piptadenia stipulacea* Benth (Fabaceae)**. Journal of Ethnopharmacology, v. 128, n. 2, p. 377-83, 2010.

- RABOISSON, P.; DALLEL, R. **The orofacial formalin test**. *Neurosci Biobehav Rev* 28(2): 219 – 226, 2004.
- RAMALHO, V. C.; JORGE, N. **Antioxidantes usados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos**. *Química Nova*, São Paulo, v.29, n.4, p. 755-760, jul./ago. 2006.
- RANDALL, L. O.; SELITTO, J. J. **A method for measurement of analgesic activity of inflamed tissue**. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 111(4): 409 – 419, 1957.
- RANDOLPH, B. C.; PETERS, M. A. **Analgesic effectiveness of ketorolac compared to meperidine in the rat formalin test**. *Anesth Prog*. 44(1): 11 – 16, 1997.
- RENAME. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais**. Disponível em <<http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/0DAF/RENAME2014ed2015.pdf>>. Acesso em 15 de outubro de 2018.
- RIBEIRO, C. S. P. **Determinação espectrofotométrica de flavonoides totais presente nas folhas de arruda (*Ruta graveolens*)**. Trabalho de Conclusão de Curso. Fundação Educacional do Município de Assis, 2014.
- RIEDEL, W.; NEECK, G. **Nociception, pain and antinociception: current concepts**. *Zeitschrift für Rheumatologie*, v. 60, n. 6, p. 404-495, 2001.
- RIO, R. G. W. **Métodos de controle químico de amostras de própolis**. Dissertação de mestrado; Universidade de São Paulo; São Paulo, 1996.
- RODRIGUES, E.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; PIRES, J. M. **Perfil farmacológico e fitoquímico de plantas indicadas pelos caboclos do Parque Nacional do Jaú (AM) como potenciais analgésicas. Parte I**. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2010.
- ROJAS, E.; LOPEZ, M. C.; VALVERDE, M. **Single cell gel electrophoresis: methodology and applications**. *Journal of Chromatography B*, v. 722, p. 225-254, 1999.
- SANTOS-MONTAGNER, G. F. F.; SAGRILLO, M.; MACHADO, M. M.; ALMEIDA, R. C.; MASTARDEIRO, C. P.; DUARTE, M. M. M. F.; CRUZ, I. B. M. **Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes**. *Toxicology In Vitro*. v. 24, p. 1410-1416, 2010.
- SANTOS, A. E.; JUNIOR, B. C. B.; KUSTER, R. M. **Flavonoides e atividade antioxidante das folhas de *Bauhinia longifolia* (Bong.) Steud.** *Revista Virtual de Química*, junho, 2017.
- SCHAIBLE, H. G. **Pathophysiology of pain**. *Orthopade*. v. 36, n. 1, p. 8-16, 2006.
- SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N.; **Anim. Feed Sci. Technol.** p. 91- 21, 2001.
- SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N. **Analysis of condensed tannins: a review**. *Animal Feed Science and Technology*, v. 92, p. 21-40, 2001.

SHINOHARA, N. K. S.; BARROS, V. B.; JIMENEZ, S. M. C.; MACHADO, E. C. L.; DUTRA, R. A. F.; FILHO, J. L. L. ***Samonella spp.*, importante agente patógeno veiculado em alimentos.** Revista Ciências & Saúde Coletiva, v. 13, n. 5, p. 1675-1683. 2008.

SILVA, E. M.; ROGEZ, H.; LARONDELLE, Y. **Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology.** Separation and Purification Technology, 55: 381-387, 2007.

SILVA, A. V. C.; OLIVEIRA, D. S. N.; YAGUIU, P.; CARNELOSSI, M. A. G.; MUNIZ, E. N.; NARAIN, N. **Temperatura e embalagem para abóbora minimamente processada.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 29, n. 2, p. 391-394, 2009.

SILVA, C. J.; SARAIVA, S. R.; DE OLIVEIRA, J.R.; ALMEIDA, G. R. **Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão.** Revista Brasileira de Farmácia, 2013.

SILVA, N. J. **Atividade antioxidante e citotóxica de extratos de plantas do semiárido brasileiro com potencial para desenvolvimento de fitoterápicos.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Piauí, 2015.

SIMÕES, R. C.; DE ALMEIDA, S. S. M. S. **Estudo fitoquímico de *Bauhinia forficata* (Fabaceae).** Biota Amazônia, 2011.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Florianópolis: UFSC, 2004.

SINGH, N.P.; MACCOY, M.T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E.L. **A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cell.** Experimental Cell Research, v. 175, p. 184-191, 1988.

SUS. **Sistema Único de Saúde.** Disponível em<<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/fitoterapianosus.pdf>> Acesso em 28 de janeiro de 2017.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J. e NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental.** 5 ed. Porto Alegre: Bookman (SBQ), 2002, p. 598-676.

SOBRINHO, G.C. A. **Estudo dos compostos bioativos de folhas de *Byrsonima crassifolia* e *Inga edulis*, visando à purificação e identificação.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pará. Belém, 2016.

SOUZA, J. N. S, SILVA, E. M.; SILVA, M. N; ARRUDA, M. S. P.; LARONDELLE, Y.; ROGEZ, H. **Identification and Antioxidant Activity of Several Flavonoids of *Inga edulis* Leaves.** Journal of Brazilian Chemical Society, v. 18, n. 6, p.1276-1280, 2007.

SOUSA, A. R.; RODRIGUES, R. O.; SANTIAGO, G. M.; DIAS, A. T. N.; CARVALHO, J. L.; YAOCHITE, J. N. U. **Avaliação da Citotoxicidade e do potencial antioxidante de *Bauhinia pulchella* em cultura de macrófagos murinos.** XXXVI Encontros Universitários da UFC. Universidade Federal do Ceará, 2017.

SROKA, Z.; CISOWSKI, W. **Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids**. Food and Chemical Toxicology, Amsterdam, v. 41, 753-758, 2003.

STASI, L. C. di. Arte, ciência e magia. In: STASI, L. C. di. (Org.). **Plantas medicinais: arte e ciência - um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Ed. UNESP, p. 15-22, 1996a.

STASI, L. C. di. Arte, ciência e magia. In: STASI, L. C. di. (Org.). **Conceitos básicos na pesquisa de plantas medicinais**. In: STASI, L. C. di. (Org.). *Plantas medicinais: arte e ciência - um guia de estudo interdisciplinar*. São Paulo: Ed. UNESP, p. 23-28, 1996b.

STASI, L. C. di. Arte, ciência e magia. In: STASI, L. C. di. (Org.). **A multidimensionalidade das pesquisas com plantas medicinais**. In: STASI, L. C. di. (Org.). *Plantas medicinais: arte e ciência - um guia de estudo interdisciplinar*. São Paulo: Ed. UNESP, p. 29-36, 1996c.

TICE, R. R.; ANDREWS, P. W.; HIRAI, O.; SINGH, N. P. **The single cell gel (SCG) assay: an electrophoretic technique for the detection of DNA damage in individual cells**. Advances in Experimental Medicine and Biology, v. 283, p. 157-164, 1991.

TITA B.; ABDEL-HAQ, H.; VITALONE, A.; MAZZANTI, G.; SASO, L. **Analgesic properties of *Epilobium angustifolium*, evaluated by the hot plate test and the writhing test**. Farmaco 56(5-7): 341-343, 2011.

TRANQUILLI, W. J. **Fisiologia da dor aguda**. In: GREENE, S. A. Segredos em anestesia veterinária e manejo da dor. Porto Alegre: Artmed, p. 399-402, 2004.

VALENTE, A. L. P.; COLLINS, C. H.; MANFREDI, J. E. **Conceitos básicos de cromatografia líquida de alta eficiência**. Química Nova, São Paulo, 1983, p.103-109.

WANG, W.; WU, N.; ZU, Y. G.; FU, Y. J. **Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main componentes**. Food Chemistry, Oxford, v.108, n.3, p.1019-1022, June, 2008.

WHITTLE, B. A. **The use of changes in capillary permeability in mice to distinguish between narcotic and nonnarcotic analgesics**. British Journal of Pharmacology, p. 246-253, 1964.

YAMAGUCHI, L. K. K. **Caracterização de substâncias fenólicas de resíduos de frutos amazônicos e avaliação para o uso biotecnológico**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Amazonas, 2015.

ZENI, A. L. B.; PARISOTTO, A. V.; MATTOS, G.; HELENA, E. T. **Utilização de plantas medicinais como remédio caseiro na Atenção Primária em Blumenau, Santa Catarina, Brasil**. Revista Ciência & Saúde Coletiva. Rio de Janeiro, 2015.

APÊNDICE

APÊNDICE A - MANUSCRITO 1.....	72
APÊNDICE B – MANUSCRITO 2.....	90

NOTA

Os manuscritos expostos a seguir foram elaborados seguindo as normas específicas das revistas as quais foram submetidos. O manuscrito 1 foi submetido na revista *Journal of Ethnopharmacology* e o manuscrito 2 foi submetido na revista *Food and Chemical Toxicology*.

MANUSCRITO 1**Phytochemical Study, Evaluation of Antioxidant Potential and Antimicrobial Activity of *Inga marginata* Willd Hydroalcohol Extract**

MAZIERO, M.¹; LOVATTO, M. O.¹; DORNELLES, R. C.²; LORENZONI, V. V.¹;
SAGRILLO, M. R.³; HORNER, R.⁴; MANFRON, M. P.⁴

¹Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil.

²Graduate Program in Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil.

³Teacher of the Franciscan University, Franciscan University, Santa Maria, Brazil.

⁴Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil.

maiaramazzerio@gmail.com

ABSTRACT

Medicinal plants have been used since antiquity to cure diseases. Even today, they are widely used by the population in a palliative way, for healing and also associated with conventional medicines. *Inga marginata* W. belongs to the family Fabaceae, genus *Inga*, has several popular nomenclatures such as Ingá and ingá-mirim, is a leguminous plant, with wide distribution in Latin America. It has several therapeutic actions, highlighting the antimicrobial and antioxidant potential. The objective of this work was to obtain the crude extract of the leaves of *I. marginata* by the maceration process, to determine the concentration of secondary metabolites (total polyphenols - 110,60 mg/g, flavonoids - 100,38 mg/g and tannins – 27,04 mg/g, gallic acid - 1,837 mg/g, epicatechin - 22.493 mg/g, rutine - 5.217 mg/g), as well as to evaluate the antioxidant potential of the extract by the method of DPPH (17,306 µg/mL), dichlorofluorescein diacetate (concentrations of 10 and 60 µg / mL presented the best results), ORAC (2952,944 µmol Trolox/g) and nitric oxide (best result for the concentration of 15 µg/mL). The antimicrobial activity of the extract was also evaluated against the following bacterial strains *S. aureus*, *B. cereus*, *E. aerogenes*, *S. epidermidis*, *M. luteus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella* and *P. aeruginosa* (128 µg/mL), *S. pneumoniae* (128 µg/mL), *M. luteus* (256 µg/mL), *E. faecalis* (128 µg/mL) and *S. aureus* 256 µg/mL). The above results of biological activities suggest the effective use of *I. marginata*.

Keywords: Crude Extract. Leaves of *I. marginata*. Phytochemical Characterization. Biological Activity.

1 Introduction

Medicinal plants are elements of biodiversity and, since the beginning of life on Earth, are used for the cure and treatment of various diseases. According to Lopes et al. (2005), medicinal plant is that which, administered to man or animal, in any way or way, exerts some type of therapeutic action.

Currently the plants are widely used by the population in a palliative way, for the cure and also associated with the conventional medicines. *Inga marginata* W. belongs to the family Fabaceae, genus *Inga*, has several popular nomenclatures such as *ingá* and *ingá-mirim*, is a plant with wide distribution in Latin America (LORENZI, 2002). *Inga marginata* has antidiarrheal, antioxidant, antimicrobial, antinociceptive and anti-inflammatory properties, among others (POMPEU et al., 2012).

With the increase of the microbial resistance to the most diverse antibiotics, the natural compounds appear as an alternative to this problematic. Plant antibiotics, with a chemical structure different from antibiotics derived from microorganisms, may act to regulate the intermediary metabolism of pathogens, blocking or activating enzymatic reactions and syntheses, or even altering the membrane structure. In addition, phytotherapies are low cost and can be used in conjunction with traditional medicine (CAPASSO et al., 2004).

Another important problem is associated with free radicals that are formed from the energy received by an extremely reactive atom, which loses an electron from its outermost layer, and because of this new configuration, it becomes chemically reactive. In general, free radicals act quickly, attacking other molecules and can also transform them into reactive species. The damage caused by these substances comes from the chemical reaction of oxidation, which results in so-called oxidative stress, causing various health hazards, such as aggression to proteins, carbohydrates, enzymes, DNA and lipid peroxidation. (CHLORELL, LEONARDI, SALGADO, 2007).

Thus, the search for substances with antioxidant capacity and antimicrobial activity is of paramount importance, since they are recurrent problems that directly affect the population. The extract of *I. marginata*, as well as other plant compounds, presents itself as an alternative to these problems.

2 Material and Methods

2.1 Obtention of the vegetable extract

Inga marginata was collected at the Federal University of Santa Maria (UFSM), at its headquarters campus, located in the city of Santa Maria, RS (geographical coordinates: altitude -29.7133 S and longitude -53.7059 W). The plant was identified by Dr. Renato Aquino Záchia of the Department of Biology, CCNE, UFSM. An exsicata of the species was deposited in the Herbarium of the Department of Biology under registration SMDB S13965.

The leaves were dried in a circulating air oven (45 °C) for seven days, and later ground in a knife mill. The extraction process occurred by maceration using 70% hydroalcoholic solution and a 1: 5 plant / solvent ratio. The hydroalcoholic extract was filtered and concentrated under low pressure in a rotary evaporator to remove all organic solvent. It was then lyophilized and a powder, the crude extract (EB), was obtained, which was duly conditioned and stored for further analysis.

2.2 Determination of secondary metabolites

2.2.1 Determination of total polyphenols

The determination of the total polyphenols content was performed according to the methodology proposed by Folin-Ciocalteu with modifications (CHANDRA; MEJIA, 2004). In the sample, previously diluted in water, Folin-Ciocalteu reagent was added, and then the solution was incubated in the dark for five minutes. At the end of this period, 20% sodium carbonate was added and further incubation was carried out in the dark for ten minutes. The absorbance readings were then read in a spectrophotometer using a wavelength of 760 nm. The concentration of the sample was 0.01%.

The total content of polyphenols is expressed in milligrams of gallic acid per gram of extract, which is calculated from the calibration curve of gallic acid using increasing concentrations of the standard.

2.2.2 Determination of flavonoids

The determination of flavonoids was performed according to Rio (1996). Samples were prepared at a concentration of 0.4% in methanol. As standard, 5% aluminum chloride was used as the reagent solution. The reading was performed in a spectrophotometer, at the wavelength of 425 nm. The total flavonoid content is expressed in milligrams of routine equivalents per

gram of extract, which is calculated from the calibration curve of the routine using increasing concentrations of the standard.

2.2.3 Tannin determination

The tannin content was obtained by the vanillin method, following a methodology proposed by Agostini-Costa et al. (1999). As standard the catechin was used as the reagent and the vanillin 4%. The sample was prepared in a concentration of 0.4% using 20% methanol and 1% hydrochloric acid as solvents and then incubated at room temperature and under light protection for eight hours. Subsequent to this pre-preparation of the sample, 4% vanillin solution reagent was added and the sample was again incubated for fifteen minutes. After that, the spectrophotometer readings were performed, with a wavelength of 490 nm. The total tannin content was expressed in milligrams of equivalent catechin per gram of extract.

2.3 Identification and quantification of active substances in vegetable extracts by high efficiency liquid chromatography (HPLC)

A qualitative and quantitative analysis of phenolic compounds was carried out using the High Performance Liquid Chromatography method (CLAE) coupled to a diode detector (DAD), following a methodology proposed by Evaristo and Leitão (2001), with adaptations. A liquid chromatograph (SHIMADZU, Kyoto/Japan), pump compound model LC-20AT, automatic injector SIL-20A, DAD SPD-M20A detector and CBM 20 communicator, controlled by LC SP1 Software was used. The analytical column was Shim-pack CLC-ODS (M), reverse phase, with C 18 silica stationary phase, 5 μm diameter particle, 4.6 mm X 150 mm dimensions. Gradient elution occurred at a flow rate of 0.9 mL / min using as mobile phase acetic acid 2% in ultrapure water.

Samples were prepared at the concentration of 10 mg / mL, the injection volume being 40 μL and the detection monitored in a photodiode system between 230-400 nm for 55 minutes.

For the quantification of the identified substances curves of the standard substances were made using the concentrations of 200, 100, 50, 35, 25, 10 and 5 μg / mL. The contents of each pattern present in the sample were calculated according to the area under the curve.

2.4 Determination of antioxidant potential of *I. marginata*

2.4.1 DPPH radical sequestration assay

The evaluation of the antioxidant activity by the photocolometric method of DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) follows the methodology of Choi et al. (2002). Solutions of 200; 100; 50; 25; 12.5; 6.25; 3.125; 1.5625 $\mu\text{g} / \text{mL}$ extract and standard (ascorbic acid) in ethanol. A 0.03 mM solution of DPPH in ethanol was also prepared using amber glass volumetric flask.

In test tubes, 1 mL of the 0.03 mM DPPH solution in ethanol and 2.5 mL of the diluted samples were added. After 30 minutes in dark environment, the absorbances were measured in a spectrophotometer at 518 nm. As white extract was used without addition of DPPH. For the negative control, 1 mL of the DPPH solution and 2.5 mL of ethanol in a test tube. The technique was performed in triplicate.

The percent inhibition of the DPPH moiety by the samples is calculated according to the formula

$$\% \text{ Inhibition} = 100 - [(\text{Sample Abs} - \text{White Abs}) \times 100 / \text{Abs. Negative control}]$$

2.4.2 Dichlorofluorescein diacetate test (DCFH-DA)

The dichlorofluorescein diacetate test uses the 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate reagent (DCFH-DA), following the methodology proposed by Esposti et al. (1999). This compound has the ability to permeate the cell membrane when deacetylated by mitochondrial enzymes, resulting in 2', 7'-dichloro-dihydrofluorescein that reacts with reactive oxygen species (EROs), mainly hydrogen peroxide (H_2O_2), producing 2', 7'-dichlorofluorescein, which emits fluorescence.

A standard curve at concentrations of 0.4; 1.0; 2.0; 4.0 and 8.0 μM was prepared using 96-well Elisa plate and TRIS HCl reagents (10 mM) pH 7.4, DFC (10 μM) and DCFH-DA (0.1 mM). To prepare the sample, 100 μL of the crude extract, 130 μL of TRIS HCl solution (10 mM) pH 7.4 and 20 μL of DCFH-DA (0.1 mM) were pipetted. The assay was performed in triplicate. After one hour of rest in the dark and at room temperature a spectrofluorimeter reading was performed.

Fluorescence was determined based on the excitation wavelengths (488nm) and emission wavelengths (525nm) in the spectrofluorimeter. The higher the emitted fluorescence, the greater the number of reactive oxygen species.

2.4.3 Radical oxygen absorption capacity (ORAC)

The oxygen radical absorbability (ORAC) assay is based on the extent of the elimination capacity of free radicals, mainly peroxy radicals, by the plant extract. The assay was performed according to OU et al. (2001). 25 µl of the crude extract diluted in ethanol and phosphate buffer pH 7.4 (10 mg / L) or 25 µl of 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox standard used in the experiment - Sigma Aldrich, USA) on microplate. 150 µL of fluorescein solution (indicator) and 25 µL of 2,2'-azobis-2-amidinopropane dihydrochloride (AAPH - peroxy radical generator - Sigma Aldrich, USA) were added to the standard and the sample and then incubated for 10 minutes at 37 °C. Fluorescence was then measured every minute (wavelengths of 485 nm and 528 nm for excitation and emission, respectively) at 37 °C for 70 minutes in a SpectraMax® M5 microplate reader (Molecular Devices, California, USA).

Antioxidant activity was determined using area under the curve (AUC) and the results were compared with a reference Trolox standard curve (0 - 96 µmol L⁻¹) and expressed as µmol Trolox/g sample. The AUC is given by the following formula

$$AUC = 1 + \frac{f_1}{f_0} + \frac{f_2}{f_0} + \frac{f_3}{f_0} + \dots + \frac{f_n}{f_0}$$

At where:

f_n = fluorescence in one reading cycle (1 min);

f_0 = fluorescence at time zero.

2.4.4 Nitric oxide testing

The nitric oxide test detects the presence of organic nitrite in the samples. Nitrite is detected and analyzed by the formation of pinkish color when the Griess reagent is added to samples containing NO₂. The sulfanilamide of the Griess reagent is responsible for the nitrite diazonium formation of the sample. When the azo compound (N-1-naphthylenediamine-bichlorohydrate) interacts with the diazonium salts, the pink color appears in the sample.

After incubation of the treatments, the culture dish was centrifuged and the supernatant was separated for the assay. Then 100 µL of the respective supernatants from the tests were transferred to another 96-well plate. Then, 100 µl of the Griess reagent was incorporated into the supernatant. This reagent is composed of 1: 1 (v/v) solution I (Sulfanylamide 1%) + solution

II (N-1-naphthylethyldiaminohydrochloride). The plates were left at room temperature for 15 minutes for further spectrophotometer reading at 540 nm absorbance. The results were calculated as a percentage of the negative control.

2.5 Evaluation of the antimicrobial activity of the extract of *I. marginata* through the minimum injectory concentration (MIC)

To achieve the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) following the CLSI, 2015, 16,38 mg of the *I. marginata* extract was weighed and diluted in 1 mL of absolute ethanol, obtaining an initial concentration of 16,38 mg/mL. Then, bacterial suspension was prepared on the Mc Farland 0.5 scale, in a tube containing 0.9% saline solution, with the aid of a spectrophotometer (absorbances ranging from 0.08 to 0.1). 40 μ L of the inoculum was transferred to the test tube containing 3960 μ L of Muller-Hinton broth.

In a 96-well Elisa plate, 100 μ L of Muller-Hinton broth were added to wells P1 to P8. In the well P1 were also added 50 μ L of the diluted extract. Serial dilutions were thus initiated to well P8, finally discarding 100 μ L. 100 μ L of inoculum was added to all wells, obtaining a final concentration of 2048 μ g/mL in well P1; 1024 μ g/mL in P2; 512 μ g/mL in P3; 256 μ g/mL in P4; 128 μ g/mL in P5; 64 μ g/mL in P6; 32 μ g/mL in P7 and 16 μ g/mL in P8.

For the negative control, 200 μ L of Muller-Hinton broth was used. In the positive control, 100 μ L of Muller-Hinton broth and 100 μ L of inoculum were added. For control of the extract, 100 μ L of Muller-Hinton broth and 100 μ L of extract were used. For both controls the same dilutions were made with the sample.

3 Results and discussion

3.1 Determination of secondary metabolites

The following secondary metabolites were quantified in the *Inga marginata* hydroalcoholic extract: total polyphenols, flavonoids and tannins. From the calibration curve and the equations of the straight lines of the standards were measured the quantities of each metabolite present in the sample. The following table demonstrates these results.

Table 1: Polyphenols, flavonoids and tannins contents in the hydroalcoholic extract of *I. marginata*.

Extract of <i>I. marginata</i>	Total polyphenols (mg/g)	Flavonoids (mg/g)	Tannins (mg/g)
Gross Extract of leaves	110,60	100,38	27,04

The hydroalcoholic extract of *I. marginata* showed a higher concentration of total polyphenols, flavonoids and tannins, respectively. To date there are no studies evaluating the content of these secondary metabolites in this species. For this reason, the results obtained were compared with other species of the same genus or of the same botanical family.

Furtado (2014) researching the raw extract of the leaves of *Inga laurina* obtained concentrations of total polyphenols of 255,38 mg / g, a value slightly higher, when compared to the one obtained in this work. Research conducted by Sobrinho (2016), using crude extract of *Inga edulis* verified a higher concentration of total polyphenols (59.49 mg/g). In a study developed with the residual ethanolic fraction of *Bauhinia unguolata*, performed by Paula (2014), a total polyphenol content of 658 mg/g was obtained.

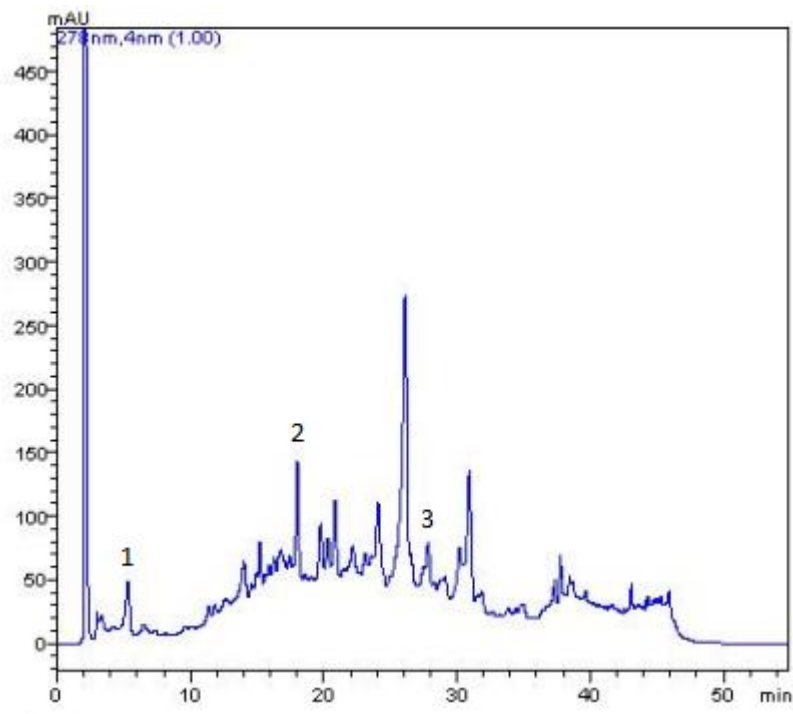
These differences in the levels of secondary metabolites can be attributed to the lack of similarity of the genus (in the case of *Bauhinia unguolata*) and the species. Even when the results are compared with the same plant, there may be divergences in values, since several factors affect the concentration of these metabolites in plants. These parameters interfere in these levels: collection site, collection period, soil constituents, technique used to prepare the plant extract, method used to quantify these metabolites, among others.

3.2 Identification and quantification of active substances in vegetable extracts by high efficiency liquid chromatography (HPLC)

Using the High Performance Liquid Chromatography (HPLC), the following compounds were identified in the crude extract of *I. marginata*: gallic acid, epicatechin and rutin, all phenolic substances.

The figure below shows the chromatogram obtained, identifying the peaks of the identified substances.

Figure 1- Chromatogram identifying the phenolic substances gallic acid, epicatechin and rutin in the crude extract of *I. marginata*.



1: gallic acid peak; 2: epicatechin peak; 3: rutin peak.

The identified substances were also quantified. The following table shows the results obtained.

Table 2 - Quantification of rutin, epicatechin and gallic acid in the hydroalcoholic extract of *I. marginata*.

Substance Identified	Content (mg/g)
Rutin	5,217
Epicatechin	22,493
Gallic acid	1,837

These values demonstrate that the pattern present at the highest concentration in the crude extract of *I. marginata* is epicatechin, followed by rutin and gallic acid. These compounds are related to the biological activities attributed to *I. marginata*. This action may be due to one

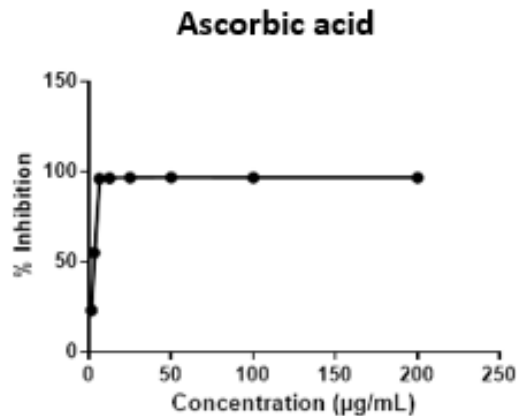
of these substances or the synergism of actions, as well as the association of the activities of these compounds with others not identified in the trial.

3.3 Determination of antioxidant potential of *I. marginata*

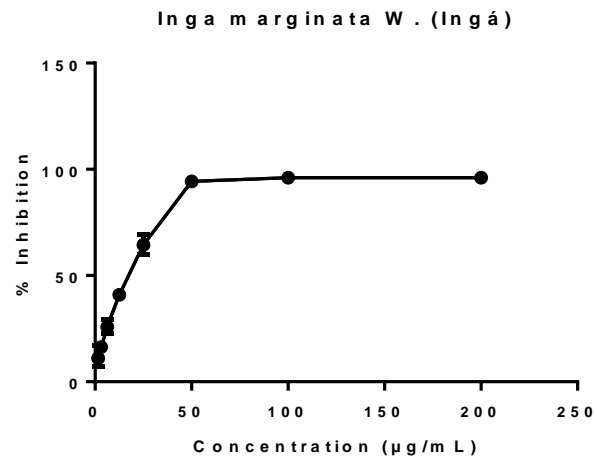
3.3.1 DPPH radical sequestration assay

The antioxidant potential was analyzed by the ability of the sample to sequester free radical DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). From the construction of the calibration curve for DPPH and standard (ascorbic acid) the IC₅₀ (inhibitory concentration capable of sequestering 50% of the DPPH radical) of the standard and *I. marginata* crude extract were calculated.

Graph 1- Graph that relates the percentage of inhibition of the DPPH radical with the concentration of the standard responsible for this inhibition.



Graph 2- Graph that relates the percentage of inhibition of the DPPH radical with the concentration of *I. marginata* extract responsible for this inhibition.



Thus, the table below demonstrates the results obtained in this test.

Table 3 - Results of the DPPH test for the standard and the sample.

Substance Analyzed	IC ₅₀ (µg/mL)
Ascorbic acid (standard)	3,423
<i>Inga marginata</i> (sample)	17,306

The lower the IC₅₀ the higher the antioxidant capacity of the sample. Considering this concept, it can be observed that the crude extract of *I. marginata* presents a good antioxidant potential.

In a study conducted by Furtado (2014) with raw extract of the leaves of *Inga lauriana*, a value of 10.43 µg/mL was obtained for its IC₅₀, a result close to that found in the present study. The same assay was performed for the ethyl acetate and butanolic fractions of *Baunhinia longifolia* (Fabaceae), also obtaining similar results for IC₅₀ (21,2 µg/mL and 16,1 µg/mL, respectively) (SANTOS, JUNIOR; KUSTER, 2017).

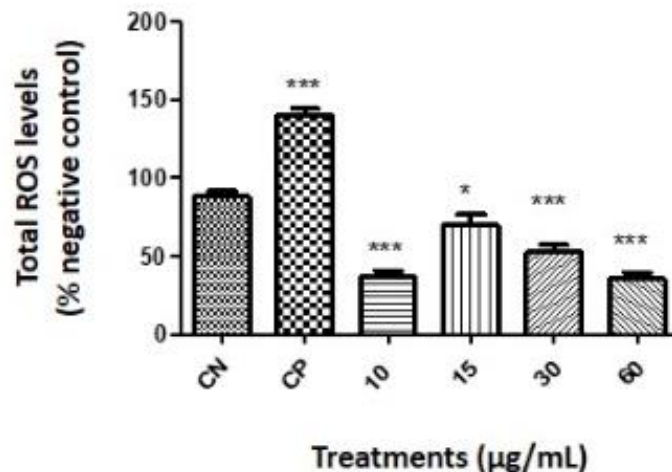
Thus, it can be concluded in general that plants of the genus *Inga* and Fabaceae family present a good antioxidant potential possibly due to the presence of phenolic compounds.

3.3.2 Dichlorofluorescein diacetate test (DCFH-DA)

The dichlorofluorescein diacetate test (DCFH-DA) evaluates the antioxidant capacity of compounds. For this assay, sample concentrations of 10, 15, 30 and 60 $\mu\text{g/mL}$ were used.

The figure below shows the results obtained.

Figure 2 - DCFH-DA assay for the crude extract of *I. marginata*.



DCFH-DA assay after 24 h of incubation. The results were expressed as a percentage of the negative control (100%). With CN being the negative control: cells in culture medium. Data were expressed as mean \pm standard deviation (SD). The analyzes were performed by variance (ANOVA) of 1-way, followed by Dunnett's post hoc test. Values with $p < 0.05$ were considered statistically significant. Being * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. CN: negative control (viable cells + culture medium) and CP: positive control (viable cells + hydrogen peroxide + culture medium).

Observing figure 2, it can be noticed that all the concentrations of the extract tested presented a satisfactory result, being better than the negative control itself. It should be noted that the concentrations of 10 and 60 $\mu\text{g/mL}$ presented the best results for the antioxidant potential. These results are called hormones because they do not follow a ratio (higher concentration - greater action). Thus, concentrations of 10 and 60 $\mu\text{g/mL}$ presented antioxidant capacity for similar ROS.

In a study carried out by Yamaguichi (2015) with Amazonian fruits rich in phenolic compounds, samples of bacuri and piquia were prepared in the concentration of 20 $\mu\text{g/mL}$, being able to inhibit the formation of these reactive species from 79 to 84%. These results are similar to those obtained in the present study, since a concentration close to the sample was used and the results were promising. However, a better correlation can not be made, because

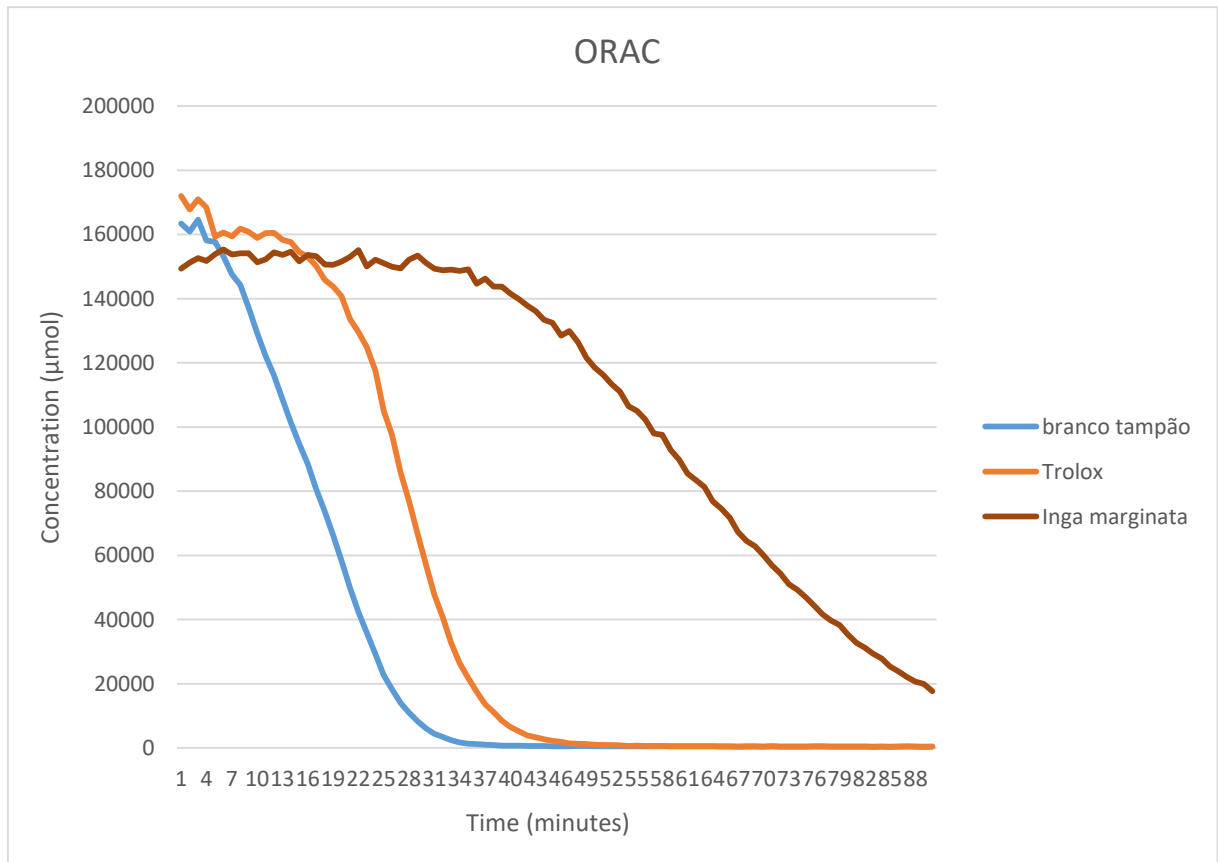
no studies were found using this methodology with plants of the same genus or of the same *I. marginata* family.

3.3.3 Radical Oxygen Absorption Capacity (ORAC)

The ORAC method evaluates the potential of substances to absorb oxygen radicals. Typically, fluorescein is used as a fluorescence marker, measuring the reduction of fluorescence emission in the presence of a radical producer, such as, for example, AAPH (2,2-azobis (2-amidinopropane) dichloride) (ALVES et al., 2010).

The following graph illustrates the decay of fluorescein for the sample (crude extract of *I. marginata*) correlating with the Trolox standard and white.

Graph 3- Decay of fluorescein for the crude extract of *I. marginata*.



From the above graph and formula $AUC = 1 + \frac{f_1}{f_0} + \frac{f_2}{f_0} + \frac{f_3}{f_0} + \dots + \frac{f_n}{f_0}$ the following result was obtained for the ORAC technique:

Table 4- Evaluation of the antioxidant potential by the ORAC method.

<i>Antioxidant Potential</i>	
Sample	ORAC (µmol Trolox/g)
Gross extract of <i>I. marginata</i>	2952, 944

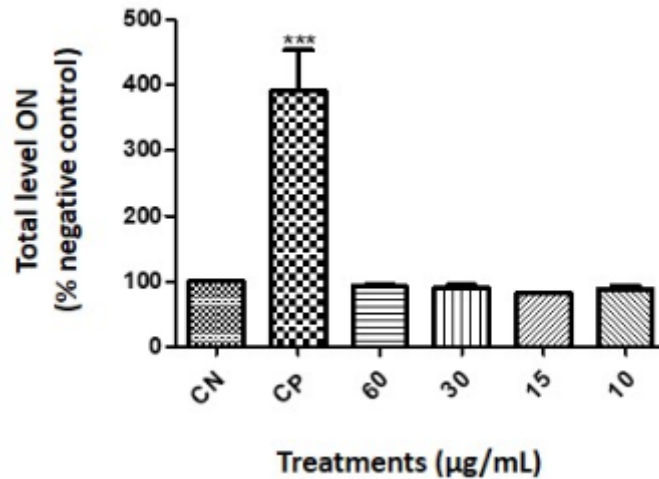
Analyzing the results obtained, it can be verified that the crude extract of *I. marginata* presents a significant antioxidant capacity against ROS. In a study by Sobrinho (2016), an ORAC value of 942 µmol Trolox/g was obtained for the *Inga edulis* species. Comparing the two results, the highest antioxidant capacity of *I. edulis* was verified. These differences may possibly be related to the method of extraction, purification and way of expressing the results obtained, besides that it is not the same botanical species.

3.3.4 Nitric oxide testing

The nitric oxide test evaluates the ability of compounds to inhibit the production of reactive nitrogen species. For this, four different concentrations of the crude extract (10, 15, 30 and 60 µg/mL) were used to evaluate this potential.

The figure below shows the results obtained for the test.

Figure 3- Nitric Oxide Assay for the crude extract of *I. marginata*.



ON assay after 24 h of incubation. The results were expressed as a percentage of the negative control (100%). With CN being the negative control: cells in culture medium. Data were expressed as mean \pm standard deviation (SD). The analyzes were performed by variance (ANOVA) of 1-way, followed by Dunnett's post hoc test. Values with $p < 0.05$ were considered statistically significant. Being * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. CN: negative control (viable cells + culture medium) and CP: positive control (viable cells + hydrogen peroxide + culture medium).

Analyzing figure 3, it can be observed that all tested concentrations of the extract were efficient in combating the production of reactive nitrogen species. As the concentrations of 60, 30 and 10 $\mu\text{g/mL}$ presented similar results to the negative control, and the concentration of 15 $\mu\text{g/mL}$ presented an even better activity when compared to the control. These results also follow hormone, because correlation is not observed, higher concentration, greater effect.

In a study by De Sousa et al. (2017) extract of *Bauhinia pulchella* (Fabaceae) at concentrations of 62,5; 31,25; 15,6 and 7,8 $\mu\text{g/mL}$ showed a significant reduction in the production of nitric oxide. Correlating the results obtained with these, it can be verified that there is similarity in the tested concentrations, botanical family and results.

Research developed by Nascimento (2017) with crude extract and fractions of *Plukenita volubilis* (Euphorbiaceae) at the concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$ also showed promising activity. When comparing these results with those obtained in the present study, it can be observed that the extract of *I. marginata* presents a potential of capturing nitrogen radicals greater than the other plants, thus demonstrating its promising use.

3.4 Evaluation of the antimicrobial activity of the extract of *I. marginata* through the minimum injectory concentration (MIC)

From the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) the antimicrobial activity of the crude extract of *I. marginata* was determined.

The table below shows the results obtained in the test.

Table 5- Results of the *I. marginata* extract for MIC.

Bacteria analyzed	ATCC	MIC ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	128
<i>Bacillus cereus</i>	14579	512
<i>Enterobacter aerogenes</i>	21/10/15	512
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	128
<i>Micrococcus luteus</i>	7468	256
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	128
<i>Escherichia coli</i>	25922	1024
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	700603	256
<i>Salmonella</i>	52117	512
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	1024

It was observed that the crude extract presented activity for all the bacterial strains tested, and the best results were obtained for *S. aureus*, *S. epidermidis*, *M. luteus* and *K. pneumoniae*, with the lowest bactericidal concentrations. The antimicrobial activity of the *I. marginata* extract can be attributed to the presence of flavonoids, which have hydroxyl phenolic groups that have affinity for proteins and, therefore, act as inhibitors of bacterial enzymes, altering their synthesis pathways. Another possible mechanism of action would be associated with the replacement of the set of flavonoid rings with prenyl groups, generally carried out in order to increase lipophilicity, thus increasing antibacterial activity through interaction with cell membranes (LI et al., 2012).

4 Conclusion

The results obtained demonstrate that the hydroalcoholic extract of *Inga marginata* can be an important bactericidal alternative, in view of the growth of the bacterial resistance to several antibiotics available in the market and the positive results for diverse bacterial strains tested. Similarly, its antioxidant power also demonstrated was satisfactory, being able to capture reactive species of oxygen and reactive species of nitrogen, proven by several in vitro tests. Thus, the use of this plant species as antioxidant and antimicrobial compound can be suggested.

5 References

AGOSTINI-COSTA, T. S.; GARRUTI, D. S.; LIMA, L.; FREIRE, S.; ABREU, F. A. P.; FEITOSA, T. **Avaliação de metodologias para determinação de taninos no suco de caju.** Boletim CEPPA, Curitiba, v. 17, n. 2, p. 167-176, 1999.

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

CAPASSO, F.; GAGINELLA, T. S.; GRANDOLINI, G.; IZZO, A. A. **Phytoterapy: a quick reference to herbal medicine.** Berlin: Springer, 424p, 2004.

CHANDRA, S.; MEJIA, E. G. **Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinonereductase activity of an aqueous extract of Ardisia compressa in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas.** Journal of Agriculture and Food Chemistry, n. 52, p. 3583-3589, 2004.

CHOI, C. W.; KIM, S. C.; HWANG, S. S.; CHOI, B. K.; AHN, H. J.; LEE, M. Y.; PARK, S. H.; KIM, S. K. **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.

CHORILLI, M.; LEONARDI, G. R.; SALGADO, H. R. N. **Radicais livres e antioxidantes: conceitos fundamentais para aplicação em formulações farmacêuticas e cosméticas.** Revista Brasileira de Farmacognosia, João Pessoa, v. 88, n. 3, p. 113-118, jul./set. 2007.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. CLSI. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically.** Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; M7-A6, 2015.

DE SOUSA, B. J. M. **Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de extratos padronizados de *Caesalpinia ferrea* (jucá) e *Brosimum gaudichaudii* (inharé).** Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica de Goiás, 2017.

ESPOSTI, M. D.; HATZINISIRIOU, I.; MCLENNAN, H.; RALPH, S. **Bcl-2 and mitochondrial oxygen radicals. New approaches with reactive oxygen species sensitive probes.** J. Biol. Chem., 274: 29831-29837, 1999.

EVARISTO I. M.; LEITÃO M. C. **Identificação e quantificação por DAD-HPLC da fração fenólica contida em folhas de *Quercus suber* L.** Silva Lusitana 9: 135-141, 2001.

FURTADO, B. F. **Estudo químico, análise do óleo essencial e atividades biológicas de *Inga laurina* Willd.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia, 2014.

LI, Y.; LUO, Y.; HU, Y.; ZHU, D. D.; ZHANG, S.; LIU, Z. J.; GONG, H. B.; ZHU, H. L. **Design, synthesis and antimicrobial activities of nitroimidazole derivatives containing 1,3,4-oxadiazole scaffold as FabH inhibitors.** Bioorganic and Medicinal Chemistry, 20, pp. 4316 – 4322, 2012.

LOPES, C. R.; ARMOND, C.; SILVA, F.; CASALI, V. W. D. **Folhas de chá.** Viçosa: UFV, 2005.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas.** Nova Odessa: Instituto Plantarum, P. 512, 2002.

NASCIMENTO, L. K. A. **Atividade imunomoduladora de diferentes extratos obtidos da espécie *Plukenetia volubilis* Linneo (Euphorbiaceae stricto sensu).** Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2017.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R.L. **Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe.** Journal of Agricultural and Food Chemistry 49, 4619–4626, 2001.

PAULA, S. C. **Estudo Fitoquímico e Propriedades Biológicas das folhas de *Bauhinia unguolata* L., Fabaceae.** Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná, 2014.

POMPEU, D. R.; ROGEZ, H.; MONTEIRO, K. M.; TINTI, S. V.; CARVALHO, J. E. **Capacidade antioxidante e triagem farmacológica de extratos brutos de folhas de *Byrsonima crossifolia* e de *Inga edulis*.** Acta Amazônica. 42(1): 165-172, 2012.

RIO, R. G. W. **Métodos de controle químico de amostras de própolis.** Dissertação de mestrado; Universidade de São Paulo; São Paulo, 1996.

SANTOS, A. E.; JUNIOR, B. C. B.; KUSTER, R. M. **Flavonoides e atividade antioxidante das folhas de *Bauhinia longifolia* (Bong.) Steud.** Revista Virtual de Química, junho, 2017.

SOBRINHO, G. C. A. **Estudo dos compostos bioativos de folhas de *Byrsonima crassifolia* e *Inga edulis*, visando à purificação e identificação.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pará. Belém, 2016.

YAMAGUCHI, L. K. K. **Caracterização de substâncias fenólicas de resíduos de frutos amazônicos e avaliação para o uso biotecnológico.** Tese de Doutorado. Universidade Federal do Amazonas, 2015.

MANUSCRITO 2**Evaluation of toxicity and antinociceptive activity of *Inga marginata* W. hydroalcoholic extract**

MAZIERO, M.¹; LOVATTO, M. O.¹; DOLESKI, P. H.²; COSSETIN, J. F.³; SAGRILLO, M. R.⁴; LEAL, D. R. B.⁵; MANFRON, M. P.⁶

¹Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil.

²Graduate Program in Toxicological Biochemistry, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil.

³Graduate Program in Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil.

⁴Teacher at the Franciscan University, Franciscan University, Santa Maria, Brazil.

^{5,6} Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil.

maiaramazzerio@gmail.com

ABSTRACT

The use of medicinal plants occurs from the beginnings of life on Earth and, even today, its use is very widespread because the knowledge is transmitted from generation to generation. *Inga marginata* W. belongs to the family Fabaceae, genus *Inga*, has several popular nomenclatures such as Ingá and ingá-mirim, is a leguminous plant, with wide distribution in Latin America. It has several therapeutic actions like antimicrobial, analgesic, anti-inflammatory and antioxidant. The objective of the present study was to obtain the crude extract of *I. marginata* leaves by the maceration process, to evaluate the cytotoxicity and genotoxicity of the extract, as well as to determine antinociceptive activity in vivo. Through MTT (cytotoxicity) and Comet (genotoxicity) assays, it was demonstrated that *I. marginata* extract is non-toxic at the cellular and DNA levels. The antinociceptive test was performed using the acetic acid-induced abdominal writhing method, evaluating the concentrations of 100, 250 and 500 mg/kg of plant extract. In this assay the analgesic effect of the sample was confirmed, and all the concentrations tested reduced the nociception, emphasizing the concentration of 100 mg/kg, which reduced nociception by 100%. In this way, the use of *Inga marginata* can be suggested in a safe and effective way.

Keywords: Crude Extract. Nociception. Evaluation of Toxicity.

1 Introduction

From the beginnings of life on Earth, man makes use of elements of nature to treat and cure the various diseases that afflict him. Medicinal plants are one of these elements and, still today, are widely used by the population, passing knowledge about their use from generation to generation (STASI, 1996a).

Phytotherapy is a therapy characterized by the use of medicinal plants in their different pharmaceutical forms, without the use of isolated active principles. Medicinal plant is characterized as a plant species used for the purpose of prevention, treatment and cure of symptoms and diseases (STASI, 1996b). *Inga marginata* W. belongs to the family Fabaceae, genus *Inga*, has several popular nomenclatures such as *ingá* and *ingá-mirim*, is a plant with wide distribution in Latin America (LORENZI, 2002). *Inga marginata* has antidiarrheal, antioxidant, antimicrobial, antinociceptive, anti-inflammatory properties, among others (POMPEU et al., 2012).

Cytotoxicity and Genotoxicity studies play an important role in the development of new drugs and should be performed at the beginning of the process in order to obtain new active compounds with lower toxicity. Genotoxic agents have the ability to alter DNA replication and genetic transmission (GOLLAPUDI, KRISHNA, 2000, HARTMANN et al., 1997). However, cytotoxicity is related to the intrinsic capacity of a material to promote metabolic alteration in cells in culture, and may or may not culminate in cell death (OLIVEIRA, 2009).

Among the biological activities of *I. marginata*, the antinociceptive activity stands out, being its use by the population an alternative for the consumption of commercial analgesics. Thus, it is essential to evaluate the toxicity of this species and its antinociceptive power in vivo.

2 Material and Methods

2.1 Obtention of the vegetable extract

Inga marginata was collected at the Federal University of Santa Maria (UFSM), at its headquarters campus, located in the city of Santa Maria, RS (geographical coordinates: altitude -29.7133 S and longitude -53.7059 W). The plant was identified by Dr. Renato Aquino Záchia of the Department of Biology, CCNE, UFSM. An exsiccata of the species was deposited in the Herbarium of the Department of Biology under registration SMDB S13965.

The leaves were dried in a circulating air oven (45 °C) for seven days, and later ground in a knife mill. The extraction process occurred by maceration using 70% hydroalcoholic solution and a 1: 5 plant / solvent ratio. The hydroalcoholic extract was filtered and concentrated under low pressure in a rotary evaporator to remove all organic solvent. It was then lyophilized and a powder, the crude extract (EB), was obtained, which was duly conditioned and stored for further analysis.

2.2 Toxicity assessment

2.2.1 Evaluation of cytotoxicity by MTT assay

The MTT assay was performed according to a protocol described by Mossman (1983). In the MTT assay, water-soluble and yellow-colored 3- [4,5-dimethyl-thiazol-2-yl] -2,5-diphenyltetrazolium bromide reagent was incorporated into viable cells after incubation. The plates were homogenized and kept in an oven at 37 °C with 5% CO₂ for 4 hours. The mitochondrial activity of viable cells reduces this compound through the enzyme succinate dehydrogenase. Upon being reduced, the MTT is converted into formazan blue crystals, which are insoluble in water and are blue-purple in color. The blue form, stored in the cytoplasm of the cell, was resuspended with the addition of 200 µL of DMSO and quantified colorimetrically by spectrophotometry at the wavelength of 570 nm. The absorbance value obtained was proportional to the number of viable cells in comparison to the negative control.

Four concentrations of the *I. marginata* extract (60, 30, 15 and 10 µg/mL) selected from the extract IC₅₀ result were tested.

2.2.2 Evaluation of genotoxicity through the comet assay

The comet assay was performed according to the protocol of Singh et al. (1988). In a glass slide, previously covered with a 5% agarose layer, the sample was suspended in low melting point agarose. The material was immersed in lysis solution, for the removal of membranes and cytoplasm from the cells. The slides were then incubated in alkaline electrophoresis buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA in distilled water), and then electrophoretic run for 30 minutes at 25 V and 300 mA. Subsequently, the neutralization, fixation and staining processes were performed for further analysis of the genetic material.

2.3 Evaluation of the antinociceptive activity of the vegetable extract

Thirty adult Wistar rats (220g-280g) were used, from the UFSM Central Animal Hospital and duly approved by the Ethics Committee on Animal Use, with project registered under the number CEUA No. 9666180118. These were divided into five groups with six rats in each group, kept in a light-dark cycle of 12 hours each, with free access to food and water.

The nociception test was performed according to a methodology adapted from Koster et al. (1959). Nociception was induced 60 minutes after administration of the controls and extract concentrations tested by intraperitoneal injection of 450 μ L of 1.2% acetic acid solution. The nociceptive indication was determined by the number of abdominal muscle contractions associated with hind limb elongation and was observed over a period of 30 minutes. The animals were pretreated with vehicle (10 mL/kg, oral), crude extract at three different concentrations (100 mg/kg, 250 mg/kg and 500 mg/kg orally) with the diclofenac sodium positive control (100 mg/kg, orally) 60 minutes prior to intraperitoneal injection of acetic acid.

3 Results and discussion

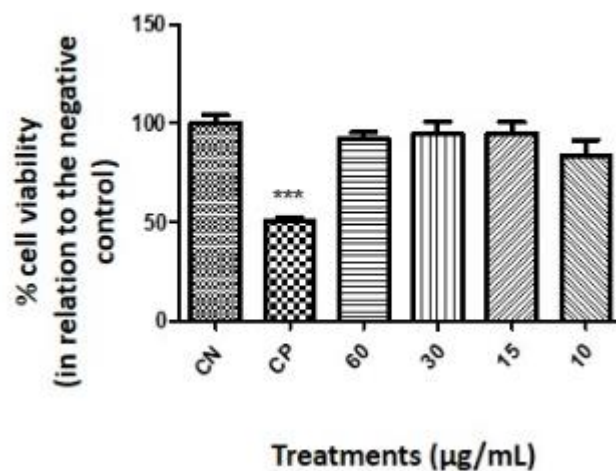
3.1 Evaluation of vegetable extract toxicity

3.1.1 Evaluation of cytotoxicity by MTT assay

The MTT assay was performed to evaluate the cytotoxicity of the hydroalcoholic extract of *I. marginata*. For this, four different concentrations of the plant extract (10, 15, 30 and 60 μ g/mL) were tested. These were determined from the plant IC_{50} result ($IC_{50} = 17.306 \mu$ g / mL).

Figure 1 shows the results obtained in this assay.

Figure 1- MTT Assay Result (cell viability assessment) for the crude extract of *I. marginata*.



MTT assay after 24 h of incubation. The results were expressed as a percentage of the negative control (100%). With CN being the negative control: cells in culture medium. Data were expressed as mean \pm standard deviation (SD). The analyzes were performed by variance (ANOVA) of 1-way, followed by Dunnett's post hoc test. Values with $p < 0.05$ were considered statistically significant. Being * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. CN: negative control (viable cells + culture medium) and CP: positive control (viable cells + hydrogen peroxide + culture medium).

All the concentrations of the extract tested showed results close to the negative control, not affecting the cellular viability, that is, they were not cytotoxic.

In a study conducted by Arini (2010) using crude ethanolic extract of *Bauhinia rufa* (Fabaceae) at 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, no cytotoxicity was observed. The same was reported by Moura et al. (2014), cytotoxicity was not observed in the concentrations of hexane, methanolic, ethanolic and ethyl acetate of *Piptadenia moniliformis* (Fabaceae) at 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

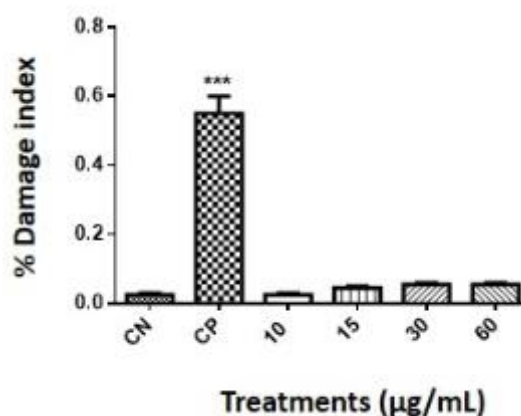
3.1.2 Evaluation of genotoxicity through the comet assay

The Comet Assay was performed to evaluate the ability of the *I. marginata* extract to cause damage at the DNA level. For this, four different concentrations of the plant extract (10, 15, 30 and 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$) obtained from the plant IC_{50} were used.

The Comet assay has been widely used to assess genetic damage induced by potentially genotoxic substances. Rapid and sensitive testing is a tool for diagnostic, therapeutic and toxicological genetics studies, as well as being one of the tests carried out in the pharmaceutical industry to investigate new drugs (OLIVEIRA, 2012).

Figure 2 shows the results obtained in this test.

Figure 2- Comet assay for evaluation of genotoxicity of *I. marginata* extract.



Comet assay after 24 h of incubation. The results were expressed as a percentage of the negative control (100%). With CN being the negative control: cells in culture medium. Data were expressed as mean \pm standard deviation (SD). The analyzes were performed by variance (ANOVA) of 1-way, followed by Dunnett's post hoc test. Values with $p < 0.05$ were considered statistically significant. Being * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. CN: negative control (viable cells + culture medium) and CP: positive control (viable cells + hydrogen peroxide + culture medium).

Analyzing figure 2, it can be seen that all tested concentrations of the crude extract showed no significant DNA damage. Among the concentrations, 10 $\mu\text{g/mL}$ stands out, which presented the best result, coming even closer to the negative control.

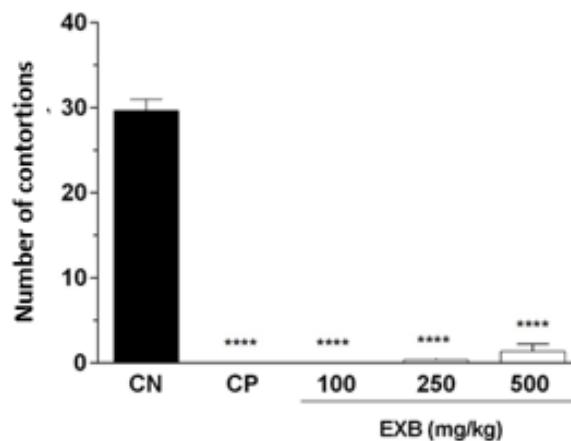
A study carried out by Silva (2015) in *Mimosa caesalpinifolia* extract (Fabaceae) at 10, 25 and 50 $\mu\text{g/mL}$ showed genotoxic potential only at the highest concentration. The concentrations mentioned above were close to or equal to those used for the *I. marginata* extract. Thus, we can observe that *I. marginata* presents a greater safety for use, considering that, in all the concentrations analyzed, there was no damage at the DNA level.

3.2 Evaluation of antinociceptive activity

There are many methodologies capable of evaluating antinociceptive activity in vivo. The technique of abdominal contortions induced by acetic acid, performed in the present study, was chosen because it is a general model for the study of antinociceptive drugs, being widely used to evaluate peripheral antinociceptive activity (DU et al., 2007).

The figure below illustrates the results obtained in the present work.

Figure 3- Antinociceptive test of abdominal contortions induced by acetic acid.



CN: controle negativo; CP: controle positivo; EXB: extrato bruto.

Analyzing figure 3, it can be observed that all tested concentrations of the extract were effective in the reduction of nociception, emphasizing the concentration of 100 mg/kg, which totally inhibited nociception at the "n" and time evaluated. The above result follows hormone, ie the concentration is not directly proportional to the effect.

It may be suggested that *I. marginata* extract has antinociceptive activity of short duration, since the evaluation time was 30 minutes. This biological activity has been related to the presence of polyphenols and flavonoids in the crude extract. Flavonoids are associated with the antinociceptive effect by inhibiting COX, LOX, glutathione S-transferase, NADPH oxidase, microsomal monooxygenases and mitochondrial succinoxide (ODONTUYA et al., 2005).

4 Conclusion

The evaluation of the toxicity of a product, be it of vegetal or synthetic origin is of paramount importance, so that it can guarantee the safety of the same and the studies can advance. The results obtained demonstrate that the hydroalcoholic extract of *Inga marginata* does not present toxicity at both the cellular and the DNA levels.

The vegetal extract can also be an alternative in the relief of pain, since it presented very promising results. Considering also that the analgesics present in the market have several adverse effects linked to the product, the search for new compounds with this activity is of paramount importance.

Thus, the results obtained in this study are promising, however complementary tests to confirm this activity should be performed.

5 References

GOLLAPUDI, B. B.; KRISHNA, G. **Practical aspects of mutagenicity testing strategy: an industrial perspective.** Mutation Research, v. 455, p. 21-28, 2000.

HARTMANN, A.; SPEIT, G. **The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (Comet assay).** Toxicology Letters, v. 90, p. 183-188, 1997.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DeBEER, E. J. **Acetic acid for analgesic screening.** Federation Proceedings 18: 418-420, 1959.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas.** Nova Odessa: Instituto Plantarum, p. 512, 2002.

MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** Journal of Immunological Methods. v. 65, v. 1-2, p.55-63, 1983.

OLIVEIRA, R. C. **Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) em célula tumoral.** Tese de Doutorado, USP, 2009.

POMPEU, D. R.; ROGEZ, H.; MONTEIRO, K. M.; TINTI, S. V.; CARVALHO, J. E. **Capacidade antioxidante e triagem farmacológica de extratos brutos de folhas de *Byrsonima crossifolia* e de *Inga edulis*.** Acta Amazônica. 42(1): 165-172, 2012.

STASI, L. C. di. Arte, ciência e magia. In: STASI, L. C. di. (Org.). ***Plantas medicinais: arte e ciência - um guia de estudo interdisciplinar.*** São Paulo: Ed. UNESP, p. 15-22, 1996a.

STASI, L. C. di. Arte, ciência e magia. In: STASI, L. C. di. (Org.). **Conceitos básicos na pesquisa de plantas medicinais.** In: STASI, L. C. di. (Org.). *Plantas medicinais: arte e ciência - um guia de estudo interdisciplinar.* São Paulo: Ed. UNESP, p. 23-28, 1996b.

SINGH, N. P.; MACCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. **A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cell.** Experimental Cell Research, v. 175, p. 184-191, 1988.