



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS DO
SEMIÁRIDO**

ANILSON JOSÉ DE SOUZA

**Estudo fitoquímico e atividade biológica *in vitro* de
Cnidoscolus urens L. (Arthur) (EUPHORBIACEAE)**

Petrolina – PE

2014

ANILSON JOSÉ DE SOUZA

**Estudo fitoquímico e atividade biológica *in vitro* de
Cnidoscolus urens L. (Arthur) (EUPHORBIACEAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Vale do São Francisco, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Semiárido, para obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida.

Petrolina – PE

2014

Souza, Anilson José de

Estudo fitoquímico e atividade biológica *in vitro* de *Cnidoscolus urens* L. (Arthur) (EUPHORBIACEAE)/ Anilson José de Souza– Petrolina, 2014.

Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais do Semiárido) – Universidade Federal do Vale do São Francisco. Recursos Naturais do Semiárido, Campus Petrolina, Petrolina, 2014.

Orientador: Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida

1. *Cnidoscolus* 2. Atividade biológica *in vitro* 3. Estudo fitoquímico. I. Título II. Universidade Federal do Vale do São Francisco.

**Estudo fitoquímico e atividade biológica *in vitro* de
Cnidoscolus urens L. (Arthur) (EUPHORBIACEAE)**

Aprovado em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. MARCELO CAVALCANTE DUARTE
(Universidade Federal de Sergipe)
Examinador Externo

Prof. Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida.
(Universidade Federal do Vale do São Francisco)
Orientador

Prof. Dra. XIRLEY PEREIRA NUNES (UNIVASF)
(Universidade Federal do Vale do São Francisco)
Examinador Interno

Dedico esta obra àqueles que não acreditavam que eu conseguiria. Pois, todos os demais sabiam de minha capacidade.

AGRADECIMENTOS.

Em primeiro lugar a Deus por ter me reconstituído a saúde e me dado força e sabedoria para chegar até aqui. Sem sua presença nada disso seria possível, principalmente nos maiores obstáculos pude perceber que a fé me fez forte para superá-los.

A toda minha família, que sempre me mostrou o melhor lado da vida, obrigado pelos ensinamentos.

Aos meus pais, Anibal Mendonça de Souza (*in memoriam*) e Maria José de Araújo Souza, sempre serei grato por ter chegado até aqui.

À minha irmã Ana Maria José de Souza, que sempre esteve junto comigo nos momentos bons e ruins.

À minha esposa Luciana de Barros França Souza que sempre esteve ao meu lado me dando apoio e incentivo para que eu pudesse superar os obstáculos, não foram poucos, e realizar mais este sonho.

Ao meu filho, Luiz Henrique de Barros França Souza e a minha Filha Maria Clara de Barros França Souza, que me acompanharam nesta caminhada com muita paciência, carinho e sempre me faziam sorrir, mesmo nos momentos difíceis.

À Eliane de Barros Formiga França, minha sogra, por ter segurado a barra durante os períodos que precisei e nunca ter me deixado abater.

À minha tia Maria Aurelina de Araújo, por ter contribuído com os meus estudos quando eu ainda era criança e por me fazer acreditar que com estudo podemos vencer.

Ao Magnífico Reitor Prof^o. Dr. Juliane Tolentino de Lima e ao Vice Reitor Prof^o. Dr. Têlio Nobre Leite pelo apoio institucional.

À Prof^a. Dra. Monica Tomé e ao Prof^o. Dr. Leonardo Sampaio pelas palavras de incentivo e carinho.

Aos amigos Agnos Adriano e Agilson Souza pelo apoio moral e logístico sempre que precisei.

Aos Amigos Airton de Deus, Natália Micheli, Marcos Antonio, Maria Olívia, José Eduardo, Filipe Aléssio, Jailton Ferrari, Ernani Freitas, Amanda Barbosa, Alessandro Moisés, Marcelo Reis, Platini Fonseca, Domingos Brandão Leoni Bagaggi, Cátia Rodrigues e Sirleide Santanna pelos conselhos e força durante todo ou parte do caminho percorrido até aqui.

Ao Prof^o. Dr. Wagner Pereira Felix, por ter estado sempre à disposição para contribuir com a conquista deste título e por ter acreditado em mim mesmo quando eu pensava que fracassaria.

Ao Prof^o. Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida por ter aberto as portas do laboratório de Bioquímica e assumido a minha orientação no momento mais difícil deste processo.

Às amigas Amanda Leite e Ana Paula Oliveira pelo apoio técnico, moral e emocional nas horas que precisei.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais do Semiárido pelas informações compartilhadas durante minha formação, disponibilidade e atenção.

Ao HVASF, em especial ao Duílio Paulino de Souza, pela identificação botânica, e preparação da exsicata.

À amiga Camila Araújo pelos inúmeros gestos e palavras de carinho e preocupação.

Aos amigos da pós-graduação pelo tempo que deixaram de realizar seus trabalhos para me dar alguns minutos de atenção e dividirem comigo informações e amizade, Edja, Camila, Juliane, Maria de Fátima, Roniere e Eugênio.

Aos amigos, Juninho, Grasielly e Pedro, que conviveram comigo no laboratório de Bioquímica incentivando-me e compartilhando comigo todo o arcabouço teórico-prático que possuíam meu muito obrigado.

Aos amigos Núcleo de Estudos e Pesquisas de Plantas Mediciniais (NEPLAME), pelo auxílio nos experimentos realizados e amizade.

Àqueles que esqueci de agradecer por falha na memória, sintam-se todos agradecidos.

À Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF e ao CNPq, pela estrutura física e apoio financeiro à realização da pesquisa.

RESUMO

O presente trabalho descreve os resultados obtidos a partir do estudo químico e biológico do extrato etanólico bruto e suas frações, obtidas através de partição líquido-líquido do extrato etanólico bruto, obtido das partes aéreas de *Cnidoscolus urens*, espécie popularmente conhecida como cansanção no semiárido nordestino, e pertencente à família Euphorbiaceae. A triagem fitoquímica preliminar do extrato etanólico bruto e suas frações permitiu caracterizar fitoquimicamente a espécie *Cnidoscolus urens*, constatando a presença de metabólitos secundários comuns no gênero, tais como, taninos, cumarinas, lignanas, monoterpenos, diterpenos, esteroides e flavonoides. A presença de compostos fenólicos como os flavonoides, taninos e cumarinas no extrato etanólico e fases, direcionou a pesquisa no caminho de avaliarmos sua atividade antioxidante, antimicrobiana, fotoprotetora e citotóxica. A avaliação da atividade antioxidante apresentou resultado satisfatório para as fases hexânica e hexano/acetato de etila para o ensaio do DPPH. Na atividade antibacteriana, o extrato e suas frações apresentaram bons resultados para as cepas Gram-positivas e Gram-negativas. Contudo, as frações hexânica e hexano/acetato de etila foram as que apresentaram melhor ação bacteriostática e bactericida. Na avaliação da atividade fotoprotetora, os resultados mostraram que a fração acetato de etila foi a que apresentou melhor resultado, porém a ação fotoprotetora fora observada para a mais alta concentração testada e, desta forma, não existe segurança na utilização da mesma como agentes fotoprotetores. No que se refere à atividade citotóxica, apenas o extrato etanólico bruto foi avaliado, e embora a literatura indique o uso da espécie para o tratamento de tumores, os resultados encontrados indicaram pouca ou nenhuma atividade antitumoral frente às linhagens testadas – OVAR-8, SF-295 e HCT-116. Desta forma, considerando que as frações acetato de etila e hexano/acetato de etila apresentaram relevante atividade antioxidante, que o extrato etanólico bruto e suas frações apresentaram importante ação antibacteriana, que a fração acetato de etila apresentou ação fotoprotetora e que o extrato etanólico bruto não apresentou atividade citotóxica significativa, a pesquisa continuará a fim de se testar as frações hexânica, hexano/acetato de etila e acetato de etila quanto à sua citotoxicidade bem como se proceder ao isolamento e à identificação dos constituintes químicos majoritários presentes nas frações e no extrato etanólico bruto.

Palavras-chave: Euphorbiaceae. *Cnidoscolus urens*. Estudo químico. Atividade biológica.

ABSTRACT

The current piece of research describes the results from the chemical and biological study of the crude ethanol extract and its fractions, obtained from the liquid-liquid partition of the crude ethanol extract from the aerial parts of the *Cnidoscolus urens*, species popularly known as spurge nettle in the northeastern semi-arid region, and belonging to the Euphorbiaceae family. The preliminary phytochemical screening of the crude ethanol extract and its fractions enabled to characterize phytochemically the *Cnidoscolus urens* species, by realizing the presence of common secondary metabolites in the gender, such as tannins, coumarins, lignans, monoterpenes, diterpenes, steroids and flavonoids. The presence of phenolic compounds as the flavonoids, tannins and coumarins in the ethanol extract and the phases led the research so as to evaluate their antioxidant, antimicrobial, photoprotective and cytotoxic activity. The evaluation of the antioxidant activity presented satisfactory results for the hexane and hexane/ethyl acetate phases for the DPPH assay. In the antibacterial activity, the extract and its fractions presented good results for the Gram-positive and Gram-negative strains. Nevertheless, the hexane fractions and the ethyl hexane/acetate were the ones which presented better bacteriostatic and bactericidal action. In evaluating the photoprotective activity, the results showed that the ethyl acetate fraction was the one which presented the best result; however, the photoprotective action was observed for the highest tested concentration and, in this way, there is no safety in using it as photoprotective agents. With reference to the cytotoxic activity, only the crude ethanol extract was evaluated; and, though the literature suggests the use of the species for the tumor treatment, the results indicated little or no antitumor activity regarding the tested strains - OVAR-8, SF-295 and HCT-116. Hence, taking into account that the ethyl acetate and the ethyl acetate /hexane fractions presented a relevant antioxidant activity, that the crude ethanol extract and its fractions presented an important antibacterial action, that the ethyl acetate fraction did not present photoprotective action and that the crude ethanol extract did not present meaningful cytotoxic activity, the research will be continued in order to have the hexane, ethyl acetate / hexane and ethyl acetate fractions tested as concerns their cytotoxicity as well as to carry out isolation and identification of the major chemical constituents present in the fractions and in the crude ethanol extract.

Keywords: Euphorbiaceae. *Cnidoscolus urens*. Chemical study. Biological activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Ilustração da Caatinga	18
Figura 02: Nova delimitação do semiárido brasileiro	23
Figura 03: Estrutura da cucurbitacina	25
Figura 04: Estrutura prostratin	25
Figura 05: Parâmetros morfológicos de <i>Cnidocolus urens</i> (L.) Arthur	29
Figura 06: Estrutura do xochitloldione	30
Figura 07: Estrutura do isoxochitlolone	30
Figura 08: Estrutura do germanicol	31
Figura 09: Estrutura do lupeol	31
Figura 10: Estrutura da β -amirina	31
Figura 11: Estrutura do acetato de lupeol	31
Figura 12: Estrutura do acetato de germanicol	31
Figura 13: Estrutura da β -amirina cinamato	31
Figura 14: Estrutura química de antioxidantes sintéticos	34
Figura 15: Estrutura química de antioxidantes naturais	34
Figura 16: Reação de ácido gálico com o íon molibdênio componente do reagente Folin-Ciocalteu	36
Figura 17: Formação do complexo flavonoide-Al, em solução metanólica de cloreto de alumínio	37
Figura 18: Estrutura das formas radicalar e não radicalar do DPPH	39
Figura 19: Estabilização do radical ABTS ⁺ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio	41
Figura 20: Representação da penetração cutânea dos raios solares	43
Figura 21: Secagem de <i>C. urens</i>	50
Figura 22. Esquema da metodologia utilizada na avaliação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	59
Figura 23: Reação de ácido gálico com o íon molibdênio componente do reagente Folin-Ciocalteu	64
Figura 24: Formação do complexo Flavonoide-Al, em solução metanólica de cloreto de alumínio	66
Figura 25: Perfil de absorção espectrofotométrica do extrato e fases de <i>Cnidocolus urens</i>	70

Figura 26: Fator de proteção solar <i>in vitro</i> para extrato e fases de <i>C. urens</i>	71
Figura 27: Atividade antimicrobiana do extrato etanólico e fases de <i>Cnidocolus urens</i>	73

LISTA DE TABELAS E FLUXOGRAMAS

Tabela 01: Caracterização fitoquímica de quatro espécies de <i>Cnidoscolus</i>	27
Tabela 02: Sistemas de eluição e reveladores utilizados para caracterizar os principais metabólitos secundários da espécie <i>Cnidoscolus urens</i> (L.) Arthur	53
Tabela 03: Função produto constante usado no calculo do FPS espectrométrico	61
Tabela 04: Perfil fitoquímico cromatográfico do extrato etanólico bruto (EEB) e fases obtidas por partição líquido-líquido do EEB	63
Tabela 05: Teor de compostos fenólicos presentes no EEB e fases obtidas por partição líquido-líquido do EEB de <i>Cnidoscolus urens</i>	65
Tabela 06: Teor de flavonoides presentes no EEB e fases obtidas por partição líquido-líquido do EEB de <i>Cnidoscolus urens</i>	67
Tabela 07: Atividade antioxidante <i>in vitro</i> do extrato etanólico bruto e fases obtidas por partição líquido-líquido do EEB de <i>Cnidoscolus urens</i>	67
Tabela 08: Tipo de radiação intensamente absorvida pela maior concentração do extrato e das fases de <i>Cnidoscolus urens</i>	71
Tabela 09: FPS calculado para os extratos na concentração de 100 mg/L, e para os padrões na concentração de 10 mg/L	71
Tabela 10: Valores de CIM e CBM para o extrato e fases de <i>C. urens</i>	72
Tabela 11: Valores de percentual de inibição de crescimento (%IC) para o EEB	74
Fluxograma 01: Obtenção e fracionamento do EEB	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

CBM: Concentração bactericida mínima

CIM: Concentração inibitória mínima

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

CLAE-DAD: Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector na região do UV com arranjos de diodos

DAD: Detector de arranjo de diodos (Diode Array Detector)

ERNs: Espécies reativas de nitrogênio

FPS: Fator de proteção solar

EROs: Espécies reativas de oxigênio

NCCLS: National Committee of clinical Laboratory Standards

AcOEt: Fase acetato de etila de *Cnidocolus urens*

Hex: Fase hexânica de *Cnidocolus urens*

Hex/AcEOt: Fase hexano/acetato de etila de *Cnidocolus urens*

EEB: Extrato etanólico bruto de *Cnidocolus urens*

Al: alumínio

UFC: Unidades formadoras de colônias

UV: Ultravioleta

OBS: as abreviaturas e os símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	21
2.1. Objetivo Geral	21
2.2. Objetivos Específicos	21
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	23
3.1. O semiárido brasileiro e a Caatinga	23
3.2. A família Euphorbiaceae	24
3.3. O gênero <i>Cnidoscolus</i>	26
3.4. A espécie <i>Cnidoscolus urens</i>	29
3.5. Oxidação, radicais livres, antioxidante, compostos fenólicos e atividade antioxidante	32
3.6. O uso de métodos espectrofotométricos na quantificação de compostos fenólicos bem como, na avaliação da atividade antioxidante e fotoprotetora <i>in vitro</i>	35
3.7. Considerações sobre atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	45
3.8. Considerações sobre atividade citotóxica <i>in vitro</i>	48
4. PARTE EXPERIMENTAL	51
4.1. Coleta e identificação do material botânico	51
4.2. Processamento do material botânico	51
4.3. Obtenção e fracionamento do extrato etanólico bruto de <i>Cnidoscolus urens</i> (EEB)	51
4.4. Avaliação fitoquímica preliminar	53
4.5. Determinação do teor de fenóis totais	54
4.6. Determinação do teor de flavonoides totais	54
4.7. Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	54
4.7.1. Ensaio do sequestro do radical livre DPPH	55
4.7.2. Teste da inibição da co-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico	56
4.7.3. Método do sequestro do radical ABTS	57
4.8. Determinação da atividade antimicrobiana <i>In vitro</i>	57
4.9. Determinação da atividade citotóxica <i>in vitro</i>	59
4.10. Atividade fotoprotetora <i>in vitro</i>	60
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	63
5.1. Avaliação fitoquímica preliminar	63

5.2. Fenóis totais, flavonoides totais e avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	64
5.3. Atividade fotoprotetora <i>in vitro</i>	69
5.4. Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	72
5.5. Atividade citotóxica <i>in vitro</i> do EEB	74
6. CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS	78
APÊNDICE	93

1. Introdução

1. Introdução

O hábito de recorrer às virtudes curativas de certos vegetais, pode se afirmar que se trata de uma das primeiras manifestações do antigüíssimo esforço do homem para compreender e utilizar a natureza como réplica a uma das suas mais antigas preocupações, a que é originada pela doença e pelo sofrimento (BARRACA; MINAMI, 1999). Para Viegas et al. (2006) a utilização de produtos naturais através da ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de tentativa de cura utilizada pela humanidade em sua história.

Segundo Barreiro e Bolzani (2009) plantas, fungos, insetos, organismos marinhos e bactérias são fontes importantes de substâncias biologicamente ativas, que podem ser utilizadas na síntese e descoberta de novos fármacos. Porém, durante algum tempo, foram realizados investimentos elevados na preparação de produtos sintéticos visando reduzir a relevância de organismos vivos como fontes de novos bioprodutos com atividade biológica (BRAZ-FILHO, 2010).

Nos últimos anos, os organismos vegetais como fontes produtivas de substâncias anticancerígenas e outras atividades biológicas reativaram interesses sociais e econômicos (BRAZ-FILHO, 2010) e recentemente, mostrou-se que 50% dos medicamentos aprovados entre 1981 e 2006, pelo FDA, são direta ou indiretamente derivados de produtos naturais (FERREIRA; PINTO, 2010).

As chances de se obter novas entidades químicas de plantas são reais, uma vez que estas apresentam uma enorme complexidade química, adquirida durante seu processo evolutivo (FERREIRA; PINTO, 2010). Os metabólitos secundários são biossintetizados para atuarem na defesa das plantas e, conseqüentemente, também podem alcançar alvos terapêuticos de doenças humanas (FERREIRA; PINTO, 2010). No entanto, a concentração, existência e qualidade dos produtos secundários nas plantas é frequentemente afetada por fatores bióticos e abióticos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Pois, os vegetais respondem a estímulos ambientais bastante variáveis, de natureza física, química ou biológica. Fatores como fertilidade e tipo do solo, umidade, radiação solar, vento, temperatura e poluição atmosférica, dentre outros, podem influenciar e alterar a composição química dos vegetais. Além desses, há interações e adaptações co-evolutivas complexas, que se produzem entre planta – planta, planta – animal e planta – microorganismo de um dado ecossistema (ALVES, 2001).

Segundo Barreiro e Bolzani (2009) as atividades de bioprospecção, visando à descoberta de produtos naturais e análogos a partir de nossa biodiversidade, devem ser estimuladas. Haja vista que o Brasil hospeda entre 15 e 20% de toda a biodiversidade mundial e que sua biodiversidade é fonte de substâncias biologicamente ativas, sendo considerado o maior do planeta em número de espécies endêmicas (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

A biodiversidade brasileira encontra-se distribuída nos biomas: Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal, Caatinga e Pampa. Henfil marcou a Caatinga, com o seu traço, como sendo uma área seca e quente, com uma vegetação formada por cactos e arbustos contorcidos, onde apenas lagartos correm assustados de um lugar para outro.



Esta imagem, por vez, não faz justiça à rica biodiversidade do bioma Caatinga. Biodiversidade essa fundamental para o equilíbrio econômico da população local com seu potencial forrageiro, frutífero, medicinal, madeireiro e faunístico (SCHOBER, 2002).

Figura 1: Ilustração da Caatinga (Desenho de Percy Lau)

Para Leal et al. (2003) a Caatinga é o bioma brasileiro menos estudado, embora seja o principal ecossistema da região Nordeste, tenha seus limites inteiramente restritos ao território nacional e possua plantas endêmicas que são importantes fontes de recursos naturais. Neste sentido, a biodiversidade da Caatinga necessita de investimento em pesquisa, para que se possam conhecer melhor suas bases e desta forma, se desenvolver ações que vislumbre não só o seu aproveitamento econômico, mas também, a preservação de sua biodiversidade (LOIOLA et al., 2012).

Assim, investimento em pesquisa que visem à busca de novos fármacos naturais com ação antioxidante, fotoprotetora, antitumoral e antimicrobiana podem contribuir para um uso sustentável do bioma Caatinga.

Souza, A. J. Estudo fitoquímico e atividade biológica *in vitro* de *Cnidoscolus urens* L. (Arthur) (EUPHORBIACEAE).

Neste sentido, sendo a família Euphorbiaceae uma das famílias mais representativas da Caatinga, com indicação de boa atividade antioxidante pelo fato de serem ricas em flavonoides (SÁTIRO; ROQUE, 2008) e sendo o gênero *Cnidoscolus*, pertencente à citada família, estudado quanto à sua atividade antimicrobiana e antioxidante, o presente estudo mereceu nossa atenção e dedicação. O presente trabalho foi desenvolvido buscando contribuir para o estudo quimiotaxonômico do gênero *Cnidoscolus*, através do estudo fitoquímico da espécie *Cnidoscolus urens*, da avaliação das atividades fotoprotetora, antioxidante, citotóxica e antimicrobiana *in vitro* da espécie.

2. Objetivos

2. Objetivos

2.1 – Objetivo geral

Contribuir para o estudo fitoquímico do gênero *Cnidoscolus*, através do estudo fitoquímico da espécie *Cnidoscolus urens*, além de avaliar as atividades: antioxidante, antimicrobiana, fotoprotetora e citotóxica *in vitro* da espécie.

2.2 – Objetivos específicos

- Analisar a fitoquímica da espécie *Cnidoscolus urens*;
- Determinar o teor de fenóis totais e flavonoides totais no extrato etanólico bruto e nas fases hexânica, hexânica/acetato de etila (1:1) e acetato de etila;
- Avaliar as atividades: antioxidante, fotoprotetora, citotóxica e antimicrobiana *in vitro* do extrato etanólico bruto e das fases hexânica, hexânica/acetato de etila (1:1) e acetato de etila;
- Contribuir para a fitoquímica da família Euphorbiaceae e do gênero *Cnidoscolus* bem como para a fitoquímica de espécies dessa família.

3. Fundamentação teórica

3. Fundamentação Teórica

3.1 – O Semiárido brasileiro e a Caatinga

O semiárido brasileiro é a região inserida na área de atuação da antiga Superintendência de Desenvolvimento do Nordeste - SUDENE, com precipitação pluviométrica média anual igual ou inferior a 800 mm (oitocentos milímetros), definição estabelecida pela portaria da SUDENE (inciso IV do art. 5 do Capítulo II Dos Beneficiários). De acordo com esta definição a região semiárida brasileira compreendia uma área de 892.309,4 km². Contudo, com a atualização do mapa geográfico e social do semiárido brasileiro em 10 de março de 2005 a região semiárida passou a compreender uma área de 969.589,4 km².



Figura 2: Nova delimitação do semi-árido brasileiro (Fonte M.I)

Esta nova área é resultante do trabalho do Grupo de Trabalho Interministerial (GTI) para delimitação do novo semiárido brasileiro que atualizou os critérios de seleção dos municípios que compõem o semiárido brasileiro, onde atualmente para fazer parte desta região os municípios precisam apresentar precipitação pluviométrica média anual igual ou inferior a 800 milímetros; ou ter índice de aridez de até 0,5 calculado pelo balanço hídrico que relaciona as precipitações e a evapotranspiração potencial, no período entre 1961 e 1990; ou ter risco de seca maior que 60%, tomando-se por base o período entre 1970 e 1990 (MI, 2005).

Caatinga, bioma genuinamente brasileiro que ocupa uma área de 844.453 Km², o equivalente a 11% do território nacional. Estando presente nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Piauí, Sergipe e o norte de Minas Gerais. Rico em biodiversidade, o bioma abriga

178 espécies de mamíferos, 591 de aves, 177 de répteis, 79 espécies de anfíbios, 241 de peixes e 221 abelhas. Cerca de 27 milhões de pessoas vivem na região, a maioria carente e dependente dos recursos do bioma para sobreviver. A Caatinga tem um imenso potencial para a conservação de serviços ambientais, uso sustentável e bioprospecção que, se bem explorado, será decisivo para o desenvolvimento da região e do país. A biodiversidade da Caatinga ampara diversas atividades econômicas voltadas para fins agrosilvopastoris e industriais, especialmente nos ramos farmacêutico, de cosméticos, químico e de alimentos (MMA, 2002).

3.2 – A Família Euphorbiaceae

A família Euphorbiaceae está entre as famílias de maior importância econômica entre as Angiospermas e encontra-se representada, nas regiões tropicais e temperadas de todo o planeta (SÁTIRO; ROQUE, 2008), especialmente nos continentes americano e africano, com exceção para poucos gêneros extratropicais (WEBSTER, 1994).

Euphorbiaceae merece destaque entre as Angiospermas por abrigar 6.300 espécies reunidas em 245 gêneros (GOVAERTS et al., 2000). Compreende um dos grupos taxonômicos mais complexos e morfologicamente diversos entre as Eudicotiledôneas (JUDD et al., 1999, SOLTIS et al., 2005, SIMPSON, 2006).

Registrada como importante grupo de plantas do semiárido nordestino (ARAÚJO et al. 1995, ALCOFORADO FILHO et al. 2003, ANDRADE et al. 2004, SÁTIRO; ROQUE, 2008), embora possua representantes em todos os diferentes tipos de vegetação do país. Apresenta grande número de espécies endêmicas na Caatinga, cerca de 17 espécies segundo Sampaio et al. (2002) e recentemente foi inventariada por Lucena (2009) em áreas selecionadas como prioritárias para conservação do Bioma Caatinga (MMA 2002).

As Euphorbiaceae, segundo Sátiro; Roque (2008), incluem plantas geralmente latescentes, monóicas ou dióicas, com flores diclinas, sendo as flores pistiladas muito características pelo gineceu sincárpico, ovário súpero e geralmente tricarpelar. O fruto é geralmente capsular com deiscência explosiva, abrindo-se em três mericarpos, sendo conhecido como cápsula tricoca.

As Euphorbiaceae têm tido um papel muito significativo nas pesquisas fitoquímicas, em especial na determinação de novos compostos farmacologicamente ativos (BITTNER et al., 2001); na família são comuns triterpenos, do tipo curcubitacina e lectinas (MACHADO, 2009).

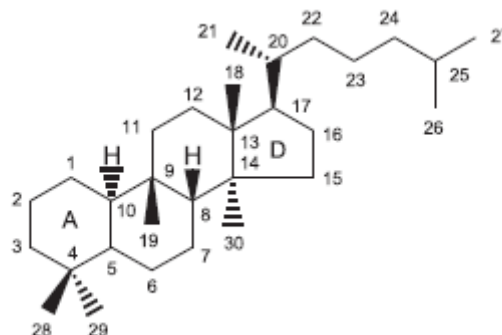


Figura 3. Estrutura da curcubitacina (VALENTE, 2004).

Na medicina tradicional, o uso da família Euphorbiaceae é muito comum ao longo do desenvolvimento da própria humanidade. Um exemplo é a espécie *Euphorbia fischeriana*, que vêm sendo utilizada há mais de 2000 anos na China para o tratamento do câncer (DEI-JI et al., 1991). Em pesquisa recente Wang et al. (2006) obtiveram dos extratos das raízes desta espécie nove diterpenos, dos quais sete ainda não eram conhecidos, elucidando suas estruturas principalmente por meios

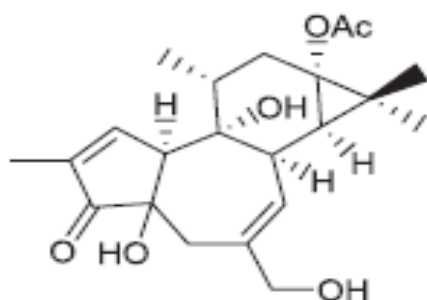


Figura 4. Prostratin (FERREIRA et al. 2010).

espectrofotométricos; destes compostos, dois apresentaram considerável citotoxicidade *in vitro*, a prostratin, um composto já conhecido e o 17-acetoxiolkinolida B, composto descrito pela primeira vez por estes autores.

Wyde et al. (1993) demonstraram efeitos antivirais seletivos de polímeros polifenólicos obtidos a partir de cascas do caule de plantas do grupo das Euphorbiaceae.

Aproximadamente 90% das espécies da família Euphorbiaceae estudadas até o momento apresentam os terpenoides como principais compostos biologicamente ativos. (BITTNER et al., 2001). Os alcaloides também são considerados como possíveis determinantes na ação farmacológica, porque uma das ações mais apontadas pela população é a antitumoral, ação esta que deriva, na maioria dos casos, da potencial ação citotóxica que exibem alguns alcaloides (MACHADO, 2009); alguns dos fármacos mais utilizados no tratamento de câncer são alcaloides

de origem vegetal, como os alcaloides da vinca (vincristina e vimblastina), o taxol e as podofilotoxinas (ALMEIDA et al., 2005; CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

3.3 – O Gênero *Cnidoscolus*

O gênero *Cnidoscolus* Pohl compreende cerca de 50-75 espécies, distribuídas exclusivamente na América tropical e concentradas, principalmente, no México e Nordeste do Brasil (WEBSTER 1994). Proposto por Pohl (1827), para incluir espécies que apresentavam apenas um verticilo no perianto e tricomas urticantes; *Cnidoscolus* não foi aceito por botânicos posteriores como Müller (1865; 1866; 1873), Pax (1910), Pax & Hoffmann (1914) e Croizat (1943), entre outros, que preferiram tratá-lo como seção ou subgênero de *Jatropha* L. Após os trabalhos de Pax & Hoffmann (1924; 1931), que revalidaram a maioria das espécies, *Cnidoscolus* passou a ser reconhecido por grande parte dos demais taxonomistas, alguns dos quais ressaltaram diferenças conspícuas entre este gênero e *Jatropha* (MELO; SALES, 2008).

Cnidoscolus apresenta como características diagnósticas tricomas urticantes em quase todas as suas partes vegetativas e florais, os quais, quando tocados, provocam fortes dores localizadas, urticárias e até, em raros casos, desmaios (MUENSCHER, 1958; MELO, SALES, 2008).

Apesar de bem representado no Brasil (aproximadamente 18 espécies), especialmente na região Nordeste (com cerca de 10 espécies), que é um dos prováveis centros de diversidade de *Cnidoscolus* (MACBRIDE 1951), os estudos sobre esse gênero são escassos no país. Embora, várias sejam as formas em que as espécies do gênero *Cnidoscolus* são empregadas, tais como: forrageira (BEZERRA,1972; PASSOS,1993; LIMA,1998), oleífera (BONDAR,1942; SANTA ROSA,1943; MORS; RIZZINI,1966), laticífera (WILLIAMS,1962), na medicina caseira (BRAGA,1976) e ornamentais (INGRAM,1957; POTT, POTT,1994).

Na Caatinga, o gênero *Cnidoscolus* é representado por quatro espécies medicinais *Cnidoscolus infestus* Pax e K. Hoffm., *Cnidoscolus pubescens* Pohl, *Cnidoscolus quercifolius* Pohl e *Cnidoscolus urens* (L). Arthur, estas espécies são utilizadas para diversos fins medicinais, inclusive, como agente antitumoral e antiinflamatório para o sistema genito-urinário, como antiséptico e para o tratamento

Souza, A. J. Estudo fitoquímico e atividade biológica in vitro de *Cnidoscolus urens* L. (Arthur) (EUPHORBIACEAE).

de infecções renais, dermatológicas, lesões oftálmicas, hematomas, fraturas, feridas, verrugas, disenteria, hemorragia, apendicite e reumatismo (AGRA *et al.*, 2007; AGRA *et al.*, 2008; ALBUQUERQUE, 2006; ALBUQUERQUE *et al.*, 2007; ALMEIDA *et al.*, 2005).

Levantamento fitoquímico realizado por Peixoto Sobrinho *et al.* (2012), com quatro espécies do gênero *Cnidoscolus* indicaram a presença de diversos metabólitos em diferentes partes da mesma conforme tabela abaixo.

Tabela 01. Caracterização fitoquímica de quatro espécies de *Cnidoscolus*. (1) Partes aéreas de *C. infestus* (2) Raízes de *C. infestus* (3) Folhas de *C. pubescens* (4) Raízes de *C. pubescens* (5) Casca de *C. quercifolius* (6) Folhas de *C. quercifolius* (7) Partes aéreas de *C. urens* e (8) Raízes de *C. urens*.

FITOQUÍMICA	1	2	3	4	5	6	7	8
Alcaloides	-	-	-	-	-	-	-	-
Antocianinas	-	-	+++	-	-	+++	+++	-
Derivados antracênicos	-	++	+++	-	-	+++	+	++
Antraquinonas	-	-	+++	-	-	+++	+	-
Cumarinas	+	+++	+	+++	+++	++	+++	+++
Flavonoides e Taninos	+	-	+++	+	-	+++	+++	-
Liganas	-	+++	-	-	-	++	-	+++
Mono e diterpenos	+++	+++	++	++	++	+	+++	+++
Naftoquinonas	-	-	-	-	-	-	-	-
Saponinas	-	+	-	-	++	-	-	++
Triterpenos e esteróides	++	+	++	+	+	++	++	+
Xantinas	++	-	+	-	-	+	+	-

- = não detectado; + = fraco; ++ = moderado; +++ = forte
Fonte: PEIXOTO SOBRINHO *et al.*, (2012).

Estudos realizados por Peixoto Sobrinho *et al.* (2012), mostram que constituintes químicos presentes no extrato metanólico obtido da casca de *Cnidoscolus quercifolius* (que possui cumarinas predominantemente na sua composição fitoquímica) atuam no mecanismo de resistência das bactérias *Staphylococcus*.

Estudos realizados por Almeida e Amorim (2009), mostram que o extrato metanólico obtido da raiz de *Cnidoscolus infestus* Pax & K. Hoffm apresentou relevante atividade antioxidante e que o extrato metanólico das raízes de

Cnidoscolus urens apresentou elevada concentração de flavonoide, sendo então um bom indicativo de atividade antimicrobiana para a espécie.

Estudos realizados por Tavares e Amorim. (2010), mostraram que os extratos metanólicos das partes aéreas das espécies *Cnidoscolus infestus* Pax & K. Hoffm e *Cnidoscolus urens* apresentaram antocianina, os perfis fitoquímicos dos extratos metanólicos das raízes das espécies citadas são idênticos e que a resposta negativa para alcalóide nos extratos das duas espécies estudadas foi uma surpresa, visto que na literatura há relatos de alcaloides para o gênero. O mesmo estudo, também indica que os resultados encontrados para as amostras das partes aéreas e raízes, de *C. infestus* e partes aéreas de *C. urens* indicam elevada toxicidade, enquanto que as raízes de *C. urens* demonstraram moderada toxicidade e que o teste de avaliação de citotoxicidade apresentou atividade antiproliferativa dos extratos frente à linhagem celular HEP-2 (câncer de laringe).

Investigação fitoquímica qualitativa realizada por Senjobi et al. (2012), a partir do extrato etanólico das folhas de *Cnidoscolus aconitifolius* demonstrou que a espécie possui entre seus metabólitos secundários alcaloides, saponinas, taninos e glicosídeos cianogênicos, os extratos de folhas não apresentam atividade antimicrobiana para microorganismos como *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella spp* e *Candida albicans*, o que sugere que a referida espécie não pode ser utilizada como remédio para tratar doenças relacionadas com estes microorganismos em plantas. No entanto, a presença de alcaloides no extrato e o resultado do teste de citotoxicidade revelam que *Cnidoscolus aconitifolius* é relevante no tratamento de cancer. Já em estudos desenvolvidos por Awoyinka et al. (2007), há a indicação de uso de *Cnidoscolus aconitifolius* como antimicrobiano de amplo espectro por ter seu extrato etanólico apresentado sensibilidade às cepas gram-positivas e gram-negativas.

Caballero et al. (1984), a partir do látex de *Cnidoscolus elasticus*, isolam e determinam a estrutura por meio ressonância magnética nuclear de ^{13}C , espectrometria de massa e difração de raios-X de um novo triterpeno, o lupeol β -fenilpropionato.

Estudo realizado por Gomes et al. (2014), concluiu que os extratos das cascas e folhas de *Cnidoscolus. quercifolius* têm atividade anti-inflamatória. Extrato

das cascas e folhas de *Cnidoscolus. quercifolius* tem atividade antinociceptiva (GOMES et al., 2014).

3.4 – A espécie *Cnidoscolus urens*

Cnidoscolus urens é um subarbusto ou arbusto com caule algumas vezes intumescido na metade superior; tricomas urticantes aciculiformes nos ramos, pecíolo, lâmina foliar, inflorescência, perianto e fruto (MELO; SALES, 2008).

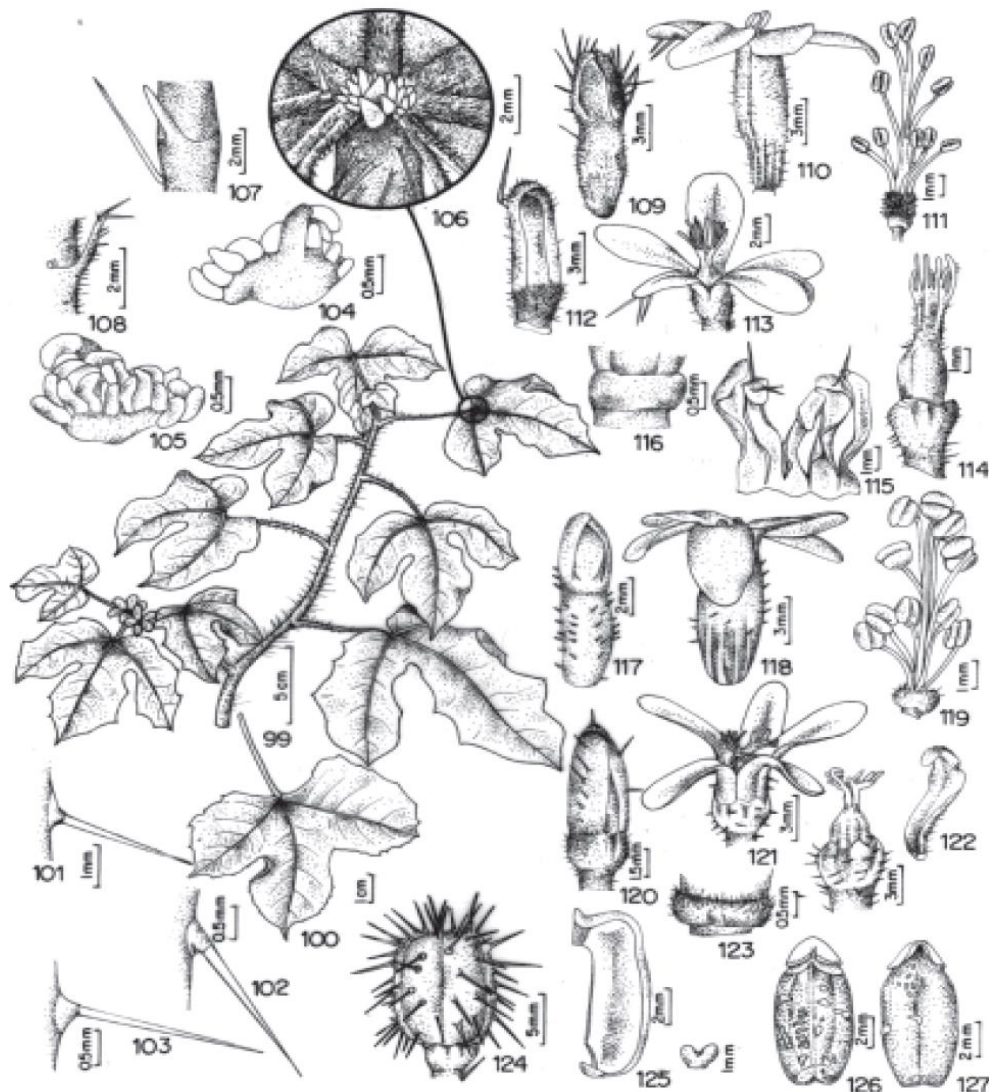


Figura 05. Parâmetros Morfológicos de *Cnidoscolus urens* (L.) Arthur. 99. Ramo florido; 100. Folha, 101; Tricoma urticante aciculiforme do ramo; 102. Tricoma urticante aciculiforme no pecíolo; 103. Tricoma urticante aciculiforme no fruto; 104. Face externa da estípula; 105. Face interna da estípula; 106. Glândulas peciolares; 107. Bráctea em vista lateral; 108. Bráctea em vista frontal; 109. Botão masculino; 110. Flor masculina; 111. Androceu; 112. Botão feminino; 113. Flor feminina; 114. Gineceu; 115. Perianto desprendido da flor feminina; 116. Disco glandular da flor feminina; 117. Botão masculino; 118. Flor masculina; 119. Androceu; 120. Botão feminino; 121. Flor feminina; 122. Desprendimento do perianto da flor feminina; 123. Disco glandular da flor feminina; 124. Fruto; 125. Valva do fruto; 126. Semente face ventral; 127. Semente, face dorsal. Fonte (MELO; SALES, 2008).

Cnidoscolus urens tem a distribuição mais ampla dentre as espécies do gênero *Cnidoscolus*, ocorrendo desde a porção oriental do México até a Argentina (BURGER; HUFT, 1995). No Brasil, é amplamente distribuída, ocorrendo: no Nordeste (AL, BA, PB, PE, PI, RN e SE), Sudeste (ES, MG e RJ) e Centro-Oeste (DF). Conhecida popularmente como “cansanção” (BA, PB, PE, PI), “cansanção-branco” (PI), “urtiga” (PB, PE, PI) ou “urtiga-branca” (PB, PE, RN) (MELO; SALES, 2008). Na medicina popular, é utilizada no tratamento de cancro, reumatismo, apendicite, inflamação na próstata, hemorragia, entre outros usos (ALBUQUERQUE, 2006; ALBUQUERQUE, 2007; MELO et al., 2011; AGRA et al., 2008).

Em estudos realizados por Menezes et al. (2014), foi relatado pela primeira vez as propriedades farmacológicas de uma fração rica em proteínas, extraída de folhas de *C. urens* rica em enzimas proteolíticas, avaliando sua ação na coagulação do sangue, mais especificamente sua atividade fibrinolítica e atividades pró-coagulantes. Indicando, desta forma, o potencial de aplicação de proteases, presentes na fração de *C. urens* estudada, como anti-hemorrágico, trombolítico e agente cicatrizante (MENEZES et al., 2014).

Dominguez et al. (1992), isolaram e identificaram por meio de espectrometria de massa, infravermelho, ressonância magnética nuclear de ^{13}C e ^1H , espectroscopia ultravioleta e cristalografia de raios-X dois compostos, xochitloldione e isoxochitlolone, a partir de extrato metanólico das raízes de *Cnidoscolus urens*.

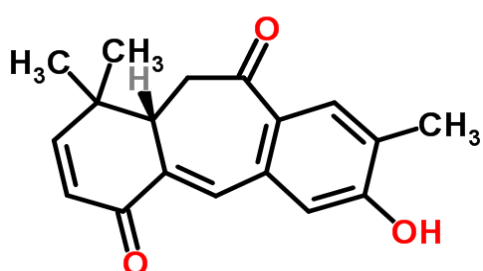


Figura 06: Estrutura do xochitloldione
(Fonte: chemspider.com)

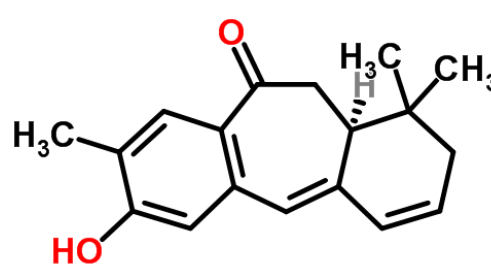


Figura 07: Estrutura do isoxochitlolone
(Fonte: chemspider.com)

Em pesquisa realizada por Bhattacharyya e Barros (1985) a partir do extrato etanólico de *C. urens*, foram identificados através de método espectrométrico de RMN ^{13}C , β -amirina cinamato, acetato de germanicol, bem como uma mistura de β -amirina, germanicol, lupeol e seus acetatos.

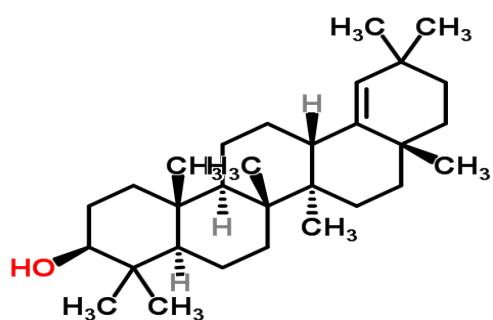


Figura 08: Estrutura do germanicol
(Fonte: chemspider.com)

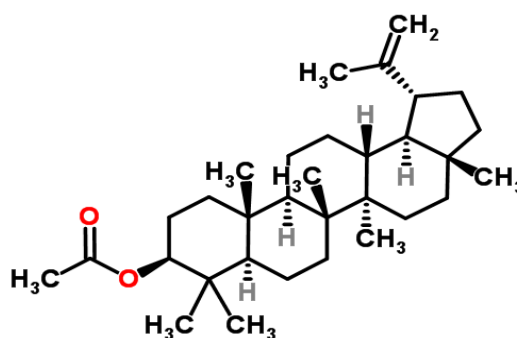


Figura 11: Estrutura do acetato de lupeol
(Fonte: chemspider.com)

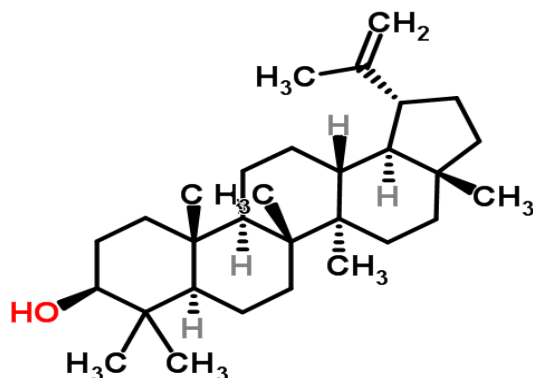


Figura 09: Estrutura do lupeol
(Fonte: chemspider.com)

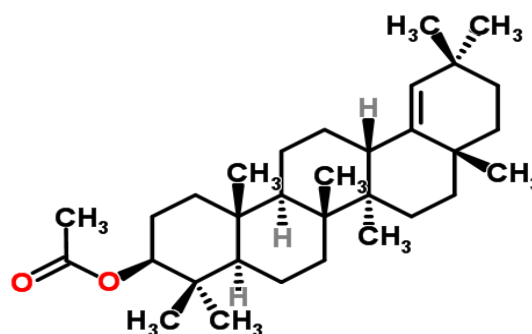


Figura 12: Estrutura do acetato de germanicol
(Fonte: chemspider.com)

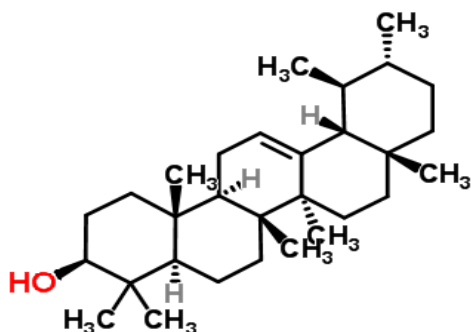


Figura 10: Estrutura da β -amirina
(Fonte: chemspider.com)

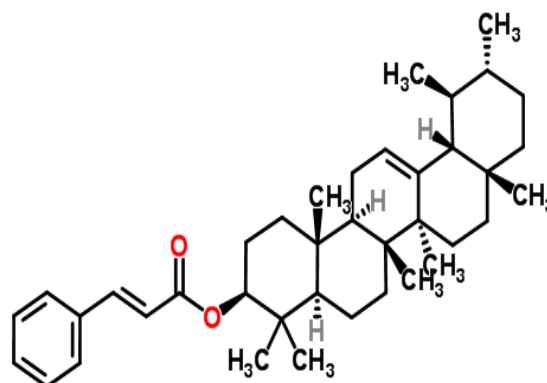


Figura 13: Estrutura do β -amirina cinamato
(Fonte: chemspider.com)

Em 1967 Korzybski et al. citam que em 1958 fora descrito o URENSIN um antibiótico isolado das raízes de *Cnidoscolus urens* (L.) Arthur (Euphobiaceae).

3.5 – Oxidação, radicais livres, antioxidante, compostos fenólicos e atividade antioxidante

Na química o termo oxidação, durante muito tempo, foi comumente definido como sendo reação com oxigênio. Contudo, o conceito de oxidação hoje é entendido como o processo de conversão de uma espécie química (átomo, íon ou molécula) em outra com menor número de elétrons. Oxidação, portanto, é a perda de um ou mais elétrons, por uma espécie química para outra e o procedimento inverso é considerado redução (ALVES et al., 2010).

Nos anais da história médica, poucos eventos tiveram impacto tão profundo como à descoberta dos radicais livres (COTINGUIBA et al., 2013). Radicais livres de oxigênio ou, mais genericamente, espécies reativas do oxigênio (EROs), bem como espécies reativas de nitrogênio (ERNs), são produtos do metabolismo celular normal (VALKO et al., 2006).

Radicais livres são espécies químicas que possuem um elétron desemparelhado na sua órbita mais externa. Essa situação implica em alta instabilidade energética e cinética, uma vez que para se manterem estáveis precisam doar ou retirar um elétron de outra molécula. A principal fonte de radicais livres produzidos no organismo vem do metabolismo normal do oxigênio (COTINGUIBA et al., 2013).

Segundo Continguiba et al. (2013), os radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular (proteínas, lipídios, carboidratos e DNA) está relacionado com seu sítio de formação. Tanto as espécies reativas tanto do oxigênio como do nitrogênio são reconhecidos por seus efeitos prejudiciais (quando provocam o estresse oxidativo e estresse nitrosativo, respectivamente) ou benéficos (quando atuam contra infecções, na sinalização do sistema celular e na indução de resposta mitogênica) (VALKO et al., 2006).

Os efeitos maléficos dos radicais livres ocorrem em sistemas biológicos quando há uma superprodução de (EROs) ou (ERNs) de uma lado e uma deficiência de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos do outro lado. O excesso de (EROs) pode danificar os lipídios celulares, proteínas ou DNA inibindo a sua função normal (VALKO et al., 2006). O excesso de radicais livres encontra-se relacionado com diversas enfermidades, tais como: câncer, envelhecimento precoce, doenças

cardiovasculares, degenerativas e neurológicas, choque hemorrágico, catarata, disfunções cognitivas, etc. (ALVES et al., 2010).

A produção de radicais livres é controlada nos seres vivos por diversos compostos antioxidantes, os quais podem ter origem endógena, ou serem provenientes da dieta alimentar (SOUSA et al., 2007). Compostos antioxidantes agem estabilizando ou desativando os radicais livres antes mesmo que eles ataquem os alvos biológicos nas células (NASCIMENTO, 2012).

Para Kong e Lillehei (1998) os únicos compostos capazes de inibir a formação de radicais livres são os antioxidantes, os quais impedem, através de sua própria redução, o dano oxidativo celular e minimizam a toxicidade causada por eles.

De acordo com Barreiros et al. (2006) apud Halliwell (2000), antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo.

Os antioxidantes podem ser divididos quanto às classes em enzimáticos e não enzimáticos e quanto ao modo de ação em primários e secundários. Os antioxidantes enzimáticos atuam inibindo o início da oxidação e os não enzimáticos atuam durante a reação em cadeia, através de interação com as espécies radicalares. Os antioxidantes primários atuam bloqueando a reação em cadeia através da conversão dos radicais livres em produtos termodinamicamente estáveis e ou reagindo com os radicais livres, enquanto que os antioxidantes secundários agem como inibidores, retardando as etapas da autooxidação (COTINGUIBA, 2013).

As defesas antioxidantes podem ser produzidas endogenamente ou adquiridas pela dieta. Neste caso, podemos ter antioxidantes sintéticos ou naturais. Dentre os antioxidantes sintéticos o butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT) e o galato de propila (GP), que são antioxidantes sequestradores de radicais livres, estão entre mais utilizados pela indústria alimentícia para prevenir a deterioração oxidativa de gorduras e alimentos gordurosos (YESILYURT et al., 2008). Contudo, estudos têm demonstrado a possibilidade dos antioxidantes sintéticos apresentarem alguns efeitos tóxicos (YESILYURT et al., 2008). O galato de propila, por exemplo, quando em presença de peróxido de hidrogênio reage com íons ferrosos formando espécies reativas de oxigênio, as quais podem posteriormente atacar alvos biológicos (HASLAM, 1996; SOARES, 2002).

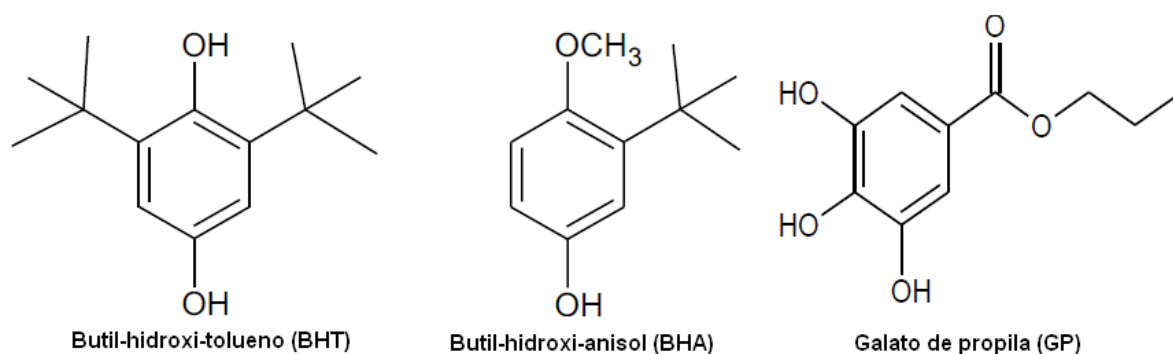


Figura 14: Estrutura química de antioxidantes sintéticos.

Em função dos possíveis problemas provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, pesquisas que buscam encontrar produtos naturais com atividade antioxidante estão sendo desenvolvidas na tentativa de se substituir os antioxidantes sintéticos por antioxidantes naturais ou fazer associação entre sintéticos e os naturais (SOUSA et al., 2007).

Entre os antioxidantes naturais merecem destaque o α -tocoferol, a quercetina, o ácido gálico e o ácido ascórbico (ALVES et al., 2010).

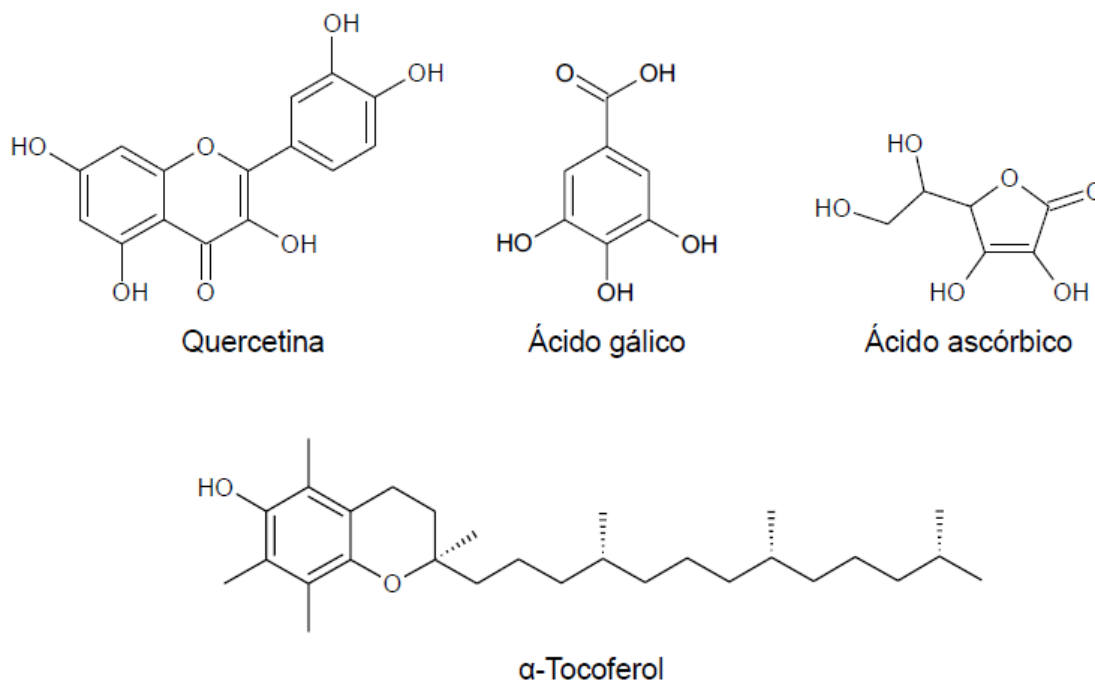


Figura 15: Estrutura química de antioxidantes naturais.

Além desses citados anteriormente temos ainda os compostos fenólicos como potentes antioxidantes, podendo agir como redutores de oxigênio singleto, atuando nas reações de oxidação lipídica, assim como na quelação de metais (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). Neste sentido, os compostos fenólicos oriundo de espécies vegetais têm merecido destaque.

Os compostos fenólicos de origem vegetal se enquadram em diversas categorias, tais como: fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (NACZK; SHAHIDI, 2004).

A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e a estrutura química dos mesmos. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou no sequestro de radicais livres e na quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na de propagação do processo oxidativo (SOUZA et al., 2007).

Estudos realizados por Almeida e Amorim (2009), mostram que o extrato metanólico obtido da raiz de *Cnidoscolus infestus* Pax & K. Hoffm apresentou relevante atividade antioxidante, sugerindo a presença de compostos fenólicos na espécie citada.

A quantificação espectrofotométrica de compostos fenólicos é realizada por meio de uma variedade de técnicas, todavia, a que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu figura entre as mais extensivamente utilizadas. Já para a avaliação da atividade antioxidante *in vitro* um dos métodos mais usados consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila - DPPH (SOUSA et al., 2007).

3.6 – O uso de métodos espectrofotométricos na quantificação de compostos fenólicos bem como, na avaliação da atividade antioxidante e fotoprotetora *in vitro*

Diferentes métodos de análise de polifenóis têm sido publicados (ANTOLOVICH et al., 2000; TSAO e DENG, 2004). No entanto, a estratégia analítica apropriada para o estudo de fenólicos bioativos em vegetais depende do propósito do estudo bem como da natureza da amostra e do analito. Os métodos utilizados para a análise de fenólicos podem ser classificados como aqueles que quantificam o conteúdo total de fenólicos ou como aqueles que determinam um grupo específico ou classe de compostos fenólicos (ROBARDS, 2003).

Entre os métodos colorimétricos tradicionais, Folin-Denis e Folin-Ciocalteu, para a determinação de fenóis totais o mais comumente usado é o método colorimétrico do reagente de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI 1965). Tal fato deve-se ao resultado da comparação realizada entre eles onde ficou constatado que o método utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu apresentou melhor estimativa de fenóis vegetais tendo evitado o problema de precipitação, apresentado maior intensidade de coloração, menor variação nas leituras, menor tempo de aquecimento, reduzindo desta forma o tempo de análise e indicando o ácido gálico como padrão (SINGLETON; ROSSI 1965). O reagente de Folin-Ciocalteu é uma solução de íons complexos poliméricos formados a partir de heteropoliácidos fosfomolibdicos e fosfotungsticos. Esse reagente oxida os fenolatos, reduzindo os ácidos a um complexo azul Mo-W (NEVES et al., 2009). A reação ocorre em meio alcalino e a solução saturada de carbonato de sódio é a base mais indicada. O número de grupos hidroxila controla a intensidade de cor formada (NACZK; SHAHIDI, 2004).

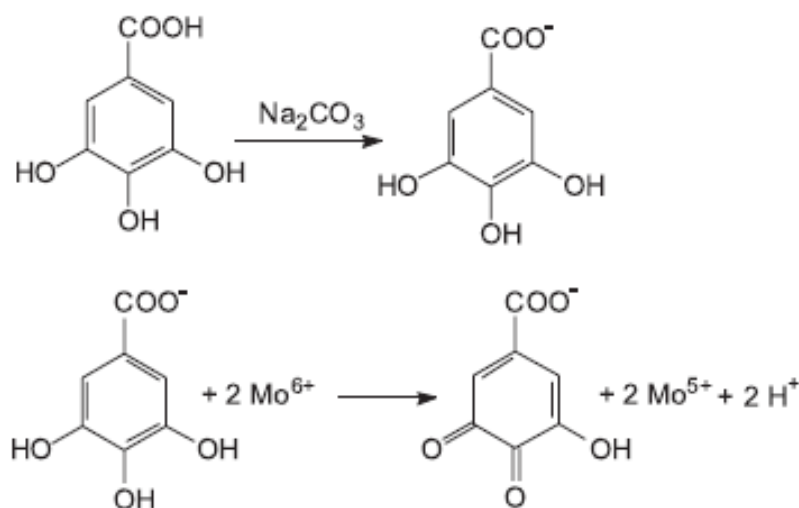


Figura 16: Reação de ácido gálico com o íon molibdênio componente do reagente Folin-Ciocalteu. Fonte: (OLIVEIRA et al, 2009)

A maneira mais precisa e exata de se identificar e quantificar flavonoides em produtos naturais é a análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Entretanto, a introdução de alternativas mais simples e baratas têm sido utilizadas por laboratórios geralmente modestos no que se refere ao instrumental instalado.

Uma das técnicas que se enquadram bem nesse contexto é a determinação de flavonoides totais por espectrometria no UV (MARCUCCI et al.,1998).

O uso do cloreto de alumínio (AlCl_3) no diagnóstico da presença de alguns grupamentos químicos foi pela primeira vez empregado para antocianinas. Trata-se de uma classe de pigmentos do grupo dos flavonoides, encontrados principalmente em flores, mas muitas vezes também em frutos, e que dão ao órgão vegetal colorações que podem variar do vermelho ao azul, passando por todas as matrizes intermediárias (MARCUCCI et al.,1998). Em 1954, Harborne sugeriu o uso do cloreto de alumínio para a determinação espectrofotométrica da presença de certos grupamentos químicos em flavonoides (MABRY et al., 1970). Da década de 60 em diante, o composto passou a ser largamente empregado como um reagente de desvios ("*shift reagent*") em espectrometria no UV-visível para a determinação estrutural de flavonoides (MABRY et al., 1970; MARKHAM, 1982).

Mais recentemente, foi proposta a utilização de métodos espectrofotométricos para a determinação de flavonoides totais em plantas, utilizando-se AlCl_3 (SCHMIDT; ORTEGA, 1993). Vennat et al. (1992) desenvolveram um método para determinar o teor de flavonoides em uma planta, adaptando o método descrito por Dowd (1959) para a quercetina, o qual se baseia no uso de cloreto de alumínio (WOISKY, 1996). O cátion alumínio forma complexos estáveis com os flavonoides em metanol, ocorrendo na análise espectrofotométrica um desvio para maiores comprimentos de onda e uma intensificação da absorção (MARCUCCI et al.,1998).

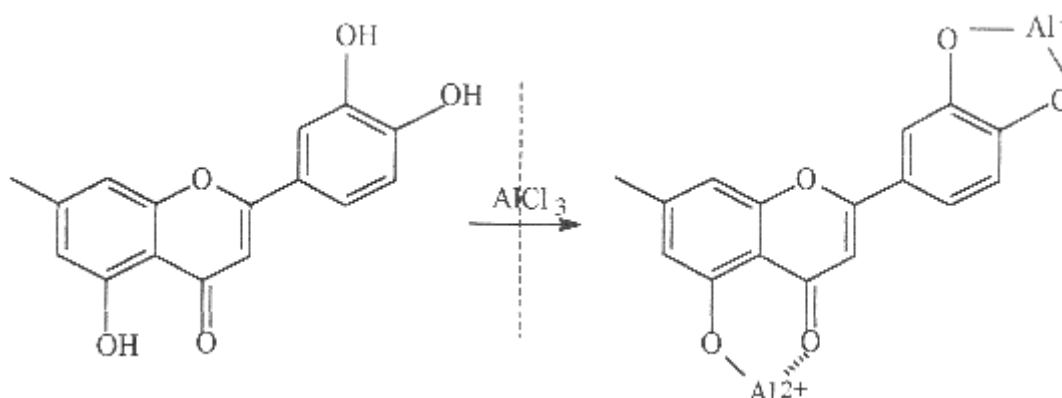


Figura 17: Formação do complexo flavonoide-Al, em solução metanólica de cloreto de alumínio.
Fonte: (Markham1982).

O uso do cloreto de alumínio para a determinação da quantidade de flavonoides totais não é um procedimento isento de limitações. O método é preciso,

isto é, ele é reproduzível, fornecendo desvios muito pequenos ou nulos entre um ensaio e outro com a mesma amostra. No entanto, ele pode ser pouco exato, ou seja, o valor que ele fornece pode ser diferente (geralmente inferior) em relação à quantidade de flavonoides totais realmente presente na amostra analisada. O valor medido e o valor real são tanto mais próximos entre si quanto maior a proporção de flavonóis na amostra, e tanto mais distantes quanto maior a proporção de flavonas. Isso se deve ao fato de que o comprimento de onda, selecionado corresponder à banda de absorção do complexo quercetina–Al. A quercetina é um flavonol, certamente os complexos dos outros flavonóis com alumínio absorvam bem próximo da quercetina, mas os complexos derivados de flavonas absorvem em comprimentos de onda inferiores, o que causa uma subestimativa nas determinações de misturas muito ricas em flavonas (MARCUCCI et al., 1998).

No entanto, essa limitação não reduz a validade do método, pois, no contexto em que o mesmo vem sendo empregado é mais importante precisão do que exatidão.

Na avaliação da atividade antioxidante os métodos espectrofotométricos se baseiam invariavelmente, na capacidade “descolorante” da amostra. Os ensaios mais utilizados recebem o nome do reagente cuja absorção será atenuada pelo antioxidante, ou seja, ensaio do sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e através da captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS⁺). Reagentes estes responsáveis pelo fator custo do método espectrofotométrico e que indicam a capacidade antioxidante total do produto no que diz respeito a varrer radicais livres (BUTERA et al., 2002).

O teste de DPPH é um dos métodos indiretos para se determinar a atividade antioxidante mais antigo sendo sugerido originalmente em 1950 para se descobrir os doadores de hidrogênio em materiais naturais. Mais tarde foi quantificado para determinar o potencial antioxidante de compostos fenólicos isolados e alimentos tão bem como amostras biologicamente relevantes (ROGINSKY; LISSI, 2005). Uma característica desse método é que ele não envolve condições drásticas de temperatura e oxigenação (SILVA et al., 1999). O DPPH pode reagir com compostos fenólicos, bem como com ácidos aromáticos contendo apenas um grupamento (SANTOS et al., 2007).

O método de DPPH é muito utilizado para se determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas como: compostos fenólicos (SOUSA et al., 2007), fenilpropanóides, fenólicos totais, flavonóis (LEJA et al., 2007), cumarinas (VOGEL et al., 2004), quitosana com diferentes pesos moleculares (KIM; THOMAS, 2006), antocianinas, antocianidinas (LEJA et al., 2007; DE LIMA et al., 2007), carotenoides (AJILA et al., 2007), rutina, kaempferol (SILVA et al., 2005). Estudo realizado com matéria prima vegetal em estado bruto mostrou-se inadequado devido a sua elevada complexidade química e inerente presença de interferentes potenciais como pigmentos coloridos. (SOUZA et al., 2007).

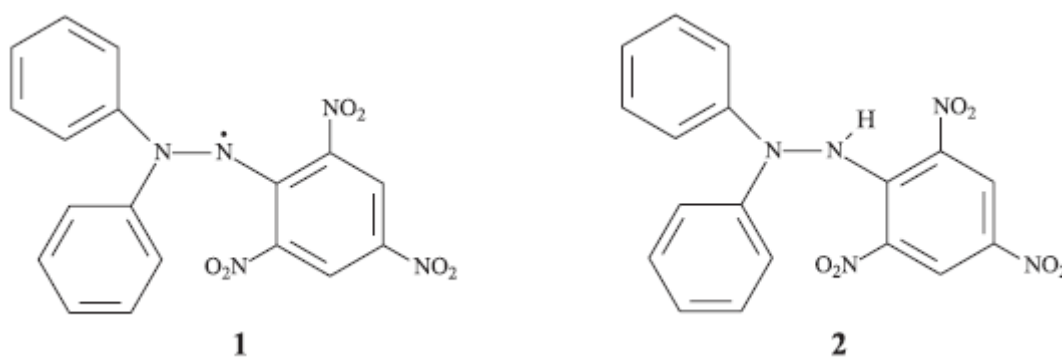
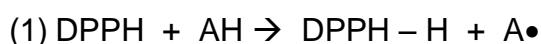


Figura 18: Estrutura das formas radicalar (1) e não radicalar (2) do DPPH. Adaptada de SOUZA et al, 2007.

Esse método consiste em avaliar a capacidade antioxidante via atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila – DPPH. O radical DPPH possui coloração purpura, forma radicalar (1), absorvendo a um comprimento de onda máximo de aproximadamente 516 nm. Por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (R), o DPPH é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, forma não radicalar (2), com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou porcentagem de DPPH remanescente no meio reacional.

A reação do radical livre DPPH com um antioxidante (AH) ou uma espécie radical (R) ocorre de acordo com as equações 1 e 2 (MILARDOVIC, 2005):



A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% e denominada concentração eficiente (CE_{50}), também chamada de concentração inibitória (CI_{50}). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CE_{50} e maior a sua atividade antioxidante (SOUSA et al, 2007).

A avaliação da atividade antioxidante se dá através da monitorização do consumo do radical livre DPPH pelas alíquotas de ensaio das amostras, através da medida do decréscimo das respectivas medidas de absorbância. As medidas são realizadas em espectrofotômetro UV-VIS no comprimento de onda de 515-517nm.

A atividade sequestrante do radical livre (%SRL) ou porcentagem de descoloração (%descoloração) pode ser expressa em porcentagem por comparação a um controle ou branco, segundo a seguinte equação:

$$\%SRL = \%Descoloração = 100 \times (A_c - A_t) / A_c$$

Onde, A_c : absorbância controle ou branco; A_t : absorbância teste (amostra).

Os radicais livres de DPPH, que inicialmente apresentam cor roxa por possuírem elétron livre, perdem esta cor quando um radical hidrogênio doado por uma molécula antioxidante entra em ressonância com a molécula de DPPH, diminuindo-se, assim, a absorbância. O DPPH é um radical estável e com baixa taxa de deterioração e reatividade com a maioria dos compostos. Assim sendo, apenas reagentes redutores fortes são capazes de reagir com estes radicais estáveis em um modo estequiométrico. A baixa absorbância indica atividade sequestrante de radicais livres (SANTOS et al., 2007).

De acordo com Halliwell e Wiseman (1996), os efeitos defensivos de antioxidantes naturais em frutas e vegetais estão relacionados a três grandes grupos: ácidos ascórbico e fenólico como antioxidante hidrofílico e carotenóides como antioxidantes lipofílicos. Um dos métodos mais utilizados para medir a atividade antioxidante é através da captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-acido sulfônico) ($ABTS^+$), que pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática (Figura 19). Com essa metodologia, pode-se medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica (KUSKOSKI et al., 2005).

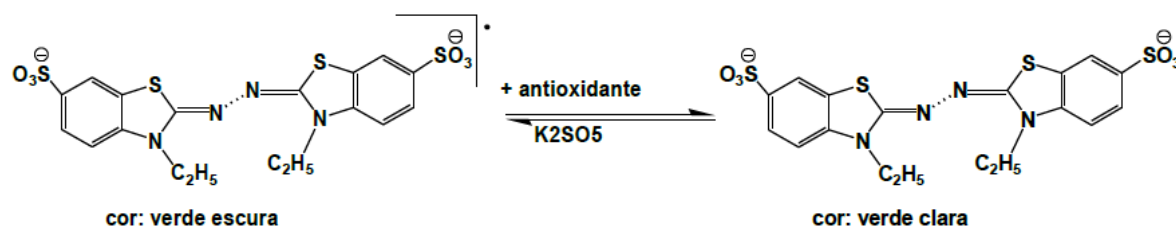


Figura 19: Estabilização do radical $ABTS^+$ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio. Adaptada de SOUSA et al, 2007.

Em ensaio proposto por Miller e Rice-Evans (1996), o radical cátion $ABTS^+$ Foi obtido em presença de H_2O_2 , apresentando máximos de absorção a 417, 645, 734 e 815 nm.

Na presença de antioxidantes doadores de hidrogênio, pode medir-se a diminuição da formação deste radical por espectrofotometria (SILVA et al, 1999).

Esse radical pode reagir de forma enérgica com compostos doadores de hidrogênio, como compostos fenólicos, sendo convertido em uma forma não colorida de $ABTS^+$. Assim, a atividade anti-radicalar de flavonoides, ésteres do ácido gálico e aldeído cafeico extraídos das folhas de *Tachigalia paniculata* (Leguminosae) foi avaliada usando-se entre outros ensaios o $ABTS^+$. Os autores observaram que dois derivados glicosídicos da miricetina e o galato de metila se mostraram ativos frente ao cátion radical $ABTS^+$, destacando as propriedades antioxidantes destes compostos. Também é possível determinar a quantidade de $ABTS^+$ consumida devido à reação com amostras contendo compostos fenólicos que foi expressa em Trolox equivalentes (unidades de concentração). Esse valor foi designado como TEAC (Capacidade antioxidante trolox equivalente), isso fornece uma estimativa da quantidade de moléculas de radicais consumidas pelo antioxidante (CAMPOS, LISSI, 1997).

Na versão comercial do teste $ABTS^+$ conhecido como TEAC protocolo, $ABTS^+$ é gerado de ABTS pela sua reação com o radical ferromioglobina e H_2O_2 na presença de peroxidase (CAMPOS, LISSI, 1997).

A vantagem do teste ABTS consiste na sua relativa simplicidade que permite a aplicação na rotina de qualquer laboratório. O valor TEAC caracteriza a capacidade da amostra testada em reagir com $ABTS^+$, bem como em inibir processos oxidativos. (CAMPOS, LISSI, 1997).

O resultado da determinação do TEAC é dependente do tempo de incubação assim como da taxa da amostra quantificada (MILLER, RICE-EVANS, 1996). Esta

dependência somada a pouca seletividade do ABTS⁺ na reação com espécies doadoras de hidrogênio constituem a limitação desse método (CAMPOS, LISSI, 1997). Deste modo, divergências nos resultados de TEAC podem ser atribuídas a fatores limitantes como a diferença no tempo de incubação ou na estratégia de obtenção de ABTS⁺.

Dentre as técnicas utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, destaca-se o sistema de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico, originalmente descrito por Marco (1968) e modificado por Miller (1971). Este método nos permite avaliar a capacidade de uma determinada substância prevenir a oxidação do β -caroteno, protegendo-o dos radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico. A reação pode ser monitorada espectrofotometricamente pela perda da coloração do β -caroteno em 470 nm, com leitura imediata e em intervalos de 15 min, por um tempo total de 2 h (BROINIZI et al., 2007).

O Tween-40 é utilizado como emulsificante e ajuda a dissolver completamente a mistura β -caroteno/ácido linoleico em clorofórmio que, após total remoção do solvente, é dissolvida em água previamente saturada com oxigênio atmosférico. O resultado pode ser comparado com padrões sintéticos, como BHA, BHT e trolox, ou naturais, como ácido gálico ou quercetina.

Este método tem sido amplamente utilizado para avaliar a atividade antioxidante tanto de substâncias isoladas de extratos vegetais, quanto de frutas e bebidas.

O método da co-oxidação empregando o sistema β -caroteno/ácido linoleico é um teste simples e sensível, e por não utilizar altas temperaturas permite a determinação da atividade antioxidante de substâncias termossensíveis, porém apresenta alguns inconvenientes. A utilização do meio emulsionado, por exemplo, interfere nos valores de absorvância causando baixa reprodutibilidade, e a interação do β -caroteno com o oxigênio proveniente do meio dificulta a interpretação dos resultados (VON GADEW et al., 1997).

Compostos naturais com propriedades antioxidantes e fotoprotetoras melhoram a qualidade e a expectativa de vida ao atuarem contra o estresse oxidativos. Estresse esse que está associado a muitas doenças crônicas e degenerativas, como o alzheimer, parkinson, arterosclerose, complicações do diabetes e envelhecimento precoce (SORG, 2004).

As EROs são responsáveis pelo ponto chave do envelhecimento por serem consideradas extremamente danosas aos tecidos, uma vez que desencadeiam redução brusca da quantidade dos antioxidantes endógenos, atacam lipídeos de membranas celulares, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, causando oxidação e alteração dessas moléculas (NAKATANI, 1996).

Para Souza et al., (2005) a agressão do sol é cumulativa, irreversível e capaz de levar a diversas alterações bioquímicas, como: alterações das fibras colágenas e elásticas, perda de tecido adiposo subcutâneo e fotocarcinogênese.

A luz solar é composta por um espectro contínuo de radiação de ondas eletromagnéticas que são divididas em três comprimentos de ondas principais: visível (VIS), infravermelha (IR) e Ultravioleta (UV) (MATSUMURA; ANANTHASWAMY, 2004).

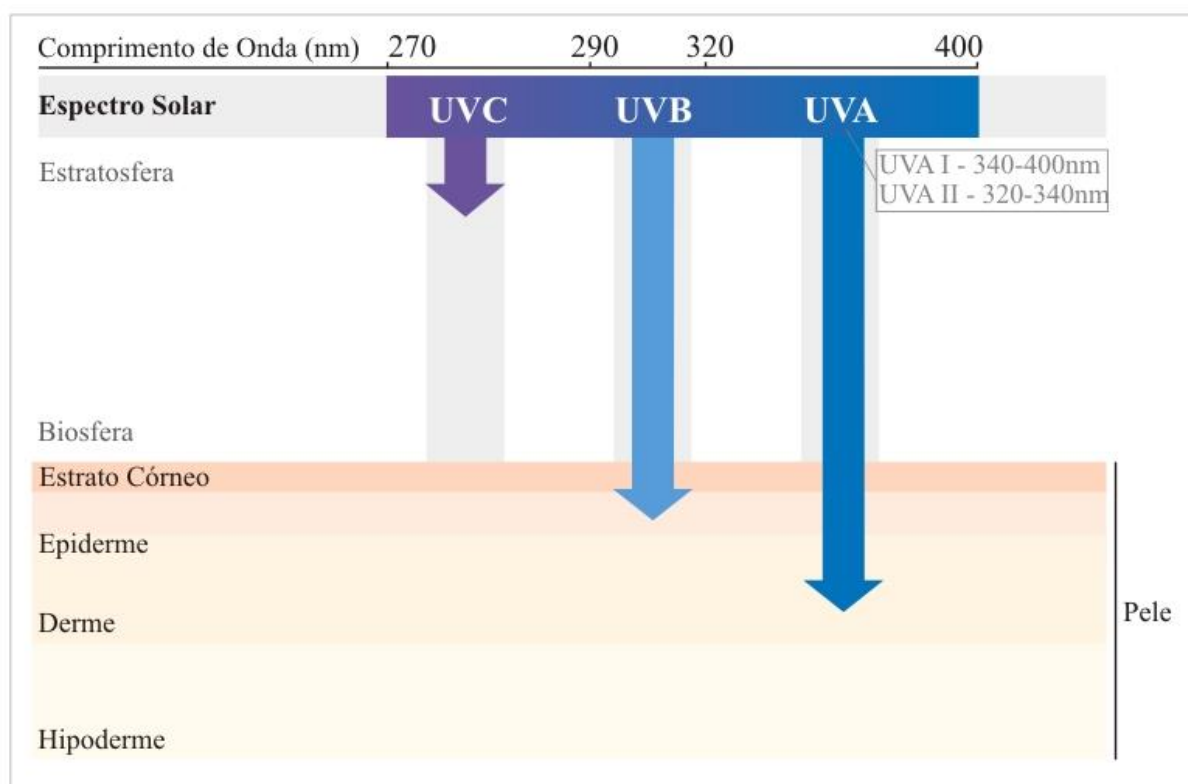


Figura 20: Representação esquemática da penetração cutânea dos raios solares.
(Fonte: Ciba Specialty Chemicals, 2002)

A radiação UV (Figura 20) é dividida em: UVC - 270-290nm, que é filtrada na camada de ozônio e estratosfera; UVB - 290-320nm, que afetam principalmente a camada epidermal, onde causa eritema, induz lesões ao DNA e aumenta o risco de mutações fatais que eventualmente desencadeiam o câncer de pele e reduz as chances das células malignas serem reconhecidas e destruídas, uma vez que

promove fotoimunossupressão; UVA – subdividida em UVA II (320-340nm) e UVA I (340-400nm). Em virtude do maior comprimento de onda, os raios UVA alcançam a camada dérmica, estimulam a pigmentação e estão relacionados ao envelhecimento e cânceres de pele (CIBA SPECIALTY CHEMICALS, 2002).

A exposição às radiações UV (ultravioleta) é responsável por alterações cutâneas relacionadas ao envelhecimento precoce, resultante da redução da concentração das substâncias antioxidantes endógenas por ação das espécies reativas de oxigênio (EROs) (DAL'BELO, 2008; VELASCO et al., 2008).

Segundo Dal'Belo, 2008 apud Damiani et al., 2006 muitas formulações contendo filtros químicos não proporcionam proteção total, principalmente quando são considerados efeitos crônicos como: foto-envelhecimento e fotocarcinogênese.

Assim, extratos vegetais ricos em constituintes fenólicos, como flavonoides, vêm sendo empregados em formulações fotoprotetoras associadas aos filtros UV, uma vez que, comprovada sua capacidade de absorver a radiação solar e antioxidante podem intensificar a proteção final do produto e ou neutralizar os radicais livres produzidos na pele após exposição ao sol (NASCIMENTO et al., 2009; DAL'BELO 2008 apud CHIU; KIMBALL, 2003; KIM et al., 2001; AQUINO et al., 2002; BONINA et al., 2000).

Segundo Souza et al., (2005) o teor de flavonoides é considerado importante para proteção das plantas frente aos raios UV. Eles atuam dissipando esta radiação, que é então absorvida de maneira inofensiva. Frente a esta informação, uma opção em produtos cosméticos com finalidade de antienvelhecimento e de fotoproteção, é recorrer aos efeitos dos flavonoides, incorporando em suas formulações, extratos vegetais que possuam estas substâncias (DAL'BELO, 2008). Além dos flavonoides, as antocianinas e os derivados do ácido cinâmico também têm capacidade de absorver radiação, propondo assim, a filtração da mesma (RAMOS; SANTOS; DELLAMORA-ORTIZ, 2010).

O espectro de absorção dos flavonoides, quando dispersos em etanol, mostra em geral, dois picos, um entre 240–280nm e o outro 300-350nm, sinalizando um potencial para a absorção da radiação UVB pela similaridade entre os espectros de absorção cujos comprimentos de onda estão entre 290 a 320nm (VIOLANTE et al., 2009 apud BOBIN et al., 1994). Estudos in vitro e in vivo têm demonstrado que os flavonoides inibem enzimas que estão envolvidas na produção de EROs sendo

termodinamicamente capazes de reduzir os radicais livres gerados por meio da doação de elétrons a estes radicais (DAL'BELO, 2008).

Segundo Velasco et al., (2008), os flavonoides não apresentam tendência à absorção cutânea, assim interpreta-se que a atividade seria exercida nas camadas superficiais da pele, ação desejada para os filtros solares.

De acordo com Ramos et al., (1996), existe uma analogia estrutural entre filtros químicos sintéticos e os princípios ativos extraídos de plantas, uma vez que a absorção ultravioleta tem sido verificada quando se utiliza extrato vegetal em produtos farmacêuticos e cosméticos, apontando uma possível ação fotoprotetora.

3.7 – Considerações sobre atividade antimicrobiana *in vitro*

O desequilíbrio da ecologia humana e a resistência microbiana são alguns dos problemas causados pelo uso indiscriminado de antibióticos. A emergência de patógenos resistentes tornou-se uma ameaça ao desenvolvimento de novos antimicrobianos (MOELLERING Jr, 2000).

Diante da problemática da resistência microbiana as pesquisas apontam para o uso de novos antibióticos que sejam eficazes ante os patógenos emergentes (ANTUNES et al., 2006). Desta forma, as propriedades antimicrobianas de substâncias presentes em extratos e óleos essenciais produzidos por plantas como uma consequência do metabolismo secundário, têm despertado o interesse da comunidade científica (JANSEN et al., 1987).

Os estudos a cerca da atividade antimicrobiana de plantas iniciou-se no Brasil em 1948 com Cardoso e Santos, que avaliaram extratos de 100 diferentes plantas, onde apenas cinco extratos apresentaram atividade inibitória contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichi coli* e *Proteus* X-19 (SARTORI, 2005). Contudo, as informações disponíveis em relação à atividade antimicrobiana da vasta biodiversidade brasileira são mínimas (DUARTE, 2006).

Atualmente, existem vários métodos para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos vegetais. Os mais conhecidos incluem método de difusão em ágar, método de macrodiluição e microdiluição. Para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) ou a concentração bactericida mínima (CBM) de extratos

ativos de plantas, tem-se utilizado um método sensível de microdiluição desenvolvido por Eloff em 1998.

As variações referentes à determinação da CIM (concentração inibitória mínima) de extratos de plantas podem ser atribuídas a vários fatores. Dentre eles podemos citar a técnica aplicada, o microrganismo e a cepa utilizada no teste, à origem da planta, a época da coleta, se os extratos foram preparados a partir de plantas frescas ou secas e a quantidade de extrato testada. Assim, não existe método padronizado para expressar os resultados de testes antimicrobianos de produtos naturais (FENNEL et al., 2004).

O teste de difusão em ágar, também chamado de difusão em placas, é um método físico, no qual um microrganismo é desafiado contra uma substância biologicamente ativa em meio de cultura sólido e relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo desafiado com a concentração da substância ensaiada (PINTO et al., 2003).

A aplicação do método de difusão se limita a microrganismos de crescimento rápido, sendo eles aeróbios ou aeróbios facultativos. A avaliação é comparativa frente a um padrão biológico de referência (controle positivo) e a zona ou o halo de inibição de crescimento é medida partindo-se da circunferência do disco ou poço, até a margem onde há crescimento de microrganismos (BARRY; THORNSBERRY, 1991). De acordo com a dimensão do halo os microrganismos podem ser classificados como: sensíveis, quando o diâmetro da zona de inibição é maior ou não mais do que 3 mm menos que o controle positivo; moderadamente sensíveis, halo maior que 2 mm, mas menor que o controle positivo de mais de 3 mm; e resistentes, diâmetro igual ou menor que 2 mm. Como controle positivo, emprega-se um quimioterápico padrão, e como controle negativo o solvente utilizado para a dissolução dos extratos (KARAMAN et al., 2003; SPRINGFIELD et al., 2003).

As condições de incubação recomendadas são temperatura de 35-37°C para bactérias durante 24 a 48 horas e para fungos de 25 a 27°C por 48 a 72 horas (CARVALHO et al., 2002; CHANDRASEKARAM; VENKATESALU, 2004; KARAMAN et al., 2003; MOODY et al., 2004; SPRINGFIELD et al., 2003; AYRES et al., 2008). Como variação do método, Rabanal et al. (2002) incubaram as placas de Petri por 14 h à temperatura de 37°C para bactérias e de 28 a 30°C para fungos.

As técnicas de aplicação da substância antimicrobiana no método de difusão são por meio de disco, cilindros de aço inoxidável ou vidro e perfuração em ágar (PINTO et al., 2003).

O método de diluição em caldo considera a relação entre a proporção de crescimento do microrganismo desafiado no meio líquido e a concentração da substância ensaiada. A avaliação é comparada frente a um padrão biológico de referência. Entende-se por proporção a densidade da turbidez provocada pelo crescimento microbiano (PINTO et al., 2003).

O método de diluição em caldo fornece resultados quantitativos e não é influenciado pela velocidade de crescimento dos microrganismos. Sua desvantagem é a dificuldade na detecção de contaminação no caso de teste de materiais clínicos. Como controle positivo, utiliza-se o caldo com o quimioterápico padrão com a suspensão padronizada de microrganismo em teste, e como controle negativo o meio de cultura com o solvente usado para dissolução da amostra e a suspensão microbiana (SAHM; WASHINGTON II, 1991). Duas metodologias podem ser empregadas: macro e microdiluição.

A macrodiluição envolve testes em tubos de ensaio, com volume de meio de cultura variando de 1 e 10 mL. Por ser laborioso, consumir muito tempo, requerer muito espaço no laboratório e gerar grande quantidade de resíduos é usado pequeno número de réplicas (SAHM; WASHINGTON II, 1991; ZGODA; PORTER, 2001).

A microdiluição utiliza microplacas com 96 poços, com volume de meio de cultura entre 0,1 e 0,2 mL. Eloff (1998) utilizou a técnica de diluição em microplacas para verificar a atividade antimicrobiana em extratos vegetais e observou inconvenientes na técnica, tais como células de alguns microrganismos que se aderiam à base do poço, enquanto as de outros permaneciam em suspensão. Ainda, compostos presentes em alguns extratos precipitavam, e a coloração verde da clorofila em concentração muito alta interferia na análise. Todavia, concluiu que o método de microplacas é barato, tem reprodutibilidade, é 30 vezes mais sensível que outros métodos usados na literatura, requerem pequena quantidade de amostra, pode ser usado para grande número de amostras e deixa um registro permanente.

3.8 – Considerações sobre atividade citotóxica *in vitro*

O câncer continua representando uma das maiores causas de mortalidade mundial com mais de seis milhões de vítimas todos os anos (ABDULLAEV et al., 2000) e, atualmente, a quimioproteção demonstra ser uma excelente estratégia de prevenção (GUPTA et al., 2004).

Baseado no conhecimento de que as células tumorais possuem defeitos estruturais que impossibilitam reparar a molécula de DNA, substâncias com potencial citotóxico seletivo que atuam sobre células deficientes, tornam-se potenciais agentes anticancerígenos preventivos (DANTAS et al., 2005). Deste modo, tais substâncias atuam protegendo o DNA dos danos frequentes, agindo antes da multiplicação desordenada das células que resulta na formação dos tumores (REZENDE et al., 2004).

A bioprospecção, principalmente a partir de plantas medicinais, é uma tendência mundial na qual os pesquisadores realizam triagens visando determinar diversas atividades biológicas e identificar substâncias ativas. Para tanto, a análise de citotoxicidade *in vitro* pelo método MTT vem sendo utilizada no programa de *screening* do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (SKEHAN et al., 1990). Este é um método que apresenta rapidez, sensibilidade e baixo custo, sendo descrito primeiramente por Mosman (1983), tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. O estudo pelo método MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE et al., 1996).

No Brasil estudos etnofarmacológicos demonstram um elevado número de plantas medicinais usadas pela população e, dentre outras, as plantas do gênero *Cnidoscolus* Pohl (Euphorbiaceae) são comumente encontradas nestas abordagens (WEBSTER, 1994).

Neste sentido, sendo a espécie *Cnidoscolus urens* (L.) Arthur, uma das espécies que podem ser encontradas no bioma Caatinga e, considerando o fato de que o gênero *Cnidoscolus* é usado para um grande número de remédios populares e o crescente interesse na avaliação biológica de plantas medicinais usadas pela população, investigar a citotoxicidade do extrato etanólico bruto de *C. urens* é importante.

4. Parte Experimental

4. Parte Experimental

4.1 – Coleta e identificação do material botânico

As partes aéreas de *Cnidoscolus urens* (L.) Arthur foram coletas em outubro de 2011 na fazenda Tigre no município de Andorinha - BA, sob as coordenadas UTM, 24L 401013 8861906 com elevação de 495 m (10°17'39,6"S, 39°54'14,4"W), com a orientação do biólogo Prof. Dr. Airton de Deus Cysneiros Cavalcanti (UNIVASF), a exsicata da espécie foi depositada no Herbário da Universidade Federal do Vale do São Francisco – HVASF, com número de tombo 12752.

4.2 – Processamento do material botânico

O material botânico fresco foi picotado e em seguida seco em estufa fechada com circulação de ar a uma temperatura média de 45°C durante 8 dias obtendo-se o material botânico seco e estabilizado. Em seguida o material vegetal foi processado em moinho de facas, obtendo-se por fim 1800 gramas de material vegetal seco e moído.



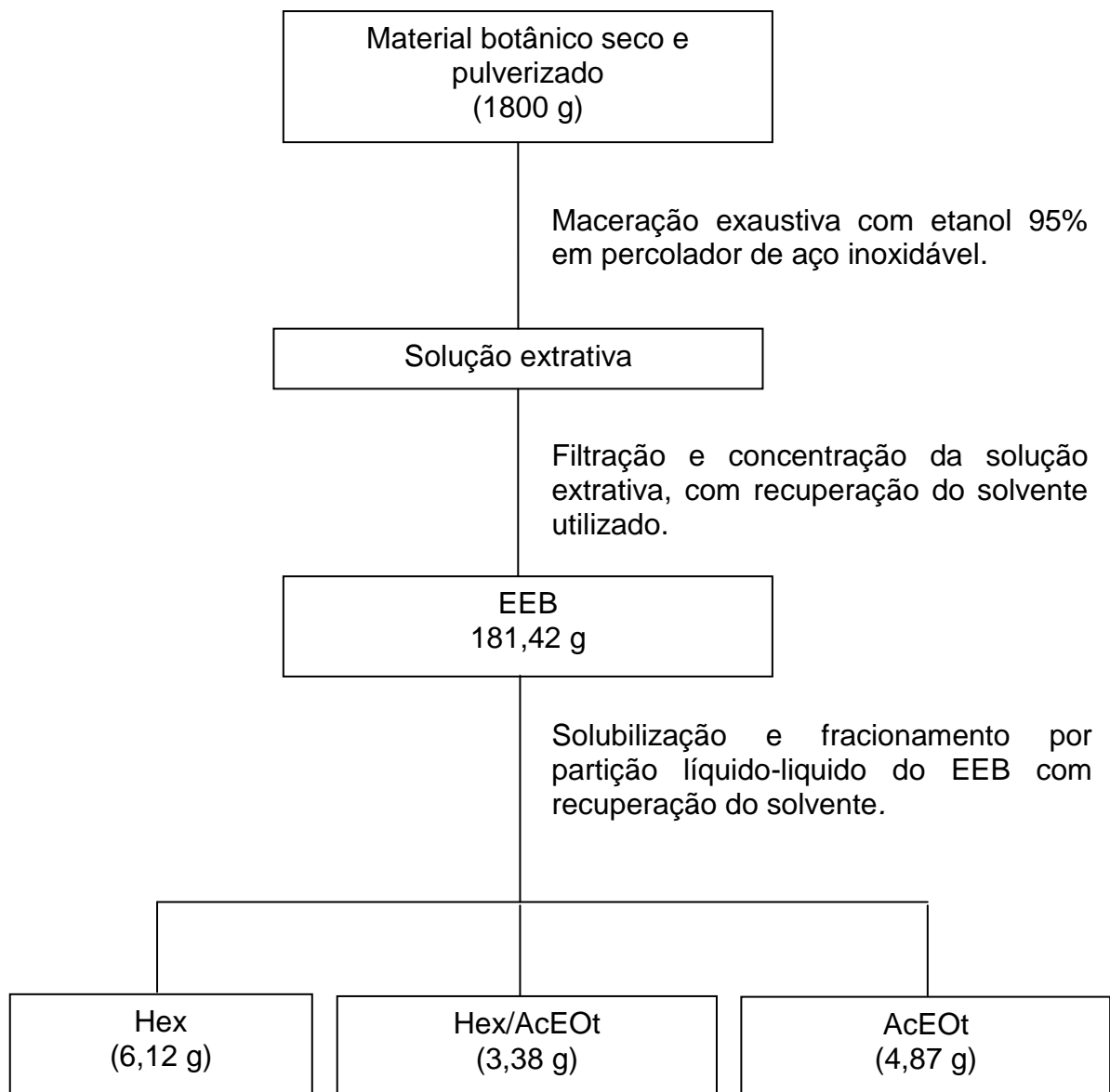
Figura 21: Secagem de *C. urens*.

4.3 – Obtenção e fracionamento do extrato etanólico bruto de *Cnidoscolus urens* (EEB)

O material botânico seco e pulverizado foi submetido à maceração exaustiva com etanol 95% em recipiente de aço inoxidável. Foram realizadas oito extrações, substituindo todo o solvente a cada 72 horas. Obtendo-se ao final deste processo 181,42 gramas de extrato etanólico bruto de *C. urens*, aproximadamente 10% de rendimento.

Ao fim desta etapa reservou-se uma alíquota do EEB para testes e todo o restante do EEB foi particionado para testes e futuro isolamento de constituintes químicos.

O EEB foi solubilizado em uma mistura de metanol:água (3:7) sob agitação constante durante 1 hora e após a solubilização foi fracionada por partição líquido-líquido com os solventes hexano (100%), hexano/acetato de etila (1:1 v/v) e acetato de etila (100%) em ordem crescente de polaridade dos solventes, obtendo-se após a evaporação e recuperação dos solventes as frações: hexânica (Hex); hexânica/acetato de etila (1:1) (Hex/AcOEt) e acetato de etila (AcOEt).



Fluxograma 01: Obtenção e fracionamento do EEB.

4.4 – Avaliação fitoquímica preliminar

A avaliação fitoquímica preliminar do EEB, Hex, Hex/AcOEt e AcOEt foi realizada por meio de técnica descrita por Wagner e Bladt em 1996. Tal técnica consiste em aplicar as amostras sobre uma placa de CCDA com auxílio de capilar e eluir a mesma em sistemas de solventes específicos para as classes de metabólitos secundários que estão sendo investigadas e em seguida revela-la com revelador específico.

Tabela 02: Sistemas de eluição e reveladores utilizados para caracterizar os principais metabólitos secundários da espécie *Cnidocolus urens* (L.) Arthur.

CLASSE DE QUÍMICA	SISTEMA ELUENTE	REVELADOR
Alcaloide	Tolueno: Acetato de Etila: Dietilamina (70:20:10, v/v)	Dragendorff
Antocianina	Acetato de etila: Ácido fórmico: Ácido acético glacial: Água (100:11:11:26, v/v)	Anisaldeído – Ácido sulfúrico
Cumarinas	Tolueno: Éter etílico (1:1 saturado com ácido acético 10%, v/v)	KOH etanólico 10%
Flavonoides e taninos	Acetato de etila: Ácido fórmico: Ácido acético glacial: Água (100:11:11:26, v/v)	NP – PEG
Lignanas	Clorofórmio: Metanol: Água (70:30:4, v/v)	Vanilina sulfúrica
Monoterpenos e diterpenos	Tolueno: Acetato de etila (93:7, v/v)	Vanilina sulfúrica
Naftoquinonas	Tolueno: Ácido fórmico (99:1, v/v)	KOH etanólico 10%
Triterpenos e esteroides	Tolueno: Clorofórmio: Etanol (40:40:10, v/v)	Lieberman–Burchard

Fonte: Adaptado de PEIXOTO SOBRINHO et al., 2012.

4.5 – Determinação do teor de fenóis totais

Para mensuração do teor de fenóis totais utilizou-se o método espectrofotométrico descrito por Slinkard e Singleton (1977), com adaptações propostas por Almeida et al., (2011), neste utiliza-se o reagente de Folin-Ciocalteu e o ácido gálico como padrão. Para procedermos a análise, uma alíquota (40 µL) do extrato e fases diluídos foi adicionada a 3,16 mL de água destilada e 200 µL do reagente de Folin-Ciocalteu, sendo misturados logo em seguida. A mistura foi deixada em repouso por 6 minutos e posteriormente foram adicionados 600 µL de uma solução estoque de carbonato de sódio (Na_2CO_3) e homogeneizados em seguida. As soluções finais foram deixadas em repouso por 2 horas a 20 °C. Passado o período de repouso, procedeu-se a leitura da absorbância de cada solução em espectrofotômetro em 756 nm contra o branco. Os resultados foram plotados em gráfico que correlaciona a absorbância da amostra com sua concentração. Desta forma, o teor de compostos fenólicos totais dos extratos é expresso em miligrama equivalente de ácido gálico por grama de amostra (mg EqAG/g), através da curva de calibração do ácido gálico obtida em concentrações que variaram de 50 a 1000 mg/L, com os ensaios sendo realizados em triplicata.

4.6 – Determinação do teor de flavonoides totais

Para mensurar o teor de flavonoides totais utilizou-se o método espectrofotométrico descrito por Zhishen et al., (1999). Neste, inicialmente, adiciona-se 300 µL do extrato, fases e da solução padrão de (+)-catequina a 1,5 mL de água destilada. Em seguida, adiciona-se 90 µL de solução de nitrito de sódio (NaNO_2). Após 6 minutos de reação, deve-se adicionar 180 µL de uma solução de $\text{AlCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 10% à mistura. Passados 5 minutos de reação, adiciona-se 600 µL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1M à mistura anterior. Após completar-se o volume com 330 µL de água destilada e homogeneizar-se a mistura final por completo, procede-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 510 nm contra o branco em comparação com soluções padrões contendo (+)-catequina em concentrações conhecidas. Desta forma, o teor de flavonoides totais é expresso em miligrama equivalente de catequina por grama de amostra (mg EqC/g), em comparação com a

curva padrão da catequina, obtida em concentrações que variaram de 50 a 1000 mg/L, com os ensaios realizados em triplicata.

4.7 – Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

Para análise da avaliação da atividade antioxidante do extrato e fases utilizou-se os seguintes ensaios: sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico e ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico).

4.7.1 – Ensaio do sequestro do radical livre DPPH

Para a avaliação da atividade antioxidante *in vitro* um dos métodos mais usados consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) (SOUSA et al., 2007). Nesta pesquisa utilizou-se o método descrito por Mensor et al., (2001). Neste, as soluções das amostras e padrões (ácido ascórbico, BHA e BHT) de concentração (1,0 mg/mL) foram preparadas e diluídas em etanol até as concentrações finais de 243, 81, 27, 9, 3 e 1 μ g/mL. Preparou-se a solução de DPPH em etanol na concentração de 50 μ g/mL. Em seguida adicionou-se 1,0 mL da solução de DPPH, preparada, a 2,5 mL das soluções de diferentes concentrações das amostras e padrões e deixou-se reagir por 30 minutos à temperatura ambiente. Passados os 30 minutos, os valores de absorbância foram medidos em 518 nm e convertidos em porcentagem da atividade sequestradora de radical livre (%SRL), utilizando a seguinte fórmula:

$$\%SRL = 100 \times (A_c - A_a)/A_c$$

Onde: A_c indica a absorbância do controle e A_a indica a absorbância para a amostra. Utilizou-se como branco misturas das soluções de etanol (1,0 mL) com as amostras estudadas (2,5 mL). Como controle negativo fez-se uso da solução de DPPH (1,0 mL) com etanol (2,5 mL) e como controle positivo utilizou-se as soluções padrões (ácido ascórbico, BHA e BHT). Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados e expressos com média \pm desvio padrão.

4.7.2 - Teste da inibição da co-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico

Outra técnica usada para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, é o sistema de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico, originalmente descrito por Marco (1968) e modificado em 1971 por Miller. Este método nos permite avaliar a capacidade de uma determinada substância em prevenir a oxidação do β -caroteno, protegendo-o dos radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico.

A reação pode ser monitorada espectrofotometricamente pela perda da coloração amarela do β -caroteno em 470 nm, com leitura imediata e em intervalos de 15 min, por um tempo total de 2 h (BROINIZI et al., 2007).

A taxa de descoloração do β -caroteno pode ser retardada na presença de antioxidantes. Portanto, para o preparo do meio oxidante foram dissolvidos 2 mg de β -caroteno em 10 mL de clorofórmio. Em seguida adicionou-se a 2mL desta solução 40 mg de ácido linoleico e 400 mg de Tween 40. Evaporou-se o clorofórmio à pressão reduzida e a 40°C e adicionou-se em seguida 100 mL de água destilada. Agitou-se a mistura vigorosamente durante 2 minutos, conferindo a oxidação do meio. Preparou-se as soluções dos padrões (ácido ascórbico, BHA e BHT) e das amostras em estudo em etanol na concentração de 1 mg/mL. Adicionou-se 3,0 mL do meio oxidante a cubetas contendo 0,12 mL das soluções dos padrões e amostras mediu-se a absorvância imediatamente em 470 nm. Em seguida, as amostras foram incubadas em banho-maria a 50°C, durante 2 horas. Passado este período, mediu-se a absorvância novamente, no mesmo comprimento de onda. Utilizou-se como controle positivo ácido ascórbico, BHT e BHA e como controle negativo, os extratos foram substituídos por um volume igual de etanol. A porcentagem de atividade antioxidante (%) foi avaliada em termos da descoloração do β -caroteno utilizando a seguinte fórmula:

$$\%AA = (1 - (A_0 - A_t) / (A_0^0 - A_t^0)) \cdot 100$$

Onde: A_0 é a absorvância inicial e A_t é a absorvância final medida para a amostra de teste, A_0^0 trata-se da absorvância inicial e A_t^0 é a absorvância final medida para o controle negativo (branco). Os resultados foram expressos em

percentagem de atividade antioxidante (% AA) como média \pm desvio padrão, e os ensaios realizados em triplicata.

4.7.3 - Método do sequestro do radical ABTS

O terceiro método utilizado para medir a atividade antioxidante nesta pesquisa foi o método da captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-acido sulfônico) (ABTS⁺). Com essa metodologia, pode-se medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica (KUSKOSKI et al., 2005). Utilizou-se a metodologia descrita por Chen et al., (2011), para a determinação da atividade antioxidante a partir da captura do radical ABTS⁺. Para tanto, preparou-se o radical ABTS⁺ a partir da reação de 5 mL da solução estoque de ABTS (7mM) com 88 μ L da solução de persulfato de potássio (140 nM). Manteve-se a mistura no escuro, à temperatura ambiente, por 16 horas. Em seguida, diluiu-se 1 mL desta mistura em álcool etílico até obter uma absorvância de 0,70 nm \pm 0,05 nm a 734 nm (preparou-se e usou-se apenas no dia da análise). Em ambiente escuro, transferiram-se alíquotas de 0,3 mL de cada amostra a ser testada para cubetas contendo 2,7 mL da solução preparada do radical ABTS⁺ que foram cuidadosamente misturadas e deixadas em repouso durante 6 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, realizou-se a medida da absorvância das soluções em 734 nm, utilizando-se como branco o etanol para calibrar o espectrofotômetro. Como referência utilizou-se soluções de Trolox com as mesmas concentrações e nas mesmas condições das amostras, fazendo-se as leituras destas a 734 nm e utilizando-se etanol como branco para calibrar o espectrofotômetro. Todas as leituras foram realizadas em triplicata e os resultados expressos (%AA) como média \pm desvio padrão.

4.8 – Determinação da atividade antimicrobiana *in vitro*

Para avaliação da atividade antimicrobiana foram utilizadas cepas bacterianas de referência obtidas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/FIOCRUZ – Brasil). Os extratos foram testados contra cepas de *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae*

Souza, A. J. Estudo fitoquímico e atividade biológica in vitro de *Cnidoscolus urens* L. (Arthur) (EUPHORBIACEAE).

(ATCC 13883), *Salmonella enterica* (ATCC 10708), *Serratia marcescens* (ATCC 13880) e *Shigella flexneri*(ATCC 12022).

Para avaliar a atividade antibacteriana, foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM). O efeito antibacteriano foi avaliado pelo método de microdiluição (SANTOS et al., 2012), como recomendado pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (CLSI, 2003).

Para a determinação da (CIM) inicialmente preparou-se uma solução mãe de 25 mg/mL do EEB e das fases Hex, Hex/AcOEt (1:1 v/v) e AcOEt de *Cnidoscolus urens* (Euphorbiaceae) estas foram preparada utilizando-se uma solução aquosa de DMSO a 20% (v/v). Foram transferidos 200 µL desta diluição para a microplaca contendo 200 µL de caldo Muller-Hinton. Em seguida, diluições seriadas foram realizadas, resultando em concentrações de 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78; 0,39; 0,195 e 0,0975 mg/mL. O inóculo contendo 5×10^5 UFC/mL (0,5 na escala de McFarland) foi adicionado a cada poço. Vale salientar que foram reservados poços nas microplacas para controle de esterilidade do caldo, de crescimento bacteriano e da ação do antimicrobiano de referência (Gentamicina).

Para a gentamicina foi usada uma concentração inicial de 1,6 mg/mL, a qual foi diluída para concentrações de 0,8; 0,4; 0,2; 0,1; 0,05; 0,025 e 0,0125 mg/mL.

As microplacas foram incubadas sob condições de aerobiose durante 24 horas a 37 °C, quando 10 µL de cloreto de 2,3,5-trifenil-tetrazólio (CTT) a 2% foram adicionados a cada poço para a detecção da mudança de cor do CTT (incolor) para vermelho, que reflete o metabolismo bacteriano ativo. A CIM foi definida como a concentração mais baixa do extrato que visivelmente inibiu o crescimento bacteriano.

Para determinar a CBM, alíquotas de 10 µL foram retiradas de cada um os poços do ensaio anterior contendo os extratos e transferidas para placas de Petri contendo ágar Muller-Hinton. As placas foram incubadas durante 24 horas a 37 °C. O surgimento de colônia de bactéria para uma dada concentração indica que essa não foi capaz de matar 99,9% ou mais do inóculo bacteriano utilizado. Os ensaios foram realizados em triplicata. A densidade do extrato foi empregada para converter µL/mL em mg/mL. Sendo este último utilizado para expressar a CIM e CBM.



Figura 22. Esquema da metodologia utilizada na avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro*.
Imagem: Araújo, C.S

4.9 – Determinação da atividade citotóxica *in vitro*

A avaliação atividade citotóxica *in vitro* do EEB obtido das partes aéreas de *C.urens* foi realizada no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará e seguiu a metodologia MTT que vem sendo utilizada no programa de *screening* do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (SKEHAN et al., 1990). É um método rápido, sensível e barato. A metodologia foi descrita primeiramente por Mosman (1983), tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de Formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE et al., 1996).

As linhagens celulares utilizadas foram plaqueadas nas concentrações de $0,1 \times 10^6$ céls/mL (HCT-116), $0,1 \times 10^6$ céls/mL (OVCAR-8) e $0,7 \times 10^5$ céls/mL (SF-295). As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante foi removido. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as

placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595nm.

Os experimentos foram analisados segundo a média ± desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa *GraphPad Prism*. Cada amostra foi testada em triplicata em dois experimentos independentes.

Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas. Amostras sem atividade (SA), com pouca atividade (PA, inibição de crescimento celular variando de 1 a 50%), com atividade moderada (MO, inibição de crescimento celular variando de 50 a 75%) e com muita atividade (MA, inibição de crescimento variando de 75 a 100%).

4.10 – Atividade fotoprotetora *in vitro*

Para a análise da máxima absorção de radiação ultravioleta ($\lambda_{MÁX}$), as amostras (EEB, Hex, Hex/AcOEt e AcOEt) foram diluídas em etanol até as concentrações de 5, 25, 50 e 100 mg/L. Posteriormente foi realizada a varredura entre os comprimentos de onda 260-400 nm, em célula de quartzo com 1 cm de caminho óptico, com intervalos de 5 nm para verificar a máxima absorção na região ultravioleta, como branco foi utilizado etanol (Violante et al., 2009).

O cálculo do fator de proteção solar espectrométrico ($FPS_{(espectrométrico)}$) *in vitro* foi realizado em conformidade com a equação abaixo, desenvolvida por Mansur et al. 1986:

$$FPS_{(espectrofotométrico)} = CF \times \sum_{290}^{320} EE_{(\lambda)} \times I_{(\lambda)} \times Abs_{(\lambda)}.$$

Onde, $EE_{(\lambda)}$ representa o efeito eritemogênico da radiação de comprimento de onda (λ); $I_{(\lambda)}$, intensidade da radiação solar no comprimento de onda (λ); $Abs_{(\lambda)}$, leitura espectrofotométrica da absorvância da solução do filtro solar no comprimento de onda (λ) e CF, fator de correção igual a 10.

Os valores de $EE_{(\lambda)} \times I_{(\lambda)}$ são constantes e foram determinados por Sayre et al. 1979 e estão representados na Tabela 3 a seguir.

Souza, A. J. Estudo fitoquímico e atividade biológica in vitro de *Cnidocolus urens* L. (Arthur) (EUPHORBIACEAE).

Tabela 03: Função produto constante usado no calculo do FPS espectrométrico.

λ (nm)	$EE_{(\lambda)} \times I_{(\lambda)}$ (constante)
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180
Total	1,0000

$EE_{(\lambda)}$ – representa o efeito eritemogênico da radiação de comprimento de onda (λ);
 $I_{(\lambda)}$ – intensidade da radiação solar no comprimento de onda (λ).

5. Resultados e discussão

5. Resultados e discussão

5.1 – Avaliação fitoquímica preliminar

Após realização da avaliação fitoquímica preliminar do EEB, Hex, Hex/AcOEt e AcOEt segundo metodologia proposta por Wagner e Bladt em 1996 obteve-se o resultado plotado na Tabela 4.

Tabela 04. Perfil fitoquímico cromatográfico do extrato etanólico bruto (EEB) e fases obtidas por partição líquido-líquido do EEB.

FITOQUÍMICA	EEB	Hex	Hex/AcOEt	AcOEt
Alcaloides	-	-	+	-
Antocianinas	-	-	+	+
Cumarinas	+	-	+	+
Flavonoides e Taninos	+	+	+	+
Liganas	+	+	+	+
Mono e diterpenos	+++	+++	+	+
Naftoquinonas	-	-	-	-
Triterpenos e esteróides	+++	+++	+	+

EEB: extrato etanólico bruto; Hex: fase hexânica; Hex/AcEOt: fase Hexano/acetato de etila (1:1); AcEOt: fase acetato de etila; - = não detectado; + = fraco; ++ = moderado; +++ = forte.

Comparando-se o resultado obtido para o perfil fitoquímico de *C. urens* com dados do gênero *Cnidocolus* encontrados na literatura consultada percebe-se que suas indicações etnobotânicas para tratamento de inflamações são coerentes devido à presença de compostos como flavonoides, taninos, cumarinas, terpenoides e esteroides no EEB-*C.urens*.

Desta forma, baseando-se nos resultados obtidos na triagem fitoquímica preliminar procedeu-se a quantificação do teor de fenóis totais, flavonoides totais, bem como a determinação das atividades antioxidante, fotoprotetora, antimicrobiana e citotóxica do EEB e fases obtidas por partição líquido-líquido do EEB de *C. urens*.

5.2 – Fenóis totais, flavonoides totais e avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

Considerando-se os resultados obtidos na triagem fitoquímica preliminar, em que foi indicada a presença da classe de fenóis, flavonoides, taninos e cumarinas no EEB e em suas fases procedeu-se a quantificação do teor de fenóis e flavonoides totais de *Cnidoscolus urens* conforme sugerido.

Dentre os métodos existentes utilizou-se para a determinação de fenóis totais o mais comumente usado, o método colorimétrico do reagente de Folin-Ciocalteu e o ácido gálico como composto fenólico padrão (SINGLETON; ROSSI 1965). O reagente de Folin-Ciocalteu é uma solução de íons complexos poliméricos formados a partir de heteropoliácidos fosfomolibdicos e fosfotungsticos. Esse reagente oxida os fenolatos, reduzindo os ácidos a um complexo azul Mo-W (NEVES et al., 2009). A reação ocorre em meio alcalino e a solução saturada de carbonato de sódio é a base mais indicada. O número de grupos hidroxila controla a intensidade de cor formada (NACZK; SHAHIDI, 2004).

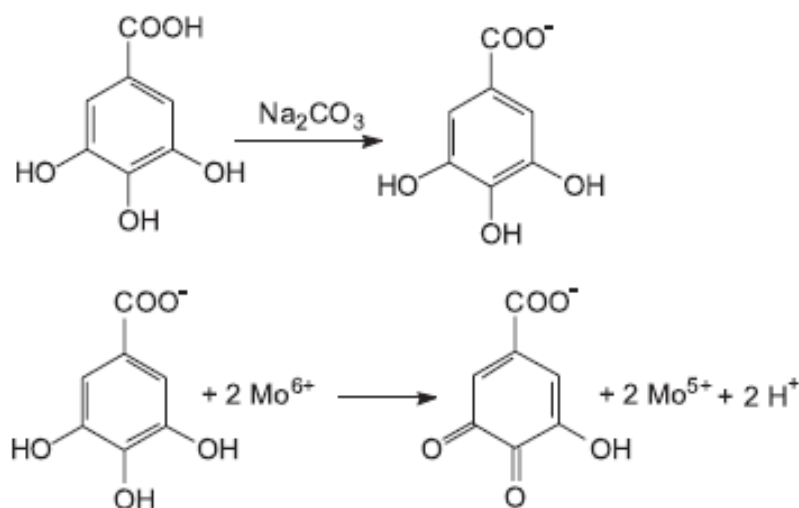


Figura 23: Reação de ácido gálico com o íon molibdênio componente do reagente Folin-Ciocalteu. Fonte: (OLIVEIRA et al, 2009)

Após tratamento dos dados espectrofotométricas e análise dos resultados com *GraphPad Prism*® por ANOVA, utilizando-se o teste *t* de *Student*, constatou-se que o conteúdo fenólico da fase hexânica (Hex) obtida por partição líquido-líquido do extrato etanólico bruto de *C. urens* (EEB) apresentou menor teor fenólico em

comparação com o EEB e as fases Hex/AcEOt e AcEOt que apresentaram quantidades significativas de conteúdo fenólico (Tabela 05).

De acordo com Sousa et al. (2007), os compostos fenólicos distribuem-se nas seguintes categorias: fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados do ácido benzoico e cinâmico), cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas. Sendo assim, o menor teor de compostos fenólicos encontrado para a fase Hexânica sugere que a maior parte do conteúdo fenólico esteja associada à classe das cumarinas, uma vez que na triagem fitoquímica preliminar não fora identificada a presença desta classe para a fase hexânica.

Tabela 05. Teor de compostos fenólicos presentes no EEB e fases obtidas por partição líquido-líquido do EEB de *Cnidoscolus urens*.

Amostra	Fenol total (mg EqAG/g)
EEB	117,42 ± 0,003
Hex	1,51 ± 0,003
Hex/AcEOt	117,42 ± 0,003
AcEOt	161,67 ± 0,003

Valores foram expressos como média ± D.P. (n=3); mgEqAG/g = equivalente de ácido gálico por grama da amostra.

Para que se possa identificar e quantificar flavonoides de forma mais precisa e exata em produtos naturais deve-se proceder à análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Contudo, na ausência do instrumental, o uso de técnicas espectrofotométricas para a determinação de flavonoides totais tem sido utilizado (MARCUCCI et al., 1998).

A utilização do método espectrofotométrico para a determinação de flavonoides totais em plantas utilizando-se o cloreto de alumínio ($AlCl_3$), usado nesta pesquisa, foi adaptado por Vennat et al. (1992) do método descrito por Dowd (1959). Neste, o cátion alumínio forma complexos estáveis com os flavonoides em metanol, ocorrendo na análise espectrofotométrica um desvio para maiores comprimentos de onda e uma intensificação da absorção (MARCUCCI et al., 1998).

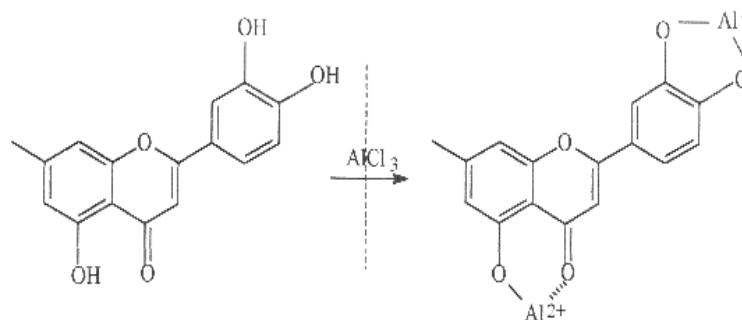


Figura 24: Formação do complexo flavonoide-Al, em solução metanólica de cloreto de alumínio.

Fonte: (Markham, 1982).

O uso do cloreto de alumínio para a determinação da quantidade de flavonoides totais não é um procedimento isento de limitações. Contudo, por ser um método preciso, isto é, que fornece desvios muito pequenos ou nulos entre um ensaio e outro com a mesma amostra a sua utilização é bastante difundida e aceita. No entanto, ele pode ser pouco exato, ou seja, o valor que ele fornece pode ser diferente (geralmente inferior) em relação à quantidade de flavonoides totais realmente presente na amostra analisada. Isto ocorre pelo fato da catequina ser um flavonol, certamente os complexos dos outros flavonóis com alumínio absorvam bem próximo da catequina, mas os complexos derivados de flavonas absorvem em comprimentos de onda inferiores, o que causa uma subestimativa nas determinações de misturas muito ricas em flavonas (MARCUCCI et al., 1998).

No entanto, essa limitação não reduz a validade do método, pois no contexto em que o mesmo vem sendo empregado é mais importante precisão do que exatidão.

Após tratamento dos dados espectrofotométricos e análise dos resultados com *GraphPad Prism*® por ANOVA, utilizando-se o teste *t* de *Student*, os resultados obtidos foram expressos na Tabela 6. Nesta, observa-se que não foi detectada a presença de flavonoides no EEB e na fase Hex, o que corrobora com a hipótese de que o conteúdo fenólico pode estar associado à presença de cumarinas, o que justifica a baixa atividade antioxidante destes quando comparados as fases Hex/AcEOt e AcEOt (Tabela 6).

Tabela 06. Teor de flavonoides presentes no EEB e fases obtidas por partição líquido-líquido do EEB de *Cnidoscolus urens*.

Amostra	Flavonoides totais (mgEqC/g)
EEB	ND
Hex	ND
Hex/AcEOt	86,65 ± 0,001
AcEOt	60,76 ± 0,001

Valores foram expressos como média ± D.P. (n=3); ND = não detectado; mgEqC/g = equivalente de catequina por grama da amostra.

Sousa et al. (2007) afirmam que as propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos são devidas à estrutura química e propriedade redutora dos mesmos, sendo estas características importantes no sequestro ou neutralização dos radicais livres, bem como na quelatação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação quanto na de propagação do processo oxidativo, formando intermediários estáveis por ressonância.

Tabela 07. Atividade antioxidante *in vitro* do extrato etanólico bruto e fases obtidas por partição líquido-líquido do EEB de *Cnidoscolus urens*.

Amostra	DPPH* (%SRL)	ABTS (%AA)	β-caroteno (%AA)
EEB	53,59 ± 0,005	- 0,91 ± 0,004	7,47 ± 1,67
Hex	25,53 ± 0,003	1,61 ± 0,005	2,76 ± 1,53
Hex/AcEOt	97,96 ± 0,002	25,62 ± 0,011	14,75 ± 0,64
AcEOt	94,45 ± 0,002	25,33 ± 0,032	16,62 ± 1,14
Ácido Ascórbico	96,98 ± 0,003		2,10 ± 1,03
BHA	93,64 ± 0,001		85,32 ± 0,29
BHT	92,66 ± 0,004		87,93 ± 4,39
Trolox		53,67 ± 0,004	

Valores foram expressos como média ± D.P. (n=3); %SRL= percentagem de sequestro de radical livre (*atividade antioxidante avaliada através do método do sequestro do radical livre estável DPPH com concentração final equivalente a 243 µg/mL de amostra); %AA= percentagem de atividade antioxidante.

Considerando os resultados de atividade antioxidante expressos na Tabela 7, podemos inferir que as fases Hex/AcEOt e AcEOt apresentaram melhor resultado para atividade antioxidante, avaliada através do método do sequestro do radical livre

estável DPPH com concentração final equivalente igual a 243 µg/mL de amostra, quando às comparamos com o EEB, a fase Hexânica e os padrões. Todavia este resultado sugere que o teor de compostos fenólicos destas frações deva está associado a outras classes de metabólitos como flavonoides, o que não é sugerido para o EEB e a fase Hexânica que apresentaram resultados inferiores às demais fases e padrões e não tiveram seu teor de flavonóis totais detectado. Os compostos fenólicos impedem a ação de radicais livres no organismo e uma vez que protegem moléculas como o DNA, podem vir a abortar alguns processos carcinogênicos (SILVA et al., 2010). O teor de compostos fenólicos está diretamente ligado ao resultado da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH, uma vez que estas substâncias podem reduzir este radical à sua forma menos reativa, a hidrazina, por meio da fixação de um hidrogênio que é removido das substâncias fenólicas (SOUSA et al., 2007).

Quando avaliamos a atividade antioxidante pelo ensaio ABTS observamos que as fases Hex/AcEOt e AcEOt também apresentaram melhor resultado quando comparadas com a fase Hexânica e o EEB que, por sua vez, apresentou valor negativo para o citado ensaio, sugerindo, neste caso, a presença de substância pró-oxidantes. Todavia os resultados encontrados neste ensaio para a atividade antioxidante foram todos inferiores ao padrão Trolox.

Considerando-se que as metodologias utilizando o sequestro dos radicais DPPH e ABTS medem a atividade de compostos de natureza hidrofílica e que se faz necessário aferir, também, a atividade de compostos de natureza lipofílica, utilizou-se então, para tanto, a metodologia da co-oxidação do β-caroteno. Nesta metodologia é medida a capacidade que os extratos têm de inibir a oxidação do β-caroteno, frente ao ácido linoleico. Essa oxidação é provocada pelos radicais livres formados durante a peroxidação do ácido linoleico que atacam o cromóforo do β-caroteno resultando no clareamento da emulsão reacional (Alves et al., 2010; Damasceno et al., 2011). Neste ensaio, todas as amostras de *C. urens* testadas mostraram baixíssima atividade antioxidante. Pelos valores de porcentagem da atividade antioxidante, podemos sugerir que o extrato e as fases possuem baixo teor de compostos lipofílicos, não os permitindo atuar em ambientes como o do teste, retardando ou inibindo a oxidação do β-caroteno. Comportamento semelhante foi observado para o ácido ascórbico, que possui uma polaridade relativamente

acentuada. Assim, pode-se inferir que no extrato e frações deve haver um maior teor de compostos de natureza hidrofílica e que estes se encontram presentes em maior percentagem nas fases Hex/AcEOt e AcEOt, conforme mostram os resultados dos ensaio DPPH e ABTS.

5.3 – Atividade fotoprotetora *in vitro*

A exposição às radiações UV (ultravioleta) é responsável por alterações cutâneas relacionadas ao envelhecimento precoce, resultante da redução da concentração das substâncias antioxidantes endógenas por ação das espécies reativas de oxigênio (EROs) (DAL`BELO, 2008; VELASCO et al., 2008).

Compostos naturais com propriedades antioxidantes e fotoprotetoras melhoram a qualidade e a expectativa de vida ao atuarem contra o estresse oxidativos. Estresse esse que está associado a muitas doenças crônicas e degenerativas, como o alzheimer, parkinson, arterosclerose, complicações do diabetes e envelhecimento precoce (SORG, 2004).

Para Souza et al. (2005) a agressão do sol é cumulativa, irreversível e capaz de levar a diversas alterações bioquímicas, como: alterações das fibras colágenas e elásticas, perda de tecido adiposo subcutâneo e fotocarcinogênese.

O espectro de ondas eletromagnéticas que compõe a luz solar é dividido em três comprimentos de ondas principais: visível (VIS), infravermelha (IR) e Ultravioleta (UV) (MATSUMURA; ANANTHASWAMY, 2004).

A radiação do UV que é dividida em UVC - 270-290 nm, UVB – 290-320 nm e UVA – subdividida em UVA II (320-340 nm) e UVA I (340-400 nm). Dentre as radiações do UV, as radiações UVB e UVA são as mais danosas ao ser humano.

Na busca por produtos naturais que protejam a pele das agressões causadas pela radiação UV, procedeu-se a avaliação da atividade fotoprotetora do EEB e suas fases, obtidas por partição líquido-líquido do referido extrato. O SPF *in vitro* foi determinado pelo método espectrofotométrico desenvolvido por Mansur (1986) utilizando a radiação UVB, considerada a radiação UV de maior incidência durante o dia e que as pessoas estão expostas por mais tempo (DUTRA et al., 2004).

A Figura 25 mostra o perfil de absorção espectrofotométrica do extrato e das fases de *C. urens*. Analisando-se os mesmos observa-se que apenas a fase AcEOt apresentou bandas característica às bandas de absorção em regiões UVC e UVA de

maneira que a absorção encontra-se dependente da concentração, sugerindo um possível potencial fotoprotetor.

O comprimento de onda de absorção máxima (λ_{max}) para AcEOt foi de 270 nm (Tabela 8). O EEB e as fases Hex, Hex/AcEOt não demonstraram absorção satisfatória. Tais resultados são justificados pelo baixo teor de flavonoides encontrados na espécie em estudo. De acordo com a literatura, o conteúdo de flavonoides produzidos por uma planta é considerado um fator importante para proteger as plantas contra a radiação ultravioleta (Souza et al., 2005). O espectro de absorção no ultravioleta dos flavonoides mostra, em geral, dois picos de máxima absorção (240-280 nm e 300-550 nm) (Bobin et al., 1995). Fato que só foi observado para a fase AcEOt-C.urens corroborando, desta forma, os resultados obtidos para o teor de flavonoides e atividade antioxidante da citada fase.

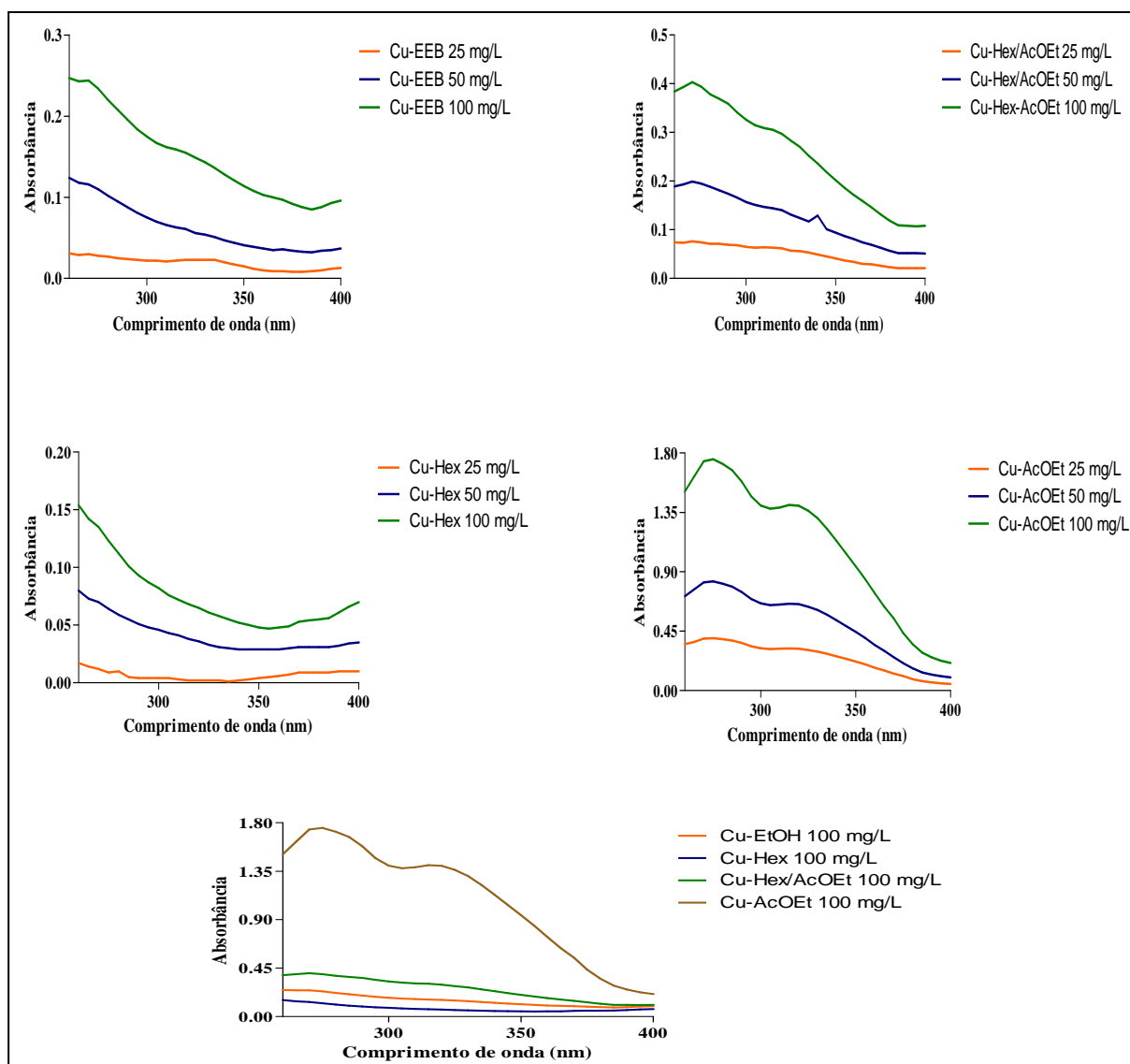


Figura 25: Perfil de absorção espectrofotométrica do extrato e fases de *Cnidoscolus urens*.

Tabela 08: Tipo de radiação intensamente absorvida pela maior concentração do extrato e das fases de *Cnidoscopus urens*.

Amostra	$\lambda_{M\acute{a}x}(nm)$	Tipo de radiação
EEB	260	UVC
Hex	250	UVC
Hex/AcEOt	260	UVC
AcEOt	270	UVC

UVC: 200 - 290 nm; UVB: 290 - 320 nm e UVA: 320 - 400 nm.

O FPS *in vitro* foi determinado pelo método espectrofotométrico desenvolvido por Mansur (1986) utilizando a região UVB, região de maior incidência durante o dia sendo a região a qual as pessoas estão expostas por mais tempo (Dutra et al., 2004). Tanto na Figura 26 como na Tabela 9, observa-se que a fase AcEOt apresenta maior FPS_(espectrométrico) na concentração de 100 mg/L.

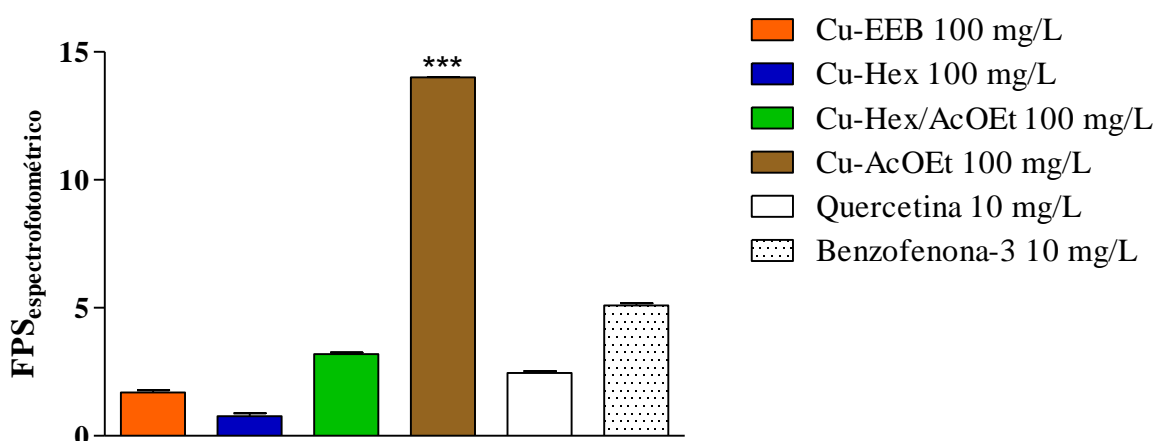


Figura 26: Fator de proteção solar *in vitro* para extrato e fases de *Cnidoscopus urens*. *** indica diferença estatística ($p < 0,001$), de acordo com ANOVA-one way, seguido pelo teste de Tukey (Cu-AcEOt 100 mg/L vs Cu-EEB, Cu-Hex, Cu-CHCl₃, Quercetina e Benzofenona-3 100 mg/L).

Tabela 09: FPS calculado para os extratos na concentração de 100 mg/L, e para os padrões na concentração de 10 mg/L.

Amostra	FPS _(espectrofotométrico)
EEB	1,694 ± 0,1458
Hex	0,7721 ± 0,1829
Hex/AcEOt	3,189 ± 0,1235
AcEOt	14,00 ± 0,0240
Quercetina	2,454 ± 0,1302
Benzofenona-3	5,097 ± 0,1471

FPS expresso em média ± DP, n = 3.

Como a radiação UVB é responsável por causar eritema na pele, um filtro bastante eficaz é aquele capaz de proteger a pele exposta contra a queimadura solar provocada por esta radiação. A eficácia de um protetor solar é medida em função de seu fator de proteção solar (FPS), que indica quantas vezes o tempo de exposição ao sol, sem o risco de eritema, pode ser aumentado (RIBEIRO et al., 2004).

Desta forma, como o melhor resultado para o FPS fora encontrado em uma concentração muito elevada (100 mg/L) há risco de desenvolvimento de processo alérgico, colocando em cheque a segurança do produto.

5.4 – Atividade antimicrobiana *in vitro*

Entre cepas bacterianas que foram submetidas ao teste de sensibilidade ao extrato e fases de *Cnidoscoulus urens*, temos a cepa *Bacillus cereus* (*B. cereus*), como uma cepa Gram-positiva enquanto que as cepas *Escherichia coli* (*E. coli*), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *Salmonella enterica* (*S. enterica*), *Serratia marcescens* (*S. marcescens*) e *Shigella flexneri* (*S. flexneri*) são Gram-negativas. A diferença existente entre os microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos encontra-se no fato destes apresentar uma parede de lipopolissacarídeos que protege sua parede celular, fato que os tornam mais resistentes à ação de antimicrobianos (GOULD, 2009).

Tabela 10: Valores de CIM e CBM para o extrato e fases de *Cnidoscoulus urens*.

Microrganismos	EEB		Hex		Hex/AcEOt		AcEOt	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>B. cereus</i>	3,12	3,12	3,12	3,12	1,56	3,12	3,12	3,12
<i>E. coli</i>	3,12	3,12	1,56	3,12	1,56	3,12	3,12	3,12
<i>K. pneumoniae</i>	6,25	6,25	6,25	6,25	3,12	6,25	6,25	6,25
<i>S. entérica</i>	3,12	12,5	3,12	12,5	1,56	12,5	3,12	6,25
<i>S. marcescens</i>	1,56	6,25	1,56	12,5	1,56	12,5	1,56	12,5
<i>S. flexneri</i>	3,12	12,5	1,56	12,5	1,56	12,5	0,78	12,5

Todos os resultados foram expressos em mg/mL.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 10 observa-se que tanto o extrato quanto as fases de *C. urens* apresentaram ação antibacteriana para todas as cepas testadas.

A Figura 27 mostra que para o EEB a melhor ação bacteriostática foi observada para a cepa *S. marcescens* enquanto que a melhor ação bactericida foi observada para as cepa *B. cereus* e *E.coli*. Para a fase Hexânica, observou-se que a melhor ação bacteriostática deu-se para as cepas *E. coli*, *S. marcescens* e *S. flexneri* enquanto que, a melhor ação bactericida foi observada para as cepa *B. cereus* e *E.coli*. Na avaliação da fase Hex/AcEOt, a ação bacteriostática mostrou pior resultado para a *K. pneumoniae* e melhor resultado para ação bactericida para as cepas *B. cereus* e *E.coli*. Na fase AcEOt, a ação bacteriostática apresentou melhor resultado à cepa *S. flexneri* e melhor ação bactericida para *B. cereus* e *E.coli*.

Acredita-se que muito do efeito antimicrobiano dos extratos vegetais se deve, principalmente, à presença de flavonoides em sua composição (AHMAD; BEG 2001). Deste modo, a presença de flavonoides (Tabela 6) nas fases Hex/AcEOt e AcEOt confere a estas fases, de um modo geral, além de uma boa atividade antioxidante uma boa atividade antimicrobiana constatada através das menores CIM e CBM para um maior número de cepas quando comparadas com o EEB e Hex.

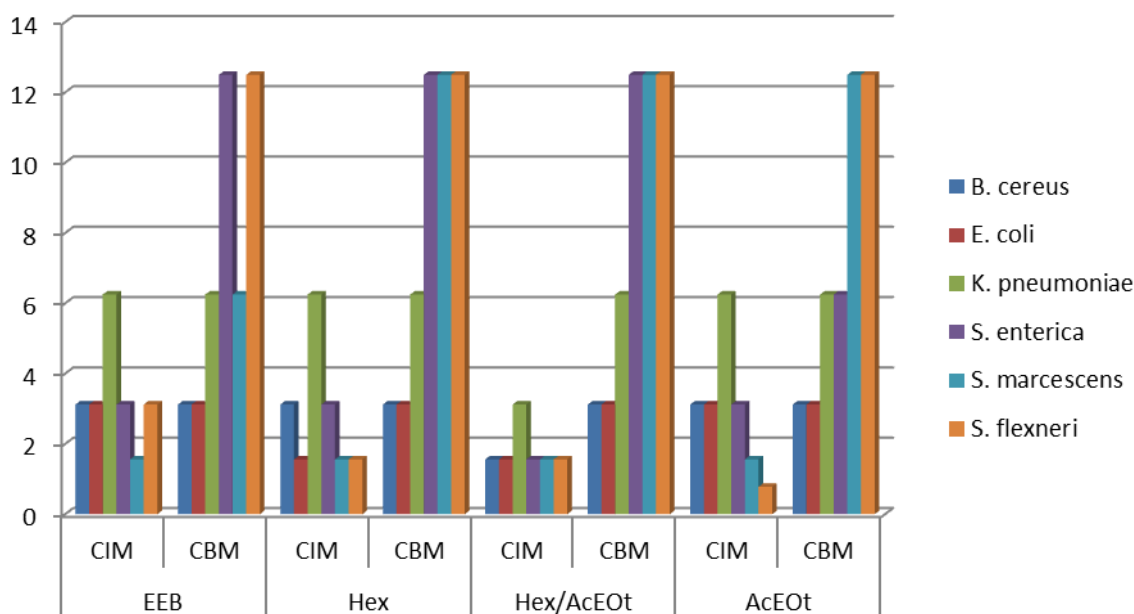


Figura 27: Atividade antimicrobiana do extrato etanólico e fases de *Cnidoscolus urens*.

5.5 – Atividade citotóxica *in vitro* do EEB

A atividade citotóxica das amostras está apresentada na Tabela 11, com seus respectivos valores de percentual de inibição de crescimento (IC%). Dentre os resultados obtidos para a citotoxicidade do EEB, pode-se observar que o EEB apresentou-se sem atividade para a linhagem OVCAR–8 (ovário humano) e com pouca atividade para as linhagens SF–295 (glioblastoma humano) e HCT–116 (colorretal humano). Os experimentos foram analisados segundo a média \pm desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa *GraphPad Prism*. Cada amostra foi testada em triplicata em dois experimentos independentes e uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico da amostra testada. Amostras sem atividade (SA), com pouca atividade (PA, inibição de crescimento celular variando de 1 a 50%), com atividade moderada (MO, inibição de crescimento celular variando de 50 a 75%) e com muita atividade (MA, inibição de crescimento variando de 75 a 100%).

Tabela 11: Valores de percentual de inibição de crescimento (%IC) para o EEB-*C.urens*.

Amostra	OVCAR–8	SF–295	HCT–116
	Média	Média	Média
EEB	(SA) -7,87 %	(PA) 29,45 %	(PA) 5,07 %

Valores de %IC com um intervalo de confiança de 95% obtido por regressão não-linear, feitos em triplicata em 3 linhagens tumorais testadas na dose máxima de 50 μ g/mL (extratos).

A pouca ou nenhuma atividade citotóxica apresentada pelo extrato etanólico bruto, obtido das partes aéreas de *Cnidocolus urens* encontra-se em conformidade com a triagem fitoquímica preliminar do EEB, que não detectou a presença de alcaloides no EEB. Contudo, estudos realizados por Tavares e Amorim em 2010 indicam atividade antiprolifera frente à linhagem celular HEp-2 (cancer de laringe) para as partes aéreas de *C. urens*. Desta forma, novos testes citotóxicos devem ser realizados para o EEB e suas frações.

6. Conclusões

6. Conclusões.

O estudo fitoquímico preliminar indicou a presença cumarinas, flavonoides, taninos, lignanas, terpenoides e esteroides, estando a maior concentração de terpenoides e esteroides no EEB e Hex (Tabela 4). O teor de fenóis apresetou melhor resultado para o EEB, Hex/AcEOt e AcCEOt (Tabela 5) enquanto que, o teor de flavonoides totais só foi encontrado nas fases Hex/AcEOt e AcEOt (Tabela 6) e a fase Hex/AcEOt apresentou maior concentração de flavonoides.

Na atividade antioxidante (Tabela 7), verificada através dos ensaios DPPH, ABTS e β -caroteno, as fases Hex/AcEOt e AcEOt apresentaram os melhores resultados. Contudo, foi no ensaio do DPPH que se obteve os melhores resultados de atividade antioxidante para as fases Hex/AcEOt e AcEOt. Ficando, neste ensaio (DPPH), a fase Hex/AcEOt com resultados superiores até aos padrões utilizados (ácido ascórbico, BHA e BHT).

Na avaliação da atividade fotoprotetora o EEB e suas frações mostraram-se capazes de absorver a radiação UVC para a maior concentração testada (100 mg/L) e a fase AcEOt apresentou melhor FPS_(espectrofotométrico) também para a concentração de 100 mg/L (Tabela 9).

No tocante a atividade antimicrobiana, o EEB e suas frações mostraram-se promissores agentes antimicrobianos para cepas gram-positivas e gram-negativas testadas. Contudo, as fases Hex/AcEOt e AcEOt apresentaram os melhores resultados para as ações bacteriostática e bactericida.

O ensaio de atividade citotóxica, realizado com o EEB, apresentou pouca atividade para as linhagens SF-295 e HCT-116 enquanto que, para a linhagem OVCAR-8 o EEB apresentou-se sem atividade.

Os resultados apresentados neste estudo mostram que a *Cnidoscolus urens* possui atividades antioxidante, antimicrobiana, fotoprotetora e citotóxica. As atividades apresentadas podem estar relacionadas à presença de substâncias fenólicas no extrato e fases, principalmente os flavonoides. Estudos estão sendo realizados para o isolamento dos constituintes químicos desta espécie, para que os mesmos possam ser testados em modelos experimentais, e, assim, determinarmos os compostos responsáveis pelas atividades biológicas do extrato e suas fases.

Referências

Referências

- ABDULLAEV, et al. Pattern of childhood cancer mortality in Mexico. **Archives of Medical Research**, v.31, n. 5, p.526-531, 2000.
- AGRA, M.F.; FREITAS, P.F. & BARBOSA FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p.114-140, 2007.
- AGRA, M.F., SILVA K.N., BASÍLIO I.J.L.D, FREITAS P.F, BARBOSA-FILHO J.M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Braz. J. Pharmacogn.**, v.18, n. 3, p.472-508, 2008.
- AHMAD, I.; BEG, A. Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 74, n.2, p.113-123, 2001.
- ÁJILA, C.M.; NAIDU, K.A.; BHAT, S.G.; RAO, U.J.S. Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. **Food Chemistry**. v.105, n.3,p.982-988. 2007.
- ALBUQUERQUE, U.P. Re-examining hypotheses concerning the use and knowledge of medicinal plants: A study in the Caatinga vegetation of NE Brazil. **J. Ethnobiol. Ethnomed.**, v. 2, n.30, p.1-10, 2006.
- ALBUQUERQUE, U.P.; MEDEIROS, P.M.; ALMEIDA, A.L.S.; MONTEIRO, J.M.; LINS NETO, E.M.F.; MELO, J.G. & SANTOS, J.P. Medicinal plants of the Caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v.114, n.3, p.325-354, 2007.
- ALBUQUERQUE, U.P.; MONTEIRO, J.M.; RAMOS, M.A.; AMORIM, E.L.C. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. **J. Ethnopharmacol**, v.110, n.1, p.76-91, 2007.
- ALCOFORADO FILHO, F.G., SAMPAIO, E.V.S.B. & RODAL, M.J.N. Composição Florística e fitossociologia de um remanescente de vegetação caducifólia espinhosa em Caruaru, Pernambuco. **Acta Botanica Brasilica**, v.17, n.2, p.287-303, 2003.
- ALMEIDA, VERA LÚCIA DE ET AL. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não-específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n.1, p.118-129, 2005.
- ALMEIDA, C.F.C.B.R, SILVA T.C.L, AMORIM E.L.C, MAIA M.B.S, ALBUQUERQUE UP. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the Caatinga (Northeast Brazil). **J. Arid. Environ.**, v. 62, n.1, p.127-142, 2005.
- ALMEIDA, D.M; AMORIM, E.L.C. Estudo químico de duas espécies do gênero *cnidoscolus* presentes no bioma caatinga com Potencial atividade antioxidante. **XVII**

Souza, A. J. Estudo fitoquímico e atividade biológica in vitro de *Cnidoscolus urens* L. (Arthur) (EUPHORBIACEAE).

congresso de iniciação científica, I congresso de iniciação em desenvolvimento tecnológico e inovação, UFPE | CTG, Recife, 2009.

ALMEIDA, J. R. G. S.; OLIVEIRA, M. R.; GUIMARÃES, A. L.; OLIVEIRA, A. P.; RIBEIRO, L. A. A.; LÚCIO, A. S. S. C. QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Phenolic quantification and antioxidant activity of *Anaxagorea dolichocarpa* and *Duguetia chrysocarpa* (Annonaceae). **International Journal of Pharma and Bio Science, Andhra Pradesh**, v. 2, n. 4, p. 367-374, 2011.

ALVES, H.M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Cad Temat QNEsc**, n.3, p.10-15, 2001.

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**, v.33, n.10, p.2202-2210, 2010.

ANDRADE, K.V.S.A., RODAL, M.J.N., LUCENA, M.F.A. & GOMES, A.P.S. Composição florística de um trecho do Parque Nacional do Catimbau, Buíque, Pernambuco-Brasil. **Hoehnea**, v. 31, n. 3, p. 337-348, 2004.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.; ROBARDS, K.; RYAN, D. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. **The Analyst**, v. 125, n.5, p. 989-1009, 2000.

ANTUNES, R.M ET AL. Atividade antimicrobiana "in vitro" e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.4, p. 517-524, 2006.

AQUINO, R. ET AL. Antioxidant and photoprotective activity of a crude extract of *Calcitium reflexum* H.B.K. leaves and their major flavonoids. **Journal of Ethnopharmacology**, v.79, n.2, p.189-91, 2002.

ARAÚJO, E.L., SAMPAIO, E.V.S.B. & RODAL, M.J.N. Composição florística e fitossociológica de três áreas de caatinga. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 55, n.4, p. 595-607, 1995.

ARAÚJO T.A.S., ALENCAR N.L., AMORIM E.L.C., ALBUQUERQUE U.P. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. **J. Ethnopharmacol**, v.120,n.1,p.72-80, 2008.

AWOYINKA, O. A., BALOGUN, I. O. AND OGUNNOWO, A. A. Phytochemical screening and in vitro bioactivity of *Cnidoscolus aconitifolius* (Euphorbiaceae). **Journal of Medicinal Plants Research**, v.1, n.3, p.63-65, 2007.

AYRES, M.C.C.; BRANDÃO, M.S.; VIEIRA-JÚNIOR, G.M.; MENOR, J.C.A.S.; SILVA, H.B.; SOARES, M.J.S.; CHAVES, M.H. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n.1, p.90-97, 2008.

Souza, A. J. Estudo fitoquímico e atividade biológica in vitro de *Cnidoscopus urens* L. (Arthur) (EUPHORBIACEAE).

BALESTRIN, LUCIANA ET AL. Contribuição ao estudo fitoquímico de *Dorstenia multiformis* Miquel (Moraceae) com abordagem em atividade antioxidante. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.2, p. 230-235, 2008.

BARRACA, S.A.; MINAMI, K. **Relatório do Estágio Supervisionado Produção Vegetal-II: Manejo e Produção de Plantas Medicinais e Aromáticas**. Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Departamento de Produção Vegetal, 1999.

BARREIRO, E.J.; BOLZANI, V. DA S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química nova**, v.32, n.3, p.679-688, 2009.

BARREIRO, E.J.; FRAGA, C. A. M. Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos. Porto Alegre (RS): **ArTmed**, 2001.

BARREIROS, ANDRÉ L. B. S.; DAVID, JORGE M. AND DAVID, JUCENI P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n.1, p. 113-123, 2006.

BARRY, A.L; THORNSBERRY, C. SUSCEPTIBILITY TESTS: DIFFUSION TEST PROCEDURES. IN: BALOWS A, HAUSER WJ, HERMANN KL, ISENBERG HD, SHAMODY HJ. **Manual of clinical microbiology**. Washington, DC: **American Society for Microbiology**, 5.ed, p. 1117-1125. 1991.

BERRIDGE, M. V., TAN, A. S., MCCOY, K. D., WANG, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. **Biochemica**, v.4, p.14-19, 1996.

BEZERRA, G.E. Favela - seu aproveitamento como forrageira. **Boletim Técnico**, v. 30, p. 71-87, 1972.

BHATTACHARYYA J., BARROS C.B. Triterpenoids of *Cnidoscopus urens*. **Phytochemistry**, v. 25, p. 274-276, 1985.

BITTNER, M. et al. Estudio químico de especies de la familia Euphorbiaceae em Chile. **Bol. Soc. Chil. Quim.**, v. 46, n. 4, p. 1-15, 2001.

BOBIN, M.F.; RAYMOND, M.; MARTINI, M.C. Propriedades de absorção UVA/UVB de produtos naturais. **Cosmet Toil**, v.7, p.44-50, 1995.

BONDAR, G. Penão - *Cnidoscopus marcgravii* Polh – novo recurso oleífero da Bahia. **Boletim do Instituto Central de Fomento Econômico da Bahia**, v. 12, p.1-16, 1942.

BONINA, F. ET AL. In vitro-antioxidant and in-vivo photoprotective effect of three lyophilized extracts of *Sedum telephium* L. leaves. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.52, n.10, p.1279-85, 2000.

BRAGA, R. **Plantas do nordeste brasileiro, especialmente do Ceará**. Editora Mossoró, 1976.

Souza, A. J. Estudo fitoquímico e atividade biológica in vitro de *Cnidoscolus urens* L. (Arthur) (EUPHORBIACEAE).

BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229–239, 2010.

BROINIZI, P.R.B.; ANDRADE-WARTH, E.R.S.; SILVA, A.M.O.; NOVOA, A.J.V.; TORRES, R.P.; AZEREDO, H.M.C.; ALVES, R.E.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.27, n.4, p.902-908, 2007.

BURGER, W. & M. HUFT. Family # 113 Euphorbiaceae. Flora Costaricensis. **Fieldiana Botany**, New Series n. 36, 1995.

BUTERA, D, TESORIERE, L, DI GAUDIO, F, BONGIORNO, A, ALLEGRA, M, PINTAUDI, A.M, KOHEN, R, LIVREA, M.A. Antioxidant Activities Of Sicilian Prickly Pear (*Opuntia Ficus Indica*) Fruit Extracts And Reducing Properties Of Its Betalains: Betanin And Indicaxanthin. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 50, n.6, p.895-901, 2002.

CABALLERO, P; FRONCZEK, FR; FISCHER, NH; FERNANDEZ, S; HERNANDEZ, E. The isolation and molecular structure of lupeol beta-phenylpropionate from *Cnidoscolus elasticus*. **Journal of natural products**, v. 47, n.5, p.819-821, 1984.

CAMPOS, A.M.; LISSI, E.A. Kinetics of the reaction between 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) derived radical cations and phenols. **International Journal of Chemical Kinetics**, v. 29, n.3, p.219-224. 1997.

CARVALHO, A.A.T; SAMPAIO, M.C.C; SAMPAIO, F.C; MELO, A.F.M; SENA, K.X.F.R; CHIAPPETA, A.A; HIGINO, J.S. Atividade antimicrobiana in vitro de extratos hidroalcoólicos de *Psidium guajava* L. sobre bactérias gram-negativas. **Acta Farm Bonaerense**, v. 21, n.4, p.255-258. 2002.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para a otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p.99-105, 1998.

CHANDRASEKARAN, M; VENKATESALU, V. Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds. **J. Ethnopharmacol.**, v.91, n.1, p.105-108, 2004.

CHEN, Y. et al. In vitro and in vivo antioxidant effects of the ethanolic extract of *Swertia chirayita*. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v.136, n.2, p.309-315, 2011.

CHIU, A.E.; KIMBALL, A.B. Topical vitamins, minerals and botanical ingredients as modulators of environmental and chronological skin damage. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 149, n.4, p.681-91, 2003.

CIBA SPECIALTY CHEMICALS. Ciba® Tinosorb® M – Microfine UVA Absorber with Triple Action. **Material Data Sheet**. Switzerland, 2002.

Souza, A. J. Estudo fitoquímico e atividade biológica in vitro de *Cnidoscopus urens* L. (Arthur) (EUPHORBIACEAE).

COTINGUIBA, G.G.; SILVA, J.R.N.; AZEVEDO, R.R.S.; ROCHA, T.J.M.; SANTOS, A.F.S. Método de Avaliação da Defesa Antioxidante: Uma Revisão de Literatura. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**; v. 15, n.3, p.231-237, 2013.

CSID:10217264, <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.10217264.html> (accessed 22:31, Jun 2, 2014)

DAL'BELO, S.E. Avaliação da eficácia fotoprotetora, penetração cutânea e segurança de formulações cosméticas contendo extratos de Chá Verde e Ginkgo Biloba. **[Dissertação] Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, 2008.**

DAMASCENO, E.I.T; SILVA J.K.R; ANDRADE E.H.A; SOUSA P.J.C; MAIA J.G.S. Antioxidant capacity and larvicidal activity of essential oil and extracts from *Lippia grandis*. **Braz J Pharmacogn**, v.21, n.1, p.78-85, 2011.

DANTAS, A.L.A. ET AL. In Vitro Study of *Vellozia pusilla* Pohl (Velloziaceae), Brazilian Plant Specie: Antitumoral Activity and Labeling of Blood Elements. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n.2, p.57-61, 2005.

DE LIMA, A.A; SUSSUCHI, E.M; DE GIOVANI, W.F. Electrochemical and antioxidante properties of anthocyanins and anthocyanidins. **Croatica Chemica Acta**. v.80, n.1, p.29-34, 2007.

DEI-JI, P. ET AL. Kanmiphorin-C and D citotoxic diterpenes from *Euphorbia kansui*. **Phytochemistry**, v.30, n. 3, p.1018-1020, 1991.

DOMINGUEZ, X.A. ET AL. Isolation and identification of xochitloldione and isoxochitlolone from *cnidosculus urens*. **Journal of Natural Products**, v. 55, n.2, p. 221-224, 1992.

DOWD L.E. Spectrophotometric determination of quercetina. **Anal.Chem.**, v. 31, n.7, p. 1184-1187, 1959.

DUARTE, M.C.T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Mediciniais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. **Revista Multiciência**, Campinas, v. 7, n.1 2006.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R. D.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n.2, p.446-452, 2006.

DUTRA, E.A.; OLIVEIRA, D.A.G.C.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M.; SANTORO, M.I.R.M. Determination of sun protection factor (SPF) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry. **Rev Bras Cienc Farm.**, v.40, n.3, p.381-385, 2004.

ELOFF, J.N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Med** , v. 64, n.8 p.711-713, 1998.

Souza, A. J. Estudo fitoquímico e atividade biológica in vitro de *Cnidoscopus urens* L. (Arthur) (EUPHORBIACEAE).

FENNEL C.W; LINDSEY, K.L; MC GAW, L.J; SPARG, S.G; STAFFORD G.I; ELGORASHI, E.E; GRACE, M; VAN STADEN, J. Review: Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: Pharmacological screening and toxicology. **J. Ethnopharmacol** , v. 94, n.2, p.205-217, 2004.

FERREIRA, V.F.; PINTO, A.C. A Fitoterapia no mundo atual. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 9, p.1829, 2010.

FERREIRA ET AL. HIV: replication mechanism, pharmacological targets and inhibition by products derived from plants. **Química Nova**, v.33, n.8, p.1743-1755, 2010.

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

GOMES, L.M.A.; LIMA-SARAIVA, S.R.G.; ANDRADE, T.M.D.; Silva, J.C.; DINIZ, T.C.; BARRETO, V.N.S.; MENDES, R.L.; QUINTANS-JUNIOR, L.J.; QUINTANS, J.S.S.;LIMA, J.T.; ALMEIDA, J.R.G.S. Antinociceptive activity of the ethanolic extract from barks and leaves of *Cnidoscopus quercifolius* (Euphorbiaceae) in mice. **Journal of Young Pharmacists**, v.6, n.2, p. 64-69, 2014.

GOMES, L.M.A.; ANDRADE, T.M.D.; Silva, J.C.;LIMA, J.T.; QUINTANS-JUNIOR, L.J.; ALMEIDA, J.R.G.S. Phytochemical screening and anti-inflammatory activity of *Cnidoscopus quercifolius* (Euphorbiaceae) in mice. **Pharmacognosy Research**, v.6, n.4, p.345-349, 2014.

GOULD, D. Effective strategies for prevention and control of Gram-negative infections. **Nursing Standard**, Londres, v.23, n.48, p.42-46, 2009.

GOVAERTS, R., FRODIN, D.G. & RADCLIFFE-SMITH, A. World checklist and bibliography of Euphorbiaceae (and Pandaceae). **Royal Botanical Gardens**, Kew, v.1-4 2000.

GUPTA, M. ET AL. Antitumor activity and antioxidant role of *Bauhinia racemosa* against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. **Acta Pharmacologica Sinica**, v.25, n.8, p.1070-1076, 2004.

HALLIWELL, B.; WISEMAN, H. Damage to dna by reactive oxygen and nitrogen Species: role in inflammatory disease and progression to cancer. **Biochemistry Journal.**, v.313,n.1, p.17–29, 1996.

HASLAM, E. Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action. **J. Nat. Prod.**, v.59, n.2, p.205-215, 1996.

HARBORNE J.B. Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis, Chapman and Hall, London. 1984.

INGRAM, J. Notes on the cultivated Euphorbiaceae. **Baileya**, v. 5, p. 107-117, 1957.

Souza, A. J. Estudo fitoquímico e atividade biológica in vitro de *Cnidoscolus urens* L. (Arthur) (EUPHORBIACEAE).

JANSEN, A.M., SCHEFFER J.J.C., BAERHEIM S, A. Antimicrobial activity of essential oils from Greek *Sideritis* species, **Pharmazie**, v. 45, n.1, p.70-71, 1987.

JUDD, W.S., CAMPBELL, C.S., KELLOGG, E.A. & STEVENS, P.F. Plant Systematics: A phylogenetic approach. **Sinauer Associates**, Sunderland, 1999.

KARAMAN, İ; ŞAHIN, F; GÜLLÜCE, M; ÖĞÜTÇÜ, H; ŞENGÜL, M; ADIGÜZEL, A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. J. **Ethnopharmacol.**, v. 85, p. 231-235, 2003.

KIM, S.J. Effect of biflavones of *Ginkgo Biloba* against UVB-induced cytotoxicity *in vitro*. **Journal Dermatology**, v. 30, n.4, p.193-199, 2001

KIM, K.W; THOMAS, R.L. Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weight. **Food Chemistry**, v.101, n.1, p.308–313, 2006.

KONG Q.; LILLEHEI K.O. Antioxidant inhibitors for cancer therapy. **Med Hypotheses**, v. 51, n.5, p.405-409, 1998.

KORZYBSK, T.,KOWSZYK-GINDIFER, Z., KURYŁOWICZ, W. Biflorin. **Antibiotics**, p.1523–1526, 1967.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; TRONCOSO, A.M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicação de diversos métodos químicos para determinar atividade antioxidante em polpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.4, p.726-732, 2005.

LARSON, R.A. Naturally Occurring Antioxidants, **Lewis Publishers: New York**, 1997.

LEAL, I.R.; TABARELLI, M.; DA SILVA, J. M. C. **Ecologia e conservação da Caatinga**.1ª ed. Recife. Editora Universitária UFPE. 2003. 822p.

LEJA, M; MARECZEK, A; WYZGOLIK, G; KLEPACZ-BANIAK, J; CZEKONSKA, K. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. **Food Chemistry**, v. 100, n.1, p.237-240. 2007.

LIMA, J.L.S. Plantas forrageiras das caatingas - usos e potencialidades. Petrolina, **EMBRAPA**, 1998.

LOIOLA, M.I.B.; DE ARAÚJO ROQUE, A.; DE OLIVEIRA, A.C.P. Caatinga: Vegetação do semiárido brasileiro. **Notas Técnicas**, p.14, 2012.

LUCENA, M.F.A. Diversidade de Euphorbiaceae sensu lato no Nordeste do Brasil. **Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco**, Recife, 2009.

LUZ, S.M.; SOUZA FILHO, A.P.S.; GUILHON, G.M.S.P.; VILHENA, K.S.S.. Atividade alelopática de substâncias químicas isoladas da *Acacia mangium* e suas variações em função do PH. **Planta daninha**, v. 28, n.3, p. 479-487. 2010.

Souza, A. J. Estudo fitoquímico e atividade biológica in vitro de *Cnidoscolus urens* L. (Arthur) (EUPHORBIACEAE).

MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. Systematic identification of flavonoids. **Springer-Verlag**; New York, USA; 354 p. 1970.

MACBRIDE, J.F. Euphorbiaceae. In: Macbride, J.F. **Flora of Peru**. Field Museum of Natural History. v.13, n.3, p.1-200, 1951.

MACHADO, A.A. Caracterização fitoquímica e avaliação da citotoxicidade de *Synadenium carinatum* Boiss (Euphorbiaceae). **Dissertação de mestrado, Curitiba**, 2008.

MARCO, J. Rapid method for evaluation of antioxidants, **J.Am.Oil Chem.Soc.**, v.45, p.594,1968.

MARKHAM, K.R. Techniques of flavonoid identification. **Academic Press**; London, UK;v.12, p.114, 1982.

MAGINA, M.D. A. ET AL. Topical antiinflammatory activity and chemical composition of the epicuticular wax from the leaves of *Eugenia beaurepaireana* (Myrtaceae). **Braz. J. Pharm. Sci.**, v.45, n.1, p.171-176, 2009.

MARCUCCI, M.C.; WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Uso De Cloreto De alumínio na quantificação de flavonoides em amostras de própolis. **Mensagem Doce**, São Paulo, v. 46, p. 3-8,1998.

MATSUMURA Y; ANANTHASWAMY H.N. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.195, n.3, p.298-308, 2004.

MELO, J.G.; SANTOS, A.G.; AMORIM, E.L.C.; NASCIMENTO, S.C.; ALBUQUERQUE, U.P. Medicinal plants used as antitumor agents in Brazil: An ethnobotanical approach. **Evid. Based Compl. Alt. Med.**, p.1–14, 2011.

MELO, A.L., SALES, M.F. O gênero *Cnidoscolus* Pohl (Crotonoideae-Euphorbiaceae) no Estado de Pernambuco, Brasil. **Acta bot. bras.**, v. 22, n.3, p 806-827, 2008.

MENEZES, Y.A.S., FÉLIX-SILVA, J., SILVA-JÚNIOR, A.A., REBECCHI, I.M.M., OLIVEIRA, A.S., UCHOA, A.F., FERNANDES-PEDROSA, M.F. Protein-Rich Fraction of *Cnidoscolus urens* (L.) Arthur Leaves: Enzymatic Characterization and Procoagulant and Fibrinogenolytic Activities. **Molecules**, v.19, n.3, p.3552-3569, 2014.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v.15, n.2, p. 127-130, 2001.

MILLER, H.E. A simplified method for evaluation of antioxidants. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, p.48-91,1971.

Souza, A. J. Estudo fitoquímico e atividade biológica in vitro de *Cnidocolus urens* L. (Arthur) (EUPHORBIACEAE).

MILLER, N. J.; Rice-Evans, C. A.; Spectrophotometric determination of antioxidant activity. **Redox Report**, v. 2, n.3, p.161-171, 1996.

M.M.A. Avaliação e ações prioritárias para conservação da Biodiversidade da Caatinga. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal, Universidade Federal de Pernambuco, **Conservation International do Brasil e Fundação Biodiversitas**, Brasília, 2002.

MOELLERING JR, R.C. Novos desafios no campo das doenças infecciosas. In: Patógenos emergentes nas doenças infecciosas: Relatório Especial Hospital Práctice. **Euromédice**. Ed. Médicas. 2000.

MOODY, J.O; ADEBIYI, O.A; ADENIYI, B.A. Do Aloe vera and Ageratum conyzoides enhance the anti-microbial activity of traditional medicinal soft soaps (Osedudu). **J. Ethnopharmacol**, v. 92, n.1, p.57-60, 2004.

MORS, W.B. & RIZZINI, C.T. Use full Plants of Brazil. London, Amsterdam, **Holden-Day Inc**, 1966.

MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, n.1-2, p.55-63, 1983.

MUENSCHER, W.C. Euphorbiaceae. In: MUENSCHER, W.C. (Ed.) Poisonous plants of the United States. New York: **The Macmillan Company**. p.142-152, 1958.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **J. Chromatography**, v. 1054, n.1, p.95-111, 2004.

NASCIMENTO, C.S; NUNES, L.C.C; LIMA, A.A.N; JÚNIOR; S.G; NETO, P.J.R. Incremento do FPS em formulação de protetor solar utilizando extratos de própolis verde e vermelha. **Rev Bras Farmacogn.**, v.90, n.4, p.34-339,2009

NASCIMENTO, L.C.S. Caracterização Centesimal, Composição Química e Atividade Antioxidante do Noni (*Morinda Citrifolia* L.) Cultivado no Município de Zé Doca-MA. **Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Tecnologia**, Rio de Janeiro, 2012.

NAKATANI, N. Antioxidants from spices and herbs. **Natural antioxidants: chemistry, health effects, and applications**, p.64-75, 1996.

NEVES, L.C.; ALENCAR, S.M.; CARPES, S.T. Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*. **Braz. J. Food Technol.**, VII BMCFB, 2009.

PASSOS, R.A.M. Favela, determinações químicas e valor nutritivo. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 22, n.3, p.451-454, 1993.

PEIXOTO SOBRINHO, T.J.S.; CASTRO, V.T.N.A.; SARAIVA, A.M.; ALMEIDA, D.M.; TAVARES, E.A.; PISCIOTTANO, M.N.C.; AMORIM, E.L.C. Phenolic content and

Souza, A. J. Estudo fitoquímico e atividade biológica in vitro de *Cnidoscolus urens* L. (Arthur) (EUPHORBIACEAE).

antioxidant capacity of four *Cnidoscolus* species (Euphorbiaceae) used as ethnopharmacologicals in Caatinga, Brazil. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.5, n.20, p.2310-2316, 2011.

PEIXOTO SOBRINHO, T.J.S.; CASTRO, V.T.N.A.; SARAIVA, A.M.; ALMEIDA, D.M.; TAVARES, E.A.; PISCIOTTANO, M.N.C.; AMORIM, E.L.C. Phytochemical screening and antibacterial activity of four *Cnidoscolus* species (Euphorbiaceae) against standard strains and clinical isolates. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 6, n.21, p.3742-3748, 2012.

PERFEITO, J.P. ET AL. Characterization and biological properties of *Pouteria torta* extracts: a preliminary study. **Rev. bras. farmacogn.**, v.15, n.3, p.183-186. 2005.

PINTO, T.J.A; KANEKO, T.M; OHARA, M.T. Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos. 2.ed. São Paulo. **Atheneu Editora**, p. 325. 2003.

POTT, A. & POTT, V.J. Plantas do Pantanal. Corumbá, **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal, 1994.

RABANAL, R.M.; ARIAS, A.; PRADO, B.; HERNÁNDEZ-PÉREZ, M.; SÁNCHEZ-MATEO, C.C. Antimicrobial studies on three species of *Hypericum* from the Canary Islands. **J Ethnopharmacol**, v.81, n.2, p.287-292, 2002.

RAMOS, M.F.S; SANTOS, E.P; BIZARRI, C.H.B; MATTOS, H.A; PADILHA, M.R.S; DUARTE, H.M. Preliminary studies towards utilization of various plant extracts as antisolary agents. **Int J. Cosmet SCI**, v.18, n.3, p.87-101, 1996.

RAMOS, M. F. S.; SANTOS, E. P.; DELLAMORA-ORTIZ, G. M. Avaliação da atividade antissolar e estudos preliminares de fotodegradação de própolis. *Revista Fitos*, v. 5, n. 3, p. 73-84, 2010.

REZENDE, J.R. et al. Efeito antimutagênico do látex de *Euphorbia tirucalli* no sistema metionina em *Aspergillus nidulans*. **Acta Scientiarum**, v.26, n.4, p.481-484, 2004.

ROBARDS, K. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n.1-2, p.657-691, 2003.

RODRIGUES, M. V. N. ET AL. O emprego de técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais. **Revista multicências**, v. 7, p.7-14. 2006.

ROGINSKY, V; LISSI, E.A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, n.2, p.235-254. 2005.

SAHM, D.F.; WASHINGTON II, J.A. Antibacterial susceptibility tests: Dilution methods. In: Balows, A.; Hausser, W.J.; Hermann, K.L.; Isenberg, H.D.; Shamody, H.J. **Manual of clinical microbiology**. 5.ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, p.1105-1116, 1991.

Souza, A. J. Estudo fitoquímico e atividade biológica in vitro de *Cnidoscolus urens* L. (Arthur) (EUPHORBIACEAE).

SAMPAIO, E.V.S.B.; GIULETTI, A.M.; VIRGÍNIO, J. & GAMARRA-ROJAS, C.F.L. Vegetação & Flora da Caatinga. Recife, Associação de Plantas do Nordeste (APNE). **Centro Nordestino de informações sobre plantas (CNPI)**, p.1-176, 2002.

SANTA ROSA, J. Óleo de Favela, nova riqueza da região das secas. **Rio de Janeiro, Instituto Nacional de Tecnologia**. 1943.

SANTOS, ET AL. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade do café (*Coffea arabica*). **Química Nova**, v. 30, n.3, p. 604-610, 2007.

SANTOS, T. G.; REBELO, R. A.; DALMARCO, E. M.; GUEDES, A.; GASPER, A. L.; CRUZ, A. B.; SCHIMIT, A. P.; CRUZ, R. C. B.; STEINDEL, M.; NUNES, R. K. Chemical composition and antimicrobial activity of leaf essential oil from *Piper malacophyllum* (C. Presl.) C. DC. **Química Nova**, v. 35, n.3, p. 477-481, 2012.

SARTORI, M. R. K. Atividade antimicrobiana de frações de extratos e compostos puros obtidos das flores da *Acmela brasiliensis* SPRENG (*Wedelia paludosa*) (ASTERACEAE). 81p. **Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas)**. **Universidade do Vale do Itajaí**. Itajaí, 2005.

SÁTIRO, L.N. & ROQUE, N. A família Euphorbiaceae nas caatingas arenosas do médio rio São Francisco, BA, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, v.22, n.1, p.99-118, 2008.

SAYRE RM., AGIN PP., LEVEE GJ., MARLOWE E. Comparison of *in vivo* and *in vitro* testing of sunscreens formulas. **Photochem Photobiol**, v 29,n.3, p. 559-566, 1979.

SCHMIDT, P.C; ORTEGA, G.G. Passionsblumenkraut. Bestimmung des Gesamtflavonoidgehaltes von *Passiflorae herba*. **Deutsche Apotheker Zeitung**, v. 133, p. 17-26, 1983.

SCHÖBER, J. Preservação e uso racional do único bioma exclusivamente nacional. **Ciência e Cultura**, v.54, n.2, p.06–07, 2002.

SENJOBI, C. T.; MOODY, J. O. AND ETTU, A. O. Antimicrobial and Cytotoxic Effects of *Cnidoscolus aconitifolius* (Miller) Johnson. **Journal of Agriculture and Biological Sciences**, v. 2, n.2, p.21-25, 2011.

SILVA, F.A.M; BORGES, M.F.M; FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22,n.1, p.94-103, 1999.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. S.; KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SIMPSON, M.G. Plant systematics. **Elsevier Academic Press, Amsterdam**, 2006.

Souza, A. J. Estudo fitoquímico e atividade biológica in vitro de *Cnidoscolus urens* L. (Arthur) (EUPHORBIACEAE).

SINGLETON, V.L. & ROSSI, J.A.JR. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **Amer. J. Enol. Viticult.**, v. 16, n.3, p.144-158, 1965.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J.T.; BODESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer – drug screening. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 82, n.13, p. 1107-1112, 1990.

SLINKARD, K.; SINGLETON, V. L. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 28, n.1, p.49-55, 1977.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição - Campinas**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOLTIS, D.E., SOLTIS, P.S., ENDRESS, P.K. & CHASE, M.W. Phylogeny and evolution of Angiosperms. **Sinauer Associates, Sunderland**, 2005.

SORG, O. Oxidative stress: a theoretical model or biological reality. **Comptes Rendus Biologies**, v. 327, n.7, p.649-662, 2004.

SOUZA, T. M. Avaliação da atividade fotoprotetora de *Achillea millefolium* L. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.1, p. 36-38, 2005.

SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-JUNIOR, G.M.; AYRES, C.L.S.C.; ARAUJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; B ARROS, E.D.S.; ARAUJO, P.B.M.; BRANDAO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v.30, n.2, p.351-355, 2007.

SPRINGFIELD, E.P; AMABEOKU, G; WEITZ, F; MABUSELA, W; JOHNSON, Q. An assessment of two *Carpobrotus* species extracts as potential antimicrobial agents. **Phytomedicine**, v.10, n. 5, p.434-439. 2003.

TAVARES, E.A., AMORIM, E.L. Estudo químico e biológico de duas espécies do gênero *Cnidoscolus* presentes no bioma caatinga com potencial atividade antioxidante. **XVIII congresso de iniciação científica, II congresso de iniciação em desenvolvimento tecnológico e inovação**, UFPE | CTG, 2010.

TSAO, R.; DENG, Z. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. **Journal of Chromatography B.**, v.812, n.1-2, p.85-99, 2004.

VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M.T.D., MAZUR, M., TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n.1, p.44-84, 2006.

VALENTE, L.M.M. Cucurbitacinas e suas principais características estruturais. **Química Nova**, v.27, n.6, 944-948, 2004.

Souza, A. J. Estudo fitoquímico e atividade biológica in vitro de *Cnidocolus urens* L. (Arthur) (EUPHORBIACEAE).

VELASCO, M.V.R; BALOGH, T.S; PEDRIALI, C.A; SARRUF, F.D; PINTO, C.A.S.O; KANEKO, T.M; BABY, A.R. Associação da Rutina com p-Metoxicinamato de Octila e Benzofenona-3: Avaliação In Vitro da Eficácia Fotoprotetora por Espectrofotometria de Refletância. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.27, n.1, p.23-27, 2008.

VENNAT, B.; GROSS, D.; POURRAT, A.; POURRAT, H. Hamamelis virginiana: Identification and assay of proanthocyanidins, phenolic acids and flavonoids in leaf extracts. **Pharm.Acta Helv.**, v.67, n.1, p.11-14, 1992.

VIEGAS JR, C; BOLZANI, VS; BARREIRO, EJ. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quím. Nova**, v.29, n.2, p.326-337, 2006.

VIOLANTE, I.M.P; SOUZA, I.M; VENTURINI; C.L; RAMALHO, A.F.S; SANTOS, R.A.N; FERRARI, M. Avaliação in vitro da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Farmacognosia**; v. 19, n.2,p.452-457. 2009.

VOGEL, H. et al. Antioxidant properties and TLC characterization of four Chilean haplopappus-species known as bailahuén. **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, n.1, p.97-100. 2004.

VON GADEW, A.; JOUBERT, E.; HANSMANN, C. F.; J. Agric. Food Chem. V. 45, 632, 1997.

WAGNER, H.; BLADT, S. Plant Drug Analysis: A Thin Layer. **Chromatography Atlas**. 2^a ed. New York: Springer, 1996.

WANG, Y. B. ET AL. Diterpenoids from the roots of *Euphorbia fischeriana*. **J. Nat. Prod.**, London, v. 69, n.6, p.967-970, 2006.

WEBSTER, G.L. Systematics of the Euphorbiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 81,n.1-2, p.1–144, 1994.

WEBSTER, G.L. Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 81,n.1, p. 33 – 144, 1994.

WILLIAMS, L. Laticifers plants of Economic Importance II. Mexican chilte (*Cnidocolus*): A source of gutta-like material. **Economic Botany**, v.16, n.2,p.53-70, 1962.

WYDE, P.R ET AL. In vitro evaluation of the antiviral activity of SP-303, an euphorbiaceae shrub extract, against a panel of respiratory viruses. **Drug Development Research**, Berlim, v. 28 n. 4 p. 467-472, 1993.

WOISKY R.G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: parameters and procedures for chemical quality control, **J.Aplic.Res.**, 1998.

YESILYURT, V.; HALFON, B.; ÖZTÜRK, M.; TOPÇU, G. Antioxidant potential and phenolic constituents of *Salvia cedronella*. **Food Chemistry**, v. 108,n.1, p. 31-39, 2008.

Souza, A. J. Estudo fitoquímico e atividade biológica in vitro de *Cnidoscolus urens* L. (Arthur) (EUPHORBIACEAE).

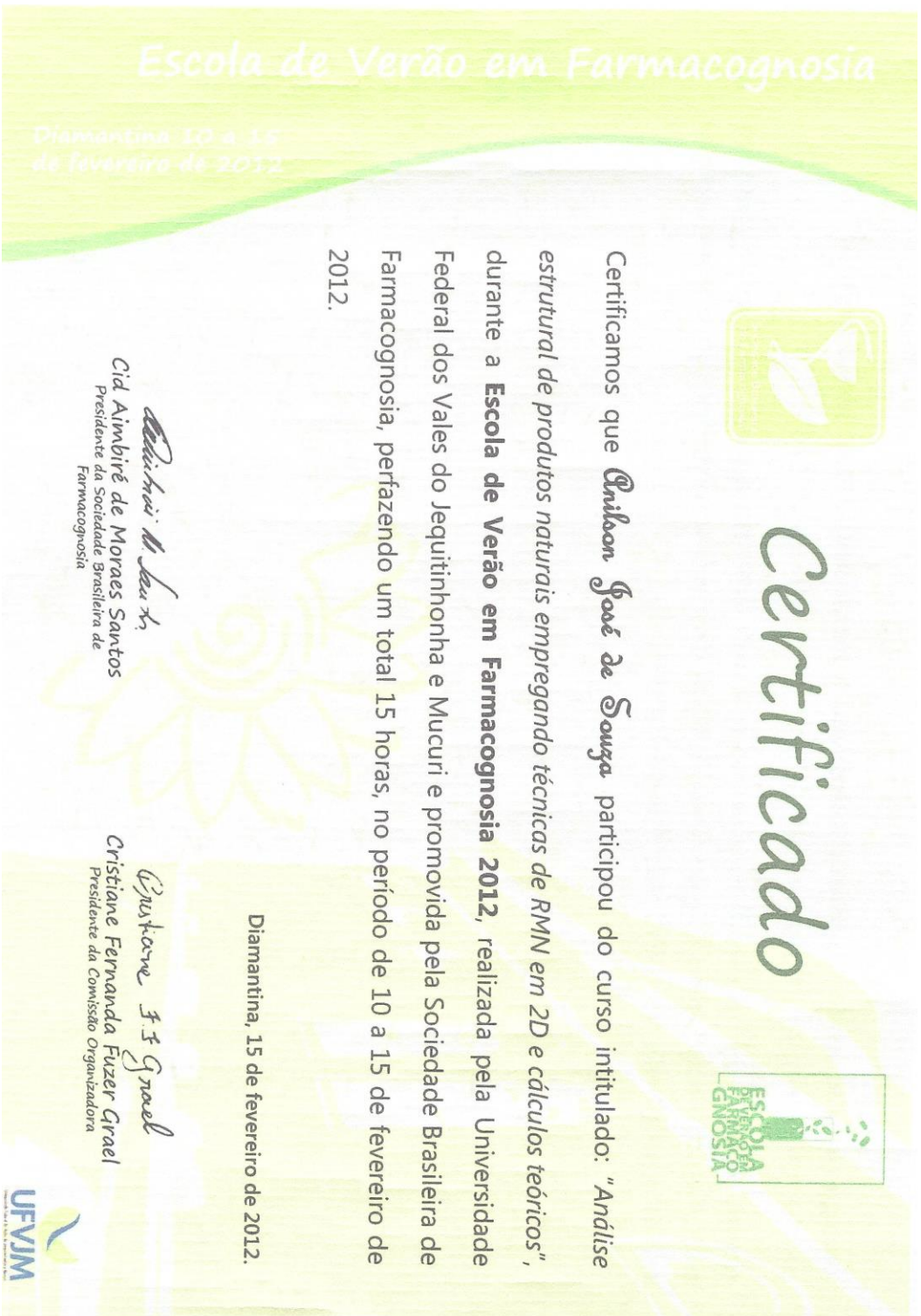
ZGODA, J.R.; PORTER, J.R. A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi. **Pharm Biol.**, v. 39, p. 221-225, 2001.

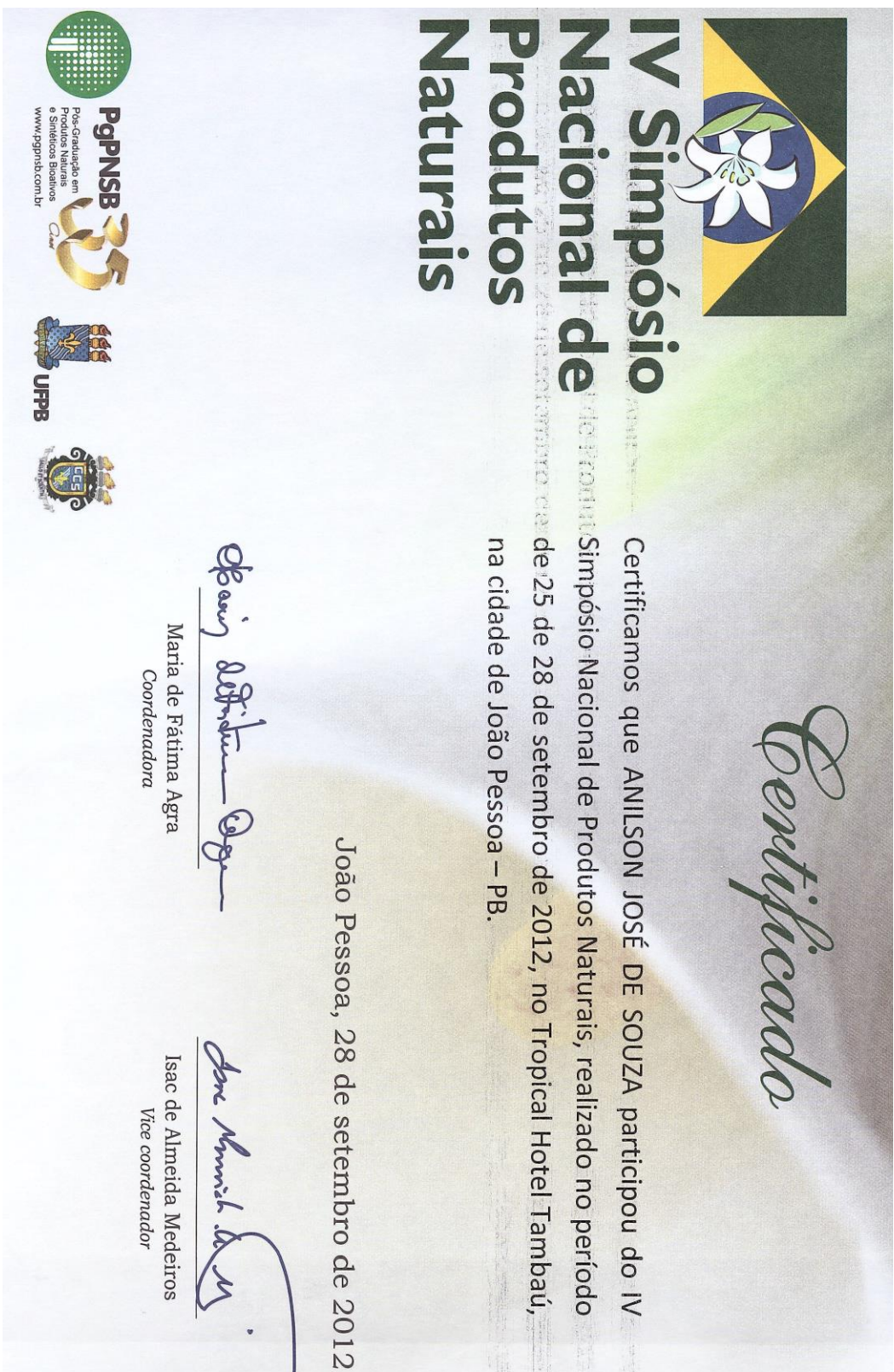
ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, n. 4, p. 555-559, 1999.

Apêndice

Apêndice









IV Simpósio Nacional de Produtos Naturais

Certificado


Certificamos que ANILSON JOSÉ DE SOUZA participou do IV Simpósio Nacional de Produtos Naturais, realizado no período de 25 a 28 de setembro de 2012, no Tropical Hotel Tambaú, na cidade de João Pessoa – PB, na qualidade de PARTICIPANTE DE MINI-CURSO: CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA : ASPECTOS BÁSICOS E SUA APLICAÇÃO NA QUÍMICA DE PRODUTOS NATURAIS, com a carga horária de 3 h.

João Pessoa, 28 de setembro de 2012.


Maria de Fátima Agra
Coordenadora


Isac de Almeida Medeiros
Vice coordenador





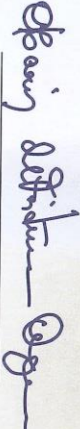
IV Simpósio Nacional de Produtos Naturais

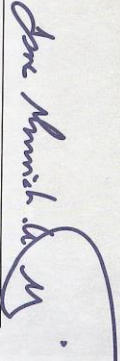
Certificados

Certificamos que ANILSON JOSÉ DE SOUZA; Ana P. de Oliveira; Amanda L. Guimarães; Amanda C. S. Moraes; Camila de S. Araújo; Géssica P. P. Franco; Nayara S. de Souza; Raimundo G. de Oliveira-Junior; Wagner P. Felix1 Jackson R. G. S. Almeida participaram do IV Simpósio Nacional de Produtos Naturais, realizado no período de 25 de 28 de setembro de 2012, no Tropical Hotel Tambauí, na cidade de João Pessoa – PB, na qualidade de:

AUTOR (S) DO TRABALHO: TRIAGEM FITOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE CNIDOSCOLUS URENS (L.) ARTHUR (EUPHORBIACEAE), na categoria PÔSTER.

João Pessoa, 28 de setembro de 2012.


 Maria de Fátima Agra
 Coordenadora


 Isac de Almeida Medeiros
 Vice coordenador

