



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA

JOÃO PAULO FERREIRA NETO

**ATIVIDADE CITOTOXICA, AVALIAÇÃO FITOQUIMICA E ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE PLANTAS MEDICINAIS DE PERNAMBUCO.**

Recife
2017

JOAO PAULO FERREIRA NETO

**ATIVIDADE CITOTOXICA, AVALIAÇÃO FITOQUIMICA E ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE PLANTAS MEDICINAIS DE PERNAMBUCO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Morfotecnologia, Área de concentração Morfologia e Inovação Tecnológica, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Morfotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Sampaio de Andrade Lima

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Yara

Recife
2017

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Ferreira Neto, João Paulo

Atividade citotóxica, avaliação fitoquímica e atividade antimicrobiana de plantas medicinais de Pernambuco/ João Paulo Ferreira Neto- 2017.

86 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Cláudia Sampaio de Andrade Lima

Coorientador: Ricardo Yara

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia. Recife, 2017.

Inclui referências e anexos

1. Plantas medicinais 2. Câncer 3. Testes de toxicidade I. Lima, Cláudia Sampaio de Andrade (orient.) II. Yara, Ricardo (coorient.) III. Título

615.321

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-099

JOAO PAULO FERREIRA NETO

**ATIVIDADE CITOTOXICA, AVALIAÇÃO FITOQUIMICA E ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE PLANTAS MEDICINAIS DE PERNAMBUCO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Morfotecnologia, Área de concentração Morfologia e Inovação Tecnológica, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Morfotecnologia.

Aprovado em: 28/07/2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Cláudia Sampaio de Andrade Lima / Universidade Federal de Pernambuco – CB

Prof. Dr. Jacinto Costa / Universidade Federal de Pernambuco – CB

Prof^a. Dr^a. Elba Lucia Cavalcanti de Amorim / Universidade Federal de Pernambuco - CCS

AGRADECIMENTOS

À toda a minha família, pelo apoio.

À minha mãe, por ser o maior exemplo que levo comigo e ter feito de tudo que estava ao seu alcance para poder fornecer todo o necessário para os seus filhos. Pelo seu amor, atenção e amizade conferido a mim e meu irmão, Osvaldo, parceiro, principalmente nos jogos, de todas as horas.

A minha orientadora, Professora Dra. Cláudia Sampaio de Andrade Lima, por todo ensinamento, apoio, exemplo, me ensinar que nunca devo duvidar do meu potencial e confiar mim.

Ao meu coorientador Professor Dr. Ricardo Yara o qual possui um amplo conhecimento, por me despertar a curiosidade, característica fundamental para um bom profissional.

A Isabela Andrade, Paulo Euzébio e Natália Onofre e que foram de extrema importância para o desenvolvimento deste trabalho, tanto com sugestões e dicas no desenvolvimento como de conselhos pessoais durante todo o trajeto.

Aos amigos de bancada, Edson Renan, Rafael Padilha, Marília Grasielly, Bruna Patriota, pelo convívio durante os seis anos de laboratório e piadas sem graça (Edson Renan), e aos que tive prazer em conhecer após a entrada no mestrado Leylianne de Cássia, Camila Pereira, Bia, Cris e Giu. Obrigado por todo o ensinamento e conhecimentos fornecidos.

A todos amigos do LBQ, obrigado por tornar os dias mais agradáveis, pela amizade, ensinamentos e momentos memoráveis que eu passei nesses seis anos. Aos profissionais que seguimos como exemplo, e tem como importante função a coordenação do LBQ: Adriana, Beate, Claudia, Leda e Ricardo.

Aos meus amigos da graduação, Lays, Paulo, Leyla e Wadja, que estão sempre disponíveis para tomar um café e conversar sobre sonhos e planos. Obrigado por proporcionar tantos momentos especiais.

Obrigado.

“- Quando a gente anda sempre em frente, não pode mesmo ir longe...”

(Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

Quimioterápicos naturais possuem alta especificidade e menor efeito colateral em relação aos sintéticos. Com o aumento da incidência de câncer com resistência aos quimioterápicos clínicos, novas drogas derivadas de plantas estão em estudo. *Erythrina velutina* Willd., *Petiveria alliacea* L. e *Momordica charantia* L. são plantas medicinais de grande importância farmacológica como tranquilizante/sedativa, hipnótica/anestésica e anticarcinogênica. No presente trabalho foi realizada a avaliação citotóxica frente a células cancerígenas (HeLa, U87, K-562, MCF-7 e Hep2), o estudo fitoquímico, além da avaliação microbiológica dos extratos obtidos a partir das cascas de *E. velutina* Willd. e folhas de *P. alliacea* L. e *M. charantia* L.. Foram utilizados os métodos de MTT para a avaliação citotóxica, o método de DPPH para avaliar seu potencial antioxidante, quantificação de compostos fenólicos equivalentes ao ácido gálico e a técnica de difusão por disco em ágar e poço para a análise da ação antimicrobiana. O *screening* de viabilidade celular demonstrou que o extrato de *E. velutina* Willd. e *M. charantia* L. apresentaram potencial citotóxico frente às células HeLa, U87 e K-562. A fração obtida de acetato de etila, a partir do extrato etanólico de *E. velutina* Willd., apresentou atividade antioxidante, citotóxica e antimicrobiana comparada as demais amostras, e também apresentou quantidades de compostos fenólicos superiores aos descritos pela literatura para plantas do mesmo gênero, expressos em equivalentes de ácido gálico (97,44 mg EAG. g⁻¹ de extrato). O extrato bruto e os extratos de acetato de etila de *E. velutina* Willd. e *M. charantia* L., além de seu extrato metanólico, demonstraram atividade frente a bactérias Gram-positivas e álcool-ácido resistente. Os resultados obtidos apontam que os extratos, frações de *E. velutina* Willd. e *M. charantia* L. apresentam atividades biológicas que poderiam complementar o seu uso popular.

PALAVRAS-CHAVES: Câncer. *Erythrina velutina* Willd. *Petiveria alliacea* L. *Momordica charantia* L. Citotoxicidade.

ABSTRACT

Natural chemotherapeutic has high specificity and lower collateral effects compared to synthetic ones. The increased incidence of cancer and the resistance to clinical chemotherapy, new drugs derived from plants are under study. *Erythrina velutina* Willd., *Petiveria alliacea* L. and *Momordica charantia* L. are medicinal plants with great pharmacological importance such as tranquilizer/sedative, hypnotic/anesthetic and anticarcinogenic. The present work performed a cytotoxic evaluation against cancer cells (HeLa, U87, K-562, MCF-7 and Hep2), the phytochemical study and the microbiological evaluation of the extracts obtained from the stem bark of *E. velutina* Willd. and leaves of *P. alliacea* L. and *M. charantia* L. The cytotoxic evaluation was performed by the MTT technique, to evaluate its antioxidant potential the DPPH method was used and to quantify the phenolics compounds was performed the quantification of phenolics equivalent to gallic acid. Moreover, it was performed the agar disk-diffusion and wells techniques to analyze the antimicrobial action. Cell viability screening indicates that *E. velutina* Willd. and *M. charantia* L. extracts presented cytotoxic potential against HeLa, U87 and K-562 cells. The fraction obtained from ethyl acetate from the ethanolic extract of *E. velutina* Willd. presented antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activity compared to the other samples, and presented higher quantities of phenolic compounds than those described in the literature for plants of the same genus, expressed in gallic acid equivalents (97.44 mg EAG. g⁻¹ extract). The crude extract and ethyl acetate extracts of *E. velutina* Willd. And *M. charantia* L., in addition to their methanolic extract, showed activity against Gram-positive bacteria and alcohol-resistant acid. The result obtained evidences the biological activities of the extracts and fractions of *E. velutina* Willd. and *M. charantia* L., that could complement their popular use.

Key Words: Cancer. *Erythrina velutina* Willd. *Petiveria alliacea* L. *Momordica charantia* L. Cytotoxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Causas do câncer.	19
Figura 2 – Esquema representativo dos tipos de morte celular. (A) Célula que sofreu um dano irreversível; (B) Célula necrótica após autólise; (C) Célula que entrou no processo de apoptose; (D) Formação de vesículas; (E) Célula fagocitária englobando o resto celular.	21
Figura 3 – Características do câncer.	22
Figura 4 - Cultura de células 2D e Cultura de células 3D.	25
Figura 5 - Inflorescência de <i>Erythrina velutina</i>	27
Figura 6 - Metabólitos de <i>Erythrina</i> : (A) <i>Eritralina</i> , (B) 11 α -hidroxieritravina, (C) 4'-metoxi licoflavonona (D) Eritravina.	28
Figura 7 - <i>Petiveria alliacea</i>	29
Figura 8 – Metabólitos de <i>Petiveria alliacea</i> : (A) Petiverina e (B) S-óxido de tiobenzaldeído.	29
Figura 9 - <i>Momordica charantia</i>	30
Figura 10 – Metabólitos de <i>Momordica charantia</i> : (A) Momordicina e (B) Cucurbitacina.	31
Figura 11 – Espectro de extrato bruto de Hortelã Graúda.	34
Figura 12 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear.	36
Figura 13 - Esquema técnico do Espectrômetro de Massa por chama.	37
Figura 14 - Representação gráfica da cromatografia em camada delgada. (I representa uma amostra de extrato bruto, II, III e VI são substâncias puras conhecidas, d é a distância do ponto de aplicação a amostra após eluição e D distância entre fase móvel e ponto de aplicação).	38
Figura 15 - Cromatografia Líquida: (A) Em coluna aberta de vidro, onde a amostra se separa por sua afinidade com a fase móvel ou com fase estacionária. (B) Cromatografia Líquida de Alta Eficiência que utiliza bomba para puxar o solvente, pode apresentar como analisador o detector por matriz de diodo (DAD).	39
Figura 16 - Representação gráfica de um Cromatógrafo FLASH.	40
Figura 17 - Fluxograma de atividades realizadas.	42
Figura 18 - Fluxograma de extração.	43
Figura 19 - Fluxograma de extração por gradiente de polaridade.	44
Figura 20 - Esquema do teste de citotoxicidade pelo método do MTT.	46
Figura 21 - Viabilidade celular relativa de linhagens cancerígenas: MCF-7 – Adenocarcinoma de Mama Humano; K-562 – Leucemia mielóide crônica humano; Hep-2 – Câncer de Fígado Humano; HeLa – Câncer de Colón de Útero Humano e U-87 – Glioblastoma Humano.	49
Figura 22 - Gráfico de viabilidade de células HeLa. Controle positivo: doxorubicina, controle negativo: meio de cultura, fração F 12-18: fração purificada do extrato de acetato de etila com presença de compostos fenólicos.	56
Figura 23 – Resultados do teste de difusão em disco das frações do extrato bruto <i>E. velutina</i> e <i>M. charantia</i>	57
Figura 24 – Resultados do CMI da fração de acetato de etila de <i>E. velutina</i> frente a isolados clínicos de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Enterococcus faecalis</i>	59
Figura 25 - Placa cromatográfica da F12-18 (1), F18-30 (2) e Berberina (3). A) Placa sob luz ultravioleta e B) placa sob luz branca após revelador de alcaloide Dragendorff.	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sobrevida de pacientes com câncer após cinco anos de tratamento. A, B e C são classificações de nível de evolução da doença.	18
Tabela 2 - Tabela de células cultivadas <i>in vitro</i> e seus respectivos tecidos, morfologia e espécie de origem.	23
Tabela 3 - Atividade antioxidante pelo método de DPPH de extrato bruto de cascas de <i>E. velutina</i> e folhas de <i>M. charantia</i> e <i>P. alliacea</i>	51
Tabela 4 - Quantificação de fenóis totais das frações de <i>E. velutina</i> e <i>M. charantia</i> (EAG.µg ⁻¹).....	52
Tabela 5 — Teste de difusão em disco, halos de inibição em mm de extratos brutos de cascas de <i>E. velutina</i> e folhas de <i>M. charantia</i> e <i>P. alliacea</i>	53
Tabela 6 - Teste de difusão em disco de frações do extrato bruto de <i>E. velutina</i> e <i>M. charantia</i>	57
Tabela 7 - CMI da fração de acetato de etila de <i>E. velutina</i> frente a isolados clínicos de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Enterococcus faecalis</i>	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACS	American Cancer Society (Sociedade Americana do Câncer)
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD	Detector de Matriz de Diodo (Diode Array Detector)
DMSO	Dimetilsulfóxido
EAG	Equivalente a Ácido Gálico
EM	Espectrometria de Massas
ESA	Extrato de Solventes Automático
FTIR	Infravermelho por Transformada de Fourier
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada (International Union of Pure and Applied Chemistry)
RF	Retention Factor (Fator de Retenção)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SFB	Soro Fetal Bovino
UV-VIS	Ultra Violeta – Visível
UFPEDA	Universidade Federal de Pernambuco Departamento de Antibióticos

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

%	Porcentagem
cm	Centímetros
m	Metros
°c	Graus celsius
μL	Microlitros
h	Hora
nm	Nanômetro
mL	Mililitro
μg	Micrograma

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	CÂNCER	18
2.1.1	Causa	18
2.1.2	Comportamento	20
2.1.3	Nomenclatura	23
2.2	ESTUDO DO CÂNCER <i>IN VITRO</i>	23
2.2.1	Cultura de Células	23
2.2.2	Novas Tecnologias	24
2.3	PLANTAS MEDICINAIS	25
2.3.1	Erythrina (Fabaceae)	26
2.3.2	Petiveria (Phytolaccaceae)	28
2.3.3	Momordica (Cucurbitaceae)	30
2.4	PRODUTOS NATURAIS	31
2.4.1	Extração por Solventes Orgânicos	32
2.4.2	Caracterização de Compostos Orgânicos	32
2.4.2.1	Espectrometria na Região do UV-Vis	33
2.4.2.2	Espectrometria na Região do Infravermelho	34
2.4.2.3	Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	35
2.4.2.4	Espectrometria de Massa (EM)	36
2.4.3	Cromatografia	37
3	OBJETIVOS	41
3.1	OBJETIVO GERAL	41
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4	METODOLOGIA	42
4.1	MATERIAL BOTÂNICO	43

4.2	FRACIONAMENTO E PRÉ-PURIFICAÇÃO:.....	43
4.3	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DE ALTA EFICIÊNCIA (CCDAE)	44
4.4	QUANTIFICAÇÃO DE FENÓIS.....	44
4.5	DETECÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	45
4.6	CULTIVO CELULAR	45
4.7	TESTE DE VIABILIDADE.....	45
4.8	TESTE DE DIFUSÃO EM DISCO	47
4.9	TESTE DE CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI)	47
4.10	TESTES ESTATÍSTICOS	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1	PRIMEIRO TESTE DE VIABILIDADE CELULAR	49
5.2	TESTE DE ANTIOXIDANTE – DPPH.....	50
5.3	QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENOLICOS TOTAIS.....	52
5.4	TESTE ANTIMICROBIANO DOS EXTRATOS BRUTOS	53
5.5	EXTRAÇÃO POR POLARIDADE.....	55
5.6	SEGUNDO TESTE DE VIABILIDADE CELULAR	55
5.7	TESTE ANTIMICROBIANO COM OS EXTRATOS FRACIONADOS	56
5.8	CMI FRENTE A <i>Staphylococcus aureus</i> MULTIRRESISTENTE	58
5.9	ANALISE CROMATOGRAFICA DE ALTA EFICIENCIA.....	59
6	CONCLUSÃO.....	61
	REFERÊNCIAS.....	62
	ANEXOS A - TRABALHO APRESENTADO EM CONGRESSO.....	70
	ANEXO B - TRABALHOS PUBLICADOS.....	71

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença degenerativa e multifatorial de grande incidência. Segundo a Sociedade Americana do Câncer (ACS), os principais tipos de tratamentos são: cirurgia, imunoterapia, radioterapia e quimioterapia, onde são administrados no paciente medicamentos potentes para tentar destruir o tumor como, por exemplo, a vincristina, paclitaxel, etoposide e doxorubicina. A quimioterapia apresenta diversos efeitos colaterais relatados por pacientes: fadiga, dores de cabeça, musculares e de estômago, e afeta o sistema nervoso, produz falta de salivagem, diarreia, constipação, vômitos, perda de cabelo e apetite, além de problemas com fertilidade (MAYER, 2013, 2012 e CASLA *et al*, 2014). Atualmente, diversas pesquisas são realizadas com o objetivo de descobrir novos medicamentos, mais específicos e com menos efeitos colaterais, como a utilização de medicamentos antioxidantes (DIWANAY *et al.*, 2004 e FUCHS-TARLOVSKY, 2013). Os produtos naturais são uma fonte promissora de princípios ativos contra o câncer, como relatado por Mondal e colaboradores (2012), que listaram diversas plantas e seus mecanismos de ação, que vão de indução de apoptose mediada por mitocôndria a inibição de fatores tumorais e de crescimento.

Plantas medicinais são utilizadas há séculos para tratamentos de diversas patologias e, atualmente, 80% da sociedade faz uso de medicamentos fitoterápicos (SEN *et al.*, 2014). As propriedades terapêuticas de uma espécie medicinal geralmente são atribuídas a metabolitos produzidos para sua sobrevivência ou adaptação. Os metabolitos são classificados como primários: necessários para o crescimento e desenvolvimento da planta; secundários: necessários para a adaptação da planta ao meio no qual se desenvolve. Sendo estes compostos orgânicos classificados de acordo com sua rota de síntese em classes como: compostos nitrogenados, compostos fenólicos e terpenos (GOBBONETO *et al*, 2007). O estudo destes metabolitos foi incentivado pelo seu uso popular através da fitoterapia e auxiliou na descoberta de vários medicamentos e no tratamento de doenças.

Dentre as diversas famílias botânicas, podemos citar algumas de interesse científico, como: (1) Fabaceae: é uma das maiores famílias botânicas (650 gêneros e aproximadamente 19000 espécies), possuindo ampla distribuição, podendo ser encontradas em todas as regiões, exceto na zona polar. Algumas espécies são descritas como citotóxicas como: *Acacia angustissima* e *Harvardia albicans* que (MENA-REJON *et al.*, 2009); (2) Phytolaccaceae: possui 18 gêneros e cerca de 100 espécies, dentre elas arbustos, árvores ou lianas, é nativa de regiões tropicais e subtropicais, possuem folhas alternas e raramente opostas, podem possuir inflorescências ou flores, dentre seus gêneros nativos do Brasil destacam-se a *Microtea*, *Petiveria* e a *Rivina* (SOUZA & LORENZI, 2012) e (3) Cucurbitaceae: ervas rastejantes ou trepadeiras com folhas alternas, possui fruto carnoso (baga) com sementes geralmente achatadas, possuem distribuição tropical e subtropical com cerca de 120 gêneros e 850 espécies (SOUZA e LORENZI, 2012).

Erythrina velutina Willd. (*Sin. Erythrina verna* Vell.) é uma planta reconhecida como medicinal, pertencente à família Fabaceae. É originária do Brasil, e é popularmente conhecida como árvore-de-coral, mulungu e flor-de-coral (GILBERT & FAVORETO 2012). A partir do gênero *Erythrina* foram detectados compostos fenólicos apresentando diversas atividades biológicas como atividade antioxidante, microbiológica, anticonvulsivante (HUSSAIN *et al.*, 2016).

Momordica charantia L. é um trepadeira pertencente à família Cucurbitaceae. Possui uma distribuição pantropical e muitas vezes é confundida com plantas daninhas por crescerem em terrenos abandonados, porém é uma planta medicinal. A *M. charantia* é bastante conhecida por apresentar efeito hipoglicemiante e seu óleo essencial por apresentar efeito citotóxico frente a células do câncer (KRAWINKEL & KEDING 2006 e PITCHAKARN *et al.*, 2010).

Petiveria alliacea L. é um arbusto perene nativo do Brasil, utilizado como planta medicinal em preparações para combater inflamações e infecções. Estudos recentes demonstram a capacidade do seu metabolito majoritário (Dibenzil trisulfeto) inibir a atividade da transcriptase reversa do HIV-1 (LOWE *et al.*, 2015).

Diante do crescente número de novos casos de câncer e da grande quantidade de meios para evadir a morte celular, é necessário o estudo de novos medicamentos naturais, por possuírem menor ou nenhum efeito colateral, para auxiliar na terapia ou tratamento clínico do câncer. Desta forma plantas medicinais como a *E. velutina*, *M. charantia* e *P. alliacea*, são de grande interesse no meio científico por possuírem efeitos, citados anteriormente.

Este trabalho objetivou analisar a ação citotóxica, realizar o estudo fitoquímico e avaliar a atividade antimicrobiana de extratos bruto e frações de *Erythrina velutina*, *Momordica charantia* e *Petiveria alliacea*, testados como possíveis precursores de anticarcinogênicos, a fim de contribuir para o conhecimento que somará na busca por novos medicamentos de origem natural utilizados no tratamento de pacientes com câncer.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÂNCER

O câncer é uma doença degenerativa multifatorial de grande incidência. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) o aumento da expectativa de vida, urbanização e globalização são fatores que podem explicar o aumento da incidência da doença (596.070 casos – 2016 em comparação a 489.270 casos–2010). Dentro dessa estimativa os principais tipos de câncer por ordem de incidência no Brasil são de pele (não melanoma), o de próstata e o de mama.

A Sociedade Americana do Câncer (ACS) relata a sobrevida, dentro de cinco anos, de pacientes em estágio diferentes do câncer (Tabela 1). O de próstata se demonstra como melhor prognóstico por obter uma sobrevida de 100 % entre os estágios I-III.

Tabela 1 - Sobrevida de pacientes com câncer após cinco anos de tratamento. A, B e C são classificações de nível de evolução da doença.

Câncer\Estágio	I (%)	II (%)	III (%)	IV / Metástase (%)	
Pele	Melanoma	A: 97 B: 92 C: 53	A: 81 B: 70 C: 53	A: 78 B: 59 C: 40	15-20
	Merkel	A: 80 B: 60	A: 60 B: 50 C: 50	A: 45 B: 25	20
Próstata	100	100	100	28	
Mama	100	93	72	22	

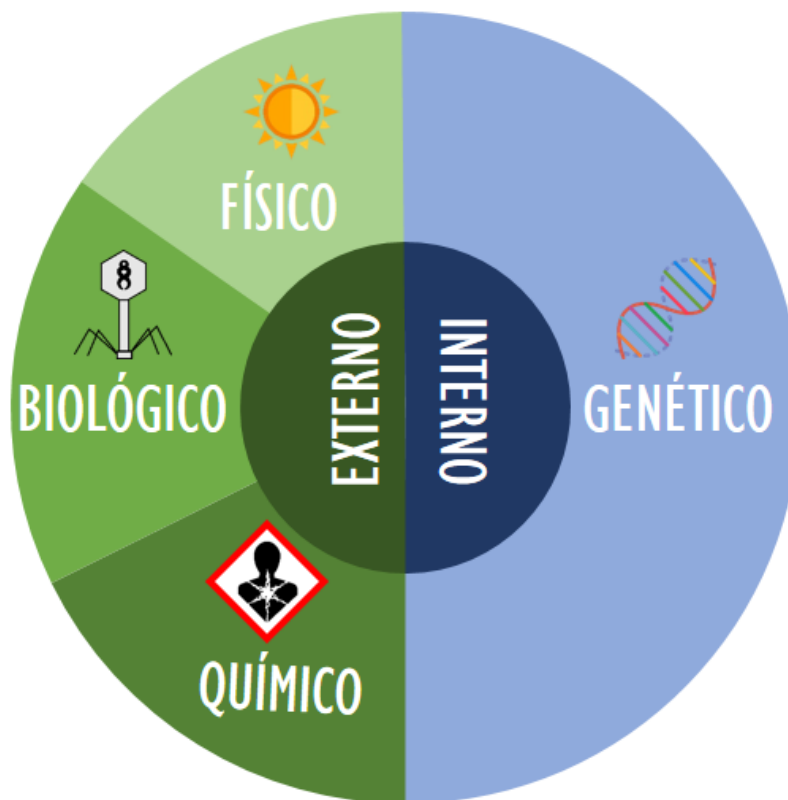
Fonte: Sociedade Americana do Câncer

2.1.1 Causa

Os causadores do câncer podem ser classificados como fatores interno ou externo ao organismo. Na maioria das vezes o fator interno está associado a uma

predisposição genética, ligado a capacidade de defesa do organismo a acometimentos externos. Já os fatores externos estão associado ao meio em que o indivíduo é exposto. Podemos classificar em três tipos de fatores: (1) Físicos: como a radiação ionizante ou exposição solar excessiva, pessoas que se expõem de forma prolongada constituem grupos de riscos de contrair algum tipo de câncer como o de tireoide ou melanoma respectivamente; (2) Químicos: tabagismo e a bebida alcoólica principais fatores para câncer de pulmão e boca e (3) Biológicos: como os vírus (HPV) e obesidade, estão relacionados a câncer do colo do útero e no sistema digestório como esôfago estômago e pâncreas, respectivamente (INCA) (Figura 1).

Figura 1 - Causas do câncer.



Fonte: Autor (2017).

2.1.2 Comportamento

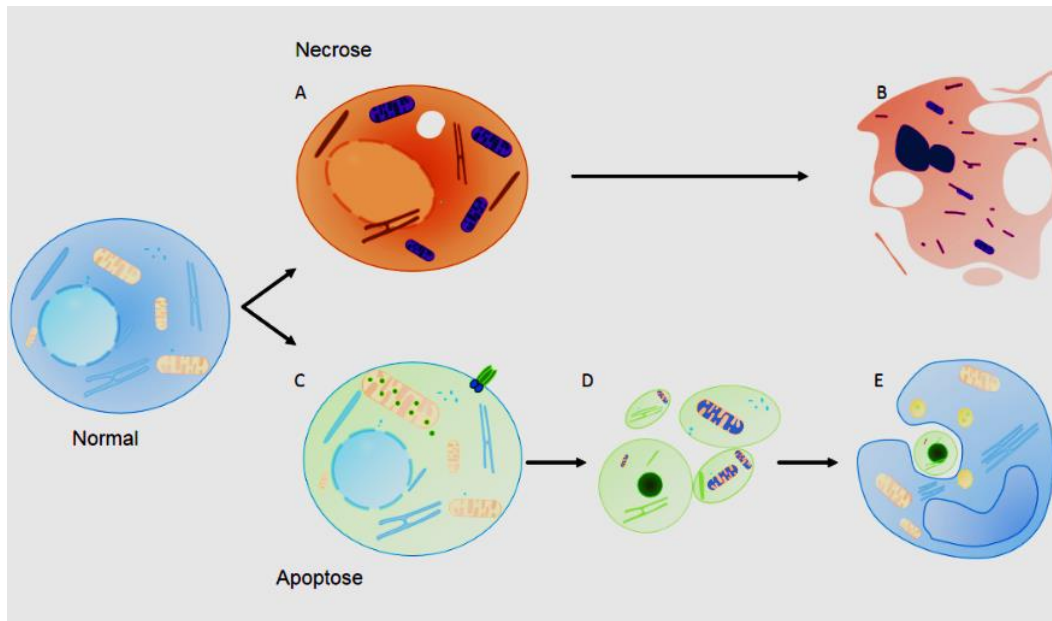
A principal característica do câncer é sua divisão celular descontrolada. A divisão ou replicação celular é uma condição normal para a maioria das células e necessária para a preservação dos tecidos. Devido aos diferentes tempos de proliferação, elas são classificadas em: (1) células com divisão constante, que compreendem as células embrionárias, as da medula óssea e as do epitélio do intestino delgado; (2) células em dormência, as quais podem dividir-se em resposta de estímulos, como os hepatócitos, fibroblastos e células renais e (3) células diferenciadas, como por exemplo, os neurônios e as células da musculatura esquelética e cardíaca, elas não se dividem, porém possuem precursores que se diferenciam nesses tipos celulares.

A divisão celular é classificada em interfase e mitose. A interfase é o período em que a célula vai começar a preparação para sua divisão, sintetizando RNA, proteínas e o DNA. Ela é segmentada em três períodos: G1, início da síntese de RNA e proteínas, também é nessa fase na qual agem os fatores de crescimento que vão estimular a célula a continuar sua divisão ou entrar no período de dormência ou quiescência (G0); já o período S marca o início da síntese de DNA e por último o período G2, o mais importante da divisão, no qual a célula confere e repara possíveis danos no DNA. O segundo passo é a mitose, no qual a célula reparte por igual todo seu conteúdo dando origem a duas células iguais (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2012).

Outro mecanismo essencial para a célula é a morte celular. Este mecanismo controla a população celular, destrói células não funcionais, aquelas que apresentam problemas na maquinaria molecular, e tem um papel fundamental no desenvolvimento, por exemplo quando os dedos perdem as membranas que os matem juntos. JUNQUEIRA & CARNEIRO (2012) descrevem dois tipos de morte celular: (1) por necrose, morte não organizada, onde as células sofrem autólise e acarreta no processo de inflamação e (2) por apoptose, processo de morte celular mediada por caspases, podendo ser iniciado extracelular (por linfócitos citotóxicos

através de receptores Fas) ou intracelular (pela mitocôndria através de liberação do *citocromo c*) (Figura 2).

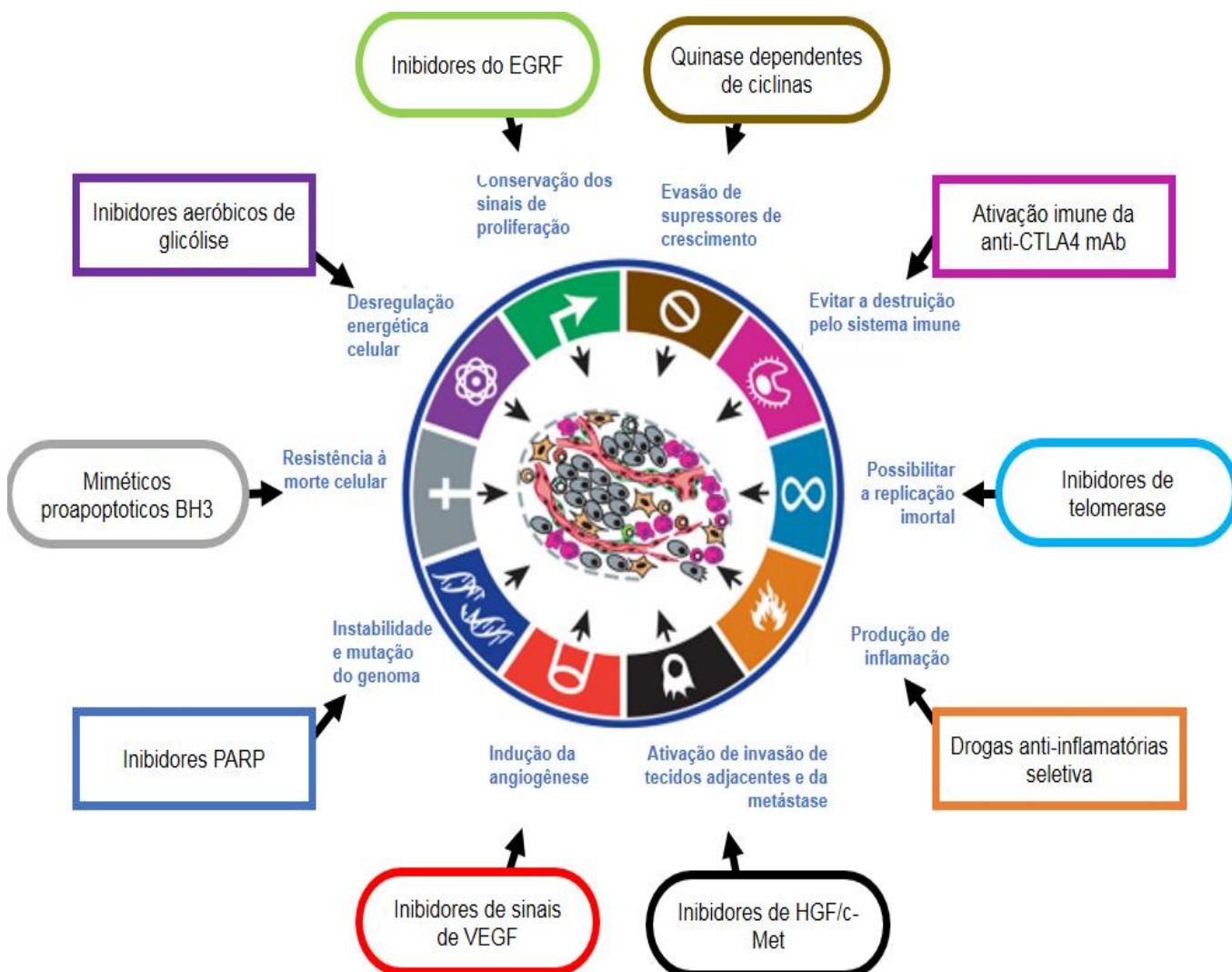
Figura 2 – Esquema representativo dos tipos de morte celular. (A) Célula que sofreu um dano irreversível; (B) Célula necrótica após autólise; (C) Célula que entrou no processo de apoptose; (D) Formação de vesículas; (E) Célula fagocitária englobando o resto celular.



Fonte: Autor (2017).

Além disso, no câncer, tanto o mecanismo de divisão celular quanto o de morte estão alterados, apresentando-se mais expresso e inibido, respectivamente. Em 2011 Hanahan & Weinberg (2011) descreveram dez características que o câncer pode expressar em sua biologia para conseguir crescer e desenvolver metástase; essas propriedades foram chamadas de *Hallmarks of Cancer* (marcas do câncer). Dentre elas estão mecanismos como: evasão de supressores de crescimento; evitar a destruição pelo sistema imune; possibilitar a replicação imortal; produção de inflamação; ativação de invasão de tecidos adjacentes e da metástase; indução da angiogênese; instabilidade e mutação do genoma; resistência à morte celular; desregulação energética celular e conservação dos sinais de proliferação. Os autores também trazem tratamentos (alguns em testes clínicos) específicos para essas características (Figura 3).

Figura 3 – Características do câncer.



Fonte: Adaptado de Hanahan & Weinberg (2011)

Pela complexa fisiopatologia é necessária a utilização de uma combinação de tratamentos. Alguns métodos utilizados são: (1) cirurgia, onde é feita a remoção total ou parcial do tumor; (2) imunoterapia, tratamento utilizando o sistema imune; (3) radioterapia, utilizando partículas ou ondas de alta energia e a (4) quimioterapia, onde o paciente usa medicamentos potentes para destruição do tumor. Os medicamentos quimioterápicos não possuem alta especificidade e muitos pacientes sofrem dos efeitos colaterais.

2.1.3 Nomenclatura

O câncer é uma neoplasia maligna com característica invasiva, com potencial destrutivo de estruturas adjacentes e pode causar metástase, ou seja, podem circular pelo corpo pelos vasos sanguíneos e se alojar em outros tecidos. Sua nomenclatura é dado pelo tipo de tecido de origem, se for de origem do tecido mesenquimal solido o nome do câncer vem com um prefixo Sarcoma (ex: Sarcoma de Kaposi), se for de origem mesenquimal liquido é chamado de Leucemia (ex: Leucemia Linfoide Aguda), e se for de origem epitelial recebe o prefixo Carcinoma (ex: Carcinoma Ductal invasivo). (ROBINS & COTRAN 2016).

2.2 ESTUDO DO CÂNCER *IN VITRO*

2.2.1 Cultura de Células

A cultura de células é um método de estudo *in vitro* desenvolvido no início do século XX por Ross G. Harrison, pioneiro na técnica ao provar que fibras nervosas eram formadas de células nervosas. Desde lá a técnica foi aprimorada e foram criados bancos de células, que promove a certificação e venda das células.

Devido à grande variedade morfológica e molecular foram criados códigos universais para a identificação de células no meio científico como apresentado na tabela 2.

Tabela 2- Tabela de células cultivadas *in vitro* e seus respectivos tecidos, morfologia e espécie de origem.

Código	Tecido	Morfologia	Espécie
HeLa	Colo do útero	Epitelial	<i>Homo sapiens</i>
MCF7	Glândula mamaria (Seio)	Epitelial	<i>Homo sapiens</i>
K-562	Medula óssea	Linfoblasto	<i>Homo sapiens</i>
HEp-2	Contaminada (HeLa)	Epitelial	<i>Homo sapiens</i>

U-87

Cérebro

Epitelial

Homo sapiens

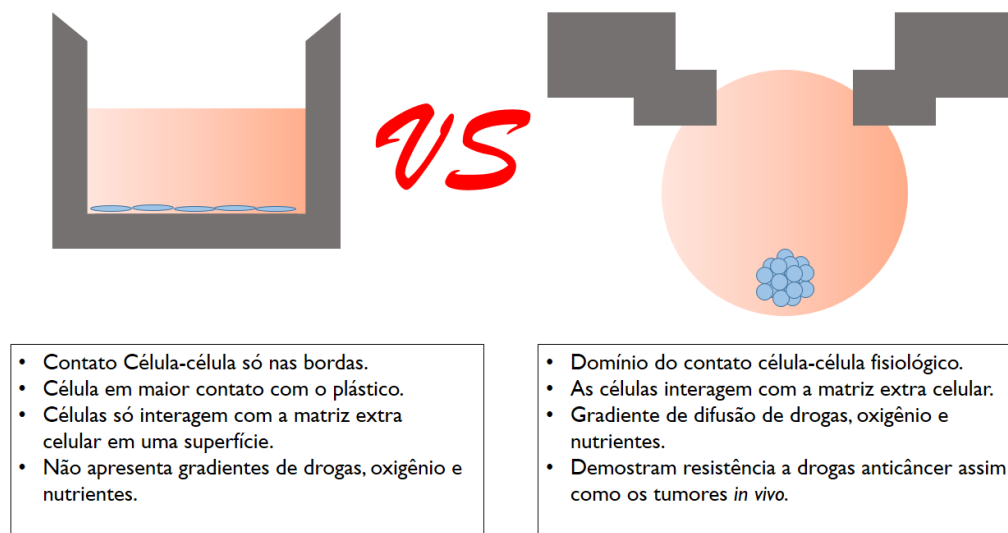
Fonte: Banco de células do Rio de Janeiro (bcrj.org.br)

Células animais podem ser cultivadas utilizando meios naturais ou artificiais. Os meios naturais consistem em fluidos biológicos que podem ser usados em uma grande variedade de células, porém culturas cultivadas com esse tipo de meio possuem baixa reprodutibilidade por não saber sua exata composição. Por outro lado, os meios artificiais ou sintéticos são preparados adicionando nutrientes orgânicos e inorgânicos, vitaminas, sais, CO₂ e O₂, soro proteico, carboidratos, cofatores e antibióticos (ARORA, 2013).

2.2.2 Novas Tecnologias

A proliferação *in vitro*, por mais próximo das condições *in vivo*, ainda possui vários problemas na mimetização do ambiente *in vivo*. Alison Abott (2003) relata que a cultura de células em 2D já está ultrapassada, em relação a expressão gênica e atividade biológica. Para combater este viés, os pesquisadores tem focado no estudo de cultura 3D, e estão descobrindo a complexidade das interação célula-célula e célula-meio (Figura 4).

Figura 4 - Cultura de células 2D e Cultura de células 3D.



Fonte: Adaptado de Durgesh kr Jha, apresentação “3D cell culture techniques for tumor models and their applications”. (site: <https://www.slideshare.net/durgeshjha2/3d-cell-culture-techniques-for-the-tumor-models>)

2.3 PLANTAS MEDICINAIS

As plantas medicinais possuem características terapêuticas devido à presença de compostos orgânicos do seu metabolismo. Estes compostos, denominados metabólitos, são produzidos a partir de reações mediadas por enzimas e outras moléculas no interior das células vegetais e de alguns organismos primitivos. Sua produção é devido à necessidade de adaptação ao meio ambiente em que a espécie se encontra, produzindo características como coloração, odor e até efeito tóxico para afastar predadores.

Os metabólitos secundários são classificados em suas rotas biossintéticas e assim divididos em três grandes grupos. São eles: (1) Compostos nitrogenados, como os alcalóides, sintetizados a partir da via do ácido chiquímico; (2) terpenos pela via do ácido mevalônico e (3) os compostos fenólicos, produzidos pela via do ácido malônico.

Dentre as plantas medicinais, algumas famílias são de grande interesse científico, devido à grande incidência de espécimes com potencial terapêutico. As mais citadas na literatura são: Lamiaceae, Asteraceae, Euphorbiaceae e Fabaceae (VÁSQUEZ *et al.*, 2014).

2.3.1 *Erythrina* (Fabaceae)

Erythrina é um gênero de árvores e arbustos pertencentes à família Fabaceae. Suas espécies são originadas no Brasil, África e Ásia, totalizando mais de cem espécies. São encontradas em clima tropical e subtropical e podem atingir até 30 m de altura. O gênero *Erythrina* apresenta uma grande diversidade morfológica entre as espécies (SOUZA & LORENZI, 2012). *E. velutina* Willd., popularmente conhecida como mulungu ou bico-de-papagaio é uma espécie que pode chegar até 12 m de altura, possui casca lisa, folhas alternadas com aproximadamente 20 cm de comprimento. *E. velutina* Willd., popularmente conhecida como mulungu ou bico-de-papagaio é uma espécie que pode chegar até 12 m de altura, possui casca lisa, folhas alternadas com aproximadamente 20 cm de comprimento. *E. velutina* floresce de Agosto a Dezembro, suas flores são vermelha alaranjada e tem formato de racemo (inflorescência em cachos), que a caracteriza como árvore-coral, seus frutos têm formato de vagem e aparecem de Janeiro a Fevereiro (SCHLEIER *et al.*, 2016) (Figura 5).

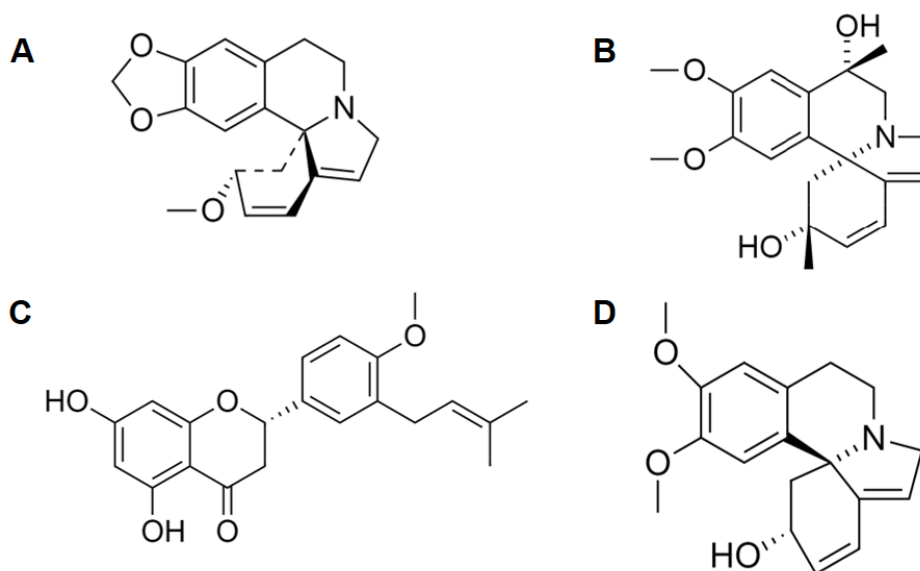
Figura 5 - Inflorescência de *Erythrina velutina*.



Fonte: Foto por Rubens Teixeira de Queiroz, Embrapa Sede, Brasília, Distrito Federal, Brasil. (site: <http://rubens-plantasdobrasil.blogspot.com.br/2012/08/Erythrina-velutina-willd.html>)

E. velutina é caracterizada por apresentar atividade antimicrobiana, antitumoral, anticonceptiva, anticonvulsivante e inibidora de receptores de nicotina (VASCONCELOS *et al.*, 2007; MARCHIORO *et al.*, 2005). O principal metabolito presente nessa espécie é a eritralina, um spiroalcaloide representado na Figura 6 (GUARATINI *et al.*, 2014)

Figura 6 - Metabólitos de *Erythrina*: (A) *Eritralina*, (B) 11 α -hidroxieritravina, (C) 4'-metoxi licoflavonona (D) Eritravina.



Fonte: Autor (2017).

2.3.2 *Petiveria* (Phytolaccaceae)

Plantas do gênero *Petiveria* são encontradas nas regiões neotropicais. As espécies desse gênero são amplamente utilizadas na medicina popular, devido a propriedades organoléptica, caracterizando com um forte odor de alho exalado por toda a planta (ROCHA *et al.*, 2006). *Petiveria alliacea* var. é conhecida popularmente como tipim, guiné ou ainda, atipim, é uma planta utilizada no campo da infectologia, reumatologia e oncologia. Esta planta da família Phytolaccaceae é descrita como uma erva alta (0,5 a 1 m) e perene, com folhas alternadas de forma elíptica, possuem flores pequenas e brancas Figura 7. (PACHECO *et al.*, 2013)

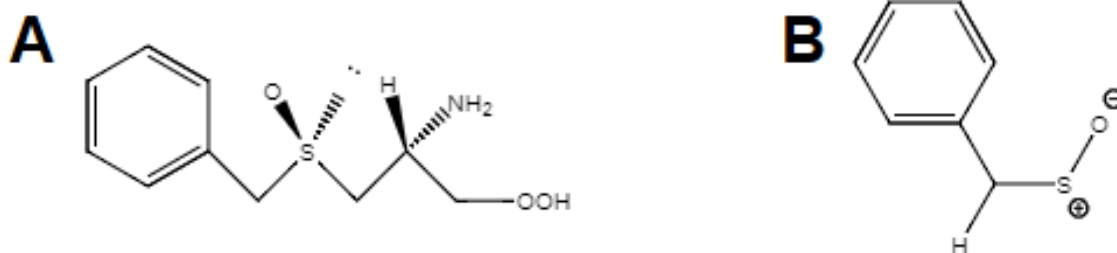
Figura 7 - *Petiveria alliacea*



Fonte: (site: http://chalk.richmond.edu/flora-kaxil-kiuic/p/petiveria_alliacea.html)

O atipim apresenta atividade depressora no sistema nervoso central. Frações extraídas de suas raízes podem agir sinergicamente com fármacos barbitúricos. Além dessas atividades no SNC, há relatos de atividade frente a células tumorais (GOMES *et al.*, 2008, URUEÑA *et al.*, 2008). Dentre seus metabolitos os compostos sulfurados são os de principal atividade biológica (Figura 8) (KUBEC & MUSAH 2001; KUBEC, KIM & MUSAH 2003 e BENEVIDES *et al.*, 2001).

Figura 8 – Metabólitos de *Petiveria alliacea*: (A) Petiverina e (B) S-óxido de tiobenzaldeído.

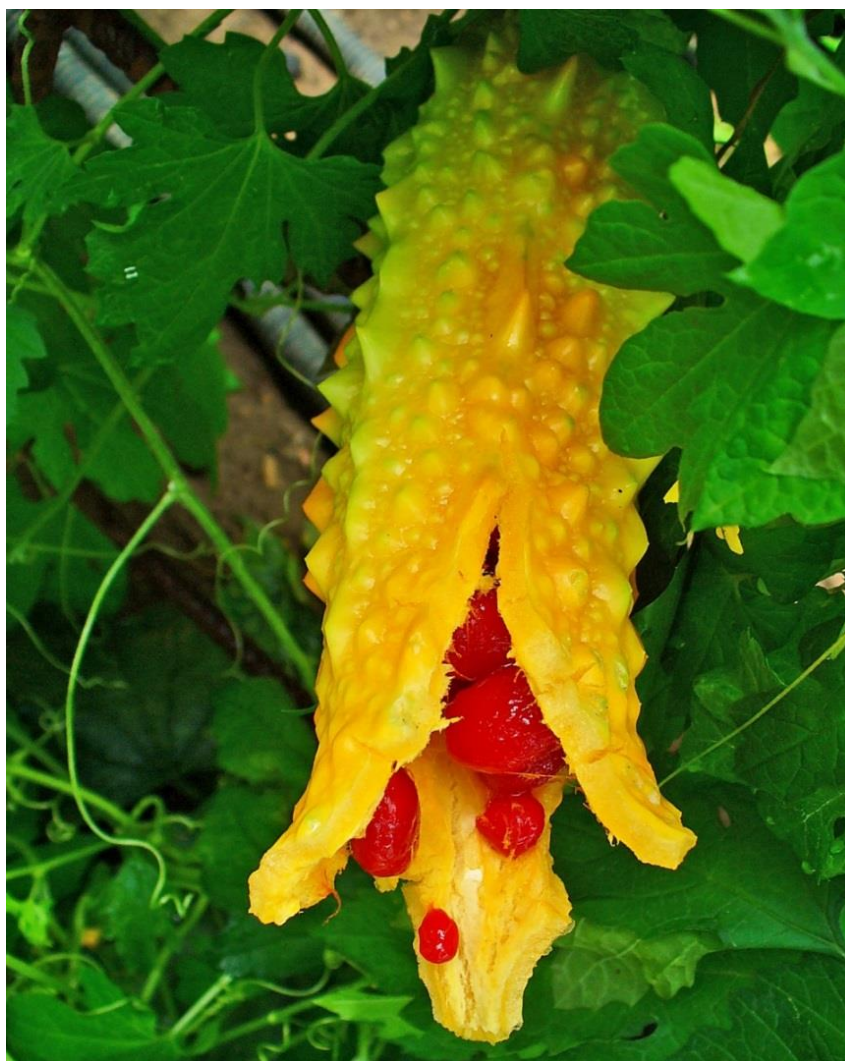


Fonte: Autor (2017).

2.3.3 *Momordica* (Cucurbitaceae)

Momordica é um dos gêneros comestíveis da família Cucurbitaceae, que reúne importante valor econômico no Brasil. *Momordica charantia* L. é uma planta medicinal conhecida popularmente como melão de são caetano, melãozinho e melão amargo (*bitter melon*). Planta trepadeira com flores amarelas e com presença de frutos, em toda sua extensão, com sabor amargo (Figura 9) (DI STASI & HIRUMA-LIMA 2002).

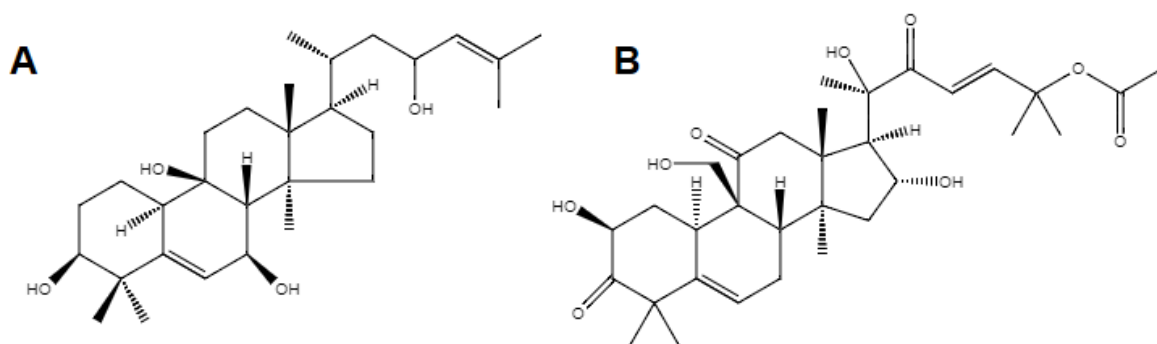
Figura 9 - *Momordica charantia*



Fonte: (site: <http://tropical.theferns.info/image.php?id=Momordica+charantia>)

O melão de são caetano é descrito na literatura por apresentar atividades antimutagênica, anticarcinogênica, hipoglicêmica e antiviral (AGRAWAL & BEOHAR 2010; BASCH, GARARDI & ULBRICHT 2003) Os compostos fitoquímicos descritos na literatura são os glicosídeos, saponinas, alcaloides, óleos fixos, triterpenos e esteroides. Dentre seus compostos ativos destacam-se: momordicina e cucurbitacina presentes (Figura 10) (SANTOS *et al.*, 2012; GROVER & YADAV 2004; COUTINHO *et al.*, 2009).

Figura 10 – Metabólitos de *Mormodica charantia*: (A) Momordicina e (B) Cucurbitacina.



Fonte: Autor (2017).

2.4 PRODUTOS NATURAIS

Devido à grande importância dos compostos bioativos, diferentes técnicas preparativas foram desenvolvidas e aperfeiçoadas com o objetivo de realizar uma purificação com alto rendimento. No século XVIII, com o progresso científico, foram desenvolvidos os primeiros estudos para o isolamento de compostos derivados de plantas, utilizando o método de enfleurage, que consiste na utilização de gordura para extração de óleos de flores (STARMANS *et al.*, 2016). Devido as diferentes propriedades químicas dos compostos bioativos é necessário a utilização de uma extração específica.

2.4.1 Extração por Solventes Orgânicos

A extração por solvente orgânico é um método de separação de misturas homogêneas muito utilizado para extrair compostos de interesse farmacêutico de plantas. Essa técnica é realizada com o material de interesse em contato com o solvente escolhido. Alguns tipos de extração mais comuns, são: (1) extração com álcool etílico 70% (v/v), a qual é um tipo de extração considerado bruto pela capacidade do solvente extrair tanto substâncias polares quanto apolares; (2) extração aquosa, que consiste num processo no qual utiliza água como solvente, acarretando uma maior separação de compostos apolares e (3) extração por gradiente de polaridade, método no qual são utilizados diferentes tipos de solventes em ordem de polaridade (apolar para polar) como hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. A extração por polaridade tem a vantagem de realizar uma separação mais refinada, onde os compostos apolares irão eluir mais facilmente nos solventes; hexano e diclorometano, enquanto os polares; no acetato de etila e metanol.

Algumas técnicas ajudam a melhorar o rendimento desses processos como: (1) a extração até esgotamento, a qual se baseia na troca do solvente em um tempo determinado até que o mesmo consiga extrair todos os compostos do material. Essa técnica é mais utilizada na obtenção do extrato bruto; (2) a utilização do Soxhlet, método no qual o solvente será aquecido e irá entrar em contato com as amostras durante ciclos predefinidos; e (3) as novas tecnologias como o ESA (Extração por Solvente Acelerado) e o extrator supercrítico de CO₂ que usam condições pré-programadas, a fim de realizar extrações com maior controle e reprodutibilidade (HAWTHORNE *et al.*, 2000).

2.4.2 Caracterização de Compostos Orgânicos

Técnicas espectrofotométricas são métodos de análise que avaliam a interação da luz com a matéria, medindo a intensidade da reação em comprimento de onda. A luz possui a importante propriedade de se comportar de duas formas: como onda ou como partícula. Ondas eletromagnéticas são constituídas de campos elétricos e magnéticos oscilantes e se propagam a velocidade constante (c – velocidade da luz) no vácuo. Tem-se além das ondas luminosas de luz visível como exemplos de ondas eletromagnéticas as ondas de rádio, radiação no infravermelho e ultravioleta, raios gama, raios x (PAVIA et al.,2010). As grandezas utilizadas para caracterizar uma onda eletromagnética é o comprimento de onda (λ) e a frequência (f), tal que a velocidade da onda ($v = \lambda f$). Entretanto a luz também pode se comportar como uma partícula em forma de fótons. Dessa forma a energia de um fóton ($E = hf$), ou seja, como pode ser visto na Equação 1. Essa energia pode ser representada pelo espectro de onda eletromagnética (PAVIA et al.,2010).

$$E = hf = \frac{hc}{\lambda} \quad \text{Eq. 1}$$

Onde, h é a constante de Planck, c é a velocidade da luz no vácuo e λ é o comprimento de onda eletromagnético. As interações da luz com a matéria revelam características sobre as propriedades da substância estudada, como; transmissão, absorção ou reflexão da luz.

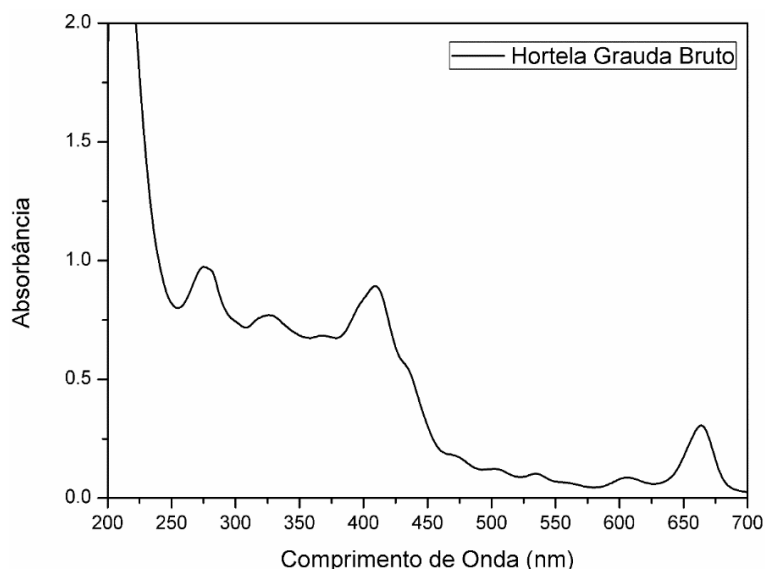
As técnicas espectrométricas, como espectrometria nas regiões de UV-Vis e Infravermelho, a ressonância magnética nuclear (RMN) e a espectrometria de massas, auxiliam na elucidação estrutural de compostos orgânicos.

2.4.2.1 Espectrometria na Região do UV-Vis

Técnica analítica capaz de medir a interação da luz com a matéria. Esse método possibilita quantificar concentrações e caracterizar amostras desconhecidas, relacionando o seu espectro de absorção com um padrão de espectro conhecido. Como mostra o espectro na Figura 11, onde é possível

identificar picos de absorção nas regiões de 650 a 700 nm e 400 a 450 nm, esse perfil de absorção indica a presença de clorofila. O fundamento da técnica leva em conta a estrutura eletrônica da molécula, que ao absorver a energia conduz os elétrons do estado fundamental para um estado excitado. O gráfico, chamado espectro, relaciona o comprimento de onda da luz emitida pela energia absorvida pela amostra (SILVERSTEEN *et al.*, 2006).

Figura 11 – Espectro de extrato bruto de Hortelã Graúda.



Fonte: Autor (2017).

2.4.2.2 Espectrometria na Região do Infravermelho

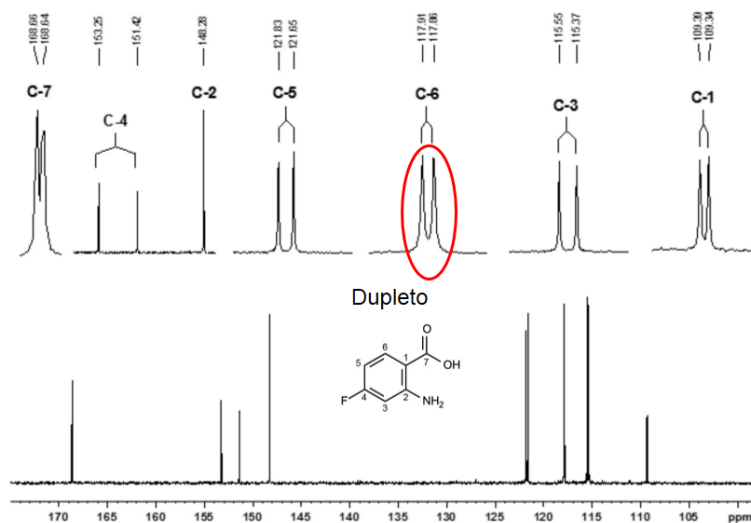
A espectrofotometria na região do infravermelho utiliza a radiação infravermelha do espectro eletromagnético situada entre as regiões do visível e micro-ondas. Alguns grupos de átomos dão origem ao chamado “fingerprint”, bandas que ocorrem na mesma frequência, independente da molécula. São essas bandas características que, com ajuda de uma tabela, fornecem informações estruturais. A radiação no infravermelho de frequências menores do que 100 cm^{-1} , quando absorvida por uma molécula orgânica, converte-se em energia de rotação molecular, e se apresenta em forma de linhas no gráfico. Enquanto que, quando a

radiação tem frequência de 10.000 a 100 cm^{-1} , quando absorvida, converte-se em energia de vibração molecular e é observada como bandas. A frequência e o comprimento de onda de absorção depende da massa relativa do átomo, constante de força de ligação e da geometria dos átomos (SILVERSTEEN *et al.*, 2006).

2.4.2.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A Ressonância Magnética Nuclear também utiliza a propriedade de absorção, porém sob a condição de um campo magnético. A amostra absorve a energia eletromagnética na região de radiofrequência, essa absorção ocorre em função de determinados núcleos da molécula. Atualmente dois tipos de elementos são mais utilizados, a RMN de H^1 e C^{13} . O espectro de RMN registra a frequência dos picos de absorção contra suas intensidades (SILVERSTEEN *et al.*, 2006). No espectro são observados picos que podem representar a quantidade do elemento e qual tipo de sua ligação (simples, dupla, tripla), essas características dependem do tamanho da integralização do pico e da região em que se encontra. Como representado na Figura 12, onde é apresentado o espectro de ^{13}C a presença de picos do tipo duplete.

Figura 12 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear.

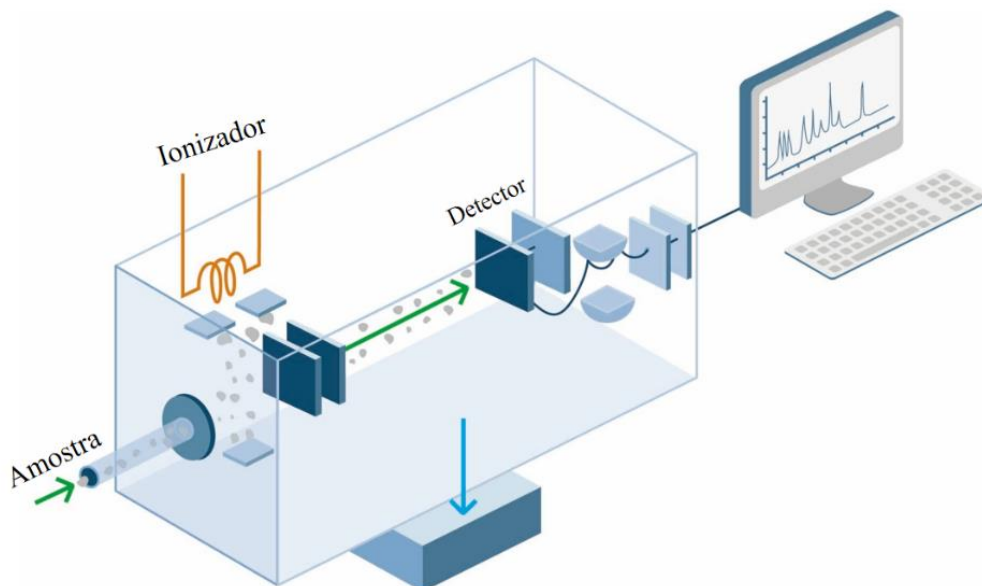


Fonte: Adaptada de Branco e colaboradores (2010)

2.4.2.4 Espectrometria de Massa (EM)

Técnica amplamente utilizada em análises de moléculas pequenas ou médias. O método é utilizado para análise de substâncias em baixas concentrações, como em caso de doping, controle de alimento, identificação de microrganismos clínicos e até em contaminação ambiental. A técnica requer a gaseificação e ionização da amostra, a aceleração da molécula ionizada e sua dispersão. O sinal registrado relaciona a razão da massa desses íons pela carga, e sua detecção registra o sinal da intensidade. É comum a utilização de métodos preparativos, como a cromatografia líquida ou gasosa, acoplado a esse método, possibilitando assim análise de amostras complexas. Apesar da degradação do material na análise de EM, esta técnica possui alta sensibilidade e especificidade (Figura 13) (COLNAGO *et al.*, 2002).

Figura 13 - Esquema técnico do Espectrômetro de Massa por chama.



Fonte: Adaptada da internet (http://hiq.linde-gas.com/en/analytical_methods/mass_spectroscopy.html)

2.4.3 Cromatografia

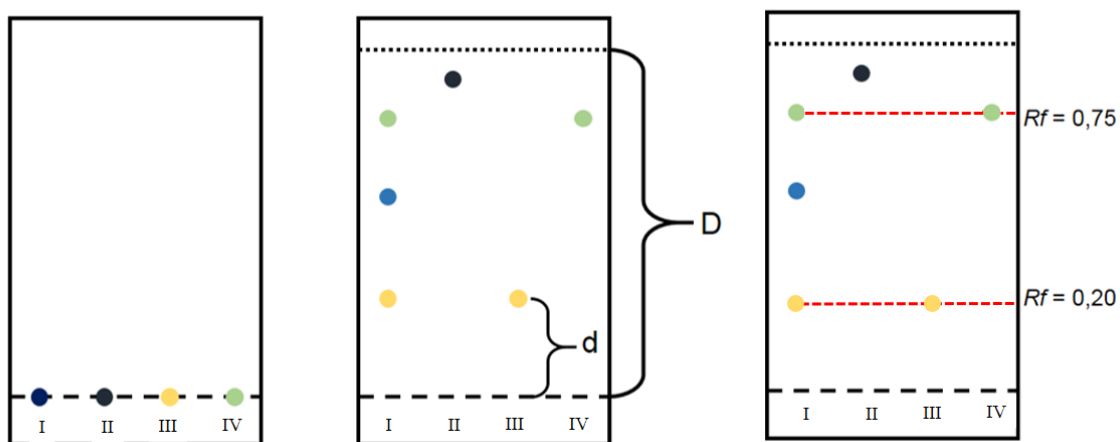
Segundo a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), a cromatografia é um método físico de separação, onde os componentes estarão distribuídos em duas fases, uma estacionária e outra que será móvel. Este método é o mais usado para separação de compostos bioativos, por não interferir quimicamente com a amostra. As fases móveis e estacionárias variam conforme a amostra e a técnica a serem utilizadas. A cromatografia pode ser classificada em fase normal, quando a fase estacionária é mais polar que a fase móvel e fase reversa, nos casos em que a fase móvel é mais polar. A utilização da fase normal ou reversa dependerá das características das amostras.

A técnica mais básica é chamada de cromatografia em camada delgada (CCD), onde temos uma fase estacionária de composto adsorvente, o qual deverá estar fixo em um suporte inerte – geralmente de alumínio ou vidro – e uma fase

móvel, que é um solvente orgânico. Uma solução da amostra é aplicada na base e a placa é imersa na fase móvel (eluente) até atingir 90% da placa (COLLINS *et al.*, 2006).

O princípio da técnica é a interação da amostra com as duas fases. Alguns compostos terão afinidade com a fase estacionária (composto polar), permanecendo na base, enquanto outros serão arrastados (eluidos) pela fase móvel (compostos apolares). Devido as características polares dos compostos presentes na mistura, a separação da amostra é observado em bandas. Como representado na Figura 14, em que após a eluição (segunda placa) seu perfil cromatográfico é comparado com os padrões conhecidos.

Figura 14 - Representação gráfica da cromatografia em camada delgada. (I representa uma amostra de extrato bruto, II, III e VI são substâncias puras conhecidas, d é a distância do ponto de aplicação a amostra após eluição e D distância entre fase móvel e ponto de aplicação).



Fonte: Autor (2017).

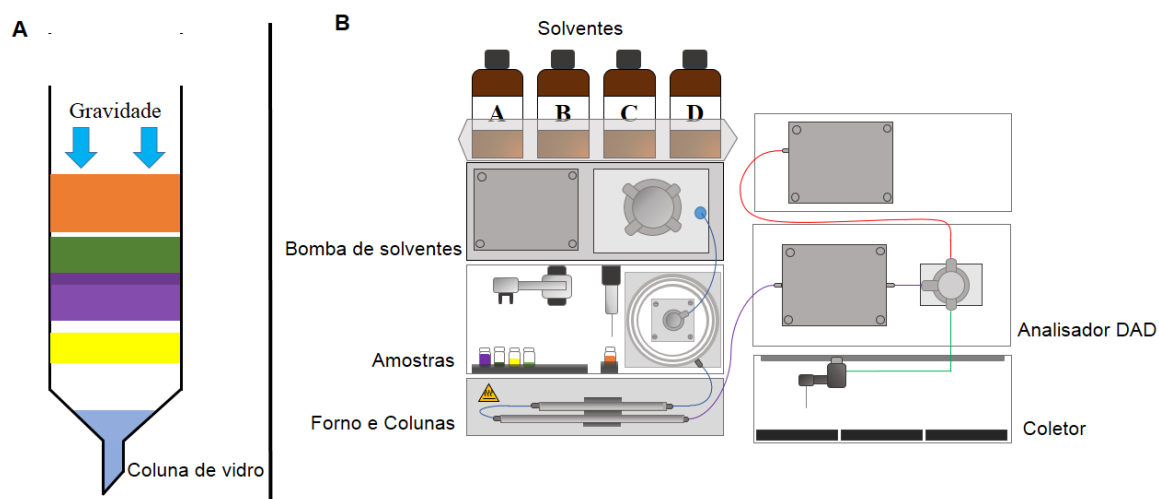
Ao final da eluição, quando o solvente chegar perto do fim da placa, é calculado o fator de retenção (Rf) pela razão entre a distância percorrida da amostra e a distância percorrida da fase móvel segundo a equação abaixo (Equação 2).

$$Rf = \frac{d}{D} \quad \text{Eq. 2}$$

Esse fator é de grande importância quando comparamos substâncias puras e amostras desconhecidas. Se a amostra tiver o mesmo R_f e coloração que o padrão conhecido, é indicativo que sejam as mesmas substâncias.

Outro método cromatográfico de grande interesse é a cromatografia em coluna ou líquida (Figura 15), técnica mais utilizada para purificação de produtos naturais e de reações químicas, por apresentar uma maior variedade, principalmente quanto a sua fase estacionária (líquida, sólida e modificada).

Figura 15 - Cromatografia Líquida: (A) Em coluna aberta de vidro, onde a amostra se separa por sua afinidade com a fase móvel ou com fase estacionária. (B) Cromatografia Líquida de Alta Eficiência que utiliza bomba para puxar o solvente, pode apresentar como analisador ou detector por matriz de diodo (DAD).

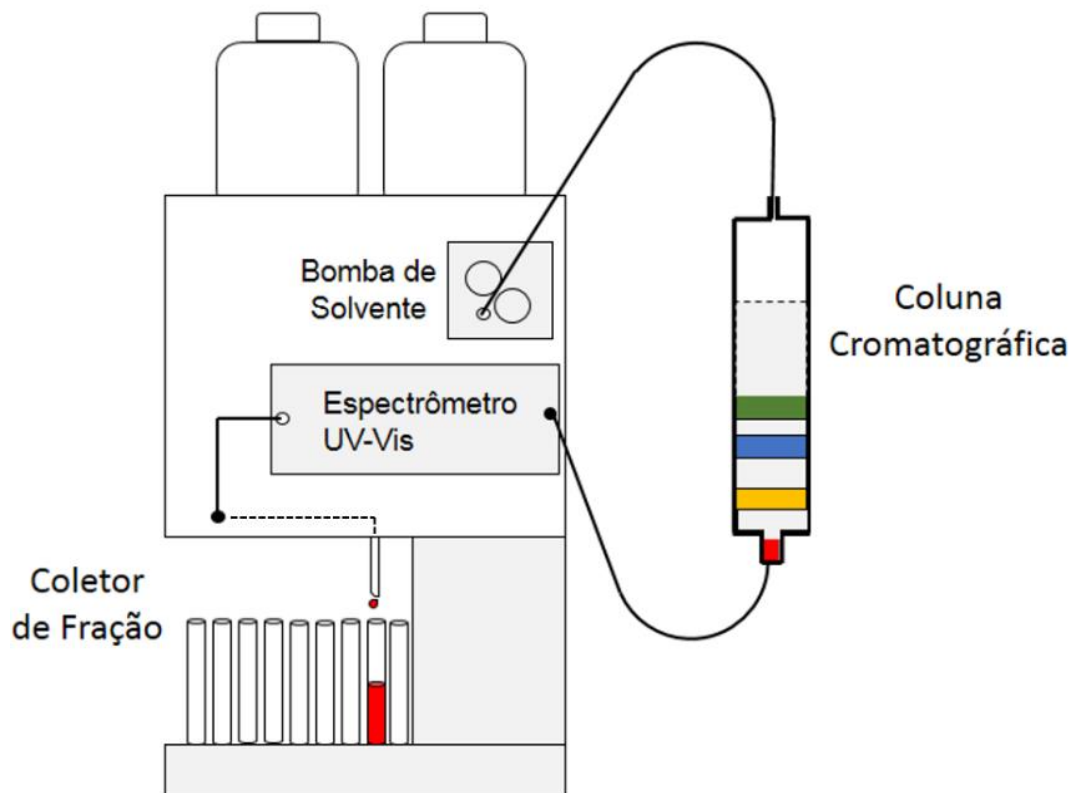


Fonte: Autor (2017).

Na cromatografia líquida clássica a fase estacionária é acondicionada em tubos cilíndricos de vidro de diâmetro variados, esse procedimento é chamado de empacotamento de coluna. Geralmente a fase estacionária é de sílica ou alumina que são classificadas quanto ao tamanho da malha em *Mesh*. Quanto maior o *Mesh* menor o tamanho entre as partículas adsorventes, o que requer um bombeamento para possibilitar a eluição da amostra, caracterizando a técnica como cromatografia FLASH (Figura 16) (DEGAMI *et al.*, 1998). Outra vantagem é que os cromatógrafos FLASH e de alta eficiência possuem detectores que

auxiliam na análise do composto durante a separação, seja por espectrofotômetro ou por espectrômetro de massas.

Figura 16 - Representação gráfica de um Cromatógrafo FLASH.



Fonte: Autor (2017).

A utilização de técnicas cromatográficas, para a elucidação e isolamento dos compostos ativos, associada a técnicas de cultura de células *in vitro* podem auxiliar na descoberta de potenciais antineoplásicos. Entretanto, *Erythrina velutina*, *Petiveria alliacea* e *Momordica charantia* possuem propriedades terapêuticas capazes de serem potenciais produtoras de metabolitos ativos contra células cancerígenas, porém não possuem estudos suficientes para comprovação destes atributos.

O trabalho teve como proposta, a comprovação da ação citotóxica *in vitro* das plantas utilizadas na medicina popular, frente às linhagens celulares humanas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação antimicrobiana, antioxidante e citotóxica *in vitro*, isolar frações e purificar substâncias bioativas a partir de extrato bruto de *Erythrina velutina*, *Petiveria alliacea* e *Momordica charantia*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade antimicrobiana, antioxidante e citotóxica frente a células cancerígenas de extrato hidroalcoólico de *Erythrina velutina*, *Petiveria alliacea* e *Momordica charantia*.

- Avaliar a atividade citotóxica, quantidade de fenóis e antimicrobiana de extratos hexânico, acetato de etila e metanol das espécies estudadas e selecionar os extratos com maior atividade.

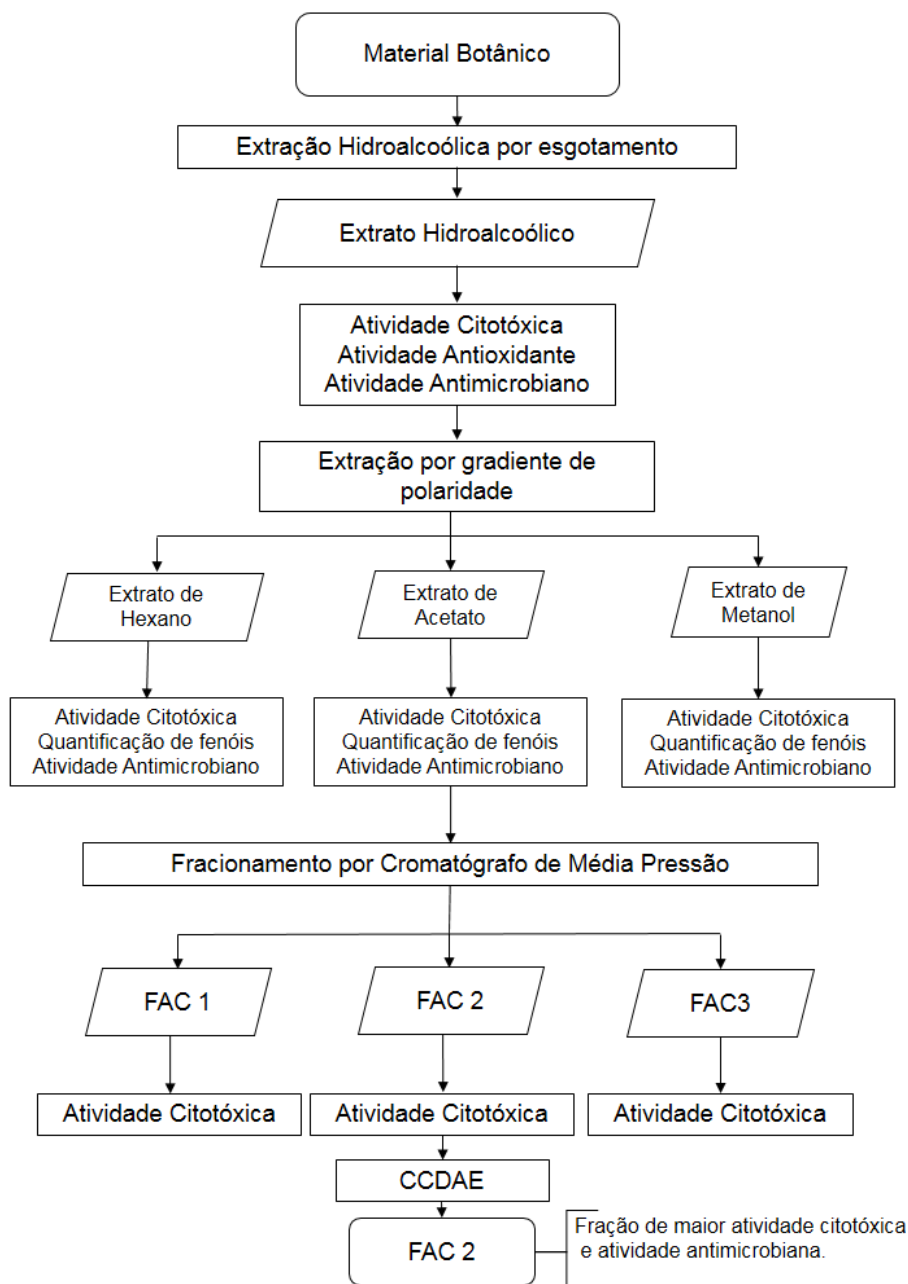
- Purificar o extrato ativo que apresentar melhor potencial citotóxico utilizando técnicas de cromatografia líquida (de média pressão e de alta eficiência).

- Determinar a fração com maior atividade citotóxica frente a células HeLa e caracterizar esta fração por cromatografia em camada delgada de alta eficiência.

4 METODOLOGIA

Com o objetivo de esclarecer os procedimentos realizados nesse trabalho foi produzido um fluxograma onde pode-se observar as etapas para obtenção de uma fração com atividade citotóxica e antimicrobiana (Figura 17).

Figura 17 - Fluxograma de atividades realizadas.

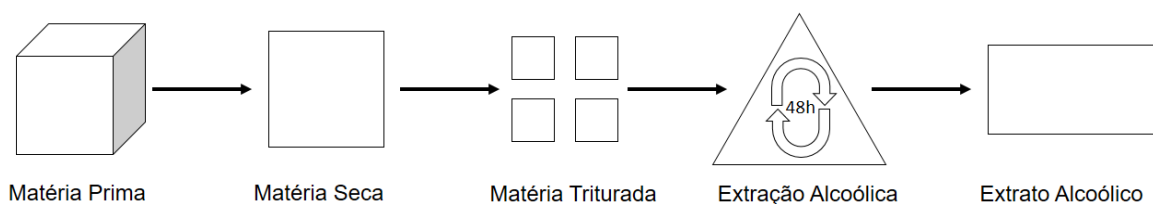


Legenda: CCDAE - Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência, FAC – Fração Acetato.

4.1 MATERIAL BOTÂNICO

As cascas de *E. velutina* Willd. (Fabaceae) e Folhas de *Petiveria alliacea* e *Momordica charantia* foram coletadas em Junho de 2015 na região de Brejo da Madre de Deus e na região metropolitana de Recife, respectivamente, Pernambuco, Brasil. O material botânico coletado foi secado em estufa com circulação forçada de ar a 42 °C. Após a secagem, o material foi triturado, pesado e submetido à extração hidroalcoólica (etanol 70 %) durante 3 ciclos de 48 horas (Figura 18).

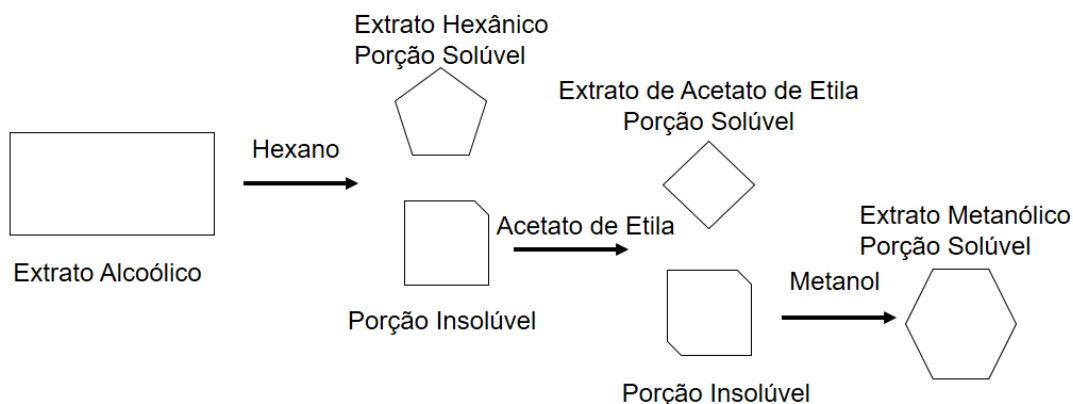
Figura 18 - Fluxograma de extração.



4.2 FRACIONAMENTO E PRÉ-PURIFICAÇÃO

Após a extração, uma parte do extrato bruto foi separada e submetida a um processo de extração utilizando solventes de polaridades crescentes: hexano, acetato de etila e metanol. Cada solvente ficou em contato com a amostra durante 24 horas, sob agitação (Figura 19). O extrato mais ativo foi separado por cromatografia líquida de média pressão (FLASH) usando como fase móvel a mistura dos solventes tolueno e acetato de etila.

Figura 19 - Fluxograma de extração por gradiente de polaridade.



4.3 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DE ALTA EFICIÊNCIA (CCDAE)

Módulos de CCDAE CAMAG (Muttentz, Suíça) consistindo em um aplicador de amostras automático (Automatic TLC Sampler 4), uma câmara de desenvolvimento (Automatic Development Chamber ADC2) e um fotodocumentador (TLC Visualizer) controlados pelo software WINCATS (versão 1.4.4.6337). A fase estacionária utilizada foi uma placa de Sílica Gel 60F254 (10 cm × 10 cm) composta por sílica gel pré-revestida com suporte de vidro compradas da E. Merck (Darmstadt, Alemanha). As amostras dos extratos foram aplicadas utilizando-se agulha do tipo spray com fluxo constante de 150 nL/s sob fluxo de gás nitrogênio. As bandas apresentaram 9,5 mm de comprimento com distância de 8 mm da base da placa e 20 mm da lateral, com espaços de 12 mm entre os pontos de aplicação. As fases móveis utilizadas para cada análise seguiram os protocolos descritos por Bladt e Wagner (1983).

4.4 QUANTIFICAÇÃO DE FENÓIS

A quantificação de fenóis foi determinada seguindo a metodologia de Folin-Ciocalteu (HATAMI *et al.*, 2014), utilizando-se 2,5 mL de bicarbonato de sódio (7,5 %) e 2,5 mL de Folin-Ciocalteu (10 %). Foi adicionado a 0,5 mL da solução da amostra e a mistura foi agitada. Esta foi incubada a 45 °C durante 30 minutos e analisada no espectrofotômetro a 760 nm.

4.5 DETECÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Para o teste antioxidante foi realizado o método do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) em placa de 96 poços (GARCEZ *et al.*, 2009 e DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006). Foram preparadas soluções em etanol da amostra nas concentrações de 1000, 500 e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e DPPH, com absorbância entre 0,6 e 0,7 em 517 nm. As amostras foram incubadas com DPPH na proporção de 1:1 (v/v) por 40 minutos a 25 °C e então a absorbância foi analisada em leitor de microplacas a 517 nm. As amostras foram relacionadas ao controle negativo (DPPH e etanol) e o ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo. A capacidade antioxidante (DPPH %) foi calculada utilizando-se a Equação 3.

$$DPPH \% = \frac{(Abs \text{ controle Negativo} - Abs \text{ amostra})}{Abs \text{ controle Negativo}} \times 100 \quad \text{Eq. 3}$$

4.6 CULTIVO CELULAR

A célula HeLa (Câncer de colón de útero humano) foi cultivada em meio DMEM, a célula U87 (Câncer de células da glia humano) cultivada em meio DMEM-F12 e as células MCF7 (Câncer de mama humano), K-562 (Células de leucemia mieloide humana) e Hep-2 (Câncer de fígado humano) foram cultivadas em meio RPMI. Todos os meios foram suplementados com 10 % de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de Penicilina e Estreptomicina. As células foram mantidas em incubadora a 37 °C com 5% de CO₂.

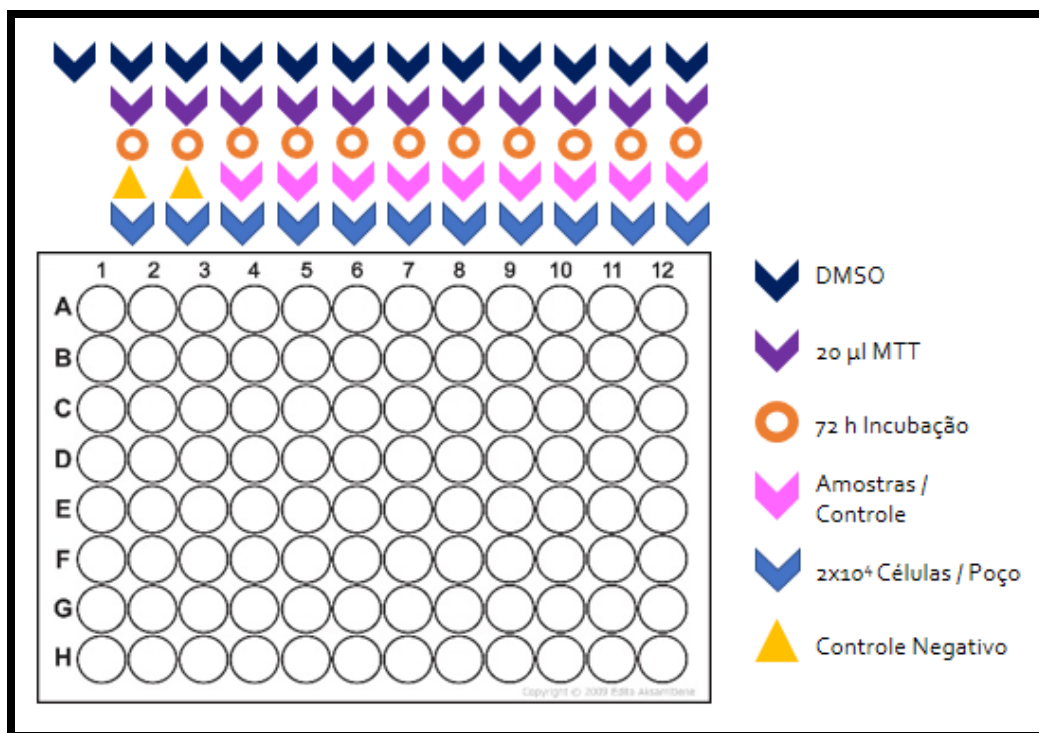
4.7 TESTE DE VIABILIDADE

Para a análise citotóxica foi utilizado o método MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio), seguindo a metodologia descrita por Coelho e colaboradores (2016). As células foram distribuídas em placa de 96 poços na concentração de 1×10^5 células.mL⁻¹ (2×10^4 células/poço) e foram

incubadas durante 24 horas na incubadora a temperatura e CO₂ controlados. Após a incubação, das células no meio, os extratos foram dissolvidos em Dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídos no respectivo meio de cultura celular, essa solução foi aplicada as células na concentração de 50 µg.mL⁻¹, e mantidas durante 72 horas a 37 °C na incubadora. Após as 72 horas o meio foi trocado e foi adicionado 20 µL/poço de uma solução de MTT (5 mg.mL⁻¹) e incubada por mais 3 horas. Após esse tempo, foi retirado o meio e aplicado DMSO puro para dissolver os cristais de formazan e a placa foi analisada em um leitor de microplacas (BioTek, Winooski, USA) em absorção de 595 nm. A viabilidade celular foi calculada utilizando a Equação 4. (Figura 20)

$$\text{Viabilidade Celular (\%)} = \frac{\text{Abs da Amostra}}{\text{Abs do Controle}} \times 100 \quad \text{Eq. 4}$$

Figura 20 - Esquema do teste de citotoxicidade pelo método do MTT.



Foi utilizado a Doxorrubicina como controle positivo por ser um dos medicamentos quimioterápico utilizado na clínica medica, e somente meio de

cultura como controle negativo.

4.8 TESTE DE DIFUSÃO EM DISCO

A avaliação antimicrobiana foi realizada segundo a metodologia descrita por Bauer e colaboradores (1966) com algumas modificações. Foram realizadas suspensões dos micro-organismos: *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 01), *Micrococcus luteus* (UFPEDA 06), *Bacillus subtilis* (UFPEDA 16), *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 39), *Mycobacterium smegmatis* (UFPEDA 71), *Enterococcus faecalis* (UFPEDA 138), *Escherichia coli* (UFPEDA 224), *Serratia marcescens* (UFPEDA 398) e *Candida albicans* (UFPEDA 1007), padronizadas de acordo com a turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland, que corresponde a aproximadamente 10^8 UFC.mL⁻¹ para bactérias, e semeados em placas de Petri com meio Müller-Hinton ou Glicose-Extrato de Levedura (GL). Os extratos testados foram diluídos com 10 % de DMSO a uma concentração de 2 mg.mL⁻¹. Discos de 6 mm de diâmetro foram embebidos com 20 µL da solução do extrato bruto ou fração e colocados sobre a superfície do meio previamente semeado em placa de Petri. As placas foram dispostas em geladeira por 20 minutos (para início da difusão antes do crescimento do micro-organismo) e em seguida incubadas a 35 °C durante 24 horas (bactérias) e 30 °C durante 24-48 horas (levedura). Os testes foram realizados em triplicata e os resultados, expressos em mm (milímetros), foram calculados pela média aritmética do diâmetro dos halos de inibição formado ao redor dos discos nas três repetições.

4.9 TESTE DE CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI)

A análise da concentração mínima inibitória foi realizada segundo a metodologia descrita por Silva (2007). Foram realizadas suspensões dos microrganismos *Staphylococcus aureus* isolados clínicos de: secreção traqueal (UFPEDA 707), ponta de cateter (UFPEDA 725), orofaringe (UFPEDA 728),

secreção de ferida (UFPEDA 731), fragmento ósseo (UFPEDA 732) e *Enterococcus faecalis* (UFPEDA 138), com turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland e semeados em placas de Petri com meio Muller-Hinton ou GL. Foram realizadas perfurações de 6 mm de diâmetro nos meios de cultura com o auxílio de ponteiras estéreis. 100 µL da fração acetato de *E. velutina* diluída em 10% de DMSO, foi colocada dentro dos poços variando as concentrações finais de 2.000 a 3,9 µg.mL⁻¹. As placas foram dispostas em geladeira por 20 minutos (para início da difusão antes do crescimento do micro-organismo) e em seguida incubadas a 35 °C durante 24 horas. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados, expressos em mm (milímetros), foram calculados pela média aritmética do diâmetro dos halos de inibição formado ao redor dos discos nas três repetições.

4.10 TESTES ESTATÍSTICOS

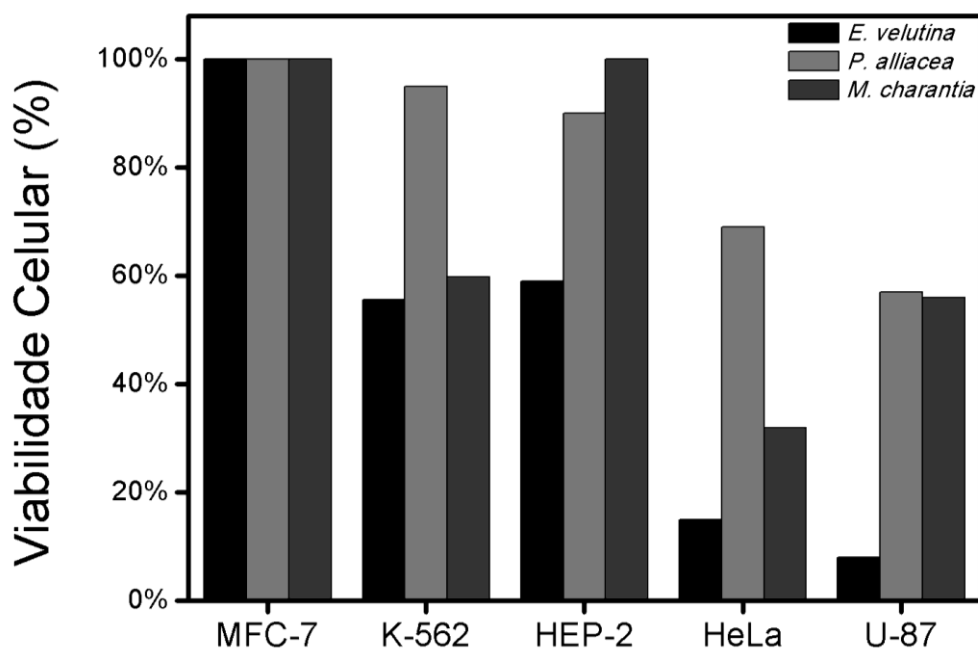
Os testes estatísticos foram realizados no programa GrandPad Prisma 7. Primeiramente os dados obtidos foram submetidos ao teste de kolmogorov Smirnov para verificar se os resultados tendiam a normalidade $p < 0,05$. Posterior ao teste de normalidade os dados foram submetidos ao teste ANOVA com o teste T.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PRIMEIRO TESTE DE VIABILIDADE CELULAR

O *screening* inicial de viabilidade celular pelo método do MTT dos extratos brutos das cascas de *E. velutina* e das folhas de *M. charantia* e *P. alliacea*, em concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ frente a células tumorais, demonstrou que o extrato bruto de *E. velutina* apresentou a melhor atividade citotóxica frente as células HeLa (14 % de viabilidade), Hep-2 (59,7 % de viabilidade), K-562 (55,6 % de viabilidade) e U-87 (8 % de viabilidade), o extrato de *M. charantia* apresentou atividade citotóxica significativa frente a HeLa (32 % de viabilidade) e U-87 (55 % de viabilidade) enquanto que a *P. alliacea* só apresentou atividade citotóxica satisfatória para U-87 (56 % de viabilidade) (Figura 21).

Figura 21 - Viabilidade celular relativa de linhagens cancerígenas: MCF-7 – Adenocarcinoma de Mama Humano; K-562 – Leucemia mielóide crônica humano; Hep-2 – Câncer de Fígado Humano; HeLa – Câncer de Colón de Útero Humano e U-87 – Glioblastoma Humano



Fonte: Autor (2017).

Mohammed e colaboradores (2012) analisaram a fração purificada de alcalóides de *Erythrina abyssinica* frente a várias células cancerígenas, e observaram uma viabilidade de 13 %. O resultado observado neste trabalho aproxima-se da ação descrita na literatura, relacionando-se a outras espécies de *Erythrina*. Entretanto, a *E. velutina* Willd. apresentou uma destacada atividade citotóxica, pois foram obtidos resultados consideráveis mesmo a partir do extrato bruto.

Dentre as três espécies descritas, a *Momordica charantia* é a mais estudada com relação a sua atividade na área oncológica. Rey e colaboradores (2010) relataram a inibição da proliferação de células de câncer de mama (MCF-7, HMEC e MDA-MB-231) pelo extrato de *M. charantia*, promovendo apoptose. Fang e colaboradores (2011) descrevem uma lectina com atividade antitumoral contra carcinoma de células da nasofaringe, os autores classificam essa lectina isolada da *M. charantia* (MCL) como um potente candidato como medida profilática e terapêutica contra esse câncer. Weng e colaboradores (2013) descreveram a ação apoptótica e autofágica de células do câncer através de um triterpenóide do tipo curcubitanico, seu potencial citotóxico deve-se à ativação de receptores gamas em peroxissomos.

Ruffa e colaboradores (2002) analisaram o efeito citotóxico de extratos de plantas em carcinoma hepatocelular humano (Hep G2), porém a *P. alliacea* não apresentou atividade citotóxica assim como neste trabalho. Entretanto Williams e colaboradores (2007) descrevem uma revisão sobre o princípio ativo Dibenzyl trisulphide, isolado da *Petiveria alliacea*, em sua revisão eles exploram sua atividade frente a várias células cancerígenas, dentre elas podemos encontrar MCF-7 e HeLa.

5.2 TESTE DE ANTIOXIDANTE – DPPH

A atividade antioxidante do extrato bruto das cascas de *E. velutina* foi aproximadamente 42 % na concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ enquanto que os

extratos de *M. charantia* e *P. alliacea* foi de 29% e 21 %, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3 - Atividade antioxidante pelo método de DPPH de extrato bruto de cascas de *E. velutina* e folhas de *M. charantia* e *P. alliacea*.

Amostras	1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
<i>Erythrina velutina</i>	42 %	34%	29%	18%	13%	5%
<i>Mormodica charantia</i>	29%	14%	0%	0%	0%	0%
<i>Petiveria alliacea</i>	21%	12%	0%	0%	0%	0%

Fonte: Autor (2017).

Juma e Majida (2004) relataram a atividade antioxidante de alcaloides derivados da eritralina, isolados a partir de flores e vagens de *Erythrina lysistemon*, apenas dois compostos apresentaram atividade significativa, possuindo um IC_{50} de $150 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Kim e colaboradores (2004) trabalhou com 20 plantas medicinais, entre elas ele analisou as sementes de *Erythrina variegata*, e observou um DPPH de 89 % na concentração de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Horax e colaboradores (2005) descreveram os componentes fenólicos e a atividade antioxidante de quatro variáveis de *Momordica charantia* (duas da Índia e duas da China), os resultados obtidos foram de 81 – 86 % de atividade antioxidante na concentração de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do extrato metanólico. Kubola e Siriamornpun (2008) trabalharam com as folhas, galhos e fruta, na concentração de $800 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ele observou uma atividade de 81,4 %, também foi observado que o IC_{50} das frutas verdes eram menores que as frutas maduras, 11mg.mL^{-1} e 27mg.mL^{-1} respectivamente.

Zaa e colaboradores (2012) avaliaram o efeito anti-inflamatório e antioxidante, segundo o método TBARS, dos extratos hidroalcoólicos de *Petiveria alliacea*, o resultado observado foi similar a vitamina E (42 % e 41 %, respectivamente). Já Pérez-leal e colaboradores (2006) trabalharam com extratos butanólicos de raiz e folhas e extrato aquoso de folhas de *P. alliacea*, o respectivo

trabalho avaliou a atividade antioxidante segundo o método de DPPH e identificou uma diferença entre sua capacidade antioxidante entre esses três extratos, sendo o extrato butanólico das folhas de maior atividade.

5.3 QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENOLICOS TOTAIS

Na análise quantitativa para compostos fenólicos totais, os resultados demonstraram que a *Erythrina velutina* apresentou uma concentração em equivalente de ácido gálico (EAG) de 174, 196 e 114 EAG.g⁻¹ de extrato alcoólico, acetato de etila e metanólico, respectivamente. Enquanto que a *Momordica charantia* apresentou 57, 119, 106 e 58 EAG.g⁻¹ de extrato alcoólico, hexânico, acetato de etila e metanólico, respectivamente. A concentração maior de compostos fenólicos foi presente nos extratos de menor polaridade, acetato de etila para *Erythrina* e hexânico para a *Momordica* (Tabela 4).

Tabela 4 - Quantificação de fenóis totais das frações de *E. velutina* e *M. charantia* (EAG.µg⁻¹)

Amostra		1000 µg.mL ⁻¹	500 µg.mL ⁻¹	250 µg.mL ⁻¹	125 µg.mL ⁻¹	100 µg.mL ⁻¹
<i>Erythrina velutina</i>						
Extrato	Alcoólico	174	113	81	33	28
	Acetato de Etila	196	130	71	40	32
	Metanólico	114	66	37	20	16
<i>Momordica charantia</i>						
Extrato	Alcoólico	57	33	18	9	8
	Hexânico	119	69	37	16	19
	Acetato de Etila	106	59	29	14	11
	Metanólico	58	30	16	10	9

Fonte: Autor (2017). Legenda: EAG/µ – Equivalente a ácido gálico por grama de amostra.

Li e colaboradores (2014) relataram 3,90 mg EAG.g⁻¹ obtido a partir de extratos de flores de *E. variegata*. Mergulo e colaboradores (2015) trabalharam com o extrato aquoso de *E. falcata* e *E. cristal-galli* e concluíram que as espécies

variaram de 0,877-1,49 mg EAG.g⁻¹ de extrato. Sowndhararajan e colaboradores (2012) descreveram que o extrato aquoso e metanólico de *E. indica* apresentam 24,91 e 25,62 mg EAG.g⁻¹ por extrato, respectivamente.

Bajpai e colaboradores (2005) analisaram o constituinte fenólico e atividade antioxidante de plantas medicinais e alimentos da Índia, o extrato metanol:água das folhas de *M. charantia* obteve 16 mg EAG por grama de extrato. Budrat & Shotipruk (2008) avaliaram a extração e quantificação de compostos fenólicos equivalentes a ácido gálico das frutas de *M. charantia*. Os autores observaram que realizando a extração aquosa supercrítica em uma temperatura de 200 °C conseguiam extrair mais compostos fenólicos quando comparado à extração por solvente orgânico (metanol), onde obtiveram valores de 48 e 7,8 mg EAG.g⁻¹ de extrato, respectivamente. Horax e colaboradores (2010) compararam a quantidade de compostos fenólicos contidos no pericarpo (camada externa que envolve a semente) e a semente, e observaram que ambos obtinham quantidades de compostos fenólicos próximos (14,8 e 18 mg EAG.g⁻¹ de extrato etanólico 80%).

5.4 TESTE ANTIMICROBIANO DOS EXTRATOS BRUTOS

Para analisar a atividade antimicrobiana foi realizado o teste de difusão de disco. Os resultados do teste demonstraram que o extrato de *E. velutina* e *M. charantia* foram mais ativos que o extrato de *P. alliacea* por este possuir atividade apenas contra o *Mycobacterium smegmatis* (UFPEDA 71). Os dois extratos de maior atividade não apresentaram atividade contra leveduras e bactérias Gram-negativas (Tabela 5).

Tabela 5– Teste de difusão em disco, halos de inibição em mm de extratos brutos de cascas de *E. velutina* e folhas de *M. charantia* e *P. alliacea*.

	UFPEDA 01	UFPEDA 06	UFPEDA 16	UFPEDA 71	UFPED A 138	UFPEDA 39/224/398/ 1007
<i>Erythrina velutina</i>	20±0	18±0,8	14±0,5	18±0,8	16±0,8	X
<i>Mormodica charantia</i>	14±0,8	15±0,5	11±0,8	19±0,8	X	X
<i>Petiveria alliacea</i>	X	X	X	14±0,8	X	X

Fonte: Autor (2017). Legenda: X - Amostras sem atividade, UFPEDA 01 - *Staphylococcus aureus*, UFPEDA 06 - *Micrococcus luteus*, UFPEDA 16 - *Bacillus subtilis*, UFPEDA 39 - *Pseudomonas aeruginosa*, UFPEDA 71 – *Mycobacterium smegmatis*, UFPEDA 138 – *Enterococcus faecalis*,

UFPEDA 224 - *Escherichia coli*, UFPEDA 338 – *Serratia marcescens* e UFPEDA 1007 - *Candida albicans*.

Ekundayo e Ezeogu (2006) analisaram cinco plantas usadas na medicina tradicional na Nigéria, entre elas o extrato metanólico de *Erythrina senegalensis*. Os autores observaram que o extrato possuía atividade inibitória frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*, com halos de inibições de 10, 8, 9, 7 e 8 mm respectivamente, resultados bem abaixo comparados aos obtidos nesse trabalho. Já Yenesew e colaboradores (2005) observaram atividade antimicrobiana do extrato de casca de *Erythrina burttii* frente a *C. albicans*, *Trychophyton mentagrophyte* (isolado clinico), *Microsporum gypsum* (isolado clinico), *Saccharomyces cerevisiae*, *S. aureus* e *E. coli*.

Mwambete (2009) relatou a atividade antimicrobiana do extrato metanólico e benzina (éter de petróleo) de folhas e fruto da *M. charantia*. Foi observado que as folhas apresentaram atividade contra *Staphylococcus aureus*, porém não obteve atividade contra bactérias gram-negativas, corroborando com os resultados obtidos nesse trabalho. Já os extratos dos frutos apresentaram atividade contra algumas bactérias gram-negativas como *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhi*. Roospashree e colaboradores (2008) também trabalharam com *M. charantia*, porém além do *S. aureus*, seu extrato etanólico apresentou atividade para *Pseudomonas aeruginosa* (CMI 150 mg.mL⁻¹) e seu extrato metanólico apresentou atividades para *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*.

Guedes e colaboradores (2009) relataram a atividade antimicrobiana de extratos brutos de *Petiveria alliacea* L. e foi observado que o extrato mais ativo foi o extraído por etanol 70 %, este apresentou CMI contra todas as bactérias (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *S. mutans*, *B. subtilis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*) > 3000 µg.mL e contras as leveduras *C. parapsilosis* (CMI de 250 µg.mL), *C. kefir* (CMI de 760 µg.mL) e *C. albicans* (CMI de 760 µg.mL).

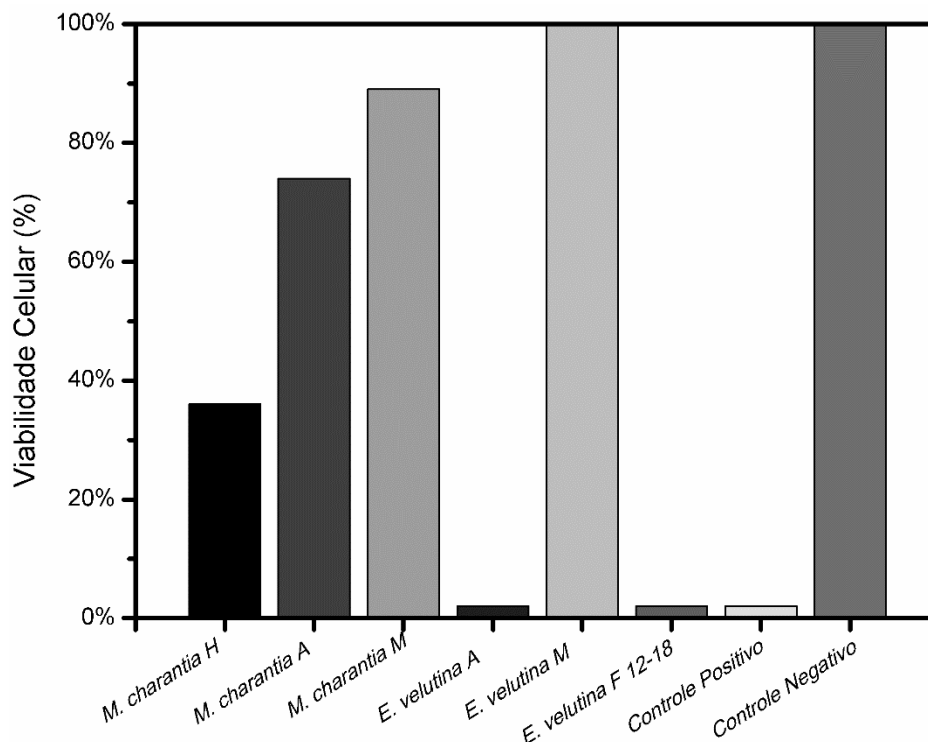
5.5 EXTRAÇÃO POR POLARIDADE

Os extratos com melhores atividades foram extraídos por gradiente de polaridade onde foi adquirido cinco extratos no total, dois do extrato bruto de *Erythrina velutina* (extratos de acetato de etila e de metanol), devido sua falta de solubilidade em hexano e três do extrato bruto de *Mormodica charantia* (Extratos de hexano, acetato de etila e de metanol).

5.6 SEGUNDO TESTE DE VIABILIDADE CELULAR

Os testes com as frações frente as células HeLa demonstraram uma maior atividade citotóxica na extrato acetato de etila (2 % de viabilidade relativa) e na fração 12-18 (3 % de viabilidade relativa) de *E. velutina*, todos na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo semelhantes ao resultado do controle positivo (Doxorubicina) 2 % de viabilidade relativa na concentração de 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto que a fração metanólica não apresentou atividade citotóxica (100 % de viabilidade relativa) (Figura 22). As frações de *M. charantia* demonstraram que o extrato hexânico (H) possui maior toxicidade (36 % de viabilidade relativa) porem a fração de acetato de etila (A) e metanol (M) possuíram uma viabilidade relativa de aproximadamente de 74 % e 89%. Os resultados foram comparados estatisticamente entre si pelo teste de ANOVA com o teste T e demonstraram que o controle negativo (meio de cultura) e o extrato metanólico de *E. velutina* foram considerados iguais entre si enquanto que o controle positivo a fração 12-18 e o extrato de acetato de etila não obteve diferença estatística ($P < 0,05$).

Figura 22 - Gráfico de viabilidade de células HeLa. Controle positivo: doxorubicina, controle negativo: meio de cultura, fração F 12-18: fração purificada do extrato de acetato de etila com presença de compostos fenólicos.



Fonte: Autor (2017).

Grahame (2013) relata a ação de produtos naturais na ativação de proteínas quinases para o tratamento do câncer. Um dos problemas comuns em produtos naturais é a dose dependente, o que torna a determinação do IC50 variável (CHEN *et al.*, 2013 e SALEM *et al.*, 2002). No presente trabalho as frações de *E. velutina* e *M. charantia* demonstraram ser dose dependentes, o que impossibilitou a realização da IC50, as células apresentaram morfologia de morte celular por apoptose, descrita por Starmans & Nijhuis (1996), no entanto são necessários estudos mais específicos para sua comprovação.

5.7 TESTE ANTIMICROBIANO COM OS EXTRATOS FRACIONADOS

O segundo teste antimicrobiano analisou os extratos por polaridade das espécimes de melhor atividade biológica. O extrato de acetato de etila de *E. velutina* demonstrou semelhante atividade contra bactérias Gram-positivas e álcool-

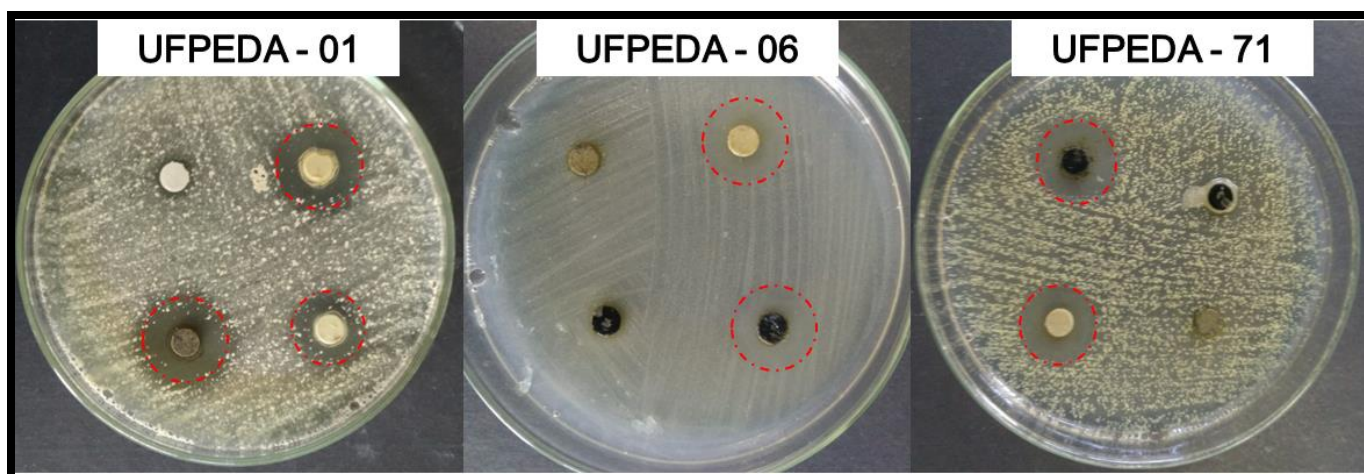
ácido resistentes que o extrato bruto obteve, porem seu extrato metanólico não apresentou nenhuma atividade. Por outro lado, tanto os extratos de acetato de etila e metanol da *M. charantia* apresentaram atividades contra as bactérias Gram-positivas e álcool-ácido resistentes e seu extrato de hexano não apresentou atividade (Tabela 6) (Figura 23).

Tabela 6- Teste de difusão em disco de frações do extrato bruto de *E. velutina* e *M. charantia*.

		UFPEDA 01	UFPEDA 06	UFPEDA 16	UFPEDA 71	UFPEDA 138	UFPEDA 39/224/ 398/1007
<i>Erythrina velutina</i>							
Extrato	Acetato de Etila	15±0,5	16±0,5	14±0,5	15±0,5	14±0,8	X
	Metanólico	X	X	X	X	X	X
<i>Mormodica charantia</i>							
Extrato	Hexânico	X	X	X	X	X	X
	Acetato de Etila	15±0,5	18±0,5	15±0,8	25±0,5	13±0,8	X
	Metanólico	15±0,5	16±0,8	16±1,2	23±1	15±0	X

Fonte: Autor (2017). Legenda: X - Amostra sem atividade, UFPEDA 01 - *Staphylococcus aureus*, UFPEDA 06 - *Micrococcus luteus*, UFPEDA 16 - *Bacillus subtilis*, UFPEDA 39 - *Pseudomonas aeruginosa*, UFPEDA 71 - *Mycobacterium smegmatis*, UFPEDA 138 - *Enterococcus faecalis*, UFPEDA 224 - *Escherichia coli*, UFPEDA 338 - *Serratia marcescens* e UFPEDA 1007 - *Candida albicans*

Figura 23 – Resultados do teste de difusão em disco das frações do extrato bruto *E. velutina* e *M. charantia*.



Fonte: Autor (2017). Legenda: Círculos vermelhos evidenciando os halos de inibição.

5.8 CMI FRENTE A *Staphylococcus aureus* MULTIRRESISTENTE

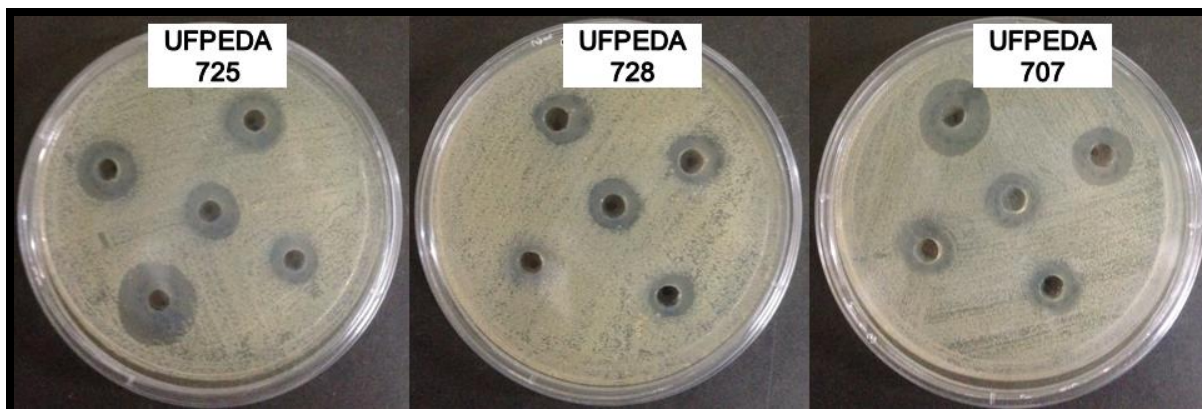
A amostra que apresentou melhor atividade biológica, antitumoral e antimicrobiana, foi o extrato de acetato de etila de *E. velutina*. Devido ao seu potencial biológico foi realizado a análise de concentração mínima inibitória (CMI) com *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos (isolados clínicos) e *Enterococcus faecalis*. Os resultados obtidos demonstraram que todos os micro-organismos foram sensíveis a fração acetato de etila de *E. velutina*. Os isolados clínicos de secreção traqueal (UFPEDA 707), ponta de cateter (UFPEDA 725) e fragmento ósseo (UFPEDA 732) obtiveram uma CMI de $3,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$, os isolados de orofaringe (UFPEDA 728) e secreção de ferida (UFPEDA 731) obtiveram a CMI de $15,8$ e $62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente e o *Enterococcus faecalis* (UFPEDA 138) de $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os resultados expressos em Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) estão descritos no Tabela 7 (Figura 24).

Tabela 7 - CMI da fração de acetato de etila de *E. velutina* frente a isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*

Micro-organismos	Amostras			
	Extrato Acetato de Etila de <i>E. velutina</i>	Eritromicina	Clindamicina	Oxacilina
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFPEDA 01)				
Secreção Traqueal (UFPEDA 707)	$3,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$	R	R	S
Ponta de Cateter (UFPEDA 725)	$3,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$	R	R	R
Orofaringe (UFPEDA 728)	$15,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$	R	R	R
Secreção de Ferida (UFPEDA 731)	$62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$	R	R	R
Fragmento Ósseo (UFPEDA 732)	$3,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$	R	R	R
<i>Enterococcus faecalis</i> (UFPEDA 138)	$125 \mu\text{g.mL}^{-1}$	ND	ND	ND

Fonte: Autor (2017). Legenda: R: Resistente, S: Sensível, ND: Não determinada

Figura 24 – Resultados do CMI da fração de acetato de etila de *E. velutina* frente a isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*.



Fonte: Autor (2017).

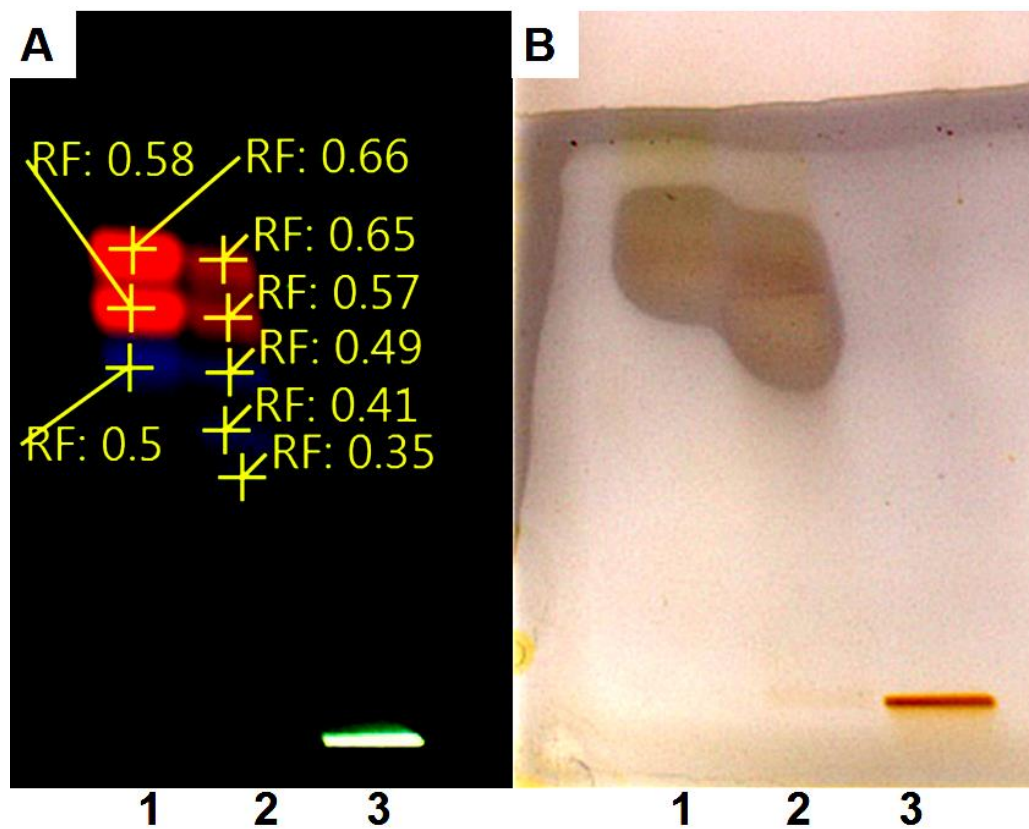
VIRTUOSO e colaboradores (2005) obtiveram atividade antibacteriana no extrato hexânico de cascas de *E. velutina* Willd. contra *Streptococcus pyogenes* (7 mm) e *Staphylococcus aureus* (13 mm) para a concentração de 200 mg.mL⁻¹, 100 vezes mais que a utilizada neste trabalho. AKTER e colaboradores (2016) também relataram a atividade antimicrobiana das frações diclorometano e acetato de etila de *E. stricta* contra *Staphylococcus aureus* metaciclina sensível (MSSA), metaciclina resistente (MRSSA), resistente a multidrogas (MDRSA) e *Candida albicans*, obtendo CMI próximos aos relatados no presente trabalho.

5.9 ANALISE CROMATOGRÁFICA DE ALTA EFICIÊNCIA

Após os resultados da segunda análise de atividades biológica, o extrato de acetato de etila de *E. velutina* obteve o melhor resultado, critério adotado para seu fracionamento no cromatógrafo de média pressão (FLASH). Foi utilizado como fase móvel uma rampa de solvente orgânico composto de Hexano-Tolueno-Acetato de Etila. Após a corrida foi obtido três frações, F1-11, F12-18 e F19-30. A fração de maior atividade citotóxica e um padrão de alcaloide (Berberina) foi analisada no cromatógrafo em camada delgada de alta eficiência (CCDAE) em fase móvel de Tolueno-Acetato de etila (7:3 v/v), após a corrida a placa foi revelada com o reagente de Dragendorff para a detecção de possíveis alcaloides,

a placa cromatográfica está representada na Figura 25.

Figura 25 - Placa cromatográfica da F12-18 (1), F19-30 (2) e Berberina (3). A) Placa sob luz ultravioleta e B) placa sob luz branca após revelador de alcaloide Dragendorff.



Fonte: Autor (2017).

6 CONCLUSÃO

- ✓ Os extratos hidroalcoólico de *Erythrina velutina*, *Petiveria alliacea* e *Momordica charantia* apresentaram atividades para *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* e *Mycobacterium smegmatis*, bactérias gram-positivas e álcool-ácido resistente.
- ✓ A atividade antioxidante de *E. velutina* foi superior à de *P. alliacea* e *M. charantia*.
- ✓ Os extratos hidroalcoólico das três espécies estudadas apresentaram atividade citotóxica para quatro linhagens celulares cancerígenas (K-562, HEP-2, HeLa e U-87) porém não possuíram atividade para a linhagem MCF-7.
- ✓ Após a extração por gradiente de polaridade a citotoxicidade dos extratos de *Erythrina velutina* aumentaram e a atividade antimicrobiana para os micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium smegmatis* e *Enterococcus faecalis* diminuíram.
- ✓ Tanto o extrato metanólico de *E. velutina* quanto o de *M. charantia* não exibiram atividade citotóxica significativa.
- ✓ O extrato de acetato de etila de *E. velutina* mostrou-se com maior atividade citotóxica e maior quantidade de equivalente a ácido gálico dentre os extratos analisados.
- ✓ Por meio de cromatografia de media pressão foram obtidas três frações F1-11, F12-18 e F19-30, sendo que a fração F12-18 exibiu maior atividade citotóxica frente a célula HeLa enquanto que a fração 1-11 não apresentou atividade.
- ✓ Em ensaios de cromatografia em camada delgada de alta eficiência, a fração F12-18 apresentou três substancias fluorescentes, que puderam ser reveladas pelo reagente de Dragendorff, indicando que são possíveis alcaloides.

REFERÊNCIAS

AGRAWAL, R.C. & BEOHAR, T. Chemopreventive and anticarcinogenic effects of *Momordica charantia* extract. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention** v. 11, n.2, p. 371-375, 2010.

AKTER, K., BARNES, E.C., LOA-KUM-CHEUNG, W.L., YIN, P., BROPHY, J.J., BARROW, R.A., IMCHEN, I., CEMULPAD, S.R., JAMIE, J.F. Antimicrobial and antioxidant activity and chemical characterization of *Erythrina stricta* Roxb. (Fabaceae). **Journal Ethnopharmacology**. v. 185, p. 171-181, 2016.

ALVES, E.A. & GUIMARÃES A.C.R. Cultivo Celular. In: MOLINARO, E.M.; CAPUTO, L.F.G.; AMENDOEIRA, M.R.R. (orgs). Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde. Vol. 2 Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, p. 215-253, 2010.

ARORA, M. Cell culture media: A review. **Materials and Methods**. V. 3, p. 175, 2013.

BAJPAI, M., PANDE, A., TEWARI, S.K., PRAKASH, D. Phenolic contents and antioxidant activity of some food and medicinal plants. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**. V. 56, n. 4, p. 287-291, 2005.

BASCH, E., GABARDI, S., ULBRICHT, C. Bitter melon (*Momordica charantia*): A review of efficacy and safety. **American Journal of Health-System Pharmacists**. V.60, p. 356-359, 2003.

BAUER, A.W., KIRBY, W.M., SHERRIS, J.C., TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**. v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

BENEVIDES, P.J.C, YOUNG, M.C.M, GIESBRECHT, A.M., ROQUE, N.F., BOLZANI, V.S. Antifungal polysulphides from *Petiveria alliacea* L. **Journal of Phytochemistry**. V.57, p. 743-747, 2001.

BRANCO, F.S.C., SILVA, B.V., DO RIO, G.F., LIÃO L.M. Ressonância magnética nuclear de substâncias organofluoradas: um desafio no ensino de espectroscopia. **Química Nova**. v. 33, n. 1, p. 48-51, 2010.

BUDRAT, P. & SHOTIPRUK, A. Extraction of phenolic compounds from fruits of bitter melon (*Momordica charantia*) with subcritical water extraction and antioxidant activities of these extracts. **Chiang Mei Journal of Science**. V. 35, n. 1, p. 123-130, 2008.

CASLA, S., HOJMAN, P., MÁRQUEZ-RODAS, I., LÓPEZ-TAURUELLA, S., JEREZ, Y., BARAKTA, R., MARTÍN, M. Running away from side effects: physical

exercise as a complementary intervention for breast cancer patients. **Clinical Translational Oncology**. V. 17, n. 3, p. 180-196, 2014.

CHEN, Y., MIAO, Y., HUANG, L., JUXIANG, L. HAIYAN, S., YUANZEG, S., JING, Y., WENKE, Z. Antioxidant activities of saponins extracted from *Radix Trichosanthis*: an in vivo and in vitro evaluation. **BMC Complementary Alternative Medicine**. V. 14, n. 1, p. 86, 2014.

COELHO, P.L.C., FREITAS, V.D.S.R., PITANGA, B.P.S., SILVA, V.D.A., OLIVEIRA, M.N., GRANGEIRO, M.S., SOUZA, C.S., EL-BACHÁ, R.S., COSTA, M.F.D., BARBOSA, R.R., NASCIMENTO, I.L.O., COSTA, S.L. Flavonoids from the Brazilian plant *Croton betulaster* inhibit the growth of human glioblastoma cells and induce apoptosis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 26, n. 1, p. 34-43, 2016.

COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. Fundamentos de cromatografia. Vol. 5. 2014.

COLNAGO, L.A., ALMEIDA, F.C.L., VALENTE, P. Espectrometria de Massa e RMN Multidimensional e Multinuclear: Revolução no Estudo de Macromoléculas Biológicas. **Química Nova na Escola**. V. 16, p. 9-14, 2002.

COUTINHO, H.D.M, COSTA, J.G.M., LIMA, E.O., FALCÃO-SILVA, V.S., SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P. In vitro interference of *Momordica charantia* in the resistance to aminoglycosides. **Journal of Pharmaceutical Biology**. V. 47, n. 11, p. 1056-1059, 2009.

DEGANI, A.L., CASS, Q.B., VIEIRA, P.C. Cromatografia um breve ensaio. **Química Nova na Escola**. V. 7, p. 21-25, 1998.

DI STASI, L.C., HIRUMA-LIMA, C.A. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. São Paulo: Editora UNESP, p.323-330, 2002.

DIWANAY, S., CHITRE, D., PATWARDHAN, B. Immunoprotection by botanical drugs in cancer chemotherapy. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 90, n. 1, p. 49-55, 2004.

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

EKUNDAYO, E.O. & EZEUGU, L.I. Evaluation of antimicrobial activities of extracts of five plants used in traditional medicina in Nigeria. **International Journal of Tropical Medicine**. V. 1, n. 2, p. 93-96, 2006.

FANG, E.F., ZHANG, C.Z.Y., NG, T.B., WONG, J.H., PAN, W.L., YE, X.J., CHANG, Y.S., FONG, W.P. *Momordica charantia* lectin, a type II ribosome inactivating protein, exhibits antitumor activity toward human nasopharyngeal carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. **Cancer Precention Research**. V. 5, n. 1, p. 109-121, 2011.

FUCHS-TARLOVSKY, V. Role of antioxidants in cancer therapy. **Journal Nutrition**. V. 29, n. 1, p. 15-21, 2013

GARCEZ, F.R., GARCEZ, W.S., HAMERSKI, L., MIGUITA, C.H. Fenilpropanóides e outros constituintes bioativos de *Nectandra megapotamica*. **Química Nova**. V. 32, n. 2, p. 407-411, 2009.

GOBBO-NETO, L. & LOPES, N.P. Plantas Medicinais: Fatores De Influência No Conteúdo De Metabólitos Secundários Fatores Que Influenciam O Conteúdo De Metabólitos Secundários. **Química Nova**. V. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOMES P.B., NORONHA, E.C., MELO, C.T.V., BEZERRA, J.N.S., NETO, M.A., LINO, C.S., VASCONCCELOS, S.M.M., VIANA, G.S.B. SOUSA, F.C.F. Central effects of isolated fractions from the root of *Petiveria alliacea* L. (tipi) in mice. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 120, p.209-210, 2008.

GRAHAME, H.D. AMPK: A target for drugs and natural products with effects on both diabetes and cancer. **Journal of Diabetes**. V. 62, n. 7, p. 2164-2172, 2013.

GROVER, J.K. & YADAV, S.P. Pharmacological actions and potential uses of *Mormodica charantia*: a review. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 93, p. 123-132, 2004.

GUARATINI, T., SILVA, D.B., BIZARO, A.C., SARTORI, L.R., HUMPF, H., LOPES, N.P., COSTA-LOTUFO, L.V., LOPES, J.L.C. In vitro metabolismo studeis of Erythraline, the major spiroalkaloid from *Erythrina verna*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. V. 14, n.61, p. 1-5, 2014.

GUEDES, R.C.M., NOGUEIRA, N.G.P., FUSCO-ALMEIDA, A.M., SOUZA, C.R.F., OLIVEIRA, W.P. Atividade antimicrobiana de extratos brutos de *Petiveria alliacea* L. **Latin American Jornal of Pharmacy**. V. 28, n.4, p. 520-524, 2009.

HANAHAN, D., WEINBERG, R.A. Review Hallmarks of Cancer : The Next Generation. **Cell**. V. 144, n.5, p. 646-674, 2011.

HATAMI, T., EMAMI, S.A., MIRAGHAEI, S.S., MOJARRAB, M. Total Phenolic Contents and Antioxidant Activities of Different Extracts and Fractions from the Aerial Parts of *Artemisia biennis* Willd. **Iran Journal Pharmaceutical Research**. V.13, n. 2, p. 551-559, 2014.

HAWTHORNE, S.B., GRABANSKI, C.B., MARTIN, E., MILLER, D.J. Comparisons of Soxhlet extraction, pressurized liquid extraction, supercritical fluid extraction and subcritical water extraction for environmental solids : recovery, selectivity and effects on sample matrix. **Journal of Chromatography A**. V. 892, p. 421-433, 2000.

HORAX, R., HETTIARACHCHY, N., ISLAM, S. Total phenolic contents and phenolic acid constituents in 4 varieties of bitter melons (*Momordica charantia*) and antioxidant activities of their extracts. **Journal of Food Science**. V. 70, n. 4, p. 275-280, 2005.

HORAX, R., HETTIARACHCHY, N., CHEN, P. Extraction, Quantification, and Antioxidant Activities of Phenolics from Pericarp and Seeds of Bitter Melons (*Momordica charantia*) Harvested at Three Maturity Stages (Immature, Mature, and Ripe). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V. 58, n. 7, p. 4428-4433, 2010.

HUSSAIN, M.M., TUHIN, T.H., AKTER, F, RASHID, M.A. Constituents of *Erythrina* – a potential source of secondary metabolites: a review. **Blangladesh Pharmaceutical Journal**. V. 19, n. 2, p. 237-253, 2016.

JUMA, B.F. & MAJINDA, R.R.T. *Erythraline* alkaloids from the flowers and pods of *Erythrina lysistemon* and their DPPH radical scavenging properties. **Phytochemistry**. V. 65, n. 10, p. 1397-1404, 2004.

JUNQUEIRA, L.C. & CARNEIRO, J. *Biologia Celular E Molecular*. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan LTDA; 2012.

KIM, E.Y., BAIK, I.H., KIM, J.H., KIM, S.R., RHYU, M.R. Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. **Korean Journal of Food Science and Technology**. V. 36, n.2, p. 333-338, 2004.

KRAWINKEL, M. B. & KEDING, G. B. Bitter Gourd (*Momordica charantia*): A dietary approach to hyperglycemia. **Nutrition Reviews**. V. 64, n. 7, p. 331-337, 2006.

KUBOLA, J. & SIRIAMORNUN, S. Phenolic contents and antioxidant activities of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) Leaf, stem and fruit fraction extracts in vitro. **Food Chemistry**. V. 110, n. 4, p. 881-890, 2008.

KUBEC, R. & MUSAH, R.A. Cysteine sulfoxide derivatives in *Petiveria alliacea*. **Journal of Phytochemistry**. V.58, p. 981-985, 2001.

KUBEC, R., KIM, S., MUSAH, R.A. The lachrymatory principle of *Petiveria alliacea*. **Journal of Phytochemistry**. V.63, p. 37-40, 2003.

Gilbert, B. & Favoreto, R. *Erythrina* sp. Fabaceae (Leguminosae, Faboideae). **Revista Fitos**. V. 7, n. 3, p. 185-197, 2012.

LI, A.N., LI, S., LI, H.B., XU, D.P., XU, X.R., CHEN, F. Total phenolic contents and antioxidant capacities of 51 edible and wild flowers. **Journal of Functional Foods**. v. 6, n. 1, p. 319-330, 2014.

LOWE, H.I.C., TOYANG, N.J., HEREDIA, A., AYEAH, K.N.N., WATSON, C.T., BRYANT, J. *Petiveria alliacea* L (guinea hen weed) and its major metabolite dibenzyl trisulfide demonstrate HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity. **European Journal of Medicinal Plants**. V. 53, n. 1, p. 88-94, 2015.

MARCHIORO, M., BLANK, M.F.A., MOURÃO, R.H.V., ANTONIOLLI, A.R. Anti-noceptive activity of the aqueous extract of *Erythrina velutina* leaves. **Journal of fitoterapia**. V.76, p. 637-642, 2005.

MASTERS, J.R. HeLa cells 50 years on : the good, the bad and the ugly. **Nature Reviews Cancer**. V. 2, n.4, p. 5-9, 2002.

MAYER, E.L. Early and late long-term effects of adjuvant chemotherapy. **American Society of Clinical Oncology Educational Book**. p. 9-14, 2013.

MENA-REJON, G., CAAMAL-FUENTES, E., CANTILLO-CIAU, Z., CEDILLO-RIVERA, R., FLORES-GUIDO, J., MOO-PUC, R. In vitro cytotoxic activity of nine plants used in Mayan traditional medicine. **Journal Ethnopharmacology**. v.121, n. 3, p. 462-465, 2009.

MERLUGO, L., SANTOS, M.C., SANT'ANNA, L.S., CORDEIRO, E.W.F., BATISTA, L.A.C., MIOTTO, S.T.S., GARCIA, C.V., MOREIRA, C.M., MENDEZ, A.S.L. Alkaloids in *Erythrina* by UPLC-ESI-MS and In Vivo Hypotensive Potential of Extractive Preparations. **Evidence-Based Complement Alternative Medicine**. V. 2015, p. 1-12, 2015.

MONDAL, S., BANDYOPADHYAY, S., GHOSH, M.K., MUKHOPADHYAY, S., ROY, S., MANDAL, C. Natural products: promising resources for cancer drug discovery. **Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry**. V. 12, n. 1, p. 49-75, 2012.

MWAMBETE, K.D. The *in vitro* antimicrobial activity of fruit and leaf crude extracts of *Mormodica charantia*: A Tanzania medicinal plant. **African Health Sciences**. V. 9, n. 1, p. 34-39, 2009.

PACHECO, A.O., MORÁN, J.M., GIRO, Z.G., RODRÍGUEZ, A.H., MUJAWIMANA, R.J., GONZÁLEZ, K.T., FRÓMETA S.S. In vitro antimicrobial activity of total extracts of the leaves of *Petiveria alliacea* L. (Anamu). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. V. 49, n.2, p. 241-250, 2013.

PAIVA, D.L., LAMPMAN, G.M., KRIZ, G.S., VYVYAN, J.R. *Introdução à espectroscopia*. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PATRICIA. S., VÁSQUEZ, F., MENDONÇA, M.S., NODA, N. Etnobotânica de plantas medicinais em comunidades ribeirinhas do Município de Manacapuru, Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**. V. 44, n. 4, p. 457-472, 2014.

PÉREZ-LEAL, R., GARCÍA-MATEOS, M.R., MARTÍNES-VÁSQUEZ, M., SOTO-HERNÁNDEZ, M. Actividad citotóxica y antioxidante de *Petiveria alliacea* L. **Revista Chapingo Serie Horticultura**. V. 12, n. 1, p. 51-56, 2006.

PITCHAKARN, P., OGAWA, K., SUZUKI, S., TAKAHASHI, S., ASAMATO, M., CHEWONARIN, T., LIMTRAKUL, P., SHIRAI, T. *Momordica charantia* leaf extract suppresses rat prostate cancer progression *in vitro* and *in vivo*. **Cancer Science**. V. 10, n. 10, p. 2234-2240, 2010.

RAY, R.B., RAYCHOUDHURI, A., STEELE, R., NERURKAR, P. Bitter melon (*Momordica charantia*) extract inhibits breast cancer cell proliferation by modulating cell cycle regulatory genes and promotes apoptosis. **Cancer Research**. V. 70, n. 5, p. 1925-1931, 2010.

ROCHA, L.D., MARANHO, L.T., PREUSSLER, H.K. Organização estrutural do caule e lâmina foliar de *Petiveria alliacea* L., Phytolaccaceae. **Revista Brasileira Farmacologia**. V.87, n.3, p 98-101, 2006.

ROOPASHREE, T.S., RAMAN, D., SHOBHA RANI, R.H., NARENDRA, C. Antibacterial activity of antipsoriatic herbs: *Cassia tora*, *Momordica charantia* and *Calendula officinalis*. **International Journal of Applied Research in Natural Products**. V. 1, n. 3, p, 20-28, 2008.

RUFFA, M.J., FERRARO, G., WAGNER, M.L., CALCAGNO, M.L., CAMPOS, R.H., CAVALLARO, L. Cytotoxic effect of argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 79, n. 3, p. 335-339, 2002.

SALEEM, A., HUSHEEM, M., HÄRKÖNEN, P., PIHLAJA, K. Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *Terminalia chebularetz*. fruit. **Journal of Ethnopharmacol**. V. 81, n. 3, p. 327-336, 2002.

SANTOS, K.K.A., MATIAS, E.F.F., SOBRAL-SOUZA, C.E., TINTINO, S.R., MORAIS-BRAGA, M.F.B., GUEDES, G.M.M., SANTOS, F.A.V., SOUSA, A.C.A. ROLÓN, M., VEJA, C., ARIAS, A.R., COSTA, J.G.M., MENEZES, I.R.A., COUTINHO, H.D.M. Trypanocide, citotoxic and antifungal activities of *Mormodica charantia*. **Jornal of Pharmaceutical Biology**. V.50, n. 2, p. 162-166, 2012.

SCHLEIER, R., QUIRINO, C.S., RAHME, S. *Erythrina* mulungu – descrição botânica e indicações clínicas a partir da antroposofia. **Arte Médica Ampliada**. V. 36, n. 4, p. 162-167, 2016.

SEN, T., SAMANTA, S.K. Medicinal plants, human health and biodiversity: A broad review. **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology**. V. 147, n. 59-110, 2014.

SILVA, J.G., SOUZA, I.A., HIGINO, J.S., SIQUEIRA-JUNIOR, J., PEREIRA, J.V., PEREIRA, M.S.V. Artigo Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V. 17, n. 4, p. 572-577, 2007.

SILVERSTEEN, R.M., WEBSTER, F.X., KIERNLE, D.J. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. Vol. 7. 2006.

SIMON, H.U., HAJ-YEHIA, A., LEVI-SCHAFFER, F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. **Apoptosis**. V. 5, n. 5, p. 415-418, 2000.

SOUZA, V.C. & LORENZI, H. *Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III*. 3ª ed. Instituto Plantarum, **Nova Odessa**, São Paulo, 768p, 2012.

SOWNDHARARAJAN, K., JOSEPH, J.M., RAJENDRAKUMARAN, D. In vitro xanthine oxidase inhibitory activity of methanol extracts of *Erythrina indica* Lam. leaves and stem bark. **Asian Pac J Trop Biomed**. V. 2, n. 3 SUPPLEMENT, p. S1415-S1417, 2012.

STANKOVIC, S.M. Total Phenolic Content, Flavonoid Concentration and Antioxidant Activity of Marrubium peregrinum L. Extracts. **Kragujevac Journal of Science**. V.33, p. 63- 72, 2011

STARMANS, I.D.A.J., NIJHUIS, H.H. Metabolites from plant material : A review. **Trends in Food Science & Technology**. V. 7, n. 6, p. 191-197, 1996.

URUEÑA, C., CIFUENTES, C., CASTAÑEDA, D., ARANGO, A., KAUR, P., ASEA, A., FIORENTINO, S. *Petiveria alliacea* extracts uses multiple mechanisms to inhibit growth of human and mouse tumoral cells. **BMC complementary and Alternative Medicine**. V. 8, n.60, p. 1-17, 2008.

VASCONCELOS, S.M.M., LIMA, N.M., SALES, G.T.M., CUNHA, G.M.A, AGUIAR, L.M.V, SILVEIRA, E.R., RODRIGUES, A.C.P., MACEDO, D.S., FONTELES, M.M.F., SOUSA, F.C.F., VIANA, G.S.B. Anticolvulsant activity of hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu*. **Journal of Ethnopharmacology**. V.110, p.271-274, 2007

VIRTUOSO, S., DAVET, A., DIAS, J.F.G., CUNICO, M.M., MIGUEL, M.D., OLIVEIRA, A.B., MIGUEL, O.G. Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae (Leguminosae). **Revista Brasileira Farmacognosia**. V. 15, n. 2, p. 137-142, 2005.

WENG, J.R., BAI, L.Y., CHIU, C.F., HU, J.L., CHIU, S.J. WU, C.Y. Cucurbitane triterpenoid from *Momordica charantia* induces apoptosis and autophagy in breast cancer cells, in part, through peroxisome proliferator-activated receptor γ activation. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**. V. 2013, p. 1-12, 2013.

WILLIAMS, L.A.D., ROSNER, H., LEVY, H.G., BARTON, E.N. A critical review of the therapeutic potential of dibenzyl trisulphide isolated from *Petiveria alliacea* L (Guinea hen weed, anamu). **West Indian Medical Journal**. V. 56, n. 1, p. 17-21, 2007

YENESEW, A., DERESE, S., MIDIWO, J.O., BII, C.C., HEYDENREICH, M., PETER, M.G. Antimicrobial flavonoids from the steam bark of *Erythrina burttii*. **Fitoterapia**. V. 76, n. 5, p. 469-472, 2005.

ZAA, C., VALDIVIA, M., MARCELO, A. Efecto anti-inflamatório y antioxidante del extracto hidroalcohólico de *Petiveria alliacea*. **Revista Peruana de Biología**. v. 19, n. 3, p. 329-334, 2012.

ANEXOS A - TRABALHO APRESENTADO EM CONGRESSO

Trabalho apresentado no VII Simpósio Ibero-Americano de Plantas Medicinais e III Simpósio Ibero-Americano de Investigação em Câncer. Itajaí, SC, Brasil 24-27 de outubro 2016.

CYTOTOXIC STUDY OF *ERYTHRINA* MULUNGU, *PETIVERIA ALLIACEA* AND *MOMORDICA CHARANTIA*, MEDICINAL PLANTS, AGAINST HELA CELLS

Ferreira-Neto JP¹ , Cabral Filho PE¹ , Fontes A¹ , Yara R² , Lima CSA¹

Introduction: Natural chemotherapeutic agents have high specificity and low systemic toxicity when compared to synthetic ones. *Erythrina* mulungu (MLG), *Petiveria alliacea* (ATP) and *Momordica charantia* (MSC) are medicinal plants with high pharmacological importance, such as: tranquilizer/sedative, hypnotic/anesthetic and anticarcinogen. As cancer's resistance has been increasing, new drugs are needed to be studied. Objective: In this work, we evaluated cytotoxic activities of MLG, ATP and MSC extracts, and fractions, against HeLa cells, and compared them with the synthetic chemotherapeutic agent, the quercetin (QUE) **Material and Methods:** Plants were dried in stove (42 °C) and right after powdered, they were submitted to ethanolic (70% v/v) extraction. Then, an aliquot was used to perform polarity extraction (hexane [H], ethyl acetate [EA] and methanol [M]) under stirring for 24 h. HeLa cells were cultivated in DMEM medium with Fetal Bovine Serum and streptomycinpenicillin. The cytotoxicity was performed by MTT assay, for this, cells were plated, until reached 2x10⁴ cells/well. Extracts were dissolved in DMSO and diluted in DMEM and then the solution was applied to the cells in a serial dilution, until reaching concentrations from 100 µg.mL⁻¹ to 0.8 µg.mL⁻¹ and remained in a humidified incubator with 5% CO₂ at 37 °C for 72 h. After this time, it was added 20 µL/well of an MTT solution (5 mg.mL⁻¹), and after 4 h, the absorbance was measured at 595 nm. **Results and Discussion:** The data showed a relative cell viability of MLG – 15%, ATP – 69%, MSC - 32% and QUE - 42%. According to these results, MLG and MSC presented a high potential for inducing cell death. Fractions showed the relative cells viability for MLG of 13%-EA and 95%-M and for MSC of 35%-H, 65%-EA and 85%-M. Conclusion: *E. mulungu* e *M. charantia* presented a high cytotoxicity activity and the fractions which induced lower viability were MLG-EA and MSC-H. These results showed a potential perspective of new chemotherapeutic drugs derivate from medicinal plants.

Support and/or Acknowledgment: SUDENE; CNPq; CAPES and FACEPE

ANEXO B - TRABALHOS PUBLICADOS

Planta Med 2016; 82(S 01): S1-S381
DOI: 10.1055/s-0036-1596362

CHEMICAL EVALUATION AND MICROBIOLOGICAL ASSAYS OF MEDICINAL PLANTS USED IN TRADITIONAL COMMUNITIES IN NORTHEASTERN BRAZIL

JP Ferreira-Neto¹, RJSA Padilha¹, ERB Santana¹, DN Gomes¹, KXFR Sena², LPM Magalhães², R Yara³, CSA Lima¹

Abstract: Despite the influence of modern Western medicine and a lack of interest on the part of the population, the increased use of medicinal plants have been restored in Brazilian communities due to population socioeconomic factors, high costs and side effects of chemically synthesized drugs and the demand for healthier lifestyle [1]. It is necessary to create mechanisms that promote the sustainable development and prevent the predatory exploitation of local biodiversity [2]. In northeastern Brazil this popular knowledge of medicinal plants and its uses is accumulated over centuries, naturally as consequence of the great cultural diversity, including Brazilian Natives, “Quilombolas” (Africans that escaped from slavery and formed independent settlements) [3,4] and the European knowledge. The aim of this work is the phytochemical evaluation, chromatographic profile by GC-MS, flavonoids and phenol quantification, antioxidant activities (DPPH and Reducing power) and antimicrobial activity (diffusion disk methods) from 14 medicinal plants from 11 different botanical families. The phytochemical evaluation showed that steroids and phenolic compounds (flavonoids or coumarins) were detected in all species. The best results of flavonoid contents (Quercetin equivalent) were observed for *Plectranthus barbatus* and *Cymbopogon citratus* (63.37 ± 7.56 and $76.63 \pm 3.48 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) respectively. The phenol contents (Gallic acid equivalent) showed that *Anadenanthera colubrina* and *Syzygium cumini* presented highest quantities (299.78 ± 5.5 and $230.052 \pm 1.86 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), respectively. The two last plants presented the best antioxidant activity (95%-DPPH). All extracts exhibited activity against Gram positive and alcohol acid resistant bacteria and yeast. The *C. citratus* and *S. cumini* extracts presented a marked inhibition against *Staphylococcus aureus* (30 and 23 mm, respectively). This study may contribute to a better raw material quality on phytotherapies production process by the traditional communities.

Acknowledgements: To SUDENE for financial support, and CESAM, CEFOMP and CEPRANSC for provide all raw materials.

PERFIL QUÍMICO, MOLECULAR E ANTIMICROBIANO DA SOLIDAGO CHILENSIS MEYEN CULTIVADA NA REGIÃO METROPOLITANA DO RECIFE-PE

João Paulo Ferreira Neto¹; Brunna Fernanda Lira Patriota¹; Rodrigo Juan Martins Cardozo¹; Edson Renan Barros de Santana¹; Lucas Henrique Veloso de Santana¹; Marília Grasielly Farias Silva¹; Rafael Jorge Santos Aracati Padilha¹; Marcelo Alves Ramos²; Kêsia Xisto da Fonseca Ribeiro de Sena³; Ricardo Yara e Cláudia Sampaio Andrade Lima^{1*}

Resumo: *Solidago chilensis* Mayen (erva-lanceta) é utilizada no tratamento de ferimentos, inflamações, traumatismos e contusões. Para aferir qualidade à espécie vegetal utilizada na produção de fitoterápicos, realizou-se a prospecção fitoquímica, a caracterização molecular e a atividade antimicrobiana da *S. chilensis*. Foi realizada adicionalmente, a quantificação de flavonoides e fenóis totais, além da sua capacidade antioxidante. Para a caracterização molecular da espécie foi desenvolvido um protocolo para amplificação e clivagem do gene maturase K (*matK*). A atividade antimicrobiana foi obtida frente a representantes de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, Álcool-Ácido resistentes e Leveduras. Os resultados obtidos indicaram a presença de esteroides e fenóis. O teste de DPPH demonstrou que a *S. chilensis* possui atividade antioxidante de 67%. Os extratos da erva-lanceta apresentaram uma discreta atividade frente aos micro-organismos Gram-positivos. Esses resultados conferiram qualidade química, molecular e microbiológica à espécie utilizada como constituinte de fitoterápicos, produzidos em Laboratórios Comunitários na Região Metropolitana do Recife.

Palavras-Chave: *Solidago chilensis*, maturase K, atividade antioxidante e atividade antimicrobiana

Abstract: *Solidago chilensis* Mayen (erva-lanceta) is used in the treatment of wounds, inflammations, injuries and bruises. To measure quality to the plant species used in the production of herbal medicines, there was the phytochemical

screening, molecular characterization and antimicrobial activity of *S. chilensis*. Additionally, it was performed the quantification of flavonoids and phenolic compounds, and also its antioxidant capacity. The molecular characterization of the species was developed a protocol for amplification and cleavage of maturase gene K (*matK*). The antimicrobial activity was obtained against representatives of Gram-positive, Gram-negative, resistant alcohol-acid bacteria and yeasts. The results indicated the presence of steroids and phenols. The DPPH test showed that *S. chilensis* has antioxidant activity of 67%. The *S. chilensis* extracts showed a slight activity against the Gram-positive microorganisms. These results confirm the chemical, molecular and microbiological quality of this specie used as a constituent of herbal medicines produced in Community laboratories in the Metropolitan Region of Recife.

Keywords: *Solidago chilensis* Meyen, maturase K antioxidant activity and antimicrobial activity.

Introdução

A família Asteraceae é considerada uma das maiores famílias entre as angiospermas, com uma ampla variabilidade, principalmente na sua morfologia floral. São herbáceas, cosmopolitas, mas se adaptam melhor a climas temperados e semi-áridos. A *Solidago chilensis* Meyen (Figura 1), também conhecida como erva-lanceta, arnica, arnica-brasileira, arnica-do-campo e espiga-de-ouro, é uma espécie utilizada em formas de infusões pelas suas propriedades antisséptica, analgésica e anti-inflamatória (Assini *et al.* 2013). Suas aplicações são conhecidas desde o século XIII e a espécie é bastante empregada pela população no tratamento de condições inflamatórias. O poder medicinal da *S. chilensis* é atribuído às suas propriedades adstringente, sedativa, antiespasmódica, anti-hemorrágica e cicatrizante, além da sua ação no tratamento de contusões. Ademais, relatos na literatura atribuem à espécie a presença de compostos como flavonoides, terpenos e derivados (Schmeda-hirschmann *et al.* 2005).

A utilização frequente de plantas medicinais pertencentes a essa família, que possui grande diversidade de espécies com propriedades terapêuticas, pode, eventualmente, ocasionar riscos a população, principalmente pelo uso incorreto. Uma forma de conferir a autenticidade da espécie é a realização de análise molecular destas plantas ou de lotes utilizados na produção de fitoterápicos.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi traçar o perfil genético da espécie *Solidago chilensis* Mayen, utilizando o gene barcode da maturase K (mat K), associado à prospecção química, a quantificação de flavonoides e fenóis totais, além de avaliar a capacidade antioxidante e antimicrobiana desta espécie

Material e métodos

Coleta, preparação do material vegetal e obtenção do extrato hidroalcoólico: As folhas de *Solidago chilensis* Mayen foram coletadas no Centro de Saúde Alternativa da Muribeca (CESAM), estado de Pernambuco, Brasil em 07 de Janeiro de 2015. A planta foi identificada e tombada no Herbário Dárdano de Andrade Lima, do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) sob o número de identificação 90441. As amostras foram submetidas à secagem em estufa a 45°C com circulação forçada de ar. Após secas, foram trituradas a fim de obter o extrato. O pó seco foi embebido em uma solução etanol-água (7:3) e ao final de cada extração, o extrato fluido foi submetido à destilação à vácuo em evaporador rotativo a uma temperatura de 45°C e posteriormente colocado em dissecador até alcançar peso constante.

Prospecção Fitoquímica: Todas as análises foram baseadas na metodologia descrita por Matos (1997). Foram realizados testes fitoquímicos para a identificação qualitativa dos seguintes compostos: saponinas, esteróides, flavonóides, cumarinas, fenóis totais e taninos.

Para a determinação quantitativa (doseamento) de flavonoides, foi utilizada a metodologia proposta por Woisky e Salatino (1998) adaptada. O experimento consistiu em adicionar 1 mL do extrato hidro-alcoólico em tubos de ensaio (1 mg.mL⁻¹), adicionando-se aos tubos 1 mL de cloreto de alumínio (AlCl₃,

5%) (hexahidratado) diluído em metanol P.A. e acrescido de 2 mL de metanol. Para o experimento, foi preparado como controle negativo, 3 mL de metanol e 1 mL da mesma solução de cloreto de alumínio a 5%. A amostra permaneceu por 30 minutos em local protegido da luz e então procedeu-se a leitura em espectrofotômetro UV- -vis a 425nm. Foi utilizada, como padrão de flavonoide, a quercetina. A curva de calibração da quercetina foi estabelecida a partir das concentrações: 1000, 500 e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O cálculo do teor de flavonoides do extrato foi expresso em termos de equivalente de quercetina (mg de QUE/g de extrato).

A quantificação de compostos fenólicos (totais) em extratos de *Solidago chilensis* foi determinada utilizando-se o método espectrofotométrico (Singleton *et al.* 1999). A solução metanólica do extrato na concentração de 1 mg.mL^{-1} foi utilizada na análise. A mistura de reação foi preparada misturando-se 0,5 mL de solução metanólica de extrato com 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (10%) e 2,5 mL de NaHCO_3 a 7,5%. O branco foi preparado concomitantemente, à partir de 0,5 mL de metanol, 2,5 mL de reagente de 10% de Folin-Ciocalteu e 2,5 mL de 7,5% de NaHCO_3 . As amostras foram em seguida incubadas num banho termostatizado a 45°C durante 45 min. A absorbância foi determinada usando o espectrofotômetro de UV-Vis com a leitura do comprimento de onda a 765 nm (λ). As amostras (1000, 500, 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foram preparadas em triplicata para cada análise e o valor médio de absorbância foi obtido. O mesmo procedimento foi repetido para a solução padrão de ácido gálico e a curva de calibração foi determinada. Com base nas absorbâncias medidas, a concentração de compostos fenólicos foi calculada (mg.mL^{-1}). Em seguida, o conteúdo de compostos fenólicos presentes em extratos foi expresso em termos de equivalentes de ácido gálico (mg de GA/g de extrato) (Stankovic, 2011).

Avaliação da atividade antioxidante: A atividade antioxidante foi verificada através do teste de redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), que baseia-se na transferência de elétrons onde, por ação de um antioxidante (AH), a espécie radicalar, o DPPH, que possui cor púrpura, é reduzido formando

difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção na região de 515 nm. A partir dos resultados obtidos, determinou-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres (Nascimento *et al.* 2011). A partir do extrato etanólico foram preparadas soluções das amostras nas seguintes concentrações: 200, 100, 50, 25, 10, 5 e 1 µg.mL⁻¹. Um controle negativo foi feito pela adição de etanol e DPPH e o controle positivo foi feito pela adição de solução de um padrão (rutina) e DPPH. Adicionou-se a cada concentração de extrato etanólico uma solução de DPPH 300 µM, exceto nos brancos, onde foi adicionado o solvente. Após a adição do DPPH, esperou-se 40 minutos e procedeu-se a leitura no espectrofotômetro a 515 nm. A capacidade de eliminar o radical DPPH (percentual de atividade antioxidante) foi calculada utilizando-se a seguinte equação:

$$DPPH \% = \frac{(Abs\ controle\ Negativo - Abs\ amostra)}{Abs\ controle\ Negativo} \times 100$$

Para a obtenção da curva de calibração, preparou-se uma solução etanólica de DPPH a 300 µMol (120µg.mL⁻¹). Em seguida, foram preparadas diluições dessa solução para obtenção de diferentes concentrações 100, 80, 60, 40, 20, 10, 5 e 1 µg.mL⁻¹. Foram realizadas as leituras das absorbâncias das soluções, em triplicata, utilizando-se etanol como branco. Foi construída a curva padrão de DPPH plotando-se o valor médio das absorbâncias obtidas x concentração da solução.

Para a confirmação da atividade antioxidante, um outro teste realizado, conhecido como teste do poder redutor. Uma alíquota de 2,5mL do extrato nas concentrações de 200, 150, 100, 50, 25 e 12,5 mg.mL⁻¹ foram misturadas com 0,2M de tampão fosfato, adicionando-se 1,5mL de ferricianeto 1% (K₃Fe(CN)₆). Essa mistura foi incubada a 50°C em 20 min. Depois foi adicionado 2,5mL de ácido tricloroacético (10%) com 5mL da mistura. A mesma foi centrifugada em 3000g. Após esse processo, foram retirados 2,5mL do sobrenadante, aos quais foram adicionados 2,5 mL de água e 0,5 mL de cloreto férrico a 0,1 %. As

amostras foram analisadas pela absorvância a 700 nm. Trolox foi usado como controle positivo nas mesmas concentrações do extrato. (Jayanthi & Lalitha 2011, Ferreira *et al*, 2007).

Análise Molecular: O isolamento de DNA seguiu o protocolo de Doyle & Doyle (1987): 300 mg de material vegetal foram trituradas em almofariz na presença de N₂ e em seguida o material foi transferido para microtubos de 1,5 mL, contendo 650 µl de tampão de extração (2% CTAB, 1,4M NaCl, 20mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8,0). Após 60 min em banho-maria a 55 °C foi adicionado 650 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) misturado manualmente até ser formada uma emulsão e em seguida centrifugado por 5 min a 10000 g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, adicionando-se volume igual de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Na sequência, a fase aquosa superior foi transferida para um novo tubo de 2mL, com cuidado para não pipetar a interfase, foi adicionada 200 µl de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Em seguida a amostra foi centrifugada após suave homogeneização e centrifugação por 5 min a 10.000 g, para separação das fases, sendo essa etapa repetida mais duas vezes. Por fim, a fase superior foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL, foi adicionado um volume igual de isopropanol gelado, em seguida, foi centrifugada novamente por 5 min a 10.000 g. foi descartado o sobrenadante, e o precipitado lavado com 1 mL de etanol 70% gelado e deixado secar no dessecador. O DNA foi ressuspendido em 30 µL de tampão TE (TRIS, 0,5M EDTA 50 mM pH 8) e estocado a -20°C.

Para a amplificação, foram utilizados os pares de iniciadores matK-465F (5'-ACT AAT ACC CTA TCC TGT CCA T-3') e o matK-1483R (5'-CCA AAT ACC AAA TCC GWC CTC TA-3'), que foram projetados para amplificar aproximadamente 1000 pb da região matK do gene das plantas. Para os iniciadores matK- -465F e matK-1483R, foram utilizados 25 µl de reação para amplificação que continha Tampão de amplificação 1X, 2.5 mM MgCl₂, dNTPs 0.2 mM, os pares de iniciadores (0.5 µM cada), 1.25 U de TaqPolymerase e 1µL do DNA da amostra vegetal a ser estudada. A PCR foi realizada no termociclador (Applied Biosystems; California, USA) com o seguinte programa: um ciclo inicial de

2 min 95°C, seguido de 40 ciclos, cada ciclo com uma etapa de desnaturação (30 segundos a 95°C), uma fase de anelamento (45 segundos a 40°C), e uma fase de alongação (2 minutos a 72°C); e, por fim, uma etapa de alongação a 72°C por 5 min. A presença da amplificação foi verificada por eletroforese, na qual 5 µL do produto da PCR foram aplicados em gel de agarose a 1,0% em tampão sódio borato, utilizando como padrão marcador de peso molecular de 100pb. O gel foi corado com Sybr Safe e observado em um transiluminador de luz ultravioleta, e então fotografado.

O produto do gene *matK* amplificado foi clivado por enzimas de restrição TaqI, HaeIII, AfaI, MboI e AluI usando de 15 a 17 µL do produto de amplificação de acordo com o solicitado pelo protocolo da enzima. A verificação dos padrões de clivagem foi realizada em gel de poliacrilamida a 3,5% juntamente com peso molecular de 100pb. O gel foi corado com Sybr Safe e fotografado.

Avaliação da atividade antimicrobiana: Os micro-organismos testados pertencem à coleção de cultura do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco e foi avaliada a ação do extrato etanólico frente a *Staphylococcus aureus* (UFPEDA01); *Micrococcus luteus* (UFPEDA06); *Bacillus subtilis* (UFPEDA16); *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA39); *Mycobacterium smegmatis* (UFPEDA71); *Enterococcus faecalis* (UFPEDA138); *Escherichia coli* (UFPEDA224); *Candida albicans* (UFPEDA1007).

Discos de papel de filtro cortados em círculos com 6 mm de diâmetro foram embebidos com 20 µL da solução do extrato bruto em estudo e colocados sobre a superfície do meio Mueller-Hinton, X ou Sabouraud, previamente semeado com micro-organismos em placas de Petri. As placas foram colocadas em geladeira por 20 minutos (para início da difusão antes do crescimento de cada micro-organismo) e em seguida, incubadas a 35 °C durante 24 horas (bactérias) e 30 °C durante 24-48 horas (levedura). Os testes foram realizados em triplicata e os resultados, expressos em milímetros (mm) foram calculados pela média aritmética do diâmetro dos halos de inibição formado ao redor dos discos nas três repetições (Bauer *et al.* 1966). Como padrão, foi utilizado Cetoconazol (Neo-

Química) para leveduras e Kanamicina (Eurofarma) para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Chiappeta, *et al.*1983).

Resultados

Prospecção fitoquímica, atividade antioxidante e avaliação antimicrobiana: Os extratos etanólicos das folhas da erva-lanceta demonstraram um rendimento de 13% em relação ao material vegetal seco e apresentaram resultados positivos para os testes qualitativos de esteroides e fenóis. O doseamento de fenóis totais está expresso em equivalente de ácido gálico (Tabela 1), enquanto os resultados obtidos na quantificação de flavonoides foram expressos em equivalente quercetina (Tabela 2). Os resultados referentes à atividade antioxidante pela redução do radical DPPH e poder redutor encontram-se na Tabela 3. Os resultados obtidos para a avaliação da atividade antimicrobiana revelaram que os extratos da erva-lanceta apresentaram uma discreta atividade frente aos micro-organismos Gram positivos (Tabela 4). O método de difusão em disco permitiu aferir uma discreta atividade antimicrobiana do extrato de erva-lanceta frente a isolados clínicos, sendo o melhor resultado frente ao *Staphylococcus aureus* (halo de inibição de 13 mm).

Tabela 1: Resultado do doseamento de flavonóides de *S. chilensis*, expresso em mg QUE/g Ext.

Planta	1000µg/mL	500µg/mL	250µg/mL
Erva- Lanceta	76,531± 5,909	37,886± 2,934	17,535± 1,62

Tabela 2: Resultado do doseamento de fenóis de *S. chilensis*, expresso em equivalente de ácido gálico (mg de Ac Ga/g de Ext).

Planta	1000µg/mL	500µg/mL	250µg/mL
Erva- Lanceta	65,046 ± 7,884	25,946 ± 4,676	13,548 ± 1,256

Tabela 3: Atividade antioxidante e Poder redutor de *S. chilensis*

Teste	200 µg/L	150 µg/L	100 µg/L	50 µg/L	25 µg/L	12,5 µg/L
DPPH	67,03 %	56,67 %	34,92 %	28,86 %	24,61 %	22,08 %
Poder Redutor	15,82 ± 1,91	13,22 ± 1,37	6,91 ± 1,82	0,77 ± 0,86	0	0

Tabela 4: Atividade antimicrobiana de *S. chilensis*.

Amostra	Micro-organismos (Halos de inibição)							
	01	06	16	39	71	138	224	1007
Extrato de erva-lanceta	13	12	10	0	0	0	0	0
Cetoconazol	0	0	0	0	0	0	0	24
Kanamicina	23	28	14	20	40	13	15	0

Análise da região matK amplificada com os iniciadores matK-465F e matK1483F

A região matK foi amplificada usando o par de iniciadores matK-465F e o matK-1483R, que amplificaram aproximadamente 1 kb de fragmento da região matK do gene da planta. Para a eletroforese em 1,2% de agarose foram preparados em um parafilme 5 μ L de produto de PCR de cada amostra acrescidos de 2 μ L de Syber e 2 μ L de tampão de carregamento 6X, totalizando 9 μ L de solução para pôr em cada canaleta, como marcador de peso molecular foi usado o 1000-bp DNA ladder (Ludwig biotec) acrescidos de 2 μ L de Syber e 2 μ L de Tampão de Carregamento 6X. Após a eletroforese o gel foi observado em um transiluminador ultravioleta, e então fotografado (Figura 2).

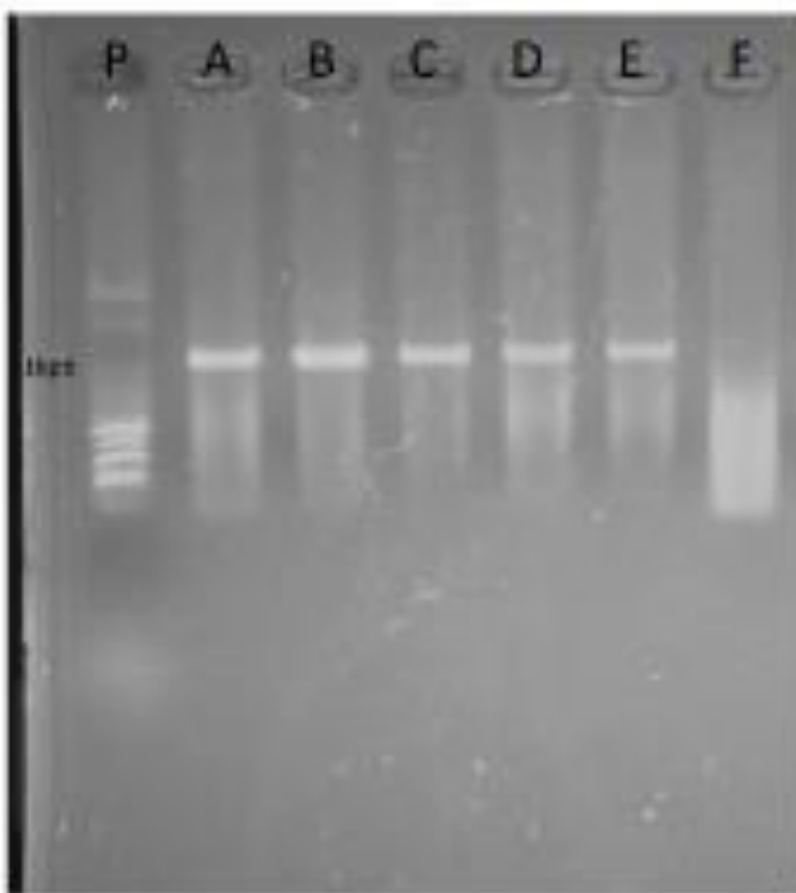


Figura 2. Amplificação da região matK com os primers matK-465F e matK-1483R. Linha P = Marcador de Peso Molecular de 1000-bp DNA ladder; Amostra A a F = *Solidago chilensis* extração de 150mg diluição 1/5; Amostra F = Controle Negativo.

As amostras de extração de 150 mg apresentaram bandas de aproximadamente 1K pb, essas amostras foram utilizadas para clivagem com as enzimas de restrição.

Clivagens

Para a enzima TaqI foi obtido o seguinte perfil eletroforético: Fragmentos um abaixo de 100pb, dois entre 100 e 200pb e 500pb. Para a enzima HaeIII foi obtido o seguinte perfil eletroforético: Fragmentos de 280pb e 750pb. Para a enzima AfaI foi obtido o seguinte perfil eletroforético: Fragmentos de 150pb, 350pb e 650pb. Para a enzima AluI não houve clivagem. Os resultados descritos encontram-se ilustrados na Figura 3.

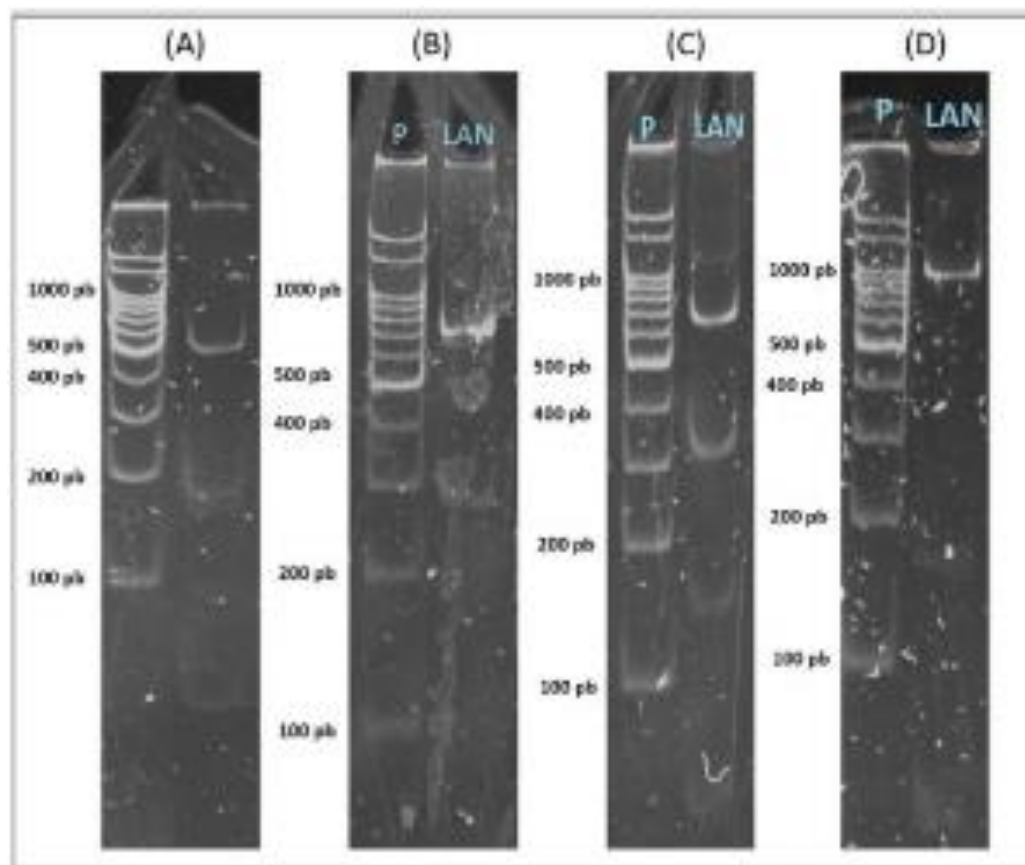


Figura 3. Perfis eletroforéticos da clivagem da *Solidago chilensis* com as enzimas: (A) TaqI com um fragmento abaixo de 100pb, dois entre 100 e 200pb e 500pb; (B) HaeIII com fragmentos de 280pb e 750pb; (C) AfaI com fragmentos de 150pb, 350pb e 650pb; (D) AluI não houve clivagem.

Discussão

A avaliação fitoquímica revelou a presença de compostos fenólicos, o que corrobora com o resultado do teste do DPPH para atividade antioxidante, tendo em vista a existência dados na literatura que atribuem essa propriedade a flavonoides ou taninos, que foram relatados anteriormente por Guntner e colaboradores (1999). Em relação à atividade frente a bactérias, os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com os publicados por Avancini e colaboradores (2008), que confirmaram a atividade da *S. chilensis* frente a *S. aureus*. A atividade de óleos essenciais da *S. chilensis* também já havia sido descrita frente a microrganismos, sendo ativos contra fungos filamentosos e leveduras (VILA *et al.*, 2002).

De forma geral, as plantas medicinais são amplamente usadas no tratamento de diversas patologias e o seu uso pela população, aumenta gradativamente. Torna-se necessário, portanto, o estabelecimento de técnicas que consigam conferir padrão de qualidade aos fitoterápicos produzidos em laboratórios comunitários e comercializados e distribuídos para a população do entorno desses laboratórios. Nesse sentido, técnicas moleculares, aliadas à técnicas químicas e microbiológicas, atuarão como uma ferramenta específica para a identificação/detecção das plantas e permitirão um melhor uso das mesmas, além de favorecer o controle de lotes utilizados na produção de fitoterápicos.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Superintendência do Desenvolvimento do Nordeste (SUDENE) pelo auxílio financeiro desta pesquisa. Todos os autores declaram não haver conflitos de interesse na publicação deste trabalho.

Referências Bibliográficas

Assini, F.L. 2013. Efeitos farmacológicos do extrato aquoso de *Solidago chilensis* Meyen em camundongos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 15: 130-134.

Avancini, C.; Wiest, J.M.; Dall'agnol, R.; Haas, J.S.; Von Poser, G.L. 2008. Antimicrobial Activity of Plants Used in the Prevention and Control of Bovine Mastitis in Southern Brazil. *Latin American Journal of Pharmacy* 27 (6): 894-9.

Bauer, A.W.; Kirby, M.N.; Sherris, J.C.; Turck, M.D. 1966. Antibiotics susceptibility test by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology* 45(4): 493-496.

Chiappeta, A.A.; Mello, J.F.; Maciel, G.M. 1983. *Revista do Instituto de Antibióticos*, 21: 43, 1982-1983.

Doyle, J.J.; Doyle, J.L. 1990. Isolation of plants DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13- 15.

Ferreira, I.C.F.R.; Baptista, P.; Villas-Boas, M.; Barros, L. 2007. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chemistry* 100: 1511–1516.

Garcia-Jacas, N.; Uysal, T.; Romashchenko, K.; Suárez-Santiago, V. N. Ertugrul, K. Susanna, A. 2006. *Centaurea* Revisited: a molecular survey of the *Jacea* Group. *Annals of Botany* 98(4): 741–753.

Guntner, C.; Barra, C.; Cesio, M.V.; Dellacassa, E.; Fernando, L.; Ferreira, F.; Garcia, C.; Gonzalez, G.; Heizen, H.; Lloret, A.; Lorenzo, D.; Menendez, P.; Paz, D.; Soule, S.; Vasquez, A.; Moyna, 1999. P. Antioxidant properties of *Solidago chilensis* L. Flavonoids. *Acta Horticulturae*, ISHS 501:159-163.

Jayanthi, P.; Lalitha, P. 2011. Reducing power of the solvent extracts of *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 3(3): 126-128.

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

Nascimento, J.C.; Lage, L.F.O.; Camargos, C.R.D.; Amaral, J.C.; Costa, L.M.; Sousa, A.N.; Oliveira, F.Q. 2011. Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonoides totais em extratos de folhas da *Bauhinia variegata* L. *Revista Brasileira de Farmácia*. 92(4): 327-332.

Schmeda-Hirschmann, G.; Jordan, M.; Gerth, A.; Wilken, D. Secondary metabolite content in rhizomes, callus cultures and in vitro regenerated plantlets of *Solidago chilensis*. *Zeitschrift für Naturforschung* 60(1-2): 5-10.

Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymology* 299: 152-178.

Vila, R.; Mundina, M.; Tomi, F.; Cañigüeral, S. 2002. Composition and Antifungal Activity of the Essential Oil of *Solidago chilensis*. *Planta Medica* 68 (2):164-7.

Woisky, R. G; Salatino, 1998. A. Analysis os propolis: some parameters ond prodecure for chemical fuality control. Journal of Apicultural Research 37(2): 99-105.