



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DAYVID BATISTA DA SILVA

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DE *Chloroleucon extortum*
BARNEBY & J. W. GRIMES (JUREMA BRANCA)**

Recife
2020

DAYVID BATISTA DA SILVA

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DE *Chloroleucon extortum*
BARNEBY & J. W. GRIMES (JUREMA BRANCA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas

Área de concentração: Fármacos e medicamentos

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim

Recife

2020

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-
1010

S586e Silva, Dayvid Batista da.

Estudo fitoquímico e avaliação citotóxica de *Chloroleucon extortum* Barneby & J. W. Grimes (jurema branca) / Dayvid Batista da Silva. – 2020.

53 f.: il.; quad.; 30 cm.

Orientadora: Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2020.

Inclui referências.

1. Células tumorais. 2. Fitoterapia. 3. Plantas medicinais. I. Amorim, Elba Lúcia Cavalcanti de (Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (20.ed.)

UFPE (CCS2020-200)

DAYVID BATISTA DA SILVA

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DE *Chloroleucon extortum*
BARNEBY & J. W. GRIMES (JUREMA BRANCA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 31/08/2020

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim (Presidente e Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Teresinha Gonçalves da Silva (Examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Valerium Thijian Nobre de Almeida e Castro (Examinador externo)
Universidade Federal de Pernambuco

À Deus e ao tempo, que me dão a oportunidade de sempre recomeçar!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao meu Deus, por ter me concedido esta oportunidade, reconhecendo que nada é meu e tudo é Dele e pra Ele.

Agradecer a minha querida mãe pela força e perseverança desde o início de minha vida, não esquecendo de suas orações que geraram frutos e hoje podemos colher o que com muitas lágrimas foi plantado.

Agradecer a minha vó Zefinha que mesmo passando por dificuldades de saúde me ajudou a entender com amor e carinho as dificuldades da vida.

Agradecer aos meus irmãos Rafaela e Deibson pelo apoio e pelas boas vibrações por cada etapa e objetivo alcançados.

Agradecer também a todos de minha parentela pela torcida e pela paciência.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Elba Lúcia Cavalcanti por todo o apoio, amizade e aprendizado compartilhado, também por me suportar mesmo sendo falho às vezes.

A Alexandre e a comunidade do Carão pelo auxílio na coleta das plantas.

Aos meus amigos do Laboratório de Produtos Naturais (LAPRONAT), Patrícia Neri, Jeniffer, Décio, Kivia, Bruno, Iza, Jorge, João Victor, as minhas amigas de mestrado que levarei dentro do meu coração Juliana Vital e Ana Klarissa. Sem me esquecer de Branca que me acompanhou em muitos momentos.

Aos meus amigos fora do laboratório que torceram por mim e me ajudaram a superar alguns medos da pós-graduação.

Agradecer a minha amiga de vida Arisa Santos, pelas risadas e pelos memes para manter a calma e a paz nos momentos difíceis.

Agradecer a Prof^a Dr^a Teresinha bem como a doutoranda Elizabeth que me ajudaram com todos os testes biológicos, gratidão!

À Universidade Federal de Pernambuco, em especial ao Programa de Ciências Farmacêuticas e todas as pessoas que o compõem.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro concedido.

E a todos que contribuíram de forma direta ou indireta nessa conquista.

RESUMO

A preocupação com a cura de doenças sempre se fez presente ao longo da história da humanidade, e nesse contexto, as espécies vegetais são usadas tanto como medicamento como alimento. Devido a ampla utilização de plantas medicinais e seus derivados no cotidiano da população mundial, o aperfeiçoamento de métodos de extrativos é de grande importância, uma vez que tais técnicas podem aumentar o rendimento de seus derivados e diminuir o risco de contaminação por solventes. Com vista nisso, o presente trabalho tem como objetivo realizar uma análise farmacognóstica de extratos de *Chloroleucon extortum* Barneby & J. W. Grimes obtidos por diferentes técnicas e avaliar a atividade antioxidante e citotóxica dessa espécie. As frações foram obtidas pelo método de extração fracionada e coluna filtrante, utilizando diferentes solventes como hexano, acetato de etila e metanol. Para a avaliação da atividade citotóxica foi utilizado a técnica de coloração pelobormeto de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) com algumas modificações. As linhagens utilizadas foram: HCT-116 (câncer de colorretal humano), HL-60 (leucemia promielocítica aguda), HeLa (câncer cervical humano) e NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano) e PBMC (células mononucleares do sangue periférico humano). Os diferentes métodos extrativos utilizados para obtenção dos extratos de casca e folhas de *C. extortum* influenciaram no rendimento, sendo os extratos obtidos por maceração com solvente metanol com melhores rendimentos, para casca 7,87% na técnica de extração fracionada e 8,15% na técnica de coluna filtrante já para folha (9,63% na técnica de extração fracionada, 3,51% na técnica de coluna filtrante, respectivamente). O extrato bruto da casca da espécie estudada (JB1) demonstrou atividade citotóxica moderada com um percentual de inibição em torno de $65,50 \pm 1,78$ e de $65,53 \pm 3,13$ frente a linhagem de câncer de colorretal e leucemia promielocítica aguda, respectivamente. Os produtos JB2, JB6, JB10 testados na concentração de 50 µg/mL inibiram 50% da proliferação celular para pelo menos em uma das linhagens cancerígenas submetidas ao estudo, enquanto que as frações JB1, JB6 e JB10 apresentaram potencial de inibição frente a células HL-60 ($65,56 \pm 3,13$; $65,56 \pm 3,135$; $51,64 \pm 1,12$, respectivamente). O percentual de inibição de crescimento das células PBMCs tratadas com os extrativos de *C. extortum* variou entre $17,04 \pm 0,88$ e $38,66 \pm 1,81$ para todas as linhagens, evidenciando seletividade para as células tumorais. Por meio da presente pesquisa foi possível obter informações relevantes acerca da presença de metabolitos secundários presentes na *C. extortum*, além disso, o estudo de citotoxicidade evidenciou que os extratos da espécie não foi citotóxico para a linhagem de células normais e que as principais linhagens

cancerígenas que tiveram seu crescimento inibidos foram a HCT-116, HL-60 e HeLa. Estes resultados evidenciam a importância de uma investigação preliminar dos extratos de plantas utilizadas na medicina popular, bem como a dose e a forma com que estes extratos são utilizados pela população necessitam de investigações científicas.

Palavras-chave: Células tumorais. Fitoterapia. Plantas medicinais.

ABSTRACT

The concern with curing diseases has always been present throughout human history, and in this context, plant species are used both as medicine and food. Due to the wide use of medicinal plants and their derivatives in the daily life of the world population, the improvement of extractive methods is of great importance, since such techniques can increase the yield of their derivatives and decrease the risk of contamination by solvents. With this in mind, the present work aims to perform a pharmacognostic analysis of *Chloroleucon extortum* Barneby & J. W. Grimes extracts obtained by different techniques and to evaluate the antioxidant and cytotoxic activity of this species. The fractions were obtained by the fractional extraction method and filter column, using different solvents such as hexane, ethyl acetate and methanol. For the evaluation of cytotoxic activity, the 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium (MTT) staining technique was used with some modifications. The strains used were: HCT-116 (human colorectal cancer), HL-60 (acute promyelocytic leukemia), HeLa (human cervical cancer) and NCI-H292 (mucoepidermoid carcinoma of human lung) and PBMC (mononuclear cells in human peripheral blood). The different extractive methods used to obtain the bark and leaves extracts of *C. extortum* influenced the yield, with the extracts obtained by maceration with methanol solvent with better yields, for bark 7.87% in the fractional extraction technique and 8.15% in filter column technique already for leaf (9.63% in the fractional extraction technique, 3.51% in the filter column technique, respectively). The crude extract of the bark of the species studied (JB1) showed moderate cytotoxic activity with a percentage of inhibition in around 65.50 ± 1.78 and 65.53 ± 3.13 against the line of colorectal cancer and acute promyelocytic leukemia, respectively. The products JB2, JB6, JB10 tested at a concentration of $50 \mu\text{g} / \text{mL}$ inhibited 50% of cell proliferation for at least one of the cancerous strains submitted to the study, while fractions JB1, JB6 and JB10 showed inhibition potential against HL-60 cells (65.56 ± 3.13 ; 65.56 ± 3.135 ; 51 , 64 ± 1.12 , respectively mind). The percentage of growth inhibition of PBMCs cells treated with the extracts of *C. extortum* varied between 17.04 ± 0.88 and 38.66 ± 1.81 for all strains, showing selectivity for tumor cells. Through this research it was possible to obtain relevant information about the presence of secondary metabolites present in *C. extortum*, in addition, the cytotoxicity study showed that the extracts of the species were not cytotoxic to the normal cell line and that the main lines carcinogens that had their growth inhibited were HCT-116, HL-60 and HeLa. These results show the importance of a

preliminary investigation of plant extracts used in popular medicine, as well as the dose and the way in which these extracts are used by the population, require scientific investigations.

Keywords: Tumor cells. Phytotherapy. Plants medicinal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição geográfica da Caatinga no Brasil.....	19
Figura 2 – Imagem característica das espécies da Caatinga.....	20
Figura 3 – Representação da diversidade de plantas da família <i>Fabaceae</i>	22
Figura 4 – <i>Chloroleucon extortum</i> Barneby & J. W. Grimes (Jurema Branca).....	24
Figura 5 – Redução do MTT por enzimas mitocondriais.....	27
Figura 6 – Brasil – Pernambuco – Altinho.....	29
Figura 7 – Placa Cromatográfica para presença de cumarinas nos extratos de casca de <i>Chloroleucon extortum</i>	37
Figura 8 – Percentual de inibição dos extratos de Jurema Branca testados em células tumorais.....	43

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Sistemas de eluição, padrões e reveladores utilizados para evidenciar a presença dos compostos fenólicos.....	31
Quadro 2 –	Rendimento em porcentagem a partir dos extratos obtidos da casca e da folha de <i>Chloroleucon extortum</i> (Jurema Branca).	35
Quadro 3 –	Análise Química dos extratos de cascas e folhas de <i>Chloroleucon extortum</i> (Jurema Branca) obtidos por diferentes métodos extrativos.....	37
Quadro 4 –	Teores (mg/g) de fenóis totais, taninos, flavonoides e cumarinas, expressos em média \pm desvio padrão/ concentração, dos extratos obtidos a partir das cascas de <i>Chloroleucon extortum</i> Barneby J. W. Grimes (Jurema Branca) por diferentes métodos extrativos.....	38
Quadro 5 –	Teores (mg/g) de fenóis totais, taninos, flavonoides e cumarinas, expressos em média \pm desvio padrão/ concentração, dos extratos obtidos a partir das folhas de <i>Chloroleucon extortum</i> Barneby J. W. Grimes (Jurema Branca) por diferentes métodos extrativos.....	39
Quadro 6 –	Percentual de inibição do crescimento celular (IC %) dos extratos de Jurema Branca em linhagens de células normais e tumorais na concentração de 50 μ g/ml através do método colorimétrico MTT após 72 horas de tratamento.	43

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1	PLANTAS MEDICINAIS.....	16
2.2	CAATINGA.....	18
2.3	ESPÉCIE <i>Chloroleucon extortum</i>	21
2.3.1	Família.....	21
2.3.2	Gênero e espécie.....	23
2.4	MÉTODO EXTRATIVO-MACERAÇÃO.....	24
2.5	CITOTOXICIDADE.....	25
2.5.1	Ensaio do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio).....	26
3	OBJETIVOS.....	28
3.1	OBJETIVO GERAL.....	28
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
4	METODOLOGIA.....	29
4.1	COLETA DO MATERIAL VEGETAL.....	29
4.2	PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS.....	29
4.3	MÉTODOS DE FRACIONAMENTO.....	30
4.4	PROSPECÇÃO DOS CONSTITUINTES FITOQUÍMICOS.....	30
4.4.1	Determinação do conteúdo fenólico total.....	31
4.4.2	Determinação do conteúdo de taninos.....	32
4.4.3	Determinação do conteúdo de flavonóides.....	32
4.4.4	Determinação do conteúdo de cumarinas.....	33
4.5	CITOTOXICIDADE.....	33
4.5.1	Método de análise de resultado.....	34
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1	ANÁLISE DE RENDIMENTOS.....	35
5.2	FITOQUÍMICA.....	36
5.3	CITOTOXICIDADE.....	42
6	CONCLUSÃO.....	45

1 INTRODUÇÃO

O uso das plantas medicinais é uma prática antiga, onde o homem tenta trazer através do seu conhecimento, soluções para a cura de algumas doenças/enfermidades através dos recursos naturais. Esse conhecimento simboliza, muitas vezes, o único recurso terapêutico de muitas comunidades ou grupos étnicos (CARVALHO, 2004). A contribuição da observação populacional é bem relevante perante o uso dessas plantas, pois, há uma grande divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais prescritos diariamente, apesar de terem seus constituintes químicos desconhecidos (MACIEL *et al*, 2002).

No Brasil e em outros países, a busca e desenvolvimento de novos fármacos a partir de produtos naturais tem crescido e vários estudos têm sido realizados com o intuito de comprovar suas atividades, esclarecer mecanismos de ação, ou mesmo, identificar componentes ativos e investigar os possíveis efeitos tóxicos de diferentes espécies vegetais (BATITUCCI, 2003). Pois, sem estes estudos, o uso de algumas plantas medicinais e seus produtos pode tornar-se um problema, onde algumas das substâncias que as compõem podem desencadear efeitos deletérios que resultam em um quadro clínico severo, e algumas vezes, fatal (PINHO *et al*, 2010).

A citotoxicidade de plantas medicinais é o exemplo perfeito para esse contexto, pois ainda é desconhecido em algumas espécies o efeito danoso que elas podem trazer ao organismo. Desta forma, a citotoxicidade pode ser avaliada através de alterações no processo de divisão celular sobre o organismo-teste e pela incidência de mutações cromossômicas (BORGES *et al*, 2011). A detecção de substâncias potencialmente citotóxicas e seus prováveis efeitos nos organismos são importantes no estudo, pois trazem um impacto relevante de modo a observar a compreensão do comportamento biológico dos materiais avaliados, podendo assim diminuir substancialmente o número de testes, diminuindo o número de materiais com aplicabilidade potencialmente clínica dessas plantas (SCHMALZ; SCHWEIK, 1994). Várias espécies dos diferentes biomas do Brasil são usadas pelas comunidades sem a devida comprovação de sua segurança de uso.

O bioma da Caatinga é caracterizado como uma floresta seca, verde apenas durante os períodos de chuva, com arbustos espinhosos e adaptados para solos áridos. A vegetação da Caatinga contempla os estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e Minas Gerais e possui uma área de aproximadamente 734.478 km² (ALBUQUERQUE; SILVA, 2005). Nesta região, diversos estudos etnodirigidos têm sido realizados para verificar o imenso potencial das plantas medicinais utilizadas na medicina

popular local (CARTAXO; SOUZA; ALBUQUERQUE, 2012; SILVA *et al*, 2011; ARAÚJO *et al*, 2012). Foram descritas na Caatinga mais de 596 espécies arbustivas e arbóreas, 1.788 espécies herbáceas, sendo pelo menos 180 espécies endêmicas, destacando-se a família botânica *Fabaceae* (JOLY, 1993), para a qual foram registradas 603 espécies até o momento. Apesar do número de espécies, paradoxalmente, este um é dos biomas mais ameaçados e menos estudados e conhecidos do Brasil, especialmente no que se refere à sua diversidade vegetal (SIQUEIRA FILHO, 2012). *Chloroleucon extortum* Barneby & J. W. Grimes, pertencente a esta família, popularmente conhecida como Jurema Branca é considerada endêmica na Caatinga e rara (QUEIROZ *et al*, 2009), não havendo relatos na literatura sobre estudos fitoquímicos e farmacológicos a seu respeito.

A família *Fabaceae*, para a qual foram registradas 603 espécies até o momento, destaca-se também como recurso alimentar. Entretanto, paradoxalmente, este um é dos biomas mais ameaçados e menos estudados e conhecidos do Brasil, especialmente no que se refere à sua diversidade vegetal (SIQUEIRA FILHO, 2012). Diante disto, o presente trabalho tem por objetivo realizar um estudo que contribua com o conhecimento da sua composição química e citotoxicidade dos seus metabólitos secundários, revelando assim o potencial terapêutico da espécie.

2 REVISAO DE LITERATURA

2.1 Plantas medicinais

Na história da humanidade o homem sempre buscou incessantemente o saber, colocando-se como o principal observador da natureza e de seus fenômenos. Para a utilização de plantas medicinais não seria diferente, os homens antigos valiam-se de suas próprias experiências empíricas de acerto e erro e da observação do uso de plantas pelos animais, além da intervenção divina para determinadas doenças. Em suma, percebe-se que mitos, lendas e tradições apontam para o emprego amplo de plantas medicinais em todos os tempos, em todas as camadas sociais e quase em toda a humanidade (OLIVEIRA; SIMÕES; SASSI, 2006).

O uso de plantas medicinais faz parte da prática da medicina popular, formando um conjunto de saberes internalizados nos diversos usuários e praticantes, especialmente pela tradição oral. Por isso que, para Sirikhwan (2014), é um fato comum a utilização de plantas medicinais na terapêutica, onde muitas vezes se desconhece a possível existência de efeitos tóxicos, além de não ter entendimento de sua ação terapêutica ou qual forma mais correta de cultivo, preparo e além do mais quando cada planta pode ser indicada e em quais casos são contraindicadas. Para os pesquisadores a composição fitoquímica das plantas não permite descartar a possibilidade de efeitos colaterais, uma vez que se associam ao princípio ativo, responsável pelo efeito desejável, de duzentos a trezentos compostos desconhecidos. Outra questão levantada é a dúvida sobre a identificação taxonômica das plantas utilizadas ou porque a dosagem é de difícil controle (AVILA-PIRES, 1995).

Um estudo sobre coagulação sanguínea confirmou que o ginseng, gengibre, alho em comprimido e o ginko biloba, podem alterar a coagulação sanguínea. Para os pesquisadores, em caso de cirurgia, é necessário fazer a investigação do uso dessas drogas pelo paciente e, se afirmativo, deve-se suspender o uso até o 10º dia do pré-operatório, com o objetivo de reduzir as eventuais complicações hemorrágicas no pré e pós-operatórias (DESTRO; SPERANZINI; DESTRO, 2006). Em outro relato, o boldo famoso por ter ação sobre desordens hepáticas e intestinais, atuando também como anti-inflamatório e antiespasmódico é citado como um poderoso analgésico capaz de mascarar sintomas de uma enfermidade grave e também pode ser considerado um agente de inibição da agregação plaquetária decorrente da não formação do tromboxano A₂, causando assim uma potencialização na terapêutica de pacientes usuários de anticoagulantes orais (BASILA; YUAN, 2005).

Segundo Fabricant e Farnsworth (2001) existem vantagens na utilização de plantas como ponto de partida para o desenvolvimento de fármacos. Um aspecto vantajoso prende-se ao fato de se poder usar informações de plantas específicas para a utilização destas por seres humanos em longo prazo (etnomedicina). Os compostos ativos isolados de plantas tendem a ser mais seguros do que os compostos ativos de plantas sem histórico de uso humano. Além disso, as plantas são consideradas fontes renováveis de matéria-prima e fornecem uma fonte ilimitada de novas e complexas estruturas. Por último, com a finalidade de assegurar patentes através do isolamento de princípios ativos de plantas, que apresentem novas estruturas e atividade biológica útil, a pesquisa de novos constituintes permite a produção de compostos sintéticos ou semissintéticos, com menor toxicidade e maior eficácia, sendo a futura tendência devido à competitividade industrial (FABRICANT; FARNSWORTH, 2001; BALUNAS; KINGHORN, 2005).

Os mesmos autores relatam as desvantagens associadas ao uso de plantas que podem ir desde a sua seleção aleatória a regulamentações que protejam a diversidade biológica. Os países com uma vasta área de florestas tropicais, para a proteção e conservação da diversidade biológica e o para o uso sustentável dos recursos biológicos, estabeleceram regulamentos e acordos formais para recolha de amostras de materiais vegetais, que requer uma prévia planificação evitando assim a perda de habitats. Algumas destas restrições estão ligadas à preservação de material genético, os direitos de propriedade intelectual e compensação para as descobertas decorrentes dos seus recursos genéticos (FABRICANT; FARNSWORTH, 2001; BALUNAS; KINGHORN, 2005).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) tem promovido reuniões internacionais com o intuito de criar melhores condições de qualidade, eficácia e segurança dos produtos fitoterápicos, além disto, elaborar diretivas convincentes a fim de dar maior garantia aos consumidores de produtos fitoterápicos. Estima-se que, aproximadamente, 40% dos medicamentos disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, sendo estes 25% provindo de plantas (ROCHA, 2010). Das 252 drogas consideradas básicas e essenciais pela OMS, 11% são originárias de plantas e um número significativo são drogas sintéticas obtidas de precursores naturais (THIAGO; TESSER, 2011).

Embora o Brasil tenha a maior diversidade vegetal do mundo, com mais de 60.000 espécies vegetais catalogadas, apenas uma pequena fração é estudada para pesquisas de compostos bioativos e avaliação de suas propriedades medicinais (VARELA; AZEVEDO, 2014). O Ministério da Saúde tem encorajado o desenvolvimento de estudos com plantas tradicionais, com a esperança de obter os possíveis benefícios que as pesquisas sobre este

assunto podem trazer e objetiva evitar efeitos irracionais ou prejuízos que esse tipo de medicina pode ocasionar (SILVA *et al*, 2015).

2.2 CAATINGA

A Caatinga é um bioma predominante do semiárido brasileiro cobrindo cerca de 80% de sua área geográfica e ocupando uma área de 826.411,23 km² (BRASIL, 2009). O termo Caatinga tem origem no tupi-guarani e é traduzida como “caa = mata” e “tinga= branca”. Esse bioma configura-se por uma diversidade de paisagens, formando por um mosaico de arbustos espinhosos, clima semiárido, florestas sazonalmente secas (SANTOS *et al*, 2017) (Figura 1).

A biodiversidade contida nesse tipo de vegetação oferece espécies vegetais intensamente adaptadas às circunstâncias do meio, como a escassez de água e de nutrientes. Na Caatinga brasileira, já foram identificadas mais de 1.700 espécies de plantas, onde cerca de 318 são endógenas (BRAND, 2017). Aproximadamente 70% da Região Nordeste é composta pela vegetação da Caatinga, este bioma engloba os Estados do Ceará (100%), Rio Grande do Norte (95%), Paraíba (92%), Pernambuco (83%), Piauí (63%), Bahia (54%), Sergipe (49%), Alagoas (48%), e a região norte do estado de Minas Gerais (2%) (SOUZA *et al*, 2017; SANTOS *et al*, 2017).

Figura 1 – Distribuição geográfica da Caatinga no Brasil.



Fonte: CERRATINGA, 2019.

Disponível em: <http://www.cerratinga.org.br/caatinga/>. Acesso em: 11 abr. 2019.

A vegetação da Caatinga é composta principalmente por plantas xerófitas, formada por espécies que desenvolveram mecanismos para sobreviver em ambiente com poucas chuvas e baixa umidade (figura 2). Um dos caracteres xeromórficos mais comuns em plantas de ambiente seco é a presença de órgãos como tubérculos e xilopódios, os quais se caracterizam pela presença de tecidos armazenadores de água e conferem a suculência a essas plantas (FAHN; CUTLER, 1992). Dentro desta perspectiva, muitas raízes e caules não suculentos mantêm a região cortical, mesmo após o crescimento secundário, com a função de manter o tecido parenquimático funcionalmente armazenador (FAHN; CUTLER, 1992).

Na Caatinga são comuns arbustos e árvores baixas. Muitas vezes ocorrem modificações morfológicas como forma de resistência a seca, nos cactos, por exemplo, as folhas são modificadas para espinhos por diminuírem a perda de água por transpiração. Outros exemplos de modificações de resistência que as plantas desenvolvem são: folhas pequenas ou folíolos céreos ou rugosos, superfície foliar ondulada, caules com vasos lenhosos curtos e de pequeno diâmetro, espinhos ou acúleos, com paredes espessas, sistema radicular profundo e extenso (ARAÚJO FILHO, 2013).

Figura 2 – Imagem característica das espécies da Caatinga



Fonte: Ministério do Meio Ambiente, 2017. Disponível em: <https://www.mma.gov.br/>. Acesso em: 15 mar. 2020.

Tais características morfofisiológicas expressam uma visão que a vegetação está morta, por esta se apresentar sem folhas, como tradicionalmente são conhecidas, só como caules e troncos secos e retorcidos (MORAES, 2016). Porém essas plantas adaptadas ao clima do semiárido permanecem vivas, utilizando como estratégia essas modificações morfológicas anteriormente citadas, para sobreviver às adversidades do ambiente.

Essas características únicas são responsáveis por uma biodiversidade que representa mais de duas mil espécies, onde aproximadamente 130 espécies são endêmicas (QUEIROZ, 2011). Por este motivo, a Caatinga é considerada um bioma bastante rico em recursos genéticos e químicos que são característicos, quando comparada a outras regiões semiáridas no mundo (CALIXTO JUNIOR; DRUMOND, 2014).

No nordeste, as pesquisas etnobotânicas se encontram intensificadas principalmente em áreas de Caatinga no estado de Pernambuco (ALMEIDA; ALBUQUERQUE, 2002; ALMEIDA *et al*, 2005; ALBUQUERQUE *et al*, 2007), entretanto, ainda são poucos os estudos realizados em outros estados nordestinos. A maioria das informações sobre as espécies medicinais da Caatinga, hoje conhecidas e estudadas, foi obtida com ajuda de

levantamentos etnobotânicos. A grande contribuição destes trabalhos é verificada nas diversas pesquisas que ressaltam as práticas de uso e sugestões de hipóteses que tentam explicar os sistemas médicos tradicionais das populações do semiárido nordestino (ALBUQUERQUE *et al*, 2007; ROQUE; ROCHA; LOIOLA, 2010; ALENCAR; ARAÚJO; AMORIM, 2010; FERREIRA JÚNIOR; LADIO; ALBUQUERQUE, 2011).

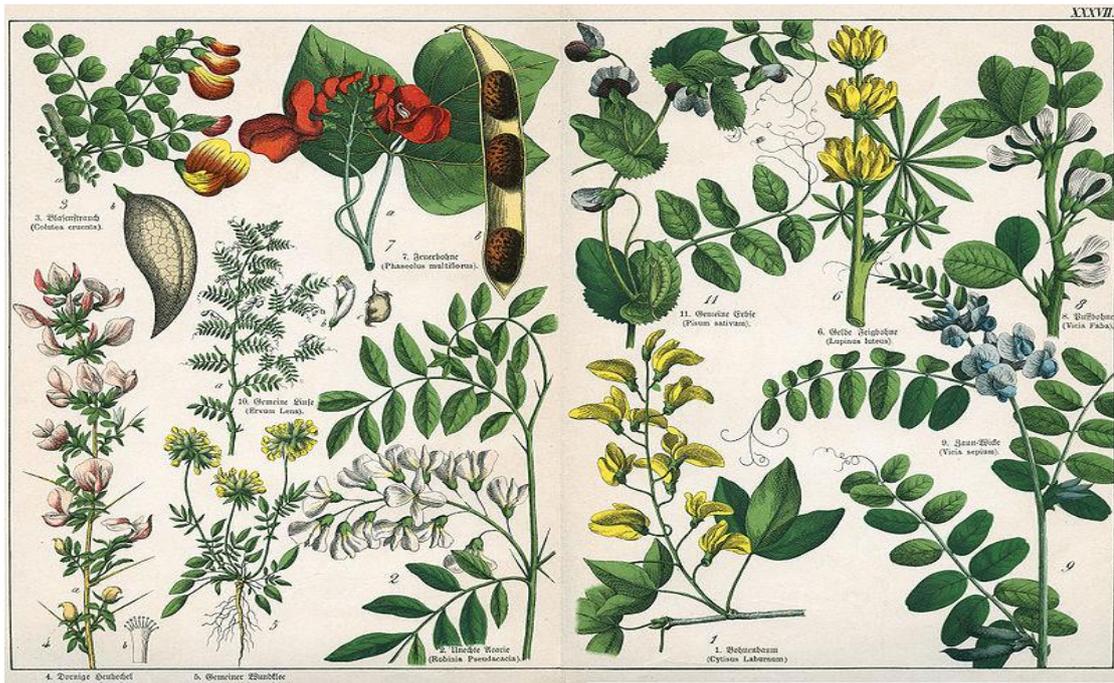
2.3 ESPÉCIE *Chloroleucon extortum*

2.3.1 Família

Pertencente à família *Fabaceae*, do grupo das angiospermas, que por sua vez considerada a terceira maior família de plantas, possuindo cerca de 727 gêneros, 19.325 espécies e 3 subfamílias (*Faboideae*, *Mimosoideae* e *Caesalpinioideae*) (LEWIS *et al*, 2005). Dentre estas, a *Faboideae* se destaca como maior, pelo fato de possuir, aproximadamente, 429 gêneros e 12.615 espécies, em seguida aparece a *Caesalpinioideae* com 150 gêneros e 2.700 espécies, e por fim, a *Mimosoideae* com 40 gêneros e 2.500 espécies (SILVA, 2009).

De acordo com Doyle e Luckow (2003), a família *Fabaceae* apresenta uma distribuição imensa, podendo ser encontradas em diversos locais, que vão desde o círculo polar ártico, até um pouco abaixo da linha do equador, sendo presente em desertos, florestas tropicais, tundras e em planícies. A grande diversidade entre as espécies dessa família (figura 3) possibilita uma significativa importância econômica, tendo em vista a utilização dessas espécies em variadas atividades, tais como, forragem para o âmbito agrícola e a alimentação humana, cujas espécies usadas são: *Pisum sativum* (Ervilha), *Phaseolus vulgaris* (Feijão), *Glycine max* (Soja), *Cicer arietinum* (Grão-de-bico), *Lens culinaris* (Lentilha) e o *Vigna radiata* (Feijão-mungo) (JARDINE; BARROS, 2015).

Figura 3 – Representação da diversidade de plantas da família *Fabaceae*



Fonte: Jardine e Barros, 2015.

Para Loiola *et al* (2010), o uso de plantas dessa família está relacionado como recurso medicinal em várias comunidades rurais da Caatinga, referindo-se ao uso dessas plantas em rituais religiosos além de enfatizarem a influência desse grupo de plantas na cultura sertaneja. Além de oferecer o interesse no âmbito agrícola como já comentado, as espécies de vegetais contidas na *Fabaceae* despertam o interesse científico, pois portam uma grande variedade de metabólitos secundários, sendo caracterizados por: alcaloides, esteroides, flavonoides, compostos fenólicos, ésteres de ácido graxo e fenilpropanoides e, especialmente, as isoflavonas, pelo fato de serem encontradas com abundância apenas nessa família (IGNOATO, 2012; KOWALSKA *et al*, 2014). Deste modo, os estudos fitoquímicos e farmacológicos tem se tornado imprescindível para auxiliar na identificação de substâncias bioativas, comprovando a sua eficácia e tornando o seu uso seguro.

Ao se analisar o estudo de Silva (2009), observou que nas três subfamílias, o metabólito flavonoide era o que apresentava uma maior concentração em relação aos outros na maioria das espécies, então, a partir disso, foi possível constatar que a *Fabaceae* é uma família particularmente rica em flavonoides, entretanto já os taninos têm frequência muito baixa se comparada aos flavonoides (SILVA, 2007). Esse é um dos fatores que impulsionam a realização de diversos estudos etnobotânicos, que permitem a utilização de determinadas espécies no âmbito industrial, viabilizando a produção de medicamentos a partir de plantas

medicinais, tintas e inseticidas. Somado a isso, torna-se importante também o conhecimento sobre as propriedades quimio-ecológicas, cujas espécies exercem alguns mecanismos de defesa ao serem expostas a um fator externo desfavorável, como: alta incidência de raios ultravioleta (UVA e UVB) e presença de pragas (insetos, fungos e bactérias) (HEGNAUER; GRAYER-BARKMEIJER, 1993).

2.3.2 Gênero e Espécie

O gênero *Chloroleucon*, formado pelas espécies (*C. acacioides*, *C. dumosum*, *C. extortum*, *C. foliolosum* e *C. tortum*), possui uma vasta distribuição no nordeste brasileiro, especialmente, por conta da predominância do bioma Caatinga (QUEIROZ, 2009). Essas espécies são agrupadas conforme a organização dos glomérulos, podendo ser classificadas como glomérulos homomórficos (*C. Dumosum*) e glomérulos heteromórficos (*C. extortum*, *C. acacioides*, *C. foliolosum* e *C. tortum*), entretanto, o fator determinante para a diferenciação taxonômica das espécies, são as características dos frutos (ALMEIDA; SOUZA; QUEIROZ, 2015).

Também conhecida popularmente como Jurema Branca a espécie *Chloroleucon extortum* Barneby & J. W. Grimes (figura 4) é reconhecida com facilidade pelo fruto torcido, moniliforme e com valvas cartáceas. Suas inflorescências estão inseridas no grupo com flores heteromórficas. As folhas de *C. extortum* são distintas entre os períodos de floração e frutificação: no primeiro caso, estão em desenvolvimento, jovens e menores; no segundo, estão totalmente desenvolvidas e maiores (ALMEIDA; SOUZA; QUEIROZ, 2015). Pouco se sabe sobre as atividades farmacológicas desta espécie uma vez que não há achados científicos sobre ela. Para Queiroz (2009) esta espécie é considerada endêmica e pouco coletada, sendo considerada rara.

Figura 4 – *Chloroleucon extortum* Barneby & J. W. Grimes (Jurema Branca)



Fonte: O Autor.

2.4 MÉTODO EXTRATIVO-MACERAÇÃO

Os métodos para extração de metabólitos secundários são de importância crucial para o estudo de plantas medicinais a extração dos seus componentes ativos tem por base o seu uso medicinal, de modo a obter um extrato similar ao seu uso tradicional. Através dos extratos juntamente com algumas técnicas é possível conhecer a composição química e a qualidade desses extratos. Entretanto, a escolha do solvente irá influenciar diretamente nos resultados. Nesse contexto, é importante salientar que estudos prévios como afinidade química, solubilidade de cada solvente deve ser levado em consideração para dar continuidade aos experimentos. A seleção do solvente depende da natureza dos compostos bioativos, sendo os mais usuais: água, os solventes orgânicos e misturas de solventes, entre os quais, metanol, etanol, acetato de etilo, acetona, diclorometano e hexano (SASIDHARAN *et al*, 2011).

Em meio às técnicas convencionais ou tradicionais de extração sólido-líquido, a maceração é uma das mais utilizadas devido a sua simplicidade e sua economia permitindo assim a obtenção de óleos essenciais e produtos naturais a partir de materiais vegetais. Esta técnica consiste na imersão do material vegetal num solvente apropriado num recipiente fechado, à temperatura ambiente durante um longo período de tempo. Por se realizar a temperatura ambiente este processo é menos suscetível de provocar a degradação dos metabolitos termolábeis (BUCAR; WUBE; SCHMID, 2013). Também se faz necessário agitação ocasional ou constante para aumentar a velocidade de extração das substâncias químicas. Este processo termina por separação do material vegetal residual (bagaço) por decantação, seguido de uma etapa de filtração para obtenção do filtrado (macerado). A adição de solvente fresco para garantir uma extração exaustiva e este passo pode ser repetida várias vezes. Segundo Azmir (2013), existem algumas desvantagens nesta técnica são: a) o tempo de duração da extração ser longo, podendo ser de horas até várias semanas; b) a utilização da extração exaustiva pode consumir grandes volumes de solvente, o que pode originar perda de metabolitos ou material vegetal; c) e alguns compostos podem não ser extraídos de forma eficiente se não forem solúveis à temperatura ambiente no solvente.

2.5 CITOTOXICIDADE

Como já é de conhecimento mundial as plantas possuem uma fonte importante de substâncias químicas naturais biologicamente ativas, muitos dos quais são utilizadas para a produção de um grande número de fármacos. Segundo um estudo realizado por Cragg, Newman e Snader (1997) as preparações fitoterápicas correspondem a 25% do receituário médico dos países desenvolvidos e 80% dos países em desenvolvimento. Várias espécies já foram estudadas e seus princípios ativos validados como medicamento como é o caso da vinca (*Catharanthus roseus*), planta da qual se obtém a vincristina e a vimblastina, substâncias altamente eficazes contra certos tipos de câncer (THOMSON; WALLACE, 2002).

Além de possuir diversas atividades benéficas, os vegetais também podem apresentar efeitos indesejáveis, na maioria das vezes, tóxicos, nos quais, podem ser danosos a saúde humana. Segundo o SINITOX (Sistema Nacional de Informação Toxicológica), os casos de intoxicação por uso inadequado de plantas, estão cada vez mais recorrentes, chegando em 2010, ao número de 1.132 casos, onde 5 destes, causaram óbito. A avaliação toxicológica de plantas medicinais contribui em inúmeras questões ligadas ao uso de vegetais em produtos naturais.

Essa avaliação é de fundamental importância, pois muitos compostos presentes nas plantas possuem atividade tóxica que podem causar danos celulares ou genéticos. Tais danos podem afetar processos vitais como a duplicação e a transcrição gênica, bem como alterações cromossômicas, levando a processos cancerosos e morte celular (BELCAVELLO *et al*, 2012). Com isso, o conhecimento dos mecanismos de citotoxicidade é de extrema importância, pois, além de corroborar com o conhecimento científico, também contribui com o conhecimento popular, objetivando o uso racional desses produtos pela população. Um estudo realizado por Nogueira, Cerqueira e Soares (2010), afirmam que 72% dos agentes utilizados no combate ao câncer, possuem como princípio ativo compostos oriundos de produtos naturais.

2.5.1 Ensaio do MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio]}

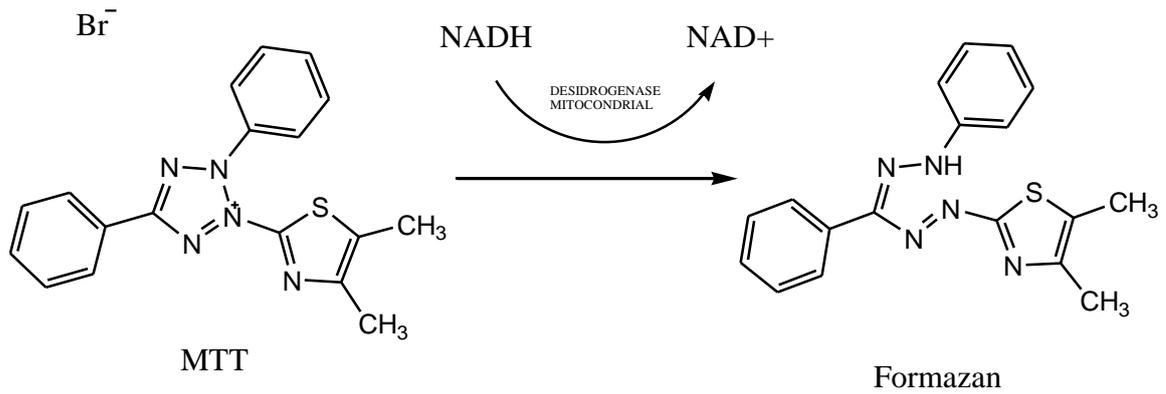
Segundo o *guideline* da OECD (2010) (*Organization for Economic Cooperation and Development*) para testar substâncias químicas usando os testes *in vitro*, devem ser avaliadas, no mínimo, três concentrações diferentes da droga. Estas deverão ser escolhidas dos dados obtidos de estudos preliminares sobre citotoxicidade. Os testes de citotoxicidade *in vitro* são importantes para se verificar a toxicidade de novos compostos, principalmente quando se está verificando sua aplicabilidade como agente terapêutico (MELO, 2000). Entre os diferentes testes que podem ser utilizados na avaliação da citotoxicidade de um composto, destaca-se o ensaio MTT proposto por Mosmann (1983), o qual tem sido amplamente utilizado para determinar a viabilidade e proliferação de células após a exposição a substâncias tóxicas, e também para a caracterização da toxicidade de novos fármacos (MOSMANN, 1983; BERRIDGE; HERST; TAN, 2005; BERRIDGE; TAN, 1993).

O ensaio com MTT é um ensaio colorimétrico que se baseia na capacidade de células metabolicamente ativas reduzirem no meio intracelular o sal solúvel de tetrazólio dando origem a cristais de formazan, que é um produto de cor roxa, insolúvel em água (MOSMANN, 1983).

Apesar de inicialmente se ter atribuído a redução do MTT a desidrogenases mitocondriais (MOSMANN, 1983), foi demonstrado que a redução do MTT em 32 células intactas ocorre na maioria das vezes, fora da mitocôndria, por desidrogenases não mitocondriais, e provavelmente envolve os cofatores nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) e nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) (BERRIDGE; TAN, 1993; LIU *et al*, 1997). Foi então proposto que o MTT entra nas células por um processo de endocitose e que o produto da sua redução, o formazan, se acumula em

endossomas/lisossomas, sendo depois secretado por exocitose. O método envolve a conversão, pelas células, do MTT de coloração amarela em cristais de formazan de coloração roxa. Após a adição de dimetilsulfóxido (DMSO), os cristais são solubilizados, liberados e quantificados colorimetricamente, através de espectrofotometria tipo ELISA (COLLIER; PRITSOS, 2003).

Figura 5 – Redução do MTT por enzimas mitocondriais



Fonte: O autor.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar estudo fitoquímico e avaliação citotóxica da espécie *Chloroleucon extortum* Barneby & J. W. Grimes (Jurema Branca).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

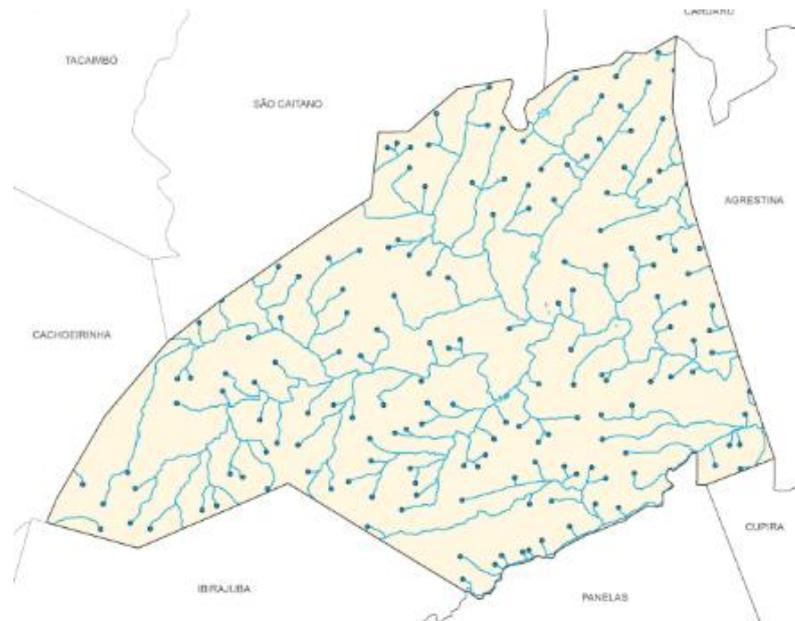
- a) Coletar e processar as amostras das espécie para obtenção do extratos.
- b) Obter os extratos secos brutos hidroetanólicos da casca e folha da espécie estudada.
- c) Obter extratos fracionados com diferentes polaridades da casca e folha da espécie *Chloroleucon extortum* Barneby & J. W. Grimes (Jurema Branca) através de diferentes técnicas extrativas.
- d) Comparar o rendimento dos extratos em relação aos métodos extrativos.
- e) Quantificar espectrofotometricamente o teor de fenóis totais, taninos, flavonóides e cumarinas da espécie estudadas.
- f) Avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos extratos das cascas e folhas de *Chloroleucon extortum* Barneby & J. W. Grimes.

4 METODOLOGIA

4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

As amostras de cascas e folhas de *Chloroleucon extortum* Barneby & J. W. Grimes (Jurema Branca) foram coletadas em Junho de 2018 em uma área de Caatinga do Estado de Pernambuco, na comunidade do Carão (08°35'13,5''S e 36°05'34,6''W), localizada na zona rural de Altinho, município do agreste central Pernambucano, distante 163,1 km do Recife, com uma área de 454, 486 km² e clima semiárido quente (ARAÚJO *et al*, 2008). A exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) sob o n° 49609.

Figura 6 – Brasil, Pernambuco, Altinho



Fonte: Google Maps, 2019. Disponível em: <https://www.google.com.br/maps/preview>. Acesso em: 15 mar. 2019.

4.2 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS

As amostras vegetais coletadas foram reduzidas a partes menores com a finalidade de aumentar a superfície de contato e evitar a contaminação do material, e submetidas à exposição ambiente por duas semanas para desidratação. Após secagem, as amostras foram pulverizadas em moinho vertical de facas tipo Willye (Adamo 340) e padronizadas em

tamises, obtendo granulometria de 20 Mesh (1,2 mm), sendo acondicionadas em sacos de papel até a preparação dos extratos. Após este processo, as amostras foram submetidas à extração por maceração de 48 horas cada na proporção de 1:10 (m/v) com etanol 80%, o líquido extrator foi renovado por duas vezes totalizando o número de 3 macerações para a obtenção do extrato bruto etanólico. Em seguida, os extratos foram filtrados e submetidos à evaporação sob pressão reduzida, à temperatura de $40\pm 5^\circ\text{C}$, até total secura.

4.3 MÉTODOS DE FRACIONAMENTO

As amostras vegetais (100g) foram submetidas a uma nova extração líquido-líquido para a obtenção de extratos fracionados com diferentes polaridades: Hexano, Acetato de etila e Metanol. Para a realização desse tipo de extração foi utilizado dois métodos extrativos:

a) Extração Fracionada: realizou-se uma maceração utilizando a matriz vegetal e inicialmente o líquido extrator hexano por 48h com 2 trocas. A fração foi filtrada e separada. A matéria vegetal foi seca e adicionou-se acetato de etila, repetindo o procedimento realizado anteriormente, o mesmo utilizando o metanol, as respectivas frações foram recolhidas individualmente e concentradas à evaporação sob pressão reduzida, à temperatura de $40\pm 5^\circ\text{C}$, até total secura.

b) Cromatografia em coluna filtrante: foi realizada em um funil de Bucher. Onde se montou um a coluna tamponando-se a parte inferior com papel de filtro, preenchendo a mesma com sílica de maneira uniforme até uma altura de 2/3 do funil sobrepondo-a com papel de filtro.

Após, incorporou-se uma alíquota do extrato vegetal bruto seco (11,5 g para casca e 5 g para folhas) a um correspondente de 1/3 do total de Silicagel 60 (Merck) que compunha a coluna formando o topo sólido. Iniciou-se a eluição, primeiramente com Hexano P.A (1L), em seguida com acetato de Etila P. A (1L) e após uma última eluição com Metanol P.A (1L). Todas as eluições respeitaram o grau de polaridade dos solventes, sendo eluído da menor para maior polaridade.

4.4 PROSPECÇÃO DOS CONSTITUINTES FITOQUÍMICOS

As análises qualitativas dos compostos químicos foram realizadas por cromatografia em camada delgada (CCD) de gel de sílica desenvolvida por sistemas eluentes e reveladores de acordo com os métodos descritos na quadro1 (WAGNER; BLADT, 1995).

Quadro 1 – Sistemas de eluição, padrões e reveladores utilizados para evidenciar a presença dos compostos fenólicos

Grupo	Sistema eluente	Padrão	Revelador
Compostos Fenólicos	acetato de etila: ácido fórmico: água (90:5:5)	Ácido Gálico	Cloreto Férrico
Taninos	acetato de etila: ácido fórmico: água (90:5:5)	Ácido Tânico	FeCl ₃
Flavonoides	Acetato de etila: ácido fórmico: água (90:5:5)	Rutina	NEU
Cumarinas	Tolueno: éter (1:1 saturado com ácido acético a 10%)	Cumarina	KOH etanolico 10%

Fonte: O autor.

4.4.1 Determinação do conteúdo fenólico total

Para determinação do conteúdo fenólico total foi utilizado a metodologia descrita por Amorim *et al* (2008). O extrato seco foi diluído em metanol P. A numa concentração de 1mg/mL em balão volumétrico de 50 mL, em triplicata.

Foi adicionada uma alíquota de 0,2 mL (200 µL) do extrato diluído a um tubo de ensaio. Posteriormente, foram adicionados 500 µL do reagente Folin-Ciocalteu (solução aquosa 10%), 1 mL de solução de carbonato de sódio (7,5%) e completado o volume com água destilada para 10 mL. Após a preparação desta solução, agitou-se adequadamente, permanecendo em repouso por 30 minutos, ao abrigo da luz, a temperatura ambiente. Após esse período, a absorbância da mistura foi medida a 760 nm contra um branco preparado com água destilada.

Como padrão foi utilizado o ácido tânico, preparando-se uma curva de calibração em tubos de ensaio com alíquotas de 0.050, 0.100, 0.150, 0.200, 0.250, 0.500, 0.750 e 1 mL da solução padrão de ácido tânico a 1 mg/mL, em água destilada. Posteriormente, foram adicionados 500 µL da solução de Folin-Ciocalteu e 1 mL da solução de carbonato de sódio em cada tubo de ensaio. O volume final foi completado para 10 mL com água destilada. As concentrações finais obtidas do ácido tânico foram 0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5; 5.0; 7.5; 10.0µg/mL, respectivamente. A cor azul produzida pela reação possui uma absorção máxima a 760 nm e é proporcional à taxa de compostos fenólicos. O teor de fenóis totais foi expresso como miligramas equivalentes de ácido tânico por grama de amostra (mg TAE/g) (AMORIM *et al*, 2008).

4.4.2 Determinação do conteúdo de taninos

A determinação do teor de taninos foi realizada segundo protocolo desenvolvido por Amorim *et al* (2008) adaptado para a espécie. O extrato seco foi diluído em metanol P. A numa concentração de 1mg/mL em balão volumétrico de 50 mL, em triplicata.

Posteriormente, foram pesados 1 g de caseína e transferidos para erlenmeyer de 50 mL, acrescentando 6 mL da amostra diluída e 12 mL de água destilada, em triplicata. Após 3 (três) horas de reação sob agitação, filtrou-se a solução em balão volumétrico e o volume foi completado para 25 mL com água destilada. Foi retirada uma alíquota de 1 mL e quantificados os fenóis residuais pelo método Folin-Ciocalteu. O teor de taninos foi calculado pela diferença entre o conteúdo de fenóis totais e fenóis residuais. Como padrão foi utilizado o ácido tânico, a curva de calibração foi preparada conforme descrito no item 4.4.1.

4.4.3 Determinação do conteúdo de flavonóides

A quantificação dos teores de flavonoides foi baseada na metodologia descrita por Peixoto Sobrinho *et al* (2008). O método é fundamentado na reação do íon alumínio (Al^{3+}) com moléculas de flavonoides da amostra, estabelecendo o complexo estável flavonoide- Al^{3+} , de coloração amarela, cuja intensidade é proporcional à concentração de flavonoides. Esta reação promove um deslocamento batocrômico e uma intensificação de suas absorções, podendo ser quantificado sem sofrer influência de outros compostos fenólicos presentes na amostra.

O extrato seco foi diluído em metanol P. A numa concentração de 1mg/mL em balão volumétrico de 50 mL, em triplicata. Para quantificar os flavonoides, uma alíquota de 0,2 mL (200 μ L) do extrato diluído foi transferida para tubos de ensaio. Posteriormente, foram adicionados 0,120 mL (120 μ L) de ácido acético glacial, 2 mL da solução de piridina (20%, v/v em metanol P. A), 0,5 mL (500 μ L) do reagente cloreto de alumínio (5%, p/v em água destilada) e completado o volume para 10 mL com água destilada em cada tubo. Após a preparação desta solução, agitou-se adequadamente, permanecendo em repouso por 30 minutos, ao abrigo da luz, a temperatura ambiente. Após esse período, a absorbância da mistura foi medida a 420 nm contra um branco preparado com água destilada.

Preparou-se a curva de calibração com alíquotas de 0,05; 0,10; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,50; 2,00 mL da solução de rutina (0,1 mg/mL em metanol), em tubos de ensaio. Posteriormente, foram adicionados 120 μ L da solução de ácido acético, 2 mL da solução de

piridina, 0,5 mL do reagente cloreto de alumínio. O volume final foi completado para 10 mL com água destilada. As concentrações finais de rutina foram de 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0; 20,0 µg/mL, respectivamente. O teor de flavonoides totais foi expresso como miligramas equivalente de rutina por grama de extrato (mg ER/g).

4.4.4 Determinação do conteúdo de cumarinas

O ensaio colorimétrico descrito por Osório e Martins (2004) com adaptações foi utilizado para quantificar o conteúdo de cumarinas. Foram transferidos 0,5 mL do extrato diluído (1,0 mg/mL) para tubos de ensaio. Posteriormente, foram adicionados 2 mL de água destilada e 500 µL da solução de acetato de chumbo. Agitou-se a amostra e, em seguida, foram adicionados 7 mL de água destilada. Desta solução, 2 mL foram transferidos para novos tubos de ensaio e adicionados 8 mL da solução de ácido clorídrico.

As amostras permaneceram por 30 minutos ao abrigo da luz à temperatura ambiente. A absorbância da mistura foi medida a 320 nm contra um branco preparado com água destilada.

A curva de calibração (alíquotas de 10, 25, 100, 200, 300, 400, 500 µL) foi preparada com uma solução padrão de 1,2-benzopirona e todos os demais reagentes citados anteriormente para os extratos, aferindo-se o volume final para 10 mL com água destilada. O ensaio foi realizado em triplicata e as concentrações finais de cumarina ficaram entre 0,4-20,0 µg/mL. O teor de cumarinas totais foi expresso como miligramas equivalente de cumarina por grama de extrato (mg EC/g).

4.5 CITOTOXICIDADE

A atividade citotóxica foi realizada no Laboratório de Cultura de Células, do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, pelo método do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MOSMANN, 1983; ALLEY *et al*, 1988).

As linhagens de célula não neoplásicas utilizadas foram PBMC (células mononucleadas de sangue periférico humano) que foram ressuspensas em meio de cultura RPMI 1640. As linhagens de células tumorais humanas utilizadas foram HCT-116 (câncer de colorretal humano) e HL-60 (leucemia promielocítica aguda) mantidas em meio de cultura RPMI 1640; HeLa (câncer cervical humano) e NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de

pulmão humano) mantidas em meio de cultura DMEM. Os meios foram suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de solução de antibiótico (penicilina e estreptomicina). As células foram mantidas em estufa a 37 °C em atmosfera úmida enriquecida com 5 % de CO₂.

As células HCT-116, HL-60, NCI-H292 e HeLa (10⁵ células/mL) e PBMC (10⁶ células/mL) foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h. Em seguida as amostras dissolvidas foram adicionadas aos poços em concentração final de 50µg/mL. O fármaco doxorrubicina (5 µg/mL) foi utilizado como padrão. Após 72 h de reincubação, foi adicionado 25 µL de MTT (5 mg/mL) e depois de 3 h de incubação, o meio de cultura com o MTT foram aspirados e 100 µL de DMSO foi adicionado a cada poço. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 560 nm.

Os experimentos foram realizados em quadruplicata e a porcentagem de inibição foi calculada no programa *GraphPad Prism* 8.1 demo. Foram realizados 2 experimentos independentes.

4.5.1 Método de análise dos resultados

Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas. Amostras com alta atividade (95 a 100 % de inibição do crescimento celular), com atividade moderada (inibição de crescimento celular variando de 70 a 90%) e sem atividade (inibição de crescimento menor que 50%) (RODRIGUES *et al*, 2014).

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os teores dos metabólitos secundários foram avaliados através da análise de variância de Kruskal Wallis seguido de comparações múltiplas pelo teste de Dunn. As diferenças foram consideradas significativas ao nível de $p < 0,05$. O programa BioEstat 5.0 foi utilizado para realização da análise estatística (AYRES *et al*, 2007).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RENDIMENTO DOS EXTRATOS

A escolha de método extrativo a partir de drogas vegetais irá depender da substância e/ou grupo de substância de interesse do estudo e deve evitar a sua modificação química, a fim de se obter um rendimento ótimo no final do processo (CUJIC *et al*, 2016). Ainda assim, a eficiência da extração está diretamente relacionada a fatores intrínsecos do processo, tais quais, tempo de contato da droga com o líquido extrator; renovação do solvente; velocidade de agitação, temperatura e entre outros. Desse modo, a sua avaliação é de suma importância, a fim de obter métodos extrativos que sejam simples, seguros, reprodutíveis e de baixo custo (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2010; VONGSAK *et al*, 2013).

Os rendimentos de extração da casca e folha de *Chloroleucon extortum* (Jurema Branca) estão dispostos no quadro 2. Em relação aos rendimentos dos extratos foi observado uma variação, tanto de acordo com o método de extração utilizado como pela utilização de diferentes solventes.

Quadro 2 – Rendimento em porcentagem a partir dos extratos obtidos da casca e da folha de *Chloroleucon extortum* (Jurema Branca)

Método extrativo	Solvente	Rendimento/casca	Rendimento/folha
Extrato bruto	Etanol 80 %	14,84%	17,47%
Extração Fracionada	Hexano	0,24%	2,78%
	Acetato de etila	0,83%	1,4%
	Metanol	7,87%	9,63%
Coluna Filtrante	Hexano	N/D	N/D
	Acetato de etila	1,86%	2,01%
	Metanol	8,15%	3,51%

Fonte: O autor.

Ao se comparar os outros métodos extrativos em ambas as partes da planta, os rendimentos que mais se destacaram apresentaram maior afinidade preferencialmente para os solventes polares, especificamente o metanol que apresentou um rendimento em diferentes técnicas extrativas de (casca = 7,87%, 8,15%) e (folha = 9,63%, 3,51%), em relação aos

solventes apolares. Constatou-se que os solventes acetato de etila (casca = 0,83 % e 1,86%), (folha = 1,04% e 2,01%) e hexano (casca = 0,24%), (folha = 2,78%), em ambas as partes da planta e em diferentes métodos, apresentaram uma baixa afinidade para os constituintes da mistura apresentando assim baixos rendimentos.

Segundo Bucar, Wube e Schmid (2013), o emprego da técnica de maceração para extração de produtos naturais (no caso da extração fracionada) origina rendimentos baixos. Desta forma, para melhorar a eficiência do processo extrativo a adição de agitação ocasional ou constante permitiria aumentar a solubilidade dos constituintes da amostra vegetal, com o consequente aumento do rendimento. Os baixos rendimentos resultantes desta técnica de extração e a seleção da mesma permitem evitar a degradação dos possíveis compostos termolábeis existentes na amostra vegetal inicial, pois o processo ocorre a temperatura ambiente (SEIDEL, 2006).

5.2 FITOQUÍMICA

Os resultados obtidos para análise fitoquímica dos extratos foram discutidos partindo da cromatografia de camada delgada, com soluções reveladoras para fenóis totais, flavonoides, taninos e cumarinas. Após a aplicação das soluções reveladoras, a visualização dos compostos se tornou possível sob luz ultravioleta 365nm. Sendo assim, não havendo prévio conhecimento químico sobre a espécie em estudo, esta análise torna-se importante para o reconhecimento de classes de metabólitos secundários relevantes (MELLO *et al*, 2000), fundamentando-se no princípio de que qualquer substância encontrada na planta pode ser um princípio ativo em potencial, independentemente de sua concentração (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

Com isso, foi possível observar a presença dos compostos avaliados nos diferentes extratos havendo diferença na composição entre os métodos extrativos utilizados (quadro 3).

Quadro 3 – Análise Química dos extratos de cascas e folhas de *Chloroleucon extortum* (Jurema Branca) obtidos por diferentes métodos extrativos

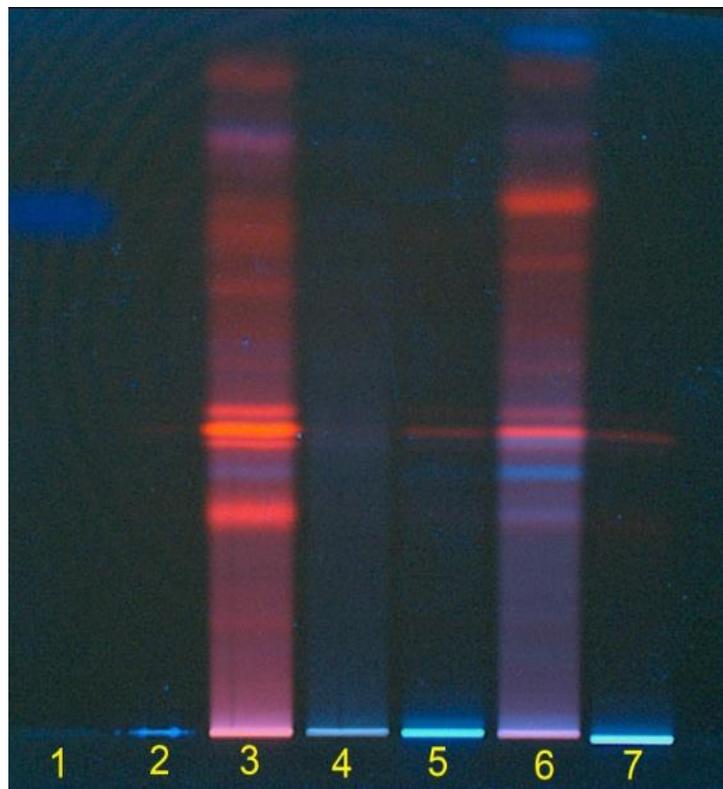
Classe de compostos	Casca							Folha							
	EB	Fracionamento			Coluna			EB	Fracionamento			Coluna			
		H	Ac	M	H	Ac	M		H	Ac	M	H	Ac	M	
Compostos fenólicos	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
Taninos Hidrolisáveis	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
Taninos Condensados	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Flavonoides	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cumarinas	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Legenda: 1 = EB: extrato bruto; H: hexano; Ac: Acetado de etila; M: metanol.

Fonte: Autor.

A partir das análises cromatográficas foi possível verificar que os extratos de casca de Jurema Branca que apresentaram maior intensidade para fenóis, flavonoides e cumarinas foram aqueles fracionados com acetato de etila por diferentes técnicas (figura 7).

Figura 7 – Placa cromatográfica para presença de Cumarina nos extratos de casca de *Chloroleucon extortum*



Legenda: 1 = Padrão Cumarina; 2 = Extrato Bruto 3 = Ext. Fracionado acetato de etila; 4 = Ext. Fracionado hexano; 5 = Ext. Fracionado metanol; 6 = Ext. coluna Acetato de etila; 7 = Ext. coluna metanol.

Fonte: O Autor.

Os teores de fenóis totais, taninos, flavonoides e cumarinas da casca e da folha de *Chloroleucon extortum* (Jurema Branca), obtidos por diferentes métodos extrativos foram avaliados e os resultados obtidos nos doseamentos estão apresentados nas quadros 4 e 5, respectivamente. Os valores expressos são as médias das replicatas acompanhadas do desvio padrão em mg/g equivalente de ácido tânico para fenóis totais e taninos, equivalente de rutina para flavonoides e equivalente de 1,2-benzopirona para as cumarinas.

A fração acetato de etila da casca da espécie Jurema branca destacou-se com relação ao teor de fenóis totais, um teor de $15,35 \pm 3,19$ mg/g. Já para os teores de flavonoides o extrato de acetato de etila, obtido por coluna filtrante, apresentou $235,04 \pm 26,66$ mg/g, respectivamente. Observou-se diferença estatística significativa dos extratos obtidos por diferentes técnicas. Para os teores de taninos a fração acetato de etila apresentou um teor de $13,60 \pm 5,65$ mg/g e para cumarinas a fração hexano apresentou um teor de $27,23 \pm 0,58$ mg/g. Contudo o teor apresentado não foi significativamente diferente dos extratos obtidos por diferente solventes.

Quadro 4 – Teores (mg/g) de fenóis totais, taninos, flavonoides e cumarinas, expressos em média \pm desvio padrão/ concentração, dos extratos obtidos a partir das cascas de *Chloroleucon extortum* Barneby J. W. Grimes (Jurema Branca) por diferentes métodos extrativos

Método Extrativo	FT (mg EAT/g)	TN (mg EAT/g)	FLA (mg ER/g)	CUM (mg EC/g)
Extrato bruto etanolico 80%	$7,88 \pm 1,86$ 24,92% a	$0,29 \pm 2,99$ 13,49 % a	$16,19 \pm 1,22$ 7,54% a	$22,18 \pm 0,09$ 0,39% a
Fração hexano	N/D	N/D	$269,40 \pm 3,80$ 1,41% b	$27,23 \pm 0,58$ 2,19% b
Fração acetato de etila	$15,35 \pm 3,19$ 20,80% b	$13,60 \pm 5,65$ 41,24% b	$119,49 \pm 6,40$ 5,36% a	$23,27 \pm 0,49$ 2,09% a
Fração metanol	$6,15 \pm 2,62$ 42,65 % a	$4,93 \pm 2,21$ 44,82% c	$31,72 \pm 1,11$ 3,49% c	$21,93 \pm 0,11$ 0,51% c
Coluna hexano	S/R			
Coluna acetato de etila	$15,29 \pm 5,38$ 35,21 % d	$13,26 \pm 5,32$ 40,12% d	$235,04 \pm 26,66$ 16,54% d	$24,76 \pm 0,38$ 1,51 % d
Coluna Metanol	N/D	N/D	$6,34 \pm 0,92$ 14,56a	$21,65 \pm 0,18$ 0,82 % a

Legenda: FT = Fenóis Totais, TAN = Taninos, FLA = Flavonoides, CUM = Cumarinas, N/D= não detectado, S/R= sem rendimentos. Letras iguais na mesma coluna indicam não diferença estatística conforme Kruskal Wallis (seguido de Dunn), $p < 0.05$.

Fonte: O autor.

Com relação aos extratos de folhas de Jurema Branca, o extrato metanólico que obteve maior quantidade em relação ao teor de fenóis totais, o qual apresentou um teor de $102,08 \pm 1,12$ mg/g. Já para os teores de flavonoides a fração acetato de etila apresentou $602,98 \pm 15,44$ mg/g. No entanto, estatisticamente não se observou diferença significativa dos extratos obtidos por diferentes solventes. Para taninos a fração metanol apresentou um teor de $65,70 \pm 3,97$ mg/g e para cumarinas a fração hexano apresentou um teor de $27,19 \pm 0,13$ mg/g. Não se observou diferença estatística significativa entre os extratos obtidos por diferentes solventes.

Quadro 5 – Teores (mg/g) de fenóis totais, taninos, flavonoides e cumarinas, expressos em média \pm desvio padrão/ concentração, dos extratos obtidos a partir das folhas de *Chloroleucon extortum* Barneby J. W. Grimes (Jurema Branca) por diferentes métodos extrativos

Método Extrativo	FT (mg EAT/g)	TN (mg EAT/g)	FLA (mg ER/g)	CUM (mg EC/g)
Extrato bruto etanolico 80%	$92,26 \pm 6,62$ 7,18% a	$71,40 \pm 4,12$ 5,77% a	$73,07 \pm 6,74$ 9,23% a	$22,58 \pm 0,11$ 0,48 % a
Fração hexano	N/D	N/D	$272,85 \pm 6,51$ 2,38% b	$27,19 \pm 0,13$ 0,48% b
Fração acetato de etila	$17,33 \pm 4,07$ 23,49% b	$25,75 \pm 4,10$ 15,91% b	$602,98 \pm 15,44$ 2,56 % a	$26,55 \pm 0,13$ 0,47% a
Fração metanol	$102,08 \pm 1,12$ 1,10% a	$65,70 \pm 3,97$ 6,07% c	$113,63 \pm 0,38$ 0,33% c	$22,53 \pm 0,13$ 0,59% c
Coluna hexano	S.R.			
Coluna acetato de etila	$45,67 \pm 4,43$ 9,71% d	$37,27 \pm 6,62$ 17,15% d	$331,15 \pm 14,31$ 4,32 % d	$23,46 \pm 0,34$ 1,44d
Coluna Metanol	$67,39 \pm 1,66$ 2,47% d	$52,22 \pm 1,99$ 3,80% d	$52,48 \pm 3,21$ 6,12% a	$23,24 \pm 0,09$ 0,37% d

Fonte: próprio autor. Legenda: FT = Fenóis Totais, TAN = Taninos, FLA = Flavonoides, CUM = Cumarinas, N/D = Não detectado, S.R.= Sem rendimento. Letras iguais na mesma coluna indicam não diferença estatística conforme Kruskall Wallis (seguido de Dunn), $p < 0.05$.

Fonte: O autor.

A determinação dos teores de metabolitos secundários em plantas de uso medicinal através de análises fitoquímicas baseia-se na marcação das quantidades de uma classe química presente na constituição química de determinada planta (VIGO *et al*, 2004; FREIRE, 2006). Este fato está ligado aos processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos, bem como sazonalidade, período circadiano, idade e desenvolvimento da planta, além da disponibilidade de nutrientes e água no solo (MIRANDA *et al*, 2016). Deste modo esses

fatores podem explicar as diferenças observadas nos resultados da avaliação fitoquímica das amostras estudadas.

Embora o estudo tenha demonstrando diversos resultados positivos, em relação à presença de alguns metabolitos secundários, vale ressaltar que, apesar das diferenças entre os métodos extrativos e seus rendimentos houve uma boa quantificação de metabolitos secundários em extratos de baixo rendimento, como por exemplo os extratos da fração acetato de etila e a fração hexânica tanto de casca quanto de folha. Para os teores de flavonoides. Corroborando assim com o estudo feito por Silva (2009), onde comprova que as espécies da família *Fabaceae* são ricas nesse tipo de metabolito.

Diversos trabalhos científicos têm evidenciado que há uma grande variedade de metabolitos secundários em espécies oriundas da Caatinga e apontam a presença de compostos fenólicos em várias espécies deste bioma, sendo um indicativo de que estes compostos podem estar relacionados com muitas das atividades farmacológicas atribuídas popularmente a estas espécies (MONTEIRO *et al*, 2006; ALENCAR *et al*, 2009). Araújo *et al* (2008) também evidenciaram o quantitativo de taninos e flavonoides de diversas espécies da Caatinga relacionando estes com uso popular.

Os compostos fenólicos por sua vez tem um papel importante durante o desenvolvimento da planta e em situações de estresse, pois atuam na absorção da radiação nas camadas epidérmicas dos tecidos, regulando o sistema antioxidante nas células além de contribuir para qualidades sensoriais, como cor, flavor (impressão sensorial determinada pelas sensações de sabor e aroma) e sabor de frutas e vegetais frescos e seus produtos (KIM; OM, 2008). Portanto a presença de compostos fenólicos nas plantas pode nos levar a respostas farmacologicamente positivas se tratado de efetividade, pois essas substancias possuem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e imunomoduladoras comprovadas. Atualmente, vêm sendo estudados como agentes quimio-preventivos (SOUZA *et al*, 2019).

Um dos representantes químicos desses compostos fenólicos são os taninos que possuem uma rica atividade com suas propriedades adstringentes. Esses compostos exercem um efeito antidiarreico e antisséptico por via interna e na via externa impermeabilizam as camadas mais expostas da pele e mucosas, protegendo assim as camadas subjacentes. Os taninos podem, também, apresentam ações antimicrobiana e antifúngica, auxilia na cura em processos inflamatórios de queimaduras e feridas como também auxilia como um bom antídoto para intoxicações (BRUNETON, 2001; MELLO *et al*, 2000). Alguns estudos realizados demonstraram a alta efetividade desses compostos contra o câncer gástrico, sendo considerado um bom agente anticancerígeno (CHUNG *et al*, 1998).

Já os flavonoides outra classe citadas anteriormente possuem também ações farmacológicas que já foram evidenciadas em diversos estudos como, por exemplo: ação analgésica, antialérgica, hepatoprotetora, antimicrobiana a ação anti-inflamatória que podem inibir as vias de ciclooxigenase (COX) e lipoxigenase, as quais desempenham um papel importante como mediadores inflamatórios (SIMÕES *et al*, 1988; FERRANDIZ; ALCARAZ, 1991). Também pode desempenhar ação antitumoral onde os flavonoides também apresentam ação antitumoral, possivelmente através do controle da proliferação celular e bloqueio da oncogênese por mecanismos que modulam enzimas da via metabólica carcinogênica (AMADO *et al*, 2011). O mecanismo de ação antiviral dessa classe se dá através da capacidade de interação com o vírus que vai desde a ligação até sua entrada na célula hospedeira onde ocorre por meio de ligações com glicoproteínas do envelope viral e receptores celulares modificando assim a sua estrutura química bloqueando o sitio de ligação do vírus (SANTOS; RODRIGUES, 2017).

Outra classe de metabólitos secundários contidos nas plantas em geral são as cumarinas onde diversos estudos apontam sua diversidade se tratando de estudos biológicos. Como por exemplo, uma serie de derivados de cumarinas (4-hidroxi, 7-hidroxi e 3-carboxicumarinas) demonstrou uma melhor atividade contra bactérias Gram positivas ao invés de Gram negativas, enquanto alguns foram mais eficazes, especificamente, para o *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* (LIN *et al*, 2012). Em outro estudo, dois novos compostos cumarínicos obtiveram êxito com uma atividade antifúngica significativa quando comparada ao fluconazol. (AL-AMIERY *et al*, 2012) e testadas contra as espécies de *Candidaalbicans* e de *Aspergillus niger*.

Por outro lado, as cumarinas também demonstraram ser eficazes na atividade anticancerígena. Um estudo realizado por Ahmad *et al* (2014) para avaliar a atividade anticancerígena sobre a linhagem celular A2780 de carcinoma epitelial do ovário humano inibiu a proliferação aproximadamente de 50% das células *in vitro* na concentração de 0,64 mg/ml. No estudo realizado por Kim e Om (2008), observaram que a esculetina (6,7-dihidroxycumarina) possuem um potente efeito citotóxico sobre a linhagem HT-20 (adenocarcinoma de cólon retal humano) com um efeito do tipo dose e tempo-dependente. O tratamento com 55 µg/ml reduziu a viabilidade celular em 50%.

5.3 CITOTOXICIDADE

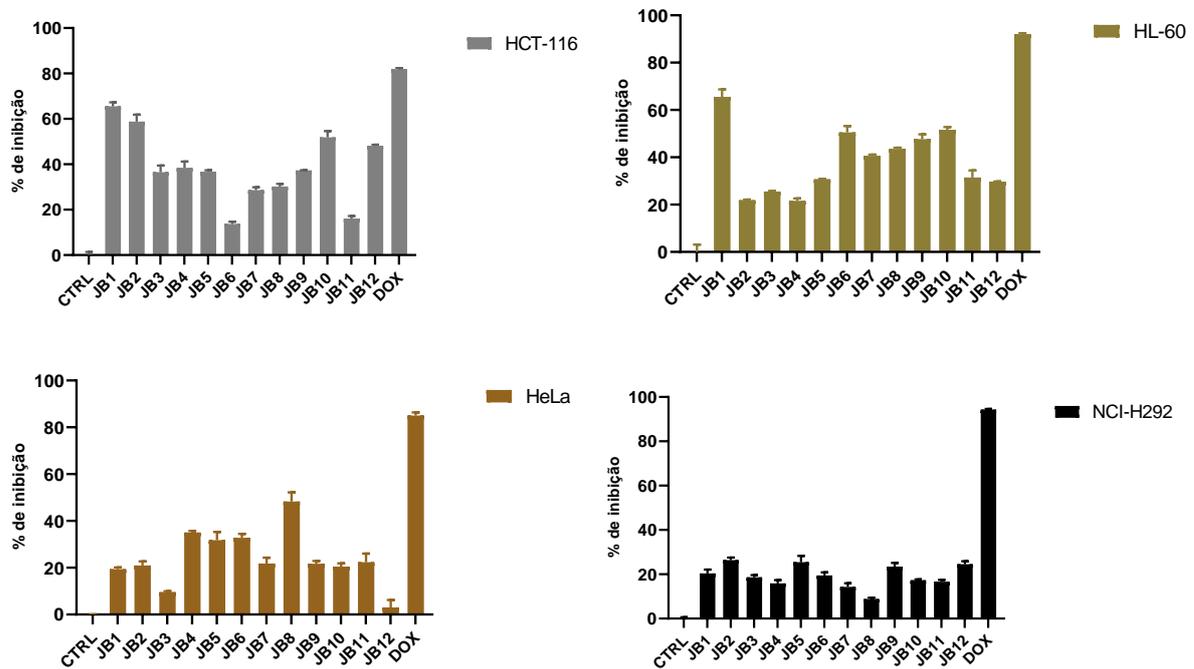
O percentual de inibição de crescimento das células PBMCs tratadas com os extrativos de Jurema Branca variaram entre $17,04 \pm 0,88$ e $38,66 \pm 1,81$. Nenhum dos extratos pode ser considerado citotóxico na concentração de $50 \mu\text{g/ml}$, pois apresentaram inibição abaixo de 50% das células mononucleadas conforme mostra o quadro 6. Isso aponta para uma baixa citotoxicidade para células do sistema hematopoiético, sendo um dado relevante na triagem de fármacos anticancerígenos uma vez que este tem como um dos principais efeitos adversos a mielossupressão. O perfil antitumoral dos extratos também foi avaliado e os resultados estão expressos no quadro 6. O Extrato bruto da casca (JB1) apresentou percentual de inibição de $65,50 \pm 1,78$ para a linhagem de câncer de colorretal e inibiu $65,53 \pm 3,13$ de crescimento da linhagem de leucemia promielocítica aguda. Esses dados permitem classificar o extrato JB1 dentro da escala de atividade citotóxica moderada.

Os doze extrativos de Jurema Branca apresentaram perfil de inibição bem semelhante com valores de inibição da linhagem NCI-H292 abaixo de 30%, segundo Rodrigues *et al* (2014), as amostras que apresentarem perfil de inibição celular abaixo de 50% não podem ser consideradas citotóxicas, portanto para esta célula, as amostras em estudo não apresentaram atividade.

As amostras testadas com a linhagem HeLa também apresentaram baixo percentual de inibição de proliferação dessas células. Apenas a amostra JB8 (coluna filtrante AcOEt) destacou-se entre as demais com perfil de inibição de 48% de crescimento celular.

Os produtos JB2 (coluna filtrante casca AcOEt), JB6 (extrato fracionado casca MeOH), JB10 (extrato fracionado folha hex) testados na concentração de $50 \mu\text{g/ml}$ inibiram cerca de 50% da proliferação celular para pelo menos uma linhagem cancerígena testada (quadro 6).

Figura 8 – Percentual de Inibição dos extratos de Jurema Branca testados em células tumorais. Os extratos foram testados na concentração de 50 µg/ml



Fonte: O autor.

Quadro 6 – Percentual de inibição do crescimento celular (IC %) dos extratos de Jurema Branca em linhagens de células normais e tumorais na concentração de 50 µg/ml através do método colorimétrico MTT após 72 horas de tratamento.

Extratos	HCT-116	HL-60	HeLa	NCI-H292	PBMCs (%IC)
JB1	65,50 ± 1,78	65,56 ± 3,135	19,33 ± 0,77	20,37 ± 1,75	21,67 ± 0,58
JB 2	58,75 ± 3,15	21,84 ± 0,26	20,91 ± 1,81	26,34 ± 1,18	26,18 ± 1,84
JB 3	36,54 ± 2,93	25,52 ± 0,22	9,55 ± 0,40	18,60 ± 1,05	22,17 ± 0,91
JB 4	38,44 ± 2,79	21,64 ± 0,98	35,00 ± 0,70	15,85 ± 1,49	17,04 ± 0,88
JB 5	36,68 ± 0,67	30,70 ± 0,16	31,76 ± 3,55	25,42 ± 2,89	20,11 ± 1,14
JB 6	13,74 ± 0,97	50,53 ± 2,70	32,76 ± 1,67	19,45 ± 1,44	18,94 ± 0,88
JB 7	28,58 ± 1,32	40,66 ± 0,46	21,79 ± 2,48	14,25 ± 1,73	25,01 ± 2,59
JB 8	30,18 ± 1,20	43,57 ± 0,43	48,28 ± 3,92	8,77 ± 0,62	38,66 ± 1,81
JB 9	37,33 ± 0,07	47,70 ± 1,97	21,68 ± 1,16	23,45 ± 1,63	24,06 ± 1,64
JB 10	51,85 ± 2,75	51,64 ± 1,12	20,48 ± 1,43	17,31 ± 0,40	25,96 ± 2,51
JB 11	16,09 ± 1,07	31,48 ± 2,97	22,39 ± 3,65	16,65 ± 0,76	26,35 ± 2,10
JB 12	48,10 ± 0,55	29,70 ± 0,08	3,05 ± 3,17	24,57 ± 1,27	20,50 ± 1,51
DOX	81,85 ± 0,52	92,04 ± 0,41	85,03 ± 1,35	94,28 ± 0,33

Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão do percentual de inibição do crescimento celular das células: HCT-116 (câncer de colorretal humano), HL-60 (leucemia promielocítica aguda); HeLa (câncer cervical humano); NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano) tratadas com os extratos orgânicos em relação ao controle negativo.

Fonte: O autor.

Ao analisar o quadro 6, é possível observar que as frações JB1 (extrato bruto), JB6 (extrato fracionado casca MeOH) e JB10 (extrato fracionado folha hexânico) apresentaram potencial de inibição frente a células HL-60 ($65,56 \pm 3,135$; $65,56 \pm 3,135$; $51,64 \pm 1,12$, respectivamente) assim como os extratos fracionados das folhas da espécie *Bauhinia rufa* também pertencente à família *Fabaceae*, cujo o potencial de inibição variou de 64,65% até 94,05 diante da linhagem celular de leucemia promielocítica aguda (SILVA JÚNIOR *et al*, 2018).

Enquanto que os extratos JB1 (extrato bruto), JB2 (coluna filtrante casca AcOEt) e JB10 (extrato fracionado folha hexânico) mostraram bom percentual de inibição frente a linhagem HCT 116, $65,50 \pm 1,78$; $58,75 \pm 3,15$ e $51,85 \pm 2,75$, respectivamente. No estudo realizado por Silva Júnior *et al* (2018), os extratos de *B. rufa* não demonstraram bom potencial de inibição diante de células de câncer de mama humano.

No presente trabalho as frações submetidas ao estudo não demonstraram ser capazes de inibir o crescimento das células NCI-H292 quando comparadas ao fármaco controle, corroborando com o estudo realizado por Silva (2013), onde foi analisada a atividade citotóxica de extratos metanólicos das folhas de *Senna alata* e *Senna siamea*. Os resultados da citotoxicidade das espécies não apresentaram efeito satisfatório de CE_{50} frente a linhagem de carcinoma de pulmão humano, apenas frente à MCF-7 (adenocarcinoma mamário humano).

As frações que demonstraram os melhores resultados diante das linhagens submetidas aos estudos apresentaram altos teores de flavonoides e cumarinas (JB2, JB6, JB8 e JB10). Portanto, a elucidação dos compostos presentes nessas frações é um caminho interessante, uma vez que se pode identificar o provável grupo de metabólitos responsável por essa diferença de atividade entre os extratos obtidos com solventes de polaridade crescente e o extrato bruto

6 CONCLUSÃO

A partir das análises dos resultados, pode-se observar que há diferenças entre os rendimentos dos métodos extrativos escolhidos, sendo os extratos com maior percentual de rendimento, os com alta polaridade tanto para casca quanto para folha de *Chloroleucon Extortum*. Apesar de pouco se saber sobre o espécime oriundo da Caatinga, popularmente conhecida como Jurema Branca, o presente estudo também forneceu informações relevantes acerca da presença de metabólitos secundários da espécie que através das técnicas de extração e obtenção de extratos com diferentes polaridades, tanto da casca quanto da folha, para que assim seja possível chegar ao isolamento de princípios ativos importantes na produção de novos fitoterápicos. Foi possível quantificar e qualificar os mesmos através de técnicas específicas e com isso o resultado fitoquímico das amostras mostrou a presença de todos os metabólitos em estudo com diferentes concentrações de seus metabólitos sendo a folha de Jurema Branca a parte mais promissora em relação a essa avaliação.

Em relação aos testes de citotoxicidade, foi evidenciado que os extratos de *Chloroleucon Extortum* não apresentaram efetividade sobre células normais, sendo mais seletivos para as células tumorais. Já o extrato bruto de casca (JB1) apresentou um percentual de inibição moderado, tanto para células de linhagem de câncer de color retal (HCT116) quanto para linhagem de leucemia promielocítica aguda (HL-60). O extrato de acetato de etila da folha obtido por coluna filtrante apresentou um perfil de inibição de 48% de crescimento celular frente à linhagem de câncer cervical humano (HeLa).

Com esses resultados foi demonstrada a importância de uma investigação preliminar dos extratos de plantas utilizadas na medicina popular, bem como a dose e a forma com que estes extratos são utilizados pela população necessitam de investigações científicas, sendo imprescindível a estimulação destes estudos.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, R. A. *et al.* Antiproliferative Activity of Coumarin and Cinnamon Water Extracts on Human Ovarian Cancer Cells. **Latin American Journal of Pharmacy**. [s.l.], v. 33, n. 6, p. 960-965, 2014.
- AL-AMIERY, A. A. *et al.* Antifungal Activities of New Coumarins. **Molecules**. [s.l.], v. 17, n. 5, p. 5713-5723, 2012.
- ALBUQUERQUE, U. P.; SILVA, A. C. O. Woody medicinal plants of the caatinga in the state of Pernambuco (Northeast Brazil). **Acta Bot. Bras.** São Paulo, n. 19, v. 1, p. 17-26, 2005.
- ALBUQUERQUE, U. P. *et al.* Medicinal plants of the Caatinga (semiarid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**. [s.l.], v. 114, n. 3, p. 325-354, 2007.
- ALENCAR, N. L.; ARAÚJO, T. A. A.; AMORIM, E. L. C. The Inclusion and Selection of Medicinal Plants in Traditional Pharmacopoeias-Evidence in Support of the Diversification Hypothesis. **Economic Botany**. [s.l.], v. 64, n. 1, p. 68-79, 2010.
- ALENCAR, N. L. *et al.* Can the Apparency Hypothesis explain the selection of medicinal plants in an area of Caatinga vegetation? A chemical perspective. **Acta Botanica Brasilica**. [s.l.], v. 23, n. 1, p. 908-909, 2009.
- ALLEY, M. C. *et al.* Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer Research**. [s.l.], v. 48, n. 3, p. 589- 601, 1988.
- ALMEIDA, C. F. C. B. R.; ALBUQUERQUE, U. P. Uso e conservação de plantas e animais medicinais no estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil): um estudo de caso. **Interciência**. [s.l.], v. 26, n. 6, p. 276-285, 2002.
- ALMEIDA, C. F. C. B. R. *et al.* Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the Caatinga (Northeast Brazil). **Journal of arid Environments**. [s.l.], v. 62, n. 1, p. 127-142, 2005.
- ALMEIDA, P. G. C. de; SOUZA, E.; QUEIROZ, L. Flora da Bahia: Leguminosae–Aliança *Chloroleucon* (*Mimosoideae: Ingeae*). **SITIENTIBUS série Ciências Biológicas**. [s.l.], v. 15, n. 1, não p., 2015.
- AMADO, N. G. *et al.* Flavonoids: potential wnt/beta-catenin signaling modulators in cancer. **Life Sci**. [s.l.], v. 89, n. 15-16, p. 545-554, 2011.
- AMORIM, E. L. C. *et al.* A simple and accurate procedure for the determination of tannin and flavonoid levels and some applications in ethnobotany and ethnopharmacology. **Functional Ecosystemsand Communities**. [s.l.], v. 2, n. 1, p. 88-94, 2008.

ARAÚJO, T. A. S. *et al.* A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**. [s.l.], v. 120, n. 1, p.72-80. 2008.

ARAÚJO, T. A. S. *et al.* Habitat influence on antioxidant activity and tannin concentrations of *Spondias tuberosa*. **Pharmaceutical Biology**. [s.l.], v. 6, n. 50, p. 754-759, 2012.

ARAÚJO FILHO, J. A. **Manejo pastoril sustentável da Caatinga**. Recife: Projeto Dom Helder Câmara, 2013.

AVILA-PIRES, F. D. Teoria e Prática das Práticas Alternativas. **Rev. Saúde Pública**. São Paulo, v. 29, n. 2, p. 147-51, 1995.

AYRES, M. *et al.* Bio Estat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. **Sociedade Civil Mamirauá**. Belém/PA, v. 1, n. 1, p. 364, 2007.

AZMIR, J. *et al.* Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. **Journal of Food Engineering**. [s.l.], v. 117, n. 4, p. 426–436, 2013.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**. [s.l.], v. 78, n. 5, p. 431-441, 2005.

BASILA, D.; YUAN, C. S. Effects of dietary supplements on coagulation and platelet function. **Thrombosis Research**. [s.l.], v. 117, n. 1-2, p. 49-53, 2005.

BATITUCCI, M. C. P. **Estudo dos efeitos cardiovasculares do extrato hidroalcoólico de plantas do gênero Solanum**: aspectos fisiofarmacológicos e citogenéticos. Tese [Doutorado em Ciências Fisiológicas]. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória-ES, 2005.

BELCAVELLO, L. *et al.* Citotoxicidade e danos ao DNA induzidos pelo extrato de *Zorniadiphylla*, uma planta medicinal. **Natureza on line**. Santa Teresa, v. 10, n. 3, p. 140-145, 2012.

BERRIDGE, M. V.; HERST, P. M.; TAN, A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. **Biotechnology Annual Review**. [s.l.], v. 11, n. 1, p. 127–152, 2005.

BERRIDGE, M. V.; TAN, A. N. S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. **Archives of biochemistry and biophysics**. [s.l.], v. 303, n. 2, p. 474-482, 1993.

BORGES, C. de S. *et al.* Efeitos citotóxicos e alelopáticos de extratos aquosos de *Ricinus communis* utilizando diferentes bioindicadores. **Tecnol. & Ciên. Agropec.** João Pessoa, v. 5, n. 3, p. 15-20, set. 2011.

BRAND, M. Potencial de uso da biomassa florestal da Caatinga, sob manejo sustentável, para geração de energia. **Ciência Florestal**. Santa Maria, v. 27, n. 1, p. 117-127, 2017.

BRASIL. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Monitoramento do desmatamento nos biomas brasileiros por satélite acordo de cooperação técnica MMA/IBAMA monitoramento do bioma Caatinga**. Brasília/DF: IBAMA, 2009.

BRASIL. SINITOX – Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas. **Casos de intoxicação**. 2009. Disponível em: <https://sinitox.iciet.fiocruz.br/>. Acesso em: 16 nov. 2019.

BRUNETON, J. **Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia**. Barcelona: Editora Acribia, 1991.

BUCAR, F.; WUBE, A.; SCHMID, M. Natural product isolation – how to get from biological material to pure compounds. **Natural Product Reports**. [s.l.], v. 30, n. 4, p. 525-545, 2013.

CALIXTO JÚNIOR, J. T.; DRUMOND, M. A. Estudo comparativo da estrutura fitossociológica de dois fragmentos de Caatinga em níveis diferentes de conservação. **Pesquisa Florestal Brasileira**. Colombo, v. 34, n. 80, p. 345-355, 2014.

CARTAXO, S. L.; SOUZA, M. M. A.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. [s.l.], v. 131, n. 2, p. 326-342, 2012.

CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos antiinflamatórios**: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004.

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

CHUNG, K. T. *et al.* Tannins and human health: a review. **Crit Rev Food Sci Nutr**. [s.l.], v. 38, n. 6, p. 421-464, 1998.

COLLIER, A. C.; PRITSOS, C. A. The mitochondrial uncoupler dicumarol disrupts the MTT assay. **Biochemical pharmacology**. [s.l.], v. 66, n. 2, p. 281-287, 2003.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and development. **Journal Of Natural Products**. [s.l.], v. 60, n. 1, p. 52-60, 1997.

CUJIC, N. *et al.* Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. **Food Chemistry**. [s.l.], v. 194, n. 1, p. 135-142, 2016.

DESTRO, M. W. B.; SPERANZINI M. B.; DESTRO, C. Estudo da utilização no pré-operatório de medicamentos ou drogas fitoterápicas que alteram a coagulação sanguínea. **Rev Col Bras Cir**. Rio de Janeiro, v. 33, n. 2, p. 107-111, 2006.

DOYLE, J. J.; LUCKOW, M. The rest of the iceberg- Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. **Plant Physiology**. [s.l.], v. 131, n. 3, p. 900-910, 2003.

FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environmental Health Perspectives**. [s.l.], v. 109, n. 1, p. 69-75, 2001.

FAHN, A.; CUTLER, D. F. Xerophytes. In: SPEZ (ed.). **Encyclopedia of Plant Anatomy**. Berlin: Gebrüder Borntraeger, 1992, p. 87-98.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: EDUFSC, 2010. p. 229-246.

FERRANDIZ, M. L.; ALCARAZ, M. J. Antiinflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. **Agents Actions**. [s.l.], v. 32, n. 3-4, p. 283-288, 1991.

FERREIRA JUNIOR, W. S.; LADIO, A. H.; ALBUQUERQUE, U. P. Resilience and adaptation in the use of medicinal plants with suspected anti-inflammatory activity in the Brazilian Northeast. **Journal of Ethnopharmacology**. [s.l.], v. 138, n. 1, p. 238-252, 2011.

FREIRE, A. F. M. **A seqüência holocênica na plataforma continental central do Estado da Bahia – costa do cacau**. 2006. 172 f. Dissertação (Mestrado em GEOLOGIA)-Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia Brasil, Bahia.

HEGNAUER, R.; GRAYER-BARKMEIJER, R. J. Relevance of seed polysaccharides and flavonoids for the classification of the *Leguminosae*: a chemotaxonomic approach. **Phytochemistry**. [s.l.], v. 34, n. 1, p. 3-16, 1993.

IGNOATO, M. C. **Contribuição ao estudo fitoquímico e atividades biológicas de *Aeschynomene fluminensis* e de *Machaeriumhirtum* (Fabaceae)**. 2012. 209 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Maringá, Porto Rico-Paraná.

JARDINE, J. G.; BARROS, T. D. **Árvore do conhecimento, agroenergia: Soja**. EMBRAPA. 2015. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agroenergia/arvore/CONT00>. Acesso em: 20 out. 2019.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 11. ed. São Paulo: Editora Nacional, 1993.

KIM, J. H.; OM, A. A quantitative structure-activity relationship model for radical scavenging activity of flavonoids. **Journal of Medicinal Food**. [s.l.], v. 11, n. 1, p. 29-37, 2008.

KOWALSKA, I. *et al.* Isolation, chemical characterization, and free radical scavenging activity of phenolics from *Triticum aestivum* L. aerial parts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. [s.l.], v. 62, n. 46, p. 11200–11208, 2014.

LEWIS, G. **Legumes of the world**. Kew: Royal Botanic Gardens. 2005. Disponível em: <https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/>. Acesso em: 10 dez. 2019.

- LIN, C. S. *et al.* Phytochemical composition, antioxidant activity, and neuroprotective effect of *Terminalia chebula* Retzius extracts. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. [s.l.], v. 2, n. 1, p. 1-7, 2012.
- LIU, Y. *et al.* Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. **Journal of Neurochemistry**. [s.l.], v. 69, n. 2, p. 581-593, 1997.
- LOIOLA, M. I. B. *et al.* Leguminosas e seu potencial de uso em comunidades rurais de São Miguel do Gostoso-RN. **Revista Caatinga**. Mossoró, v. 23, n. 3, p. 59-70, 2010.
- MACIEL, M. M. *et al.* Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**. Rio de Janeiro, v. 8, n. 25, p. 429-438, 2002.
- MELO, P. S. **Derivados da desidrocrotina: síntese, atividade antiulcerogênica e citotoxicidade**. 2000. 116 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.
- MELLO, J. C. P. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Porto Alegre: Ed.UFRGS/Ed.UFSC, 2000.
- MIRANDA, M. V. *et al.* Controle de qualidade de amostras comerciais de *Schinus molle* L. (Aroeira) adquiridas em mercados públicos da cidade de São Luís-MA. **Biota Amazônia**. Macapá, Amapá, v. 6, n. 1, p. 83-90, 2016.
- MONTEIRO, J. M. *et al.* Use patterns and knowledge of medicinal species among two rural communities in Brazil's semi-arid northeastern region. **Journal of Ethnopharmacology**. [s.l.], v. 105, n. 1-2, p. 173-186, 2006.
- MORAES, D. **In vivo: FIOCRUZ: Bioma Caatinga**, 2016. Disponível em: <http://www.invivo.fiocruz.br/>. Acesso em: 2 jul. 2019.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. [s.l.], v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- NOGUEIRA, R. C.; DE CERQUEIRA, H. F.; SOARES, M. B. P. Patenting bioactive molecules from biodiversity: the Brazilian experience. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**. [s.l.], v. 20, n. 2, p. 145-157, 2010.
- OECD Test. 487: In vitro mammalian cell micronucleus test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section, v. 4, 2010. Disponível em: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/test-no-487-in-vitro-mammalian-cell-micronucleus-test-9789264264861-en.htm>. Acesso em: 4 nov. 2019.
- OLIVEIRA, M. J. R.; SIMÕES, M. J. S.; SASSI, C. R. R. Fitoterapia no sistema de saúde pública (SUS) no Estado de São Paulo, Brasil. **Rev Bras PIMed**. [s.l.], v. 8, n. 2, p. 39-41, 2006.

OSORIO, A. C.; MARTINS, J. L. S.; Determinação de cumarina em extrato fluido e tintura de guaco por espectrofotometria derivada de primeira ordem. **Rev. Brasileira de Ciências Farmaceuticas**. [s.l.], v. 4, n. 40, não p. 2004.

PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S. *et al.* Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. [s.l.], v. 44, n. 4, p. 683-689, 2008.

PINHO, D. S. *et al.* Avaliação da atividade mutagênica da infusão de *Baccharis trimera* (Less.) DC. em teste de *Allium cepa* e teste de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. [s.l.], v. 20, n. 2, p. 165-170, 2010.

QUEIROZ, L. P. *et al.* **Leguminosas da Caatinga**. Feira de Santana: UEFS, 2009.

QUEIROZ, M. A. Recursos Genéticos Vegetais da Caatinga para o Desenvolvimento do Semiárido Brasileiro. **Revista Brasileira de Geografia Física**. [s.l.], v. 4, n. 6, p. 1135-1150, 2011.

ROCHA, M. T. A. **Efeitos de *Momordica charantia* L. em ratos diabéticos**. 2010. 72 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola). Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais, 2010.

RODRIGUES, F. A. R. *et al.* Mefloquine-oxazolidine derivatives: a new class of anticancer agents. **Chem Biol Drug Des**. [s.l.], v. 83, n. 1, p. 126-131, 2014.

ROQUE, A. A.; ROCHA, R. M.; LOIOLA, M. I. B. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (Nordeste do Brasil). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu**. Botucatu, v. 12, n. 1, p. 31-42, 2010.

SANTOS, W. S. *et al.* Estudo fitossociológico em fragmento de Caatinga em dois estágios de conservação, Patos, Paraíba. **AGROPECUÁRIA CIENTÍFICA NO SEMIÁRIDO**. Patos, v. 13, n. 4, p. 315-321, 2017.

SANTOS, D. S.; RODRIGUES, M. M. F. Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão. **Estação Científica (UNIFAP)**. Macapá, v. 7, n. 3, p. 29-35, 2017.

SASIDHARAN, S. *et al.* Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants extracts. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**. [s.l.], v. 8, n. 1, p. 1-10, 2011.

SCHMALZ, G., SCHWEIK, H. Characterization of an in vitro dentin barrier test using standard toxicant. **J Endod**. [s.l.], v. 20, n. 12, p. 592-594, 1994.

SEIDEL, V. Initial and Bulk Extraction. *In*: S. D. LATIF, S. Z.; SARKER, S. D. (Orgs.). **Natural Products Isolation**. 2 ed. Totowa, New Jersey: Humana Press, p. 27-46, 2006.

SILVA, C. H. T P. *et al.* Antioxidant capacity and phenolic content of *Caesalpinia pyramidalis* Tul. and *Sapium glandulosum* (L.) Morong from Northeastern Brazil. **Molecules**. [s.l.], v. 6, n.16, p. 4728-4739, 2011.

SILVA, J. P. **Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato aquoso bruto da casca de *Bowdichiavirgilioides Kunth***. 2009. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2009.

SILVA, G. K. C. **Caracterização química e Atividade biológica de *Senna alata* L. ROXB e *Senna siamea* LAM. (Fabaceae)**. 2013. 137 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

SILVA, A. *et al.* Utilização e aceitação do tratamento com plantas medicinais em Roque Gonzales, RS. **Revista Contexto & Saúde**. Ijuí, v. 15, n. 29, p. 104-111, 2015.

SILVA JÚNIOR, W. M. *et al.* Avaliação da Atividade citotóxica das folhas de *Bauhinia rufa* (Bong.) Steud. (Fabaceae) contra linhagem de células tumorais. **Revista Processos Químicos**. [s.l.], v. 12, n. 23, p. 43-46, 2018.

SILVA, H. R. *et al.* Constituintes químicos das cascas do caule de *Cenostigmamacrophyllum*: ocorrência de colesterol. **Quim. Nova**. São Paulo, v. 30, n. 8, p. 1877-1881, 2007.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* Pharmacological investigations on *Achyroclinesatureioides* (Lam.) DC., compositae. **J. Ethnopharmacol.** [s.l.], v. 22, n. 3, p. 281-293, 1988.

SIQUEIRA FILHO, J. A. **A flora das Caatingas do Rio São Francisco: história natural e conservação**. Rio de Janeiro: Editora Andrea Jakobsson, 2012.

SIRIKHWAN, T. Comparação de atividades antioxidantes e antimicrobianas de extratos de frutas maduras e maduras de *Momordica Cochinchinesis* Spreng (Gac Fruit). **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**. [s.l.], v. 28, n. 1, p.75-82, 2014.

SOUZA, B. V. de. *et al.* Avaliação da sazonalidade da deposição de serapilheira em área de preservação da Caatinga na Paraíba, Brasil. **Agropecuária Científica no Semiárido**. Patos/PB, v. 12, n. 3, p. 325-331, 2017.

SOUZA, M. A. *et al.* Comparação das atividades antineoplásica e antioxidante do triterpenoslupeol em plantas da Caatinga. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental**. Pombal, v. 13, n. 3, p. 1-4, 2019.

THIAGO, S. C. S.; TESSER, C. D. Percepção de médicos e enfermeiros da Estratégia de Saúde da Família sobre terapias complementares. **Rev Saúde Pública**. São Paulo, v. 45, n. 2, p. 249-257, 2011.

THOMSON, A. B.; WALLACE, W. H. B. Treatment of paediatric Hodgkin's disease: a balance of risks. **European Journal of Cancer**. [s.l.], v. 38, n. 4, p. 468-477, 2002.

VARELA, D. S. S; AZEVEDO, D. M. Saberes e práticas fitoterápicas de médicos na estratégia saúde da família. **Trab Educ Saúde**. Rio de Janeiro, v. 12, n. 2, p. 273-290, 2014.

VIGO, C. L. S. *et al.* Caracterização farmacognóstica comparativa de *Pfaffiaglomerata* (Spreng.) Pedersen e *Hebanthepaniculata* Martius – Amaranthaceae Kuntze. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v. 6, n. 2, p. 7-19, 2004.

VONGSAK, B. *et al.* Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. **Industrial Crops and Products**. [s.l.], v. 44, n. 1, p. 566-571, 2013.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis**. 2 ed. New York: Springer Verlag, 1995.