

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

MARIA CECÍLIA LIMA VIEIRA DE MELO

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE,
ANTIMICROBIANO E ANTINEOPLÁSICO DO EXTRATO AQUOSO DE RAMOS
DE *Krameria tomentosa* A. ST. -HIL (KRAMERIACEAE)**

Recife
2018

MARIA CECÍLIA LIMA VIEIRA DE MELO

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE,
ANTIMICROBIANO E ANTINEOPLÁSICO DO EXTRATO AQUOSO DE RAMOS
DE *Krameria tomentosa* A. ST. -HIL (KRAMERIACEAE)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia.

Área de concentração: Bioquímica / Produtos Naturais

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Maria Tereza dos Santos Correia

Coorientador: Prof^º. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

Recife

2018

Catálogo na fonte
Elaine C. Barroso (CRB4/1728)

Melo, Maria Cecília Lima Vieira de

Avaliação da toxicidade e do potencial antioxidante, antimicrobiano e antineoplásico do extrato aquoso de ramos de *Krameria tomentosa* A. ST.-HIL (Krameriaceae) / Maria Cecília Lima Vieira de Melo- 2018.

93 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Maria Tereza dos Santos Correia

Coorientador: Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia. Recife, 2018.

Inclui referências, apêndice e anexos

1. Plantas medicinais 2. Toxicidade 3. Câncer I. Correia, Maria Tereza dos Santos (orient.) II. Rêgo, Moacyr Jesus Barreto de (coorient.) III. Título

615.321

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-429

MARIA CECÍLIA LIMA VIEIRA DE MELO

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE,
ANTIMICROBIANO E ANTINEOPLÁSICO DO EXTRATO AQUOSO DE RAMOS
DE *KRAMERIA TOMENTOSA* A. ST. HIL (KRAMERIACEAE)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Bioquímica e Fisiologia.

Aprovada em: 07 / 02 / 2018

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Maria Tereza dos Santos Correia (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^º. Dr. Thiago Henrique Napoleão (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco – DBioq

Dr^ª. Marina Ferraz Cordeiro (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco – LINAT

Dr^ª. Raiana Apolinário de Paula (Examinadora Externa)
Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste - CETENE

Dedico este trabalho aos meus pais, Aldo e Angela, ao meu irmão, Bruno e ao meu amor, Rodrigo, por permanecerem sempre comigo ao longo da minha caminhada acadêmica, me apoiando, orientando e acreditando na minha capacidade de superação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por tudo que até hoje ele me possibilitou conquistar e por todas as bênçãos derramadas sobre mim ao longo da minha caminhada.

Agradeço aos meus pais, Aldo e Angela, pela educação, amor e carinho dedicados a mim e por permanecerem sempre ao meu lado em todas as situações, me amparando, orientando e apoiando as minhas escolhas.

Agradeço ao meu irmão Bruno e ao meu companheiro Rodrigo, por sempre estarem presentes, me apoiando e me ajudando a enfrentar todos os obstáculos da melhor maneira possível.

Agradeço ao Departamento de Bioquímica da UFPE a todos que fazem parte dele por terem me acolhido carinhosamente e passado um conhecimento essencial para minha trajetória acadêmica na pesquisa.

Agradeço de forma especial a minha Orientadora Professora Maria Tereza, que acreditou em mim, me dando a chance de conhecer e aprender um pouco mais sobre a carreira científica e seus obstáculos.

Agradeço carinhosamente ao meu Co Orientador Professor Moacyr Barreto, que me acolheu, orientou e proporcionou sempre que precisei todo o apoio necessário para realização dos meus trabalhos.

Agradeço aos meus colegas e amigos do Laboratório de Biologia Molecular, Bárbara Ramos, Camilla Paiva, Amanda Virgínia, Sivoneide Maria, Vitória Araújo, Daíllo Augusto, Rafael Artur, Marília Manta, Natália Lira pelo conhecimento compartilhado, pelas ajudas e conselhos dados durante esses dois anos de mestrado.

Em especial também agradeço a Marina Ferraz e Fernanda Gomes, pela paciência e por toda ajuda dedicada na realização dos experimentos

Por fim, agradeço aos meus amigos e familiares que torceram e comemoraram comigo todas as minhas conquistas desde o início da minha jornada acadêmica.

RESUMO

A utilização de plantas para fins medicinais é bastante difundida em todo o mundo. No Brasil, são poucas as pesquisas que avaliam o grau de utilização das plantas como medicamentos e sua aplicação na cultura popular. O gênero *Krameria* é o único membro da família Krameriaceae, composta por 18 espécies herbáceas ou arbustivas encontradas na região neotropical, que compreende desde a América Central, incluindo o México, até a América do Sul. Há relatos que a espécie *Krameria tomentosa* já é utilizada na medicina popular no tratamento de algumas doenças e por isso foi escolhida para ser avaliada em relação a sua toxicidade e sua ação antioxidante, antibacteriana e antitumoral, que ainda não foram comprovadas cientificamente. O extrato aquoso de ramos de *K. tomentosa* (EAq KT) foi submetido à triagem fitoquímica preliminar para detecção das principais classes de metabólitos existentes e em seguida foi realizada a dosagem de flavonoides e fenóis totais, que determinou a quantidade desses compostos no extrato. A atividade antioxidante do extrato foi avaliada por cinco métodos distintos (DPPH, SOD, FRAP, TAC e LPIC) e a atividade antimicrobiana foi determinada através do método de microdiluição em caldo, que analisou a concentração mínima inibitória (CMI) e a concentração mínima bactericida (CMB). A atividade antitumoral do extrato foi avaliada em relação a linhagem de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e também quanto as linhagens tumorais de HL-60, MOLT-4, K562, DU145 e PANC-1, pelos métodos de redução do MTT e exclusão pelo azul de tripan. Além disso, foi realizada uma análise toxicológica de EAq KT de acordo com o guia 423 da OECD, que avaliou o grau de toxicidade do extrato pelo ensaio de toxicidade aguda oral (in vivo). Também foram avaliados os parâmetros bioquímicos hepáticos e renais para determinar se o extrato provocou danos aos órgãos e tecidos. Diante do que foi proposto, este estudo teve como objetivo identificar o perfil fitoquímico, avaliar a toxicidade e determinar a capacidade antioxidante, antimicrobiana e antitumoral do extrato aquoso de *K. tomentosa*, para que ele possa ser um futuro candidato a novo fármaco.

Palavras-chave: Plantas medicinais. Antioxidante. Câncer. Toxicidade.

ABSTRACT

The use of plants for medical purposes is well adopted throughout world. In Brazil, few researches evaluate the degree of use of plants as medicines and their application in popular culture. The genre *Krameria* is the only member of the Krameriaceae family, comprised by 18 species herbaceous or shrub species found in the Neotropical region, from Central America, including Mexico, to South America. Reports have shown that the *Krameria tomentosa* species is already used in popular medicine, to treat a variety of diseases, and that is the reason why it was chosen to be evaluated regarding its toxicity and antioxidative, antibacterial and antitumor effects, which have not yet been scientifically proven. The aqueous extracts of *K. tomentosa* (EAq KT) were subjected to preliminary phytochemical screening to detect the main classes of metabolites and then the total flavonoids and phenols were determined, which determined the amount of these compounds in the extract. The antioxidant activity of the extract was evaluated by five different methods (DPPH, SOD, FRAP, TAC and LPIC) and the antimicrobial activity was determined by the broth microdilution method, which analyzed the minimum inhibitory concentration (CMI) and minimum bactericidal concentration (CMB). The antitumor activity of the extract was evaluated in relation to the peripheral blood mononuclear cell lineage (PBMC) and also the HL-60, MOLT-4, K562, DU145 and PANC-1 tumor cell lines by MTT reduction methods and trypan blue exclusion. In addition, a toxicological analysis of EAq KT was performed according to OECD Guideline 423, which assessed the toxicity of the extract by oral (in vivo) acute toxicity test. Hepatic and renal biochemical parameters were also evaluated to determine if the extract caused any organ and tissue damage. The objective of this study was to identify the phytochemical profile, to evaluate the toxicity and to determine the antioxidant, antimicrobial and antitumor capacity of the aqueous extract of *K. tomentosa*, so that it may be considered a future candidate for a new drug.

Keywords: Medicinal plants. Antioxidant. Cancer. Toxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação simplificada de algumas rotas biosintéticas para produção de metabólitos secundários.....	21
Figura 2 - Fatores que podem interferir na composição química dos metabólitos secundários dos vegetais	22
Figura 3 - Esquema das rotas metabólicas que dão origem aos compostos fenólicos	24
Figura 4 - Estrutura básica dos flavonoides.	25
Figura 5 - Estrutura química das principais classes de flavonoides.	26
Figura 6 - Mapa dos estados brasileiros que apresentam o bioma Caatinga.	27
Figura 7 - Desenho ilustrativo da espécie <i>K. tomentosa</i>	31
Figura 8 - Espécies reativas causando danos em importantes macromoléculas biológicas	32
Figura 9 - Mecanismos de resistência bacteriana - (A) Inativação da droga, (B) Modificação do alvo, (C) Impermeabilidade da membrana e (D) Bomba de efluxo	37
Figura 10 - Alterações celulares responsáveis pela formação de células tumorais	39
Figura 11 - Fases do ciclo celular.	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies que pertencem ao gênero <i>Krameria</i>	30
Tabela 2 - Classificação taxonômica da espécie <i>Krameria tomentosa</i>	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aa	Absorbância da Amostra
Aaa	Absorbância do Ácido Ascórbico
Ac	Absorbância do Controle
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CMB	Concentração Mínima Bactericida
CMI	Concentração Mínima Inibitória
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EAG	Equivalente de Ácido Gálico
EQ	Equivalente de Quercetina
ERRO	Espécie reativa de oxigênio
GSH	Glutathione Reduzida
GSH-Px	Glutathione Peroxidase
GSSG	Glutathione Oxidada
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IPA	Instituto Agrônomo de Pernambuco
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
O ₂ •	Radical superóxido
OH•	Radical hidroxila
OMS	Organização Mundial de Saúde
RNA	Ácido ribonucleico
RNS	Espécies Reativas de Nitrogênio
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RSS	Espécies Reativas de Enxofre
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SOD	Superóxido dismutase
SRL	Sequestro de Radicais Livres
TAC	Atividade Antioxidante Total
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UFPEA	Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Antibióticos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 OBJETIVOS	15
1.1.1 Objetivo Geral	15
1.1.2 Objetivos Específicos	15
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1 PLANTAS MEDICINAIS E SUAS APLICAÇÕES	16
2.2 METABOLISMO DAS PLANTAS	19
2.3 COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONOIDES	23
2.4 BIOMA CAATINGA.....	26
2.5 FAMÍLIA KRAMERIACEAE (<i>KRAMERIA TOMENTOSA</i>)	29
2.6 ESTRESSE OXIDATIVO E DEFESAS ANTIOXIDANTES	31
2.7 RESISTÊNCIA BACTERIANA	35
2.8 CÂNCER E O PROCESSO DE CARCINOGENÊSE.....	38
3 RESULTADOS.....	43
3.1 ARTIGO - INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTE, ANTIBACTERIANA E ANTINEOPLÁSICA DO EXTRATO AQUOSO DE RAMOS DE <i>KRAMERIA TOMENTOSA</i> A. ST. -HIL (KRAMERIACEAE).....	43
4 CONCLUSÃO.....	75
REFERÊNCIAS	76
ANEXO A - PARECER DO CEP	92
ANEXO B - PARECER DO CEUA	93

1 INTRODUÇÃO

O uso das plantas medicinais acompanha a história da humanidade desde a antiguidade. O ser humano procurou na natureza os recursos para sua sobrevivência e qualidade de vida, encontrando nas espécies vegetais propriedades alimentares, terapêuticas e outras finalidades (CLÁUDIO et al., 2006). A utilização de plantas no Brasil é uma prática comum consequente da forte influência cultural dos indígenas locais e das tradições africanas, provenientes do tráfico escravo no passado e da cultura europeia trazida pelos colonizadores (ALMEIDA, 2003). Muitos extratos obtidos de diversas espécies de plantas estão sendo usados na medicina popular no combate a várias doenças, devido a isso, a utilização dos produtos naturais aumentou nas últimas décadas pois começou a ganhar grande credibilidade em decorrência das importantes pesquisas farmacêuticas (STEEP, 2004; SOUZA & LORENZI, 2005). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 80% da população mundial, principalmente nos países subdesenvolvidos, utilizam as plantas medicinais para suprir suas necessidades médicas primárias (RATES, 2001).

A maioria das substâncias orgânicas conhecidas são provenientes de fontes naturais, porém, é o reino vegetal que tem participado de forma mais significativa na formação de um enorme arsenal terapêutico, devido à grande produção e fornecimento de metabólitos secundários. As espécies vegetais se destacam por possuir grande capacidade de biossintetizar metabólitos secundários com ação farmacológica. Os vegetais produzem a maior diversidade de compostos ativos usados na terapêutica, uma vez que, um extrato vegetal pode conter milhares de substâncias com propriedades físico-químicas diversificadas (HAMBURGUER & HOSTETTMANN, 1991; MONTANARI, 2001).

A diversidade de espécies medicinais encontradas nos biomas brasileiros constitui uma das mais importantes fontes de princípio ativo do planeta (BIESKI, 2005). O Brasil é um dos países com a maior cobertura vegetal nativa do mundo, totalizando 62 % do território nacional (SOARES-FILHO, 2013). Possui a maior biodiversidade do mundo, com 15 a 20 % do número total de espécies e é dono da maior riqueza de espécies da flora, com 40.989 espécies (FORZZA et al., 2010). No entanto, parte desta diversidade de espécies ainda não foi investigada em relação as suas propriedades terapêuticas, embora este seja um processo que vem progredindo significativamente (SIMÕES et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2009; CARTAXO et al., 2010). Em virtude disso, a exploração desse patrimônio exige maior conhecimento das espécies e dos seus usos, além da adoção de estratégias que permitam propagar esse conhecimento e de iniciativas

que valorizem e estimulem o uso desses recursos para todos os segmentos da sociedade (LEITE E CORADIN, 2011).

A utilização de plantas medicinais tornou-se tradicional no tratamento de diversas enfermidades, incluindo desde o combate ao câncer até a micro-organismos patogênicos (FLOGIO et al., 2006). Aproximadamente 50% dos medicamentos utilizados na atualidade são de origem sintética e apenas 25% são de origem natural, o que mostra a importância da procura e desenvolvimento de novos fármacos neste âmbito terapêutico, a fim de possibilitar reais oportunidades de controle da doença com menores efeitos adversos (FLOGIO et al., 2006; COSTA-LOTUFO et al., 2010).

Ao longo da história, os seres humanos batalham continuamente com uma quantidade imensurável de micro-organismos que causam infecções e doenças, resultando em altos índices de mortalidade. A partir do século XX, com a descoberta da penicilina por Alexander Fleming, os grandes avanços no desenvolvimento de medicamentos antibacterianos favoreceram os seres humanos nesta guerra. No entanto, pouco tempo depois que as drogas antibacterianas foram implantadas, as bactérias reagiram manifestando várias formas de resistência (TENOVER, 2006; HOWARD et al., 2013).

A resistência aos antimicrobianos tem causado grande impacto clínico e econômico aos sistemas de saúde, gerando um custo adicional de 10 a 40 mil dólares por paciente infectado com cepas multidrogas-resistentes. Se esta situação não mudar, estima-se que o impacto econômico será de 2,9 trilhões de dólares e mais de 10 milhões de mortes anuais em todo o mundo até 2050 (LAXMINARAYAN et al, 2013; FRIEDMAN et al, 2016). Sendo assim, tornou-se de grande importância a pesquisa de novos agentes para o combate de infecções (COSTA et al., 2005), estando as plantas medicinais dentre os produtos naturais de grande interesse científico devido à possibilidade de emprega-las como fitofármacos, proporcionando grandes chances de se obter moléculas protótipos em virtude da diversidade de seus constituintes (NASCIMENTO et al., 2000; PESSINI et al., 2003; DUARTE et al., 2004; MICHELIN et al., 2005; LIMA et al., 2006).

Os radicais livres e vários outros oxidantes foram apontados nos últimos anos como grandes causadores de doenças como o câncer, doenças cardiovasculares, catarata, enfraquecimento do sistema imune, disfunções cerebrais e a diabetes mellitus tipo I (SOUSA, et al., 2007). No organismo, os radicais livres desempenham diversos papéis, como produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. Entretanto, o excesso deles pode ser responsável por uma série de efeitos deletérios como peroxidação de lipídios da membrana, agressão às proteínas

dos tecidos, às enzimas, carboidratos e ao DNA, causando perda de fluidez da membrana e levando ao surgimento de câncer como consequência de alterações no DNA, envelhecimento precoce, doenças cardiovasculares, degenerativas e neurológicas, choque hemorrágico, catarata, entre outras doenças (ALVES et al., 2010; BARREIROS et al., 2006; RATHEE et al., 2006). Este excesso é combatido por moléculas antioxidantes, sejam elas endógenas ou exógenas, absorvidas na dieta. Os antioxidantes podem ser descritos como substâncias que apresentam a capacidade de retardar ou inibir a oxidação de moléculas oxidáveis (HALIWELL, 2001; SOUSA et al., 2007). A utilização de antioxidantes naturais, como os compostos fenólicos existentes em grande parte das plantas, inibe a produção de radicais livres e por esse motivo vem sendo associada a uma menor incidência de doenças ligadas ao estresse oxidativo (DROGE, 2002).

O câncer é considerado umas das mais importantes doenças que atingem a população mundial e por isso vem despertando o interesse científico e comercial para a descoberta de novos agentes com atividade anticancerígena. É a segunda maior causa de morte em todo o mundo, ficando atrás apenas das doenças cardiovasculares (WAMIQUE YUSUF & NEGI, 2012). É estimado que a cada ano, 6 milhões de novos casos ocorram em todo o mundo (IBRAHIM et al., 2013). O desenvolvimento de novos recursos medicamentosos para o tratamento desta doença utilizando plantas medicinais tem se tornado uma alternativa interessante para os especialistas da área, a fim de promover a eficácia e o controle de tumores primários assim como as metástases (KUMMAR, 2004).

Nesse contexto, é notável um ambiente esperançoso e produtivo para a pesquisa científica, sobretudo a brasileira, envolvendo a aplicação de conhecimentos locais sobre a utilização das plantas medicinais (LEITE, 2008).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Identificar o perfil fitoquímico, investigar a toxicidade e avaliar as propriedades antioxidante, antimicrobiana e antineoplásica do extrato aquoso de ramos de *Krameria tomentosa*.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Realizar extração para obtenção do extrato aquoso de *K. tomentosa* (EAq KT);
- Analisar o perfil fitoquímico de EAq KT;
- Quantificar o conteúdo total de fenóis e flavonoides presentes em EAq KT;
- Avaliar a atividade antioxidante de EAq KT;
- Avaliar a atividade antimicrobiana de EAq KT contra bactérias gram-positivas e gram-negativas;
- Determinar a citotoxicidade de EAq KT frente a células saudáveis do sangue periférico humano;
- Determinar a citotoxicidade de EAq KT frente a várias linhagens tumorais humanas;
- Avaliar a toxicidade aguda oral de EAq KT em camundongos (in vivo);

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 PLANTAS MEDICINAIS E SUAS APLICAÇÕES

A utilização de plantas no tratamento e na cura de enfermidades faz parte da cultura de diversas civilizações (HERNANDEZ et al., 2004). Registros históricos comprovam que na antiguidade, o homem já conhecia várias propriedades das plantas, destacando, entre elas, as medicinais (PELISSARI, 2008). O conhecimento popular sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais colabora significativamente para a divulgação dos benefícios terapêuticos dos vegetais, que são prescritos com frequência pelos efeitos medicinais que produzem, ainda que não apresentem seus componentes químicos identificados. Assim, usuários de plantas medicinais de todo o mundo, mantém o hábito de consumo de fitoterápicos, tornando válidas as informações terapêuticas, que vão sendo acumuladas durante séculos. De forma indireta, este tipo de informação estimula o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como a botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural: a flora mundial (MACIEL et al., 2002).

O uso dos produtos naturais surgiu há milhares de anos em diversos países com o objetivo de tratar inúmeras patologias. Estes eram utilizados pela população como forma alternativa ou complementar aos medicamentos sintéticos. As plantas medicinais possuem um papel fundamental na saúde mundial e apesar dos importantes avanços observados na medicina moderna, nas últimas décadas, elas continuam sendo utilizadas (CALIXTO, 2005; VEIGA-JUNIOR; MELLO, 2008). As plantas medicinais podem ser definidas como vegetais que possuem substâncias com ação terapêutica (MARTINS et al., 2000). A utilização dessas plantas pela população é bastante difundida no Brasil e suas potencialidades neste âmbito são reconhecidas mundialmente (SIMÕES et al., 2000). Acredita-se que ao menos metade das espécies nativas possua alguma propriedade medicinal, entretanto, nem 1% foi estudada adequadamente (MARTINS et al., 2003).

A Organização Mundial de Saúde estima que 65 a 80% da população dos países em desenvolvimento utiliza as plantas medicinais como única maneira de acesso aos cuidados básicos à saúde, embora a grande maioria não apresentem sua eficácia comprovada cientificamente. Apesar da imensa diversidade de espécies de plantas existentes no planeta, grande parte é desconhecida sob o ponto de vista científico, sendo apenas cerca de 5% das

espécies conhecidas, estudadas fitoquimicamente e um percentual ainda menor avaliado em relação aos aspectos biológicos (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

No Brasil, considerando a diversidade de espécies vegetais, assim como a riqueza étnico-cultural, as plantas medicinais devem exercer posição de destaque em relação à importância do uso popular medicinal. A realização de estudos etnobotânicos proporcionam o resgate e a preservação dos conhecimentos populares das comunidades envolvidas (GARLET; IRGANG, 2001). Nos últimos anos, o interesse pelo conhecimento, utilização e comercialização de plantas medicinais e produtos fitoterápicos tem crescido bastante e isto tem possibilitado grandes avanços nas pesquisas científicas nessa área do conhecimento (FREITAS et al., 2012). Os estudos realizados em feiras livres e mercados são extremamente relevantes para aquisição de informações sobre a utilização da flora nativa e exótica (ALMEIDA; ALBUQUERQUE, 2002). Os mercados tradicionais de comercialização de plantas medicinais são importantes por reunir, concentrar, preservar e difundir o saber empírico sobre a diversidade de recursos tanto da fauna como da flora, tornando-se fontes fundamentais para a resistência e manutenção do conhecimento acerca das espécies medicinais (MONTEIRO et al., 2010).

O conhecimento adquirido pelas populações tradicionais vem sendo analisado pela etnobiologia, a qual desenvolve estudos que visam conhecer o papel da natureza sob os olhares das populações locais dentro de um sistema de crenças e adaptações do homem com o meio (ALBUQUERQUE; LUCENA, 2004). Dentro da abordagem etnobiológica encontra-se em destaque a etnobotânica, ciência que estuda os conhecimentos e a utilização das plantas para os diversos fins, entre eles os medicinais (ALMEIDA; ALBUQUERQUE, 2002; ALBUQUERQUE; LUCENA, 2004; COSTA; MAYWORM, 2011).

No Brasil, o uso de plantas medicinais surgiu da miscigenação de três culturas, a indígena, a europeia e a africana. O conhecimento adquirido através desses povos foi difundido ao longo de sucessivas gerações (MARTINS et al., 2000). O Brasil é um país rico em diversidade cujo território possui cinco biomas principais, designados como floresta amazônica, cerrado, mata atlântica, pantanal e caatinga. Por isso, é considerada uma rica fonte de produtos terapêuticos. No entanto, o potencial para a descoberta de plantas como fonte de novas drogas é pouco explorado ou regulamentado, ao contrário do que ocorre em países como Alemanha, Estados Unidos e Canadá (CALIXTO, 2000; RATES, 2001; VEIGA-JUNIOR, 2008).

Em virtude dos grandes avanços da medicina, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que cerca de 80 % da população mundial utiliza espécies medicinais, e que aproximadamente 25% dos medicamentos produzidos no mundo sejam provenientes de vegetais (OLIVEIRA et al., 2005). A própria OMS estimula o desenvolvimento de pesquisas

visando a utilização da flora nacional para fins terapêuticos e diminuição no número de indivíduos excluídos dos sistemas governamentais de saúde, representando importante alternativa para o tratamento de doenças, principalmente nos países em desenvolvimento, em atenção aos cuidados primários com a saúde (GONÇALVES et al., 2005).

No Brasil, de acordo com dados oficiais publicados pelo Portal da Saúde, a procura por tratamentos à base de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos cresceu 161% entre os anos de 2013 e 2015 (PORTAL DA SAÚDE, 2016). Esse aumento está diretamente relacionado à Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos promovida pelo Ministério da Saúde, que tem conseguido promover esforços para difundir e reunir espécies de valor medicinal ao Sistema Único de Saúde – SUS (BRASIL, 2006). As ações e os programas elaborados para utilização de plantas medicinais previstas pelo Sistema Único de Saúde (SUS) são distribuídos de várias formas nas diversas regiões do Brasil, de acordo com seus biomas. A implementação dessas políticas públicas tem evoluído bastante nas últimas décadas, valorizando a importância das plantas medicinais para a saúde humana (BRASIL, 2012).

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, 2006; ALBUQUERQUE et al., 2007), entretanto, ainda são poucos os estudos realizados em outros estados nordestinos. A maior parte das informações encontradas sobre as espécies medicinais da caatinga, hoje conhecidas e estudadas, foram obtidas com auxílio de levantamentos etnobotânicos. A grande contribuição destes trabalhos pode ser observada nas diversas pesquisas que evidenciam as práticas de uso e sugestões de hipóteses que tentam explicar os costumes médicos tradicionais das populações do semiárido nordestino (ALMEIDA et al., 2005; ALBUQUERQUE et al., 2007a; ALBUQUERQUE, 2010; ROQUE et al., 2010; ALENCAR et al., 2010; JÚNIOR et al., 2011).

As plantas medicinais são usadas frequentemente com a finalidade de auxiliar ou substituir as terapias convencionais no tratamento de diversas doenças. Essa frequência de uso é consequência da facilidade de obtenção dessas espécies medicinais. Entretanto, o consumo de produtos derivados de plantas necessita de mais atenção, pois inúmeras plantas brasileiras ainda não foram suficientemente estudadas em relação ao seu potencial toxicológico e/ou mutagênico (SIMÕES et al., 2003). O emprego da medicina popular baseado no conhecimento empírico não é suficiente para validar as plantas medicinais como medicamentos seguros e eficazes. É necessário avaliar a relação entre o risco e o benefício do uso, por meio de estudos farmacodinâmicos e toxicológicos (FARIAS, 2007). A falta de conhecimento por parte da

população, sobre possíveis efeitos secundários e tóxicos dos extratos vegetais, pode provocar graves consequências para a saúde humana a curto e longo prazo (NAVARRO-MOL, 2000).

Para a Organização Mundial da Saúde (OMS), é de fundamental importância a realização de estudos experimentais com plantas que possuem efeitos medicinais, visando avaliar seus princípios ativos, garantindo padrão de segurança e comprovando sua eficácia terapêutica (SANTOS, 2004). Assim, considerando a importância e a significativa contribuição da biodiversidade através de seus recursos para a sobrevivência do ser humano e ainda sendo a base das atividades econômicas, é imprescindível a realização de pesquisas científicas com a finalidade melhorar o aproveitamento e a conservação dos recursos naturais. Além disso, a exploração do potencial de uso dos recursos naturais nativos necessita da aplicação de estratégias apropriadas para propagação do conhecimento e iniciativas que valorizem e incentivem a utilização dos componentes da flora nativa brasileira por outros segmentos da sociedade, incluindo a indústria, o comércio e a população em geral (CORADIN, 2011).

2.2 METABOLISMO DAS PLANTAS

A natureza, de modo geral, tem produzido a maioria das substâncias orgânicas conhecidas. Dentre os diversos reinos que existem na natureza, o vegetal é o que tem contribuído de maneira mais significativa para o fornecimento de metabólitos secundários, muitos destes de grande importância devido as suas aplicações como medicamento, cosméticos, alimentos e agroquímicos (CROTEAU et al., 2000; PINTO et al., 2002).

As funções fisiológicas dos princípios ativos nas plantas ainda não estão totalmente esclarecidas, mas associa-se a sua produção à defesa das plantas contra agentes externos como doenças, pragas, radiação solar ou resíduos do metabolismo vegetal. Estes princípios ativos possuem funções ecológicas importantes na sobrevivência da espécie e são produzidos pelo metabolismo secundário das plantas (MONTANARI, 2002). Os constituintes químicos provenientes do metabolismo vegetal são ativamente responsáveis por suas funções terapêuticas e ações toxicológicas. Nos vegetais, os metabólitos primários atuam nos processos de fotossíntese, respiração e assimilação de nutrientes, enquanto os metabólitos secundários atuam na produção de estratégias de defesa das plantas (NASS, 2007; SILVA et al, 2010).

As substâncias produzidas pelos vegetais podem ser divididas em dois tipos: metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários possuem função estrutural, plástica e de armazenamento de energia. Já os metabólitos secundários, também chamados de produtos secundários ou produtos naturais, aparentemente não estão associados ao crescimento e desenvolvimento da planta (TAIZ; ZEIGER, 2006). Teoricamente, todas as plantas são

potencialmente capazes de sintetizar metabólitos secundários. No entanto, essa característica é mais comum entre as plantas selvagens, que durante o ciclo evolutivo, desenvolvem mecanismos de adaptação para competir com outras, possibilitando assim sua sobrevivência (SOUZA FILHO; ALVES, 2002).

Há algum tempo atrás, os metabólitos secundários eram conhecidos como produtos sem função fisiológica, resultante do catabolismo do metabolismo primário, apresentando uma mínima importância no metabolismo e desenvolvimento da planta (RICHARD, et al., 1994). Contudo, essa visão mudou completamente após a investigação mais aprofundada desses metabólitos, o que permitiu a descoberta de funções relacionadas ao desenvolvimento das defesas fisiológicas das plantas e sua atuação como mediadores nas interações entre as plantas e outros organismos (SIMÕES, et al., 2002).

O metabolismo secundário não é essencial ao crescimento e desenvolvimento da planta, mas fundamental para sobrevivência e continuidade da espécie dentro do ecossistema, sendo responsável pelas relações entre o indivíduo e o ambiente onde se encontra por causa do seu caráter adaptativo. O fato do metabolismo secundário ser controlado pelo código genético e este interagir com o ambiente, tem grande importância na produção de plantas medicinais, pois a qualidade do produto final é extremamente influenciada pelas técnicas de cultivo aplicadas em sua produção e pelas características genéticas da população cultivada (DÔRES, 2007).

Os metabólitos secundários produzidos pelos vegetais são formados por várias rotas biossintéticas (Figura 1) que formam moléculas com grande variedade de esqueletos estruturais, originando diversas classes de compostos, como: terpenos, flavonoides, cumarinas, quinonas, taninos, saponinas, alcaloides, entre outros (ALVES, 2001).

Devido as atividades biológicas que possuem, são empregados na medicina tradicional há muitos anos, atuando como antibióticos, antifúngicos, antivirais e antioxidantes. Também são comumente utilizados como inseticidas, corantes, saborizantes, cosméticos ou fragrâncias (AOYAGI, 2011; FUMAGALI et al., 2008).

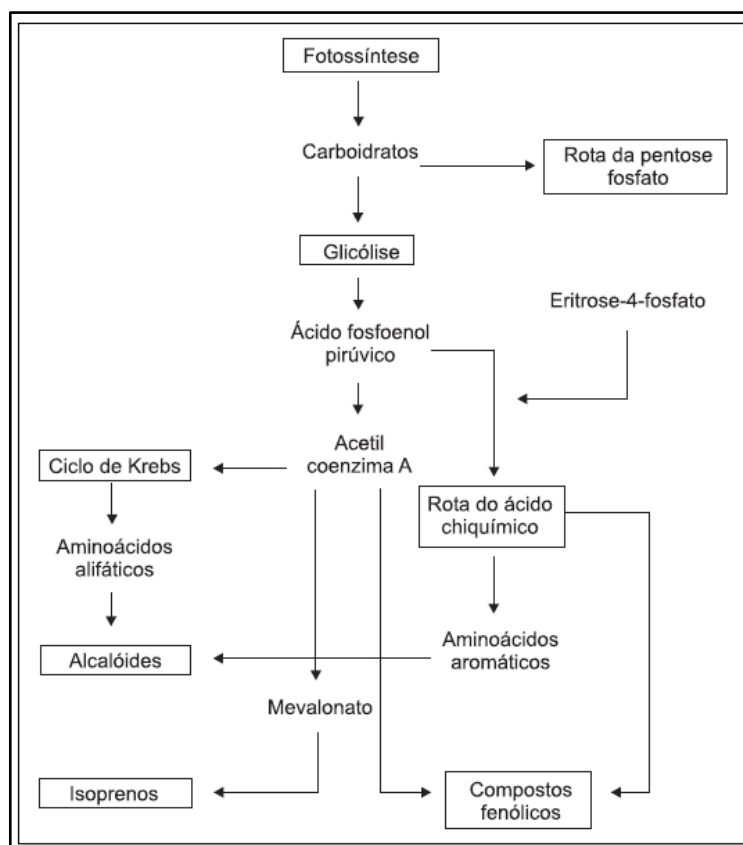


Figura 1 - Representação simplificada de algumas rotas biossintéticas para produção de metabólitos secundários (CASTRO et al., 2001).

O conhecimento acerca da química dos produtos naturais, em especial do metabolismo secundário, constitui uma ciência que envolve diversas áreas. A composição química dessas moléculas é influenciada diretamente por fatores bióticos (herbivorismo, ação antrópica, alelopatias) e fatores abióticos (condições climáticas, radiação luminosa). Os compostos químicos que mais sofrem alterações no metabolismo vegetal são os metabólitos secundários. Estes suportam as variações qualitativas e/ou quantitativas com a finalidade de melhorar a adaptação da planta às diversas condições ambientais a qual ela é exposta (Figura 2). Porém, não são apenas os fatores ambientais que podem interferir na produção dos metabólitos secundários. Os fatores genéticos também possuem esta influência, pois, as plantas armazenam uma enorme diversidade de compostos fitoquímicos que desempenham um papel importante na relação da planta com o meio ambiente, como por exemplo, proteção. Além disso, algumas plantas podem sofrer mutações que prejudicam parcialmente a função de várias vias metabólicas, afetando assim a formação de vários metabólitos secundários (GROTEWOLD, 2005).

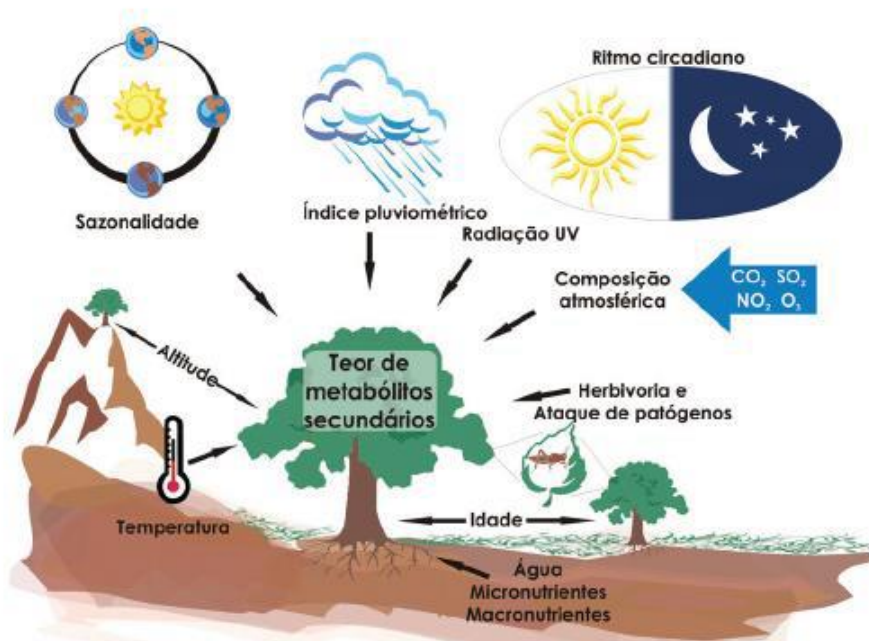


Figura 2 - Fatores que podem interferir na composição química dos metabólitos secundários dos vegetais (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

O metabolismo secundário das plantas é definido por alguns autores como um metabolismo que biosintetiza compostos exclusivos a organismos específicos ou grupos de organismos, expressando a individualidade das espécies. Os metabólitos secundários não são produzidos necessariamente em todas as condições. Alguns estão envolvidos na proteção contra herbívoros ou patógenos, na atração de polinizadores e de animais dispersores de sementes ou na competição entre espécies de plantas (alelopatia). Embora nem todas as funções dos metabólitos secundários sejam conhecidas, é possível afirmar que todos exercem um papel vital para o bem-estar dos organismos que os produziram. Diante disso, alguns autores referem-se aos metabólitos secundários como produtos naturais de plantas, os quais fornecem a maioria das substâncias farmacologicamente ativas na produção de novas drogas (CROTEAU et al., 2000; DEWICK, 2009).

Diante deste cenário, a realização de estudos sobre a composição química de produtos vegetais se torna de grande importância, proporcionando a identificação de substâncias com propriedades tóxicas, terapêuticas e conhecimento de novas estruturas moleculares. Também auxiliam no controle de qualidade de fitoterápicos, contribuindo para o uso racional de plantas medicinais e ampliando o conhecimento quimiotaxonômico de várias espécies vegetais (LORENZI; MATOS, 2002; PINTO et al., 2009).

2.3 COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONOIDES

Ao longo dos anos, o interesse pelos compostos fenólicos vem aumentado bastante devido à propriedade antioxidante que essas substâncias apresentam em sequestrar radicais livres, os quais são extremamente prejudiciais à saúde humana (ALVES et al., 2007; NEVES et al., 2008).

Quimicamente, os compostos fenólicos são definidos como substâncias que estruturalmente possuem um anel aromático com uma ou mais hidroxilas, incluindo seus grupos funcionais (LEE et al., 2005). Apresentam estrutura variável e por isso, são multifuncionais (SHAHIDI; NACZK, 1995). Esses compostos englobam desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização, contribuindo para promover sabor, odor e coloração aos diversos vegetais, além de serem essenciais para o crescimento e reprodução destes (SIMÕES et al., 2007, SOARES, 2002). Estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (BRAVO, 1998). Já são conhecidos mais de 8000 compostos pertencentes a este grupo de moléculas, os quais podem ser encontrados em diversas partes das plantas, como nas sementes, frutos, folhas, casca, caule e também na raiz (DREOSTI, 2000).

Os compostos fenólicos apresentam grande diversidade de efeitos biológicos e podem ser divididos em duas categorias. A primeira está relacionada a sua estrutura-atividade, devido à presença do anel fenólico e hidroxilas, atuando como antioxidantes eficazes no sequestro de radicais livres e na inibição da oxidação em cascata, inibindo assim as reações oxidativas desses radicais com moléculas biológicas, como: lipídios, carboidratos, proteínas e DNA (VATTEM; SHETTY, 2005). A segunda está relacionada ao seu mecanismo de ação, que apresenta a capacidade de modular a fisiologia celular, tanto em níveis moleculares quanto bioquímicos/fisiológicos. Devido a sua estrutura ser similar a inúmeras moléculas biológicas sinalizadoras e efetoras, os compostos fenólicos são capazes de participar dos processos de repressão/indução da expressão gênica ou na ativação/desativação de proteínas, enzimas e fatores de transcrição de vias metabólicas (YEH et al., 2009; YEH; YEN, 2006 a, b).

Os compostos fenólicos exercem importante função nos vegetais, como: proteção contra raios UV, insetos, fungos, vírus e bactérias. Há inclusive certas espécies vegetais que biosintetizam compostos fenólicos para inibir o crescimento de outras plantas competidoras. Esses compostos são sintetizados a partir de duas rotas metabólicas principais: as vias do ácido chiquímico e do ácido-malônico (Figura 3) (PERES, 2004).

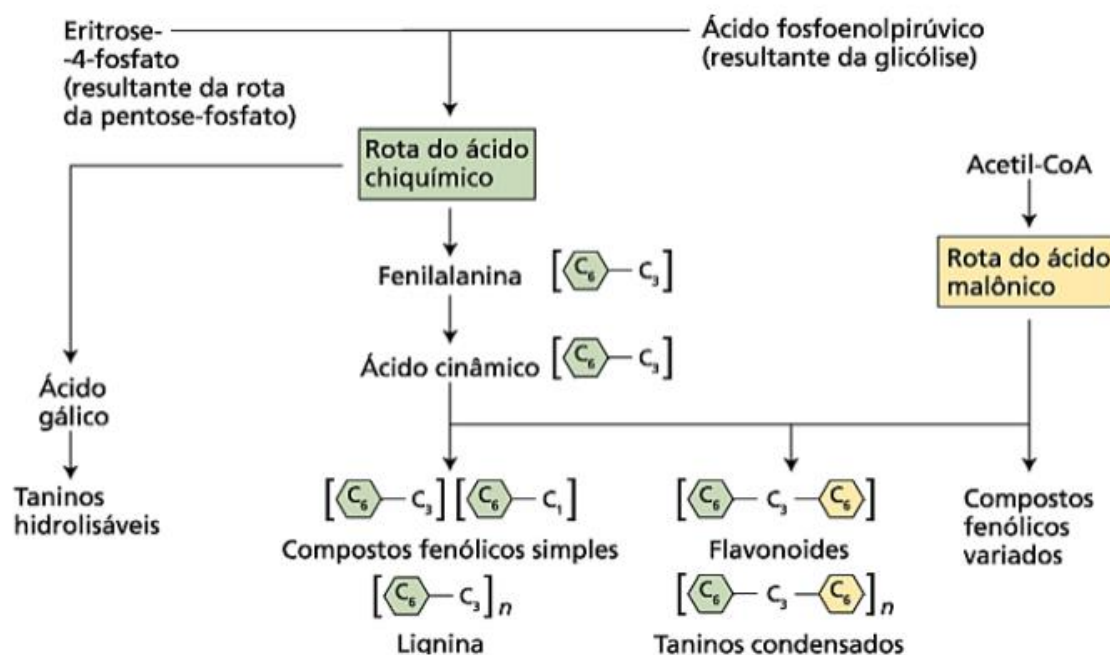


Figura 3 - Esquema das rotas metabólicas que dão origem aos compostos fenólicos (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Entre os antioxidantes presentes nos vegetais, os mais ativos e frequentemente encontrados são os compostos fenólicos, tais como os flavonoides. As propriedades benéficas desses compostos podem ser atribuídas à sua capacidade de sequestrar radicais livres (DECKER, 1997). A atividade antioxidante desses compostos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química, desempenhando papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação dos antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (HASLAM, 1996; SOARES, 2002; CHUN et al., 2005).

Já foi descoberto que os compostos fenólicos possuem várias propriedades farmacológicas, como: antialérgica, anti-inflamatória, antimicrobiana, antineoplásica, cardioprotetora e vasodilatadora (MIDDLETON; KANDASWAMI, 1994; BENAVENTE-GARCIA et al., 1997; SAMMAN et al., 1998; PUUPPONEN-PIMIA et al., 2001). Entre os compostos fenólicos conhecidos, os flavonoides e os ácidos fenólicos se destacam por serem considerados os antioxidantes mais comuns provenientes de fontes naturais (KARAKAYA, 2004). Estão presentes diariamente na dieta humana e são considerados por especialistas da área da saúde, importantes protetores naturais do organismo contra vários efeitos adversos (RIBEIRO et al., 2006).

Os flavonoides representam uma das classes mais importantes e diversificadas entre os produtos de origem natural. Essa classe de metabólitos secundários é amplamente distribuída no reino vegetal (SIMÕES et al., 2004). São encontrados em frutas, vegetais, sementes, cascas de árvores, raízes, talos, flores e em seus produtos de preparação, tais como chás e vinhos (NIJVELDT, 2001). São compostos de baixo peso molecular, formados por 15 átomos de carbono, organizados na configuração C6–C3–C6 (HARBORNE et al., 1999). A estrutura química dos flavonoides possui dois anéis aromáticos (A e B) unidos por um anel heterocíclico oxigenado (C) (Figura 4). Substituições dos anéis A e B originam diferentes compostos dentro de cada classe de flavonoides (HERTOG et al., 1993; PETERSON; DWYER, 1998; ANGELO; JORGE, 2007).

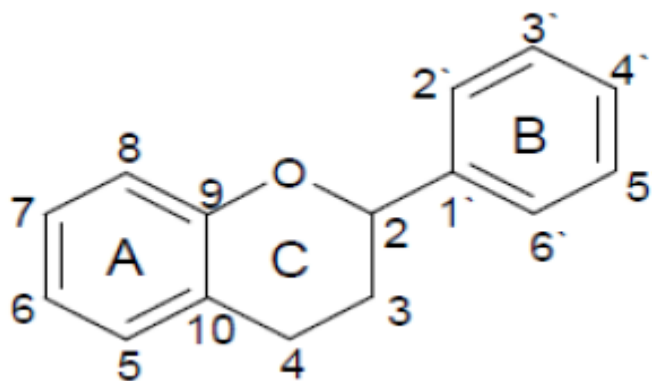


Figura 4 - Estrutura básica dos flavonoides (SIMÕES et al., 2010).

De acordo com Machado et al (2008), a grande diversidade estrutural encontrada nos flavonoides ocorre em função das pequenas modificações químicas ocorridas na estrutura básica destes compostos, que podem ocorrer por meio de hidroxilação, metilação, acilação, glicosilação, hidrogenação, malonilações e sulfatações, formando as diferentes classes de flavonoides.

Os flavonoides são subdivididos nas principais classes: flavonas, flavonóis, chalconas, auronas, flavanonas, flavanas, antocianidinas, leucoantocianidinas, proantocianidinas, isoflavonas e neoflavonoides (Figura 5) (BRAVO, 1998) e já foram descritos mais de 4000 tipos de flavonoides com estruturas conhecidas (SILBERBERG et al., 2006).

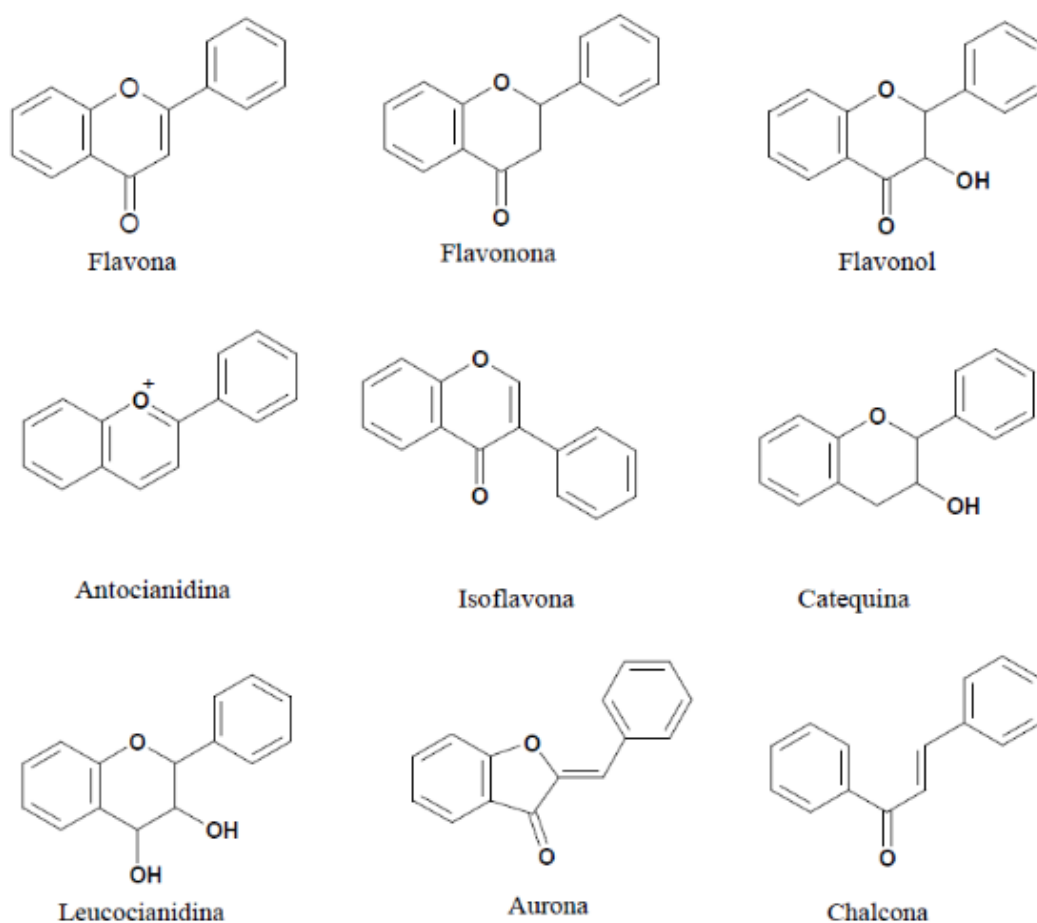


Figura 5 - Estrutura química das principais classes de flavonoides (SHAHIDI; NACZK, 2004).

Vários estudos indicam que os flavonoides podem ser benéficos à saúde, ajudando no combate de diversas doenças (PATIL et al., 2009) e diversas pesquisas têm mostrado que estes compostos apresentam atividade anti-inflamatória, antioxidante, antialérgica, hepatoprotetora, antitrombótica, antiviral e atividade anticarcinogênica (MIDDLETON et al., 2000; GARCYA-LAFUENTE et al., 2009).

2.4 BIOMA CAATINGA

A Caatinga é um bioma brasileiro que está localizado na região nordeste do Brasil, na qual predomina o clima semiárido. A região é coberta por vegetação xerófila, composta por árvores e arbustos adaptados a grandes períodos de estiagem, apresentando características únicas que o tornam um bioma exclusivamente brasileiro (SANTOS et al., 2011; GARIGLIO et al., 2010). Este bioma ocupa uma área de aproximadamente 844,453 km² da região Nordeste, o equivalente a 11% do território brasileiro (GARIGLIO et al., 2010). Engloba os estados do

Maranhão (1%), Piauí (63%), Ceará (100%), Rio Grande do Norte (95%), Paraíba (92%), Pernambuco (83%), Alagoas (48%), Sergipe (49%), Bahia (54%) e Minas Gerais (2%) (Figura 6) (IBGE, 2004). Cerca de 50% de sua cobertura vegetal original permanece relativamente intacta, apesar da grande densidade de população humana e as altas taxas de desmatamento (GARIGLIO et al., 2010).



Figura 6 - Mapa dos estados brasileiros que apresentam o bioma Caatinga (IBGE, 2004).

O significado do nome Caatinga (do Tupi: caa (mata) + tinga (branca) = mata branca) é baseado na paisagem esbranquiçada, característica desta vegetação durante os períodos de estiagem, na qual grande parte das árvores perdem suas folhas para reduzirem a evapotranspiração e o tronco apresenta uma coloração esbranquiçada e seca. Esse bioma é considerado único e exclusivamente brasileiro, portanto, seus recursos biológicos não são encontrados em nenhum outro lugar do planeta (DRUMOND et al., 2012).

Região que abriga espécies endêmicas, a Caatinga possui uma diversidade biológica ainda pouco explorada. Caracterizada por apresentar condições extremas de habitat devido ao clima semiárido, solo salino, baixa disponibilidade de nutrientes e baixa disponibilidade hídrica, as espécies oriundas deste bioma desenvolveram adaptações fisiológicas e reprodutivas para sobreviver nesta região (OLIVEIRA et al., 2012). Em consequência disso, apresentam

diferentes tipos de metabolismos e respostas adaptativas interessantes no âmbito científico e potencialmente exploráveis nos processos biotecnológicos (SILVA et al., 2015).

Em consequência aos períodos de estiagem característicos do clima semiárido, a vegetação da caatinga apresenta algumas adaptações e modificações anatômicas, morfológicas e fisiológicas, como aprofundamento das raízes, expansão do caule, perda de folhas e até ajuste do metabolismo osmótico em resposta às condições, não só do clima, mas também do meio onde habitam, mantendo assim a sobrevivência e a proliferação de suas espécies (TROVÃO et al., 2007).

Apesar de ser o bioma menos conhecido do país, é o principal da região nordeste, e os dados mais recentes apontam que ele apresenta uma grande riqueza de ambientes e espécies, com 932 espécies de plantas, 148 de mamíferos e 510 de aves (MMA, 2011).

De acordo com o Ministério do Meio Ambiente (2011), cerca de 27 milhões de pessoas vivem atualmente no território original da Caatinga, porém, 80% de seu ecossistema nativo já foi modificado, principalmente por causa de desmatamentos e queimadas, que vem ocorrendo desde a ocupação do Brasil no período colonial. Grande parte da população que reside em áreas de Caatinga é carente e precisa dos recursos da sua biodiversidade para sobreviver, os quais, se conservados e explorados de forma sustentável, poderiam impulsionar o desenvolvimento da região (MMA, 2011).

Estudos já realizados sobre a caatinga revelam que, além da importância biológica, este bioma possui um significativo potencial econômico devido a excelente utilidade das espécies como forragens, frutíferas e medicinais (ALBUQUERQUE, 2000). Pesquisas têm comprovado a ação benéfica de muitas espécies deste bioma, promovendo o uso dos vegetais com efeito medicinal comprovado entre a população economicamente mais carente (ALMEIDA; ALBUQUERQUE, 2002). Isto tem resultado na investigação dos princípios ativos pelas indústrias farmacêuticas (BIESKI, 2005).

Apesar do seu grande potencial, a Caatinga tem sido apontada como o bioma brasileiro mais crítico em relação à conservação. Devido à degradação ambiental e a falta de preservação, grande parte de sua área já foi modificada e por isso sua biodiversidade foi significativamente reduzida (TROVÃO et al., 2007; ARCOVERDE et al., 2014), levando várias espécies a serem classificadas como vulneráveis a extinção dentro dos parâmetros da legislação brasileira (SOUZA; SANTOS, 2012). Assim, torna-se emergente o desenvolvimento de programas que tenham o objetivo de criar soluções para as questões relativas à produção, à exploração sustentável e à conservação da sua biodiversidade (REGO JUNIOR et al., 2011).

Pesquisas recentes revelam que a riqueza particular do bioma Caatinga em termos de biodiversidade e de fenômenos característicos é resultante da interação dos fatores edafoclimáticos, que influenciam diretamente a diversidade local (FREIRE; GONÇALVES, 2012). Estudos preliminares também relataram sobre a grande diversidade microbiológica presente na Caatinga, com surgimento de novas espécies e novos registros para o Brasil (BARBOSA; GUSMÃO, 2011; ALMEIDA et al., 2014).

Diante do exposto, é evidente que o potencial biotecnológico da Caatinga ainda é pouco explorado, embora este bioma represente uma reserva de diversidade genética e funcional acumulada durante milhões de anos, tornando-se uma importante fonte de produtos com potencial aplicação industrial e biotecnológica. (DIONISI et al., 2012).

2.5 FAMÍLIA KRAMERIACEAE (*KRAMERIA TOMENTOSA*)

A família Krameriaceae é constituída por plantas endêmicas das regiões áridas, tropicais e subtropicais das Américas (MARTINEZ, 1959; SHREVE; WIGGINS, 1964). No Brasil, é representada por uma única espécie, *Krameria tomentosa* A. St. Hill. (*K. ovata* Berg e variedade *K. elliptica*), popularmente conhecida como "carrapicho de cavalo" (SIMPSON, 1989). As plantas desta família têm sido utilizadas na medicina popular para o tratamento de problemas intestinais e estomacais, devido à suas propriedades adstringentes, antidiarreicas e antimicrobianas, relacionadas a presença de compostos fenólicos, lignanas e proantocianidinas de alto peso molecular (DAEMS, 1981; EVANS, 1989; SIMPSON, 1991; ARNONE et al., 1988; SCHOLZ; RIMPLER, 1989). Em estudos prévios realizados por Achenbach e colaboradores (ACHENBACH et al., 1993, 1995 e 1996), a maioria dos compostos do tipo lignana foram isolados das raízes das espécies de *Krameria*. A presença de neolignanas e norneolignanas está bem documentado para este gênero (ACHENBACH et al., 1987; DOMINGUEZ et al., 1990).

O gênero *Krameria* é formado por 18 espécies (Tabela 1) herbáceas ou arbustivas que são predominantemente encontradas em regiões neotropicais e ecologicamente restritas a zonas áridas ou sazonalmente secas das Américas (SIMPSON et al., 2004; GIMENES; LOBÃO, 2006; GIANNINI et al., 2011). O centro primário de diversidade específica está localizado no México, onde ocorre o aparecimento de onze espécies, e o secundário no Brasil, com cinco espécies (GIANNINI et al., 2009 e 2011), podendo ser encontradas nos biomas Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (SIMPSON, 2014).

Tabela 1 - Espécies que pertencem ao gênero *Krameria* (GIANNINI et al., 2011).

<i>K. argentea</i>	<i>K. paucifolia</i>
<i>K. bahiana</i>	<i>K. revoluta</i>
<i>K. cistoidea</i>	<i>K. sonora</i>
<i>K. cytisoides</i>	<i>K. secundiflora</i>
<i>K. erecta</i>	<i>K. ramosissima</i>
<i>K. grandiflora</i>	<i>K. spartioides</i>
<i>K. grayi</i>	<i>K. ixine</i>
<i>K. lanceolata</i>	<i>K. pauciflora</i>
<i>K. lappacea</i>	<i>K. tomentosa</i>

Após ser registrado pela primeira vez por Loeffling em 1758, o gênero *krameria* apresentou um problema para os taxonomistas. No início, foi colocado na família Polygalaceae por Jussieu (1789) e depois transferido para a família Leguminosae por Taubert (1892). O consenso atual é que o gênero é o único membro da família Krameriaceae (Tabela 2) (SIMPSON et al., 2004; CARLQUIST, 2005).

Tabela 2 - Classificação taxonômica da espécie *Krameria tomentosa* (SIMPSON, 1989).

Reino: Plantae
Divisão: Magnoliophyta
Classe: Magnoliopsida
Ordem: Polygalales
Família: Krameriaceae
Gênero: <i>Krameria</i>
Espécie: <i>tomentosa</i>

A distribuição das espécies de *krameria* em relação às diferentes regiões das Américas é caracterizada por algumas particularidades. As espécies da América do Norte encontram-se predominantemente em solos rochosos e estão associadas a áreas secas ou desérticas do México e dos EUA. Já as espécies da América do Sul são encontradas em áreas sazonalmente secas, principalmente no cerrado e caatinga do Brasil, ou em regiões de altas altitudes nos Andes (SIMPSON, 1989; GIANNINI et al., 2009).

A espécie *Krameria tomentosa* A. St. -Hil. (Figura 7) é conhecida popularmente como "ratanha de nova granada", "carrapicho de cavalo" ou "ratanha de salvanille". Semelhante ao que ocorre em outras espécies de *Krameria*, a raiz de *K. tomentosa* tem largo emprego na medicina popular no combate a disenterias, estomatites, diarreia, corrimentos vaginais, hemorragias, hemorroidas e afecções da boca (BRAGA, 1960; CORREA, 1981; SIMPSON, 1989 e 1991).

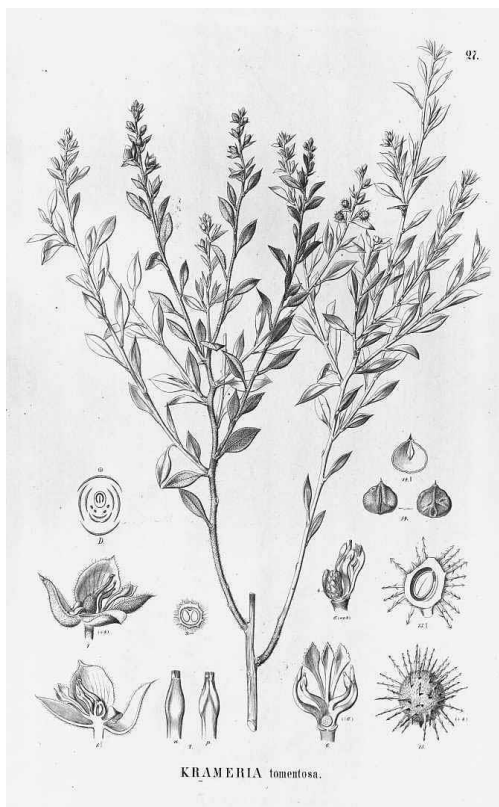


Figura 7 - Desenho ilustrativo da espécie *Krameria tomentosa* (MARTIUS et al., 1874).

Krameria tomentosa pode ser encontrada em quase todas as regiões do Brasil. Na região nordeste não é encontrada apenas nos estados de Sergipe e Alagoas. Poucos estudos foram realizados com esta espécie e do ponto de vista fitoquímico existe apenas um estudo no qual foram isoladas uma trinorneolignana inédita e outras quatro neolignanas que são comuns a outras espécies (SILVA et al, 2001).

2.6 ESTRESSE OXIDATIVO E DEFESAS ANTIOXIDANTES

Nos últimos anos, muitas evidências têm indicado que os radicais livres e outros oxidantes estão relacionados ao processo de envelhecimento e desenvolvimento de diversas patologias como o câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (ATOUI et al., 2005; ABRAHÃO et al., 2010). Diante disso, na intenção

de atenuar a ação desses radicais, diversos compostos com potencial antioxidante estão sendo investigados visando a redução de efeitos genotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (BEN et al., 2011).

Os radicais livres são produzidos continuamente durante os processos metabólicos e atuam como mediadores na transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, desempenhando funções relevantes no metabolismo (PERSSONELLE, 2004). Estes átomos ou moléculas são altamente reativos por possuírem um ou mais elétrons não pareados em sua última camada eletrônica. São substâncias instáveis que se multiplicam em cascata, possuem uma vida média extremamente curta e podem ser neutralizados por dois modos: pela ação de agentes antioxidantes endógenos e exógenos ou pelo mecanismo de oxido redução, quando dois radicais se ligam (OLSZEWER, 2008). Para se tornarem moléculas estáveis, precisam doar ou retirar elétrons de outra molécula, exercendo então a função de agentes redutores ou oxidantes (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

No sistema biológico, os radicais livres são provenientes de moléculas de oxigênio, nitrogênio e enxofre. Em virtude disso, foram denominados de espécies reativas de oxigênio (ROS – reactive oxygen species), espécies reativas de nitrogênio (RNS – reactive nitrogen species) e espécies reativas de enxofre (RSS – reactive sulphur species) (LU et al., 2010). O principal alvo dessas espécies reativas são as proteínas, o DNA (ácido desoxirribonucleico), o RNA (ácido ribonucleico), os carboidratos e os lipídios (Figura 8) (CAROCHO; FERREIRA, 2012).

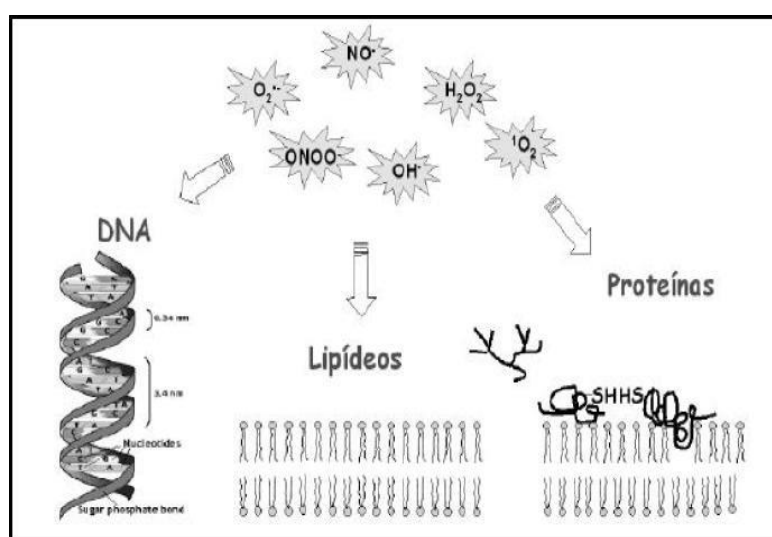


Figura 8 - Espécies reativas causando danos em importantes macromoléculas biológicas (TORRES, 2003).

No organismo, estes radicais encontram-se envolvidos com a produção de ATP, fagocitose, regulação do crescimento celular, entre outros (ABRAHÃO et al., 2010). A produção de radicais livres ocorre naturalmente como um processo fisiológico, porém, em determinadas condições, é possível ocorrer um aumento na produção de ERO, levando ao estresse oxidativo, no qual algumas destas espécies reativas, tais como o radical superóxido (O_2^-), radical hidroxil (OH) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), podem produzir danos ao organismo como a lipoperoxidação de lipídios insaturados das membranas celulares (LEMOS, 2006). Por outro lado, a produção de radicais livres também pode estar relacionada a fatores externos como: tabagismo, poluentes ambientais, radiação, drogas, pesticidas, solventes industriais e ozônio (CHANDRA et al., 2010).

O organismo está regularmente em equilíbrio em relação a produção e a degradação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio, que estão presentes em baixas concentrações em todos os tecidos (DROGE, 2002). Entretanto, quando ocorre um desequilíbrio entre as moléculas antioxidantes e as espécies reativas produzidas, em favor das pró-oxidantes, cria-se um estado denominado estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

O estresse oxidativo pode ocorrer devido a uma redução nos níveis das defesas antioxidantes, elevada velocidade na produção de espécies reativas ou uma junção de ambos (SALVADOR; HENRIQUES, 2004). Durante o estresse oxidativo, o organismo pode comportar-se de duas maneiras: adaptando-se ou sofrendo dano celular. Em caso de estresse oxidativo leve, as células resistem e respondem a essa situação com o aumento da produção de defesas antioxidantes, tentando assim restabelecer o equilíbrio pró-oxidante/antioxidante. Entretanto, quando o organismo sofre um estresse oxidativo muito forte, provoca danos irreversíveis podendo causar até mesmo a morte celular. Em virtude disso, as células possuem defesas antioxidantes para combater os efeitos deletérios causados pelos radicais livres, transformando assim as espécies reativas em compostos inativos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

As substâncias antioxidantes atuam em diferentes etapas na proteção do organismo. O primeiro mecanismo de defesa contra os radicais livres é impedir a sua formação, principalmente pela inibição das reações em cadeia que participam o ferro e o cobre. Os antioxidantes são capazes de bloquear os radicais livres gerados pelo metabolismo celular, impedindo o ataque sobre os lipídeos, os aminoácidos das proteínas, a dupla ligação dos ácidos graxos poliinsaturados e as bases do DNA, prevenindo a formação de lesões e a perda da integridade celular (ABRAHÃO et al., 2010). O outro mecanismo de proteção é o reparo das lesões causadas pelos radicais. Esse processo está relacionado com a eliminação de danos da molécula de DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas. Em algumas circunstâncias, o organismo sofre algumas adaptações em resposta a geração desses radicais, aumentando a síntese de enzimas antioxidantes (LIMA et al., 2012).

Por definição, o termo antioxidante se refere a qualquer substância capaz de retardar ou impedir danos decorrentes da oxidação, se fazendo presente em pequenas concentrações quando comparada a do agente oxidante. As substâncias antioxidantes podem atuar por diferentes mecanismos e em função disso podem ser classificadas em duas categorias principais: antioxidantes primários e secundários. São considerados primários os compostos antioxidante capazes de inibir ou retardar a oxidação por inativação de radicais livres devido a doação de átomos de hidrogênio ou de elétrons, transformando os radicais em substâncias estáveis. Os antioxidantes secundários apresentam uma enorme variedade de modos de ação: ligação de íons metálicos (alteração de valência); inativação de ROS, conversão de hidroperóxidos em espécies não-radicalares ou absorção de radiação UV (MAISUTHISAKUL et al., 2007). As defesas antioxidantes podem ser classificadas em enzimáticas ou não enzimáticas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; HALLIWELL, 1994). As enzimas antioxidantes atuam impedindo a formação de espécies reativas, bem como removendo-as. Dentre os principais antioxidantes enzimáticos estão a enzima superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação de dois radicais superóxidos, formando H_2O_2 e O_2 , a enzima catalase, que é responsável pela degradação do H_2O_2 , formando água (H_2O) e O_2 e a enzima glutathione peroxidase (GSH-Px), que catalisa a degradação de hidroperóxidos, utilizando glutathione reduzida (GSH) como substrato para formar glutathione oxidada (GSSG) e o produto de redução do hidroperóxido (HALLIWELL, 2001; BONNEFOY et al., 2002; SALVADOR; HENRIQUES, 2004).

Além das enzimas antioxidantes, o organismo tem a habilidade de sintetizar compostos não-enzimáticos que exibem de forma direta ou indireta, capacidade eficaz de defesa antioxidante, atuando afim de manter o estado de equilíbrio celular. São exemplos deles a bilirrubina, o ácido úrico, a melatonina, o estrógeno e a glutathione (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Muitos antioxidantes não podem ser produzidos pelo organismo, devendo ser consumidos na dieta. Dentre estes antioxidantes não-enzimáticos, pode-se mencionar vitaminas, como as vitaminas A, C, E, a riboflavina e a tiamina, o selênio, a L-carnitina e os polifenóis (SALVADOR; HENRIQUES, 2004). O modo de atuação dos antioxidantes não enzimáticos é bastante diverso, podendo abranger a remoção do oxigênio existente no meio, o sequestro das espécies reativas de oxigênio ou de seus precursores, bem como a inibição da formação das espécies reativas (HALLIWELL, 1994). Dessa forma, a distribuição das enzimas antioxidantes está fortemente relacionada com as fontes de espécies reativas de oxigênio, portanto, é possível perceber a importância da existência das defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas. Sem elas, o equilíbrio celular seria modificado e

facilitaria o aparecimento de várias disfunções que poderiam ocasionar processos patológicos (HARRIS, 1992).

Diversas moléculas antioxidantes têm apresentado uma infinidade de atividades biológicas, tais como antimicrobiana, antiparasitária, antifúngica entre outras. Elas podem ser produzidas pelo próprio organismo, ou ser ingeridas por meio da alimentação, como é o caso de algumas vitaminas (E, C e pró-vitamina A) e compostos fenólicos (flavonoides e poliflavonoides) presentes nos alimentos, especialmente os de origem vegetal. Além de seus benefícios à saúde, os antioxidantes também são bastante utilizados na indústria, pois evitam a oxidação de diversos produtos tais como fármacos, cosméticos e alimentos (PIETTA, 2000; HALLIWELL et al., 1995; FAURÉ et al., 1990; BARREIROS et al., 2006).

Ao longo dos anos, uma atenção maior tem sido dedicada ao papel da dieta na saúde humana. Vários estudos epidemiológicos indicaram que o aumento no consumo de produtos vegetais está associado com uma redução no risco de uma variedade de doenças crônicas como aterosclerose e câncer. Estes efeitos têm sido particularmente atribuídos aos compostos que possuem atividade antioxidante. Os principais antioxidantes encontrados nos vegetais são as vitaminas C e E, os carotenoides e os compostos fenólicos, especialmente os flavonoides. Esses antioxidantes absorvem os radicais livres e inibem a cadeia de iniciação ou interrompem a cadeia de propagação das reações oxidativas promovidas pelos radicais (PODSEDEK, 2007). Além da ingestão de frutas e vegetais, que são recomendadas como fontes de compostos antioxidantes, acredita-se que a complementação da dieta com ervas, contendo altas concentrações de compostos capazes de desativar radicais livres, também origina efeitos benéficos (CAPECKA et al., 2005).

Visto que os compostos antioxidantes são fundamentais para a manutenção do equilíbrio do organismo, atuando no sequestro de radicais livres produzidos em excesso durante o processo metabólico e, conseqüentemente na prevenção de diversas doenças relacionadas ao estresse oxidativo, é crescente o interesse pela investigação de antioxidantes provenientes de fontes naturais, os quais, ao contrário dos antioxidantes sintéticos, não apresentam efeitos nocivos à saúde (LI et al., 2014).

2.7 RESISTÊNCIA BACTERIANA

Historicamente, a criação dos medicamentos de sulfa na década de 1930 e o desenvolvimento da penicilina durante a Segunda Guerra Mundial marcou o começo de uma nova fase no tratamento de doenças infecciosas (GERARD; WRIGTH, 2010). A inserção desses medicamentos (antibióticos) na quimioterapia das infecções bacterianas em meados do século

XX inovou o tratamento médico, proporcionando uma enorme redução na mortalidade causada por doenças microbianas (MONIQUE et al., 2000). Entretanto, a disseminação e o uso exagerado dos antibióticos desenvolveram nas bactérias mecanismos de defesa contra esses agentes antimicrobianos, surgindo a resistência bacteriana (COHEN; TARTASKY, 1997).

O uso contínuo dos antibióticos tem provocado muitos problemas, dentre os quais se destacam o desequilíbrio da microbiota humana e a resistência microbiana, que resulta na busca de novos antibióticos que sejam eficazes e abre caminhos para o crescimento das pesquisas nessa área. O desenvolvimento de um novo antimicrobiano vem seguido pela resistência dos microrganismos, por isso, o aparecimento de patógenos resistentes é uma ameaça a esses progressos (MOELLERING JR, 2000). O aparecimento de bactérias resistentes pode ser limitado a um hospital ou setor hospitalar, pode aparecer disseminado em uma região geográfica, como um país específico e também pode ser generalizada, com focos de multirresistência em diferentes continentes ou países (LIVERMORE, 2003).

No sentido clínico, resistência é definida como um estado no qual, o paciente contaminado por um patógeno, recebe tratamento apropriado, com antibióticos específicos para esta finalidade, contudo, a cura não é atingida, ou seja, os microrganismos sobrevivem à ação dos medicamentos. Já no sentido microbiológico, a resistência acontece quando um organismo apresenta um mecanismo de resistência que o torna menos vulnerável à ação do antimicrobiano, quando comparado a outras células bacterianas da mesma espécie (CANTÓN; MOROSINI, 2011).

O tratamento de infecções bacterianas está cada vez mais complicado em virtude da grande habilidade que as bactérias possuem de desenvolverem resistência aos agentes antimicrobianos. Esses são constantemente classificados de acordo com seu mecanismo de ação principal. Esses mecanismos compreendem a interferência com a síntese da parede celular (beta-lactâmicos e glicopeptídeos), a inibição da síntese de proteínas (macrólídeos e tetraciclínas), a interferência com a síntese de ácidos nucleicos (fluoroquinolonas e rifampicina), a inibição de uma via metabólica (sulfametoxazol-trimetoprima) e o rompimento da estrutura da membrana bacteriana (polimixinas e daptomicina) (TENOVER, 2006). Os principais mecanismos de resistência bacteriana (Figura 9) incluem a limitação da concentração intracelular do antimicrobiano pelo influxo reduzido ou pelo efluxo aumentado deste, neutralização do agente antimicrobiano por enzimas, modificação do sítio de ligação do antibiótico e eliminação do alvo pela criação de novas vias metabólicas (CHEN et al., 2009).

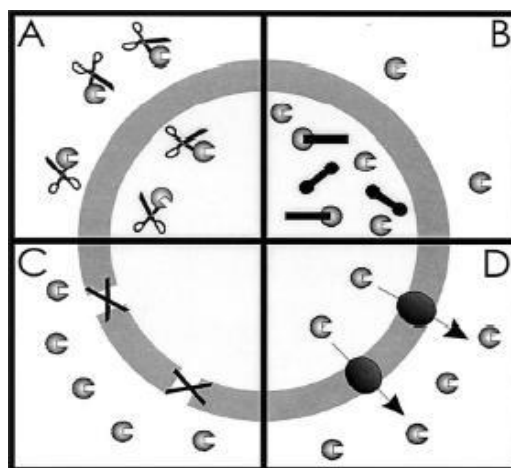


Figura 9 - Mecanismos de resistência bacteriana – (A) Inativação da droga, (B) Modificação do alvo, (C) Impermeabilidade da membrana e (D) Bomba de efluxo (PUTMAN et al., 2000).

Há registros de um crescimento preocupante na frequência do isolamento de bactérias que eram reconhecidamente sensíveis às drogas de uso rotineiro utilizadas na clínica, mas que hoje se apresentam resistentes a maioria dos fármacos disponíveis no mercado, como ocorre com diversas bactérias multirresistentes (HUYCKE et al., 1998; RATTAN et al., 1998; PIDDOCK et al., 1998; PITTET, 2002; SHIOMORI, et al., 2002; SAKAGAMI; KAJAMURA, 2006).

A resistência bacteriana emerge como um problema mundial de saúde pública atraindo a atenção de órgãos governamentais nacionais e internacionais como Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Organização Mundial de Saúde (OMS) e associações de controladores de infecções hospitalares, além da indústria farmacêutica internacional (BECKER et al., 2006). No Brasil, representa um grande ônus socioeconômico para as instituições em decorrência dos custos hospitalares e em relação ao paciente pelo prolongamento do período de afastamento de suas atividades profissionais e familiares (RABHAE et al., 2000).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recentemente categorizou bactérias resistentes a múltiplas drogas como uma das três principais ameaças à saúde humana (BASSETTI et al., 2011). No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde, mais de 70% das bactérias que causam infecções hospitalares são resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos comumente utilizados para o tratamento dos pacientes, no qual requerem tratamento com fármacos de segunda e terceira geração, que podem ser menos efetivos, mais tóxicos ou mais caros (MARTINS et al., 1998).

O estudo de agentes antimicrobianos tem uma enorme dimensão, sendo ponto fundamental em várias áreas do campo farmacêutico e cosmético. Outro ponto importante a ser ressaltado é a aplicação desse estudo como primeiro screening na descoberta da atividade farmacológica de novos agentes, sendo de grande importância em um país como o Brasil, que oferece uma vasta biodiversidade. Como o desenvolvimento da resistência aos antimicrobianos por vários patógenos vem crescendo a cada dia, torna-se de grande importância o estudo de novos agentes para o combate de infecções. Desta forma, tais pesquisas podem colaborar significativamente no desenvolvimento do campo da saúde em nível mundial, buscando substâncias mais eficientes e menos tóxicas na corrida contra a resistência e o aparecimento de microrganismos patogênicos (MENG et al., 2000; HO et al., 2001; MICHELIN et al., 2005; LEITÃO et al., 2006; LIMA et al., 2006; BARBOSA-FILHO et al., 2007; SAÚDE-GUIMARÃES; FARIA, 2007).

2.8 CÂNCER E O PROCESSO DE CARCINOGENESE

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. Por possuírem a capacidade de se multiplicar rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas (INCA, 2017).

Nas últimas décadas, o câncer ganhou uma importância maior por ter se tornado evidente problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que até 2030 sejam previstos 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas convivendo com esta doença (WHO, 2017). Nos países desenvolvidos predominam os casos de câncer de pulmão, mama, próstata e cólon, enquanto que nos países em desenvolvimento destaca-se os casos de câncer de estômago, fígado, cavidade oral e colo de útero. No Brasil, o câncer de mama é o tipo que mais afeta as mulheres e o câncer de próstata o mais incidente em homens, porém, o câncer de pele do tipo não-melanoma é o mais frequente na população brasileira (INCA, 2011).

São muitos os fatores que possuem a capacidade de provocar danos genéticos e induzir transformação neoplásica nas células do organismo. Esses fatores são responsáveis pelo desenvolvimento do câncer e podem ser divididos em: fatores exógenos e endógenos. O grupo dos fatores exógenos inclui os hábitos nutricionais, estilo de vida, agentes físicos (radiações ionizantes e não ionizantes), compostos químicos (naturais e sintéticos) e agentes biológicos

(*Helicobacter pylori*, vírus Epstein Barr, vírus do papiloma humano, vírus da hepatite B). Já no grupo dos fatores endógenos estão os danos sofridos pelo sistema imune, constituição genética, idade, equilíbrio do sistema endócrino, condição fisiológica e inflamações (JEMAL et al., 2010; OHSHIMA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2007).

O câncer é uma doença caracterizada pela ocorrência de diversas alterações que danificam os sistemas responsáveis pela regulação da proliferação e diferenciação celular. A origem de uma célula cancerígena é consequência de alterações genéticas que podem ser produzidas por diversos mecanismos como a inativação de genes supressores de tumor, ativação de oncogenes, inativação de genes responsáveis pela apoptose, e mutações produzidas por agentes químicos, físicos e biológicos, os chamados carcinógenos (SIEBER et al., 2003).

De acordo com Hanahan e Weinberg (2011), seis importantes alterações celulares fazem com que células normais se transformem em células tumorais: 1- autossuficiência na produção dos sinais de crescimento celular, 2- insensibilidade aos sinais de anticrescimento, 3- resistência a mecanismos de morte celular (evasão da apoptose), 4- ilimitado potencial de replicação, 5- angiogênese, 6- invasão tecidual, seguido de metástase (Figura 10). Além dessas alterações, o estresse oxidativo parece estar intimamente associado a progressão do tumor (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Alguns estudos realizados com uma variedade de tumores, incluindo mama, próstata e câncer de cólon, revelaram uma superexpressão do estresse oxidativo e que isso afeta as etapas de iniciação e progressão do câncer (FIASCHI; CHIARUGI, 2012).

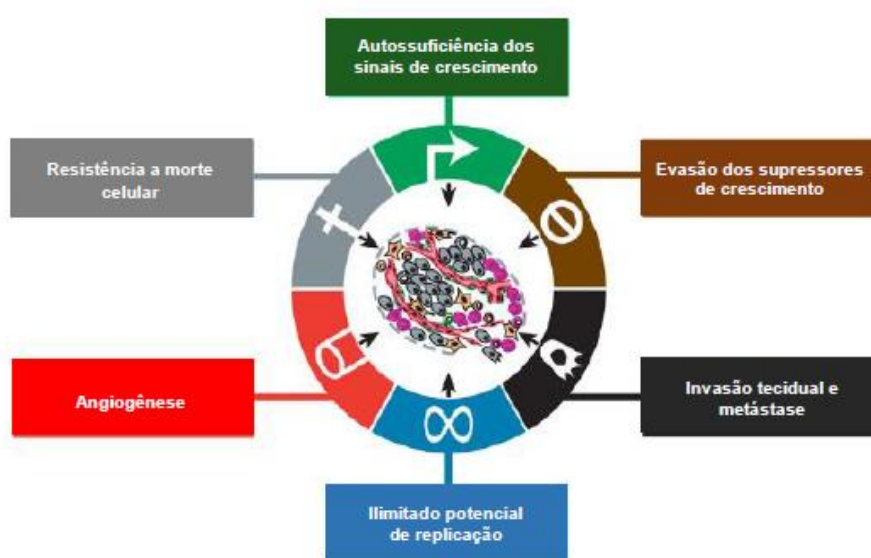


Figura 10 - Alterações celulares responsáveis pela formação de células neoplásicas (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Considerando que o ciclo celular é de fundamental importância no processo de carcinogênese, algumas considerações devem ser feitas. O ciclo celular é dividido em quatro fases: G₁, S, G₂ e M (Figura 11). Na fase S ocorre a duplicação do DNA e durante a fase M, a separação de todos os componentes celulares entre as células filhas. As fases G₁ e G₂ correspondem aos períodos em que as células se preparam para execução das fases S e M, respectivamente. Entretanto, quando as células não proliferam, elas entram em estado de quiescência, conhecido como fase G₀. A principal função do ciclo celular é garantir que o DNA seja duplicado fielmente durante a fase S e que cópias idênticas dos cromossomos sejam igualmente distribuídas entre as células filhas durante a mitose (MALUMBRES; BARBACID, 2009). O ciclo celular é regulado por mecanismos denominados checkpoints (pontos de checagem). Estes possuem a função de proteger a transição entre as fases do ciclo garantindo que o estágio precedente tenha sido completado sem erros (KHODJAKOV; RIEDER, 2009). As paradas nos checkpoints permitem que as células reparem seus defeitos, impedindo a transmissão destes para as células filhas e contribuindo com a manutenção da estabilidade genômica (MALUMBRES; BARBACID, 2009).

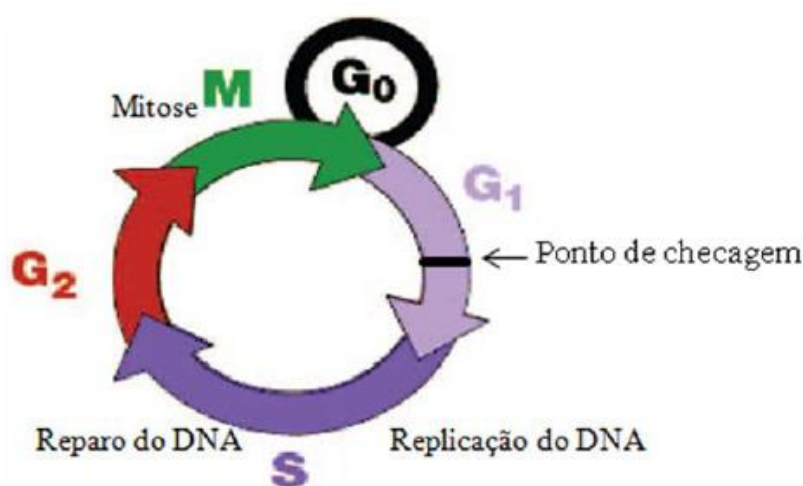


Figura 11 - Fases do ciclo celular (ALMEIDA et al., 2005).

A carcinogênese envolve diversas etapas e tem início pela exposição celular a agentes cancerígenos ou carcinogênicos capazes de induzir alterações no material genético das células normais. O processo de malignização das células ocorre mediante a transformação de genes específicos denominados proto-oncogenes. Estes, atuam normalmente no controle da divisão celular, apoptose e diferenciação celular, porém, quando são transformados em oncogenes, adquirem a capacidade de promover a transformação das células normais em células tumorais

(INCA, 2011; RANG et al., 2012). Os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor estão diretamente relacionados à regulação do ciclo celular. Os proto-oncogenes são responsáveis pela produção de proteínas que atuam na estimulação do ciclo celular, enquanto os genes supressores de tumor são responsáveis pela produção de proteínas que atuam inibindo o ciclo celular (DE ALMEIDA et al., 2005). Sendo assim, o equilíbrio na atuação desses dois grupos de genes resulta no perfeito funcionamento do ciclo celular (SANTOS; WADA, 2005).

Em síntese, a carcinogênese pode iniciar-se de forma espontânea ou provocada pela ação de agentes carcinogênicos (químicos, físicos ou biológicos). Como o câncer se desenvolve a partir de diversas mudanças que ocorrem no genoma de uma célula, o acúmulo de anormalidades genéticas é o principal responsável pelo desenvolvimento e progressão neoplásica. No entanto, alterações epigenéticas também desempenham papel crítico neste processo (BAYLIN; OHM, 2006). A epigenética estuda os mecanismos reguladores da atividade e herança gênica que independem das modificações na sequência de nucleotídeos do DNA (BAYLIN et al., 2001; DAS; SINGAL, 2004). Os principais eventos epigenéticos descritos correspondem a modificações que ocorrem no próprio DNA e a alterações que se processam na compactação deste polímero e modificações pós traducionais em histonas. (ROTHHAMMER; BOSSERHOFF, 2007). Portanto, o acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas em proto-oncogenes e em genes supressores de tumor desempenha papel fundamental na neoplasia (BLAGOSKLONNY, 2005).

O tratamento do câncer envolve três principais abordagens terapêuticas: a quimioterapia, a radioterapia e a excisão cirúrgica, porém, outras modalidades como a imunoterapia e a hormonioterapia também vem sendo bastante utilizadas na clínica (INCA, 2011a).

Atualmente, o uso de quimioterápicos antineoplásicos constitui uma das mais relevantes modalidades terapêuticas empregadas na clínica oncológica. No entanto, por ser um tipo de tratamento sistêmico, as drogas não são seletivas apenas contra as células neoplásicas, acometendo também células normais, especialmente aquelas com grande capacidade de renovação, como as da medula óssea, pelos e mucosa gastrointestinal. Por isso, uma série de efeitos colaterais está associada a essa modalidade terapêutica, como por exemplo: alopecia, náuseas, diarreias e mielossupressão. Porém, o nível de toxicidade e seletividade varia entre os fármacos antineoplásicos (RANG et al., 2012; INCA, 2017). É importante ressaltar que apesar das estratégias terapêuticas serem individualizadas, na maioria dos casos tem prevalecido o uso da chamada terapia combinada, em que várias modalidades terapêuticas são utilizadas em associação, visando à obtenção de melhores resultados. Dentre os objetivos da terapia

anticâncer estão: proporcionar a cura, prolongar a vida ativa e melhorar a qualidade de vida dos pacientes portadores da doença (INCA, 2011a).

O século XX apresentou um avanço extraordinário na pesquisa de produtos naturais provenientes de plantas e microrganismos no campo da oncologia, propiciando a descoberta de diversas substâncias utilizadas atualmente no tratamento antineoplásico. A maioria (60%) dos fármacos anticâncer introduzidos na terapêutica nas últimas décadas tem sua origem nos produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2007; BUTLER, 2008; HARVEY, 2008). Dentre estes se destacam a vimblastina (Velban®) e a vincristina (Oncovin®) e os análogos vindesina (Eldisine®) e vinorelbina (Navelbine®); o paclitaxel (Taxol®) e o análogo docetaxel (Taxotere®); a podofilotoxina e os análogos, etoposídeo (Etopophos®) e teniposídeo (Vumon®); e a camptotecina e os análogos topotecano (Hycamtin®) e irinotecano (Camptosar®). Estes medicamentos movimentam anualmente um mercado de cerca de 60 bilhões de dólares (PINTO et al., 2002).

No campo da pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, a especialidade oncológica tem despertado o interesse de muitos pesquisadores devido à deficiência de um arsenal terapêutico abrangente e eficaz (WHO, 2017). No Brasil, vários grupos de pesquisa atuam na busca de novos agentes com potencial terapêutico para o tratamento do câncer a partir de produtos naturais, especialmente de plantas. Isto se justifica pelo fato do país apresentar a maior biodiversidade do planeta e abrigar cerca de 22% das espécies de plantas superiores, sendo grande parte delas endêmicas (ELISABETSKY; COSTA-CAMPOS, 1996). Além disso, a utilização de plantas medicinais é culturalmente muito difundida no país, inclusive para o tratamento do câncer. Um dos biomas brasileiros cuja pesquisa de compostos de plantas endêmicas tem apresentado surpreendente número de moléculas ativas contra o câncer, é a caatinga. Diversos estudos relatam a atividade citotóxica significativa de diversas espécies utilizadas na medicina popular dessa região (MORAES et al., 1997; PESSOA et al., 2006).

As fontes naturais ainda estão disponíveis em abundância e oferecem as melhores possibilidades de encontrar substâncias de interesse terapêutico. Mais de uma centena de compostos derivados de produtos naturais está em fase de testes clínicos, principalmente para tratamento do câncer e de doenças infecciosas (HARVEY, 2008). Apesar disso, é importante destacar que embora sejam significativos os avanços tecnológicos e investimentos voltados para a triagem de novos compostos bioativos, menos de 10% das fontes naturais foram estudadas com relação ao seu potencial anticâncer (ZHANG, 2002; PESSOA et al., 2006).

3 RESULTADOS

3.1 ARTIGO - INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTE, ANTIBACTERIANA E ANTINEOPLÁSICA DO EXTRATO AQUOSO DE RAMOS DE *KRAMERIA TOMENTOSA* A. ST. -HIL (KRAMERIACEAE)



Artigo a ser enviado e traduzido para Journal of Ethnopharmacology
(ISSN: 0378-8741)

Investigação fitoquímica e Avaliação das propriedades antioxidante, antibacteriana e antineoplásica do extrato aquoso de ramos de *Krameria tomentosa* A. St. -Hil (Krameriaceae)

Maria Cecília Lima Vieira de Melo¹ (ceci_lvm@hotmail.com)

Bárbara de Azevedo Ramos¹ (babi.a.ramos@gmail.com)

Camilla Morais de Paiva¹ (camillampaiva@gmail.com)

Maria de Fátima Rodrigues² (fatima_rlr@hotmail.com)

Marina Ferraz Cordeiro³ (marinafcml@gmail.com)

Túlio Diego da Silva⁴ (diegotulio1@gmail.com)

Alexandre Gomes da Silva¹ (agsilva@live.com)

Márcia Vanusa da Silva¹ (marciavanusa@yahoo.com.br)

Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo³ (moacyr.rego@gmail.com)

Maira Galdino da Rocha Pitta³ (mgrpitta@gmail.com)

Rafael Matos Ximenes² (ximenesrm@gmail.com)

Maria Tereza dos Santos Correia¹ (mtscorreia@gmail.com)

¹Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife – PE.

²Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife – PE.

³Núcleo De Pesquisa Em Inovação Terapêutica, UFPE, Recife – PE.

⁴Central Analítica do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), Recife – PE.

RESUMO

As plantas medicinais são as maiores fontes de produtos naturais e substâncias bioativas, por isso, muitos estudos estão em busca dos princípios ativos dessas plantas para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas. O gênero *Krameria* é o único membro da família *Krameriaceae*, composta por 18 espécies herbáceas ou arbustivas encontradas na região neotropical, que compreende desde a América Central (incluindo o México) até a América do Sul. A espécie *Krameria tomentosa* já é utilizada na medicina popular no tratamento de algumas doenças e em virtude disso foi escolhida para ser avaliada em relação a sua toxicidade, ação antioxidante, antibacteriana e antineoplásica, que ainda não foram comprovadas cientificamente. Na identificação do perfil fitoquímico, o extrato aquoso de ramos de *K. tomentosa* (EAq KT) revelou a presença de flavonoides, proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas. Na determinação do teor total de fenóis e flavonoides, EAq KT apresentou um conteúdo fenólico total de $306,32 \pm 0,30$ mg EAG/g de extrato e um conteúdo de flavonoides totais de $7,76 \pm 0,39$ mg EQ/g de extrato. A atividade antioxidante de EAq KT foi avaliada por cinco métodos diferentes. No ensaio de redução do radical DPPH, EAq KT apresentou um IC₅₀ de 25,72 µg/mL, valor próximo ao da quercetina (IC₅₀= 20,7 µg/mL) e do BHT (IC₅₀ = 20,9 µg/mL). No ensaio de sequestro do ânion superóxido, EAq KT apresentou um IC₅₀ de 63,05 µg/mL, revelando ter uma atividade melhor que o padrão BHT (IC₅₀ = 996,9 µg/mL) e próxima à da quercetina (IC₅₀ = 56,52 µg/mL). Na avaliação da atividade antioxidante total pelo método de formação do complexo fosfomolibdênio, EAq KT apresentou atividade antioxidante maior que todos os padrões testados. Pelo método do FRAP, EAq KT revelou ter uma atividade melhor quando comparado com a quercetina e ácido gálico. Já no ensaio de inibição da peroxidação lipídica, EAq KT apresentou uma atividade de inibição maior que a da quercetina e do BHT. Na avaliação da atividade antimicrobiana, EAq KT apresentou uma concentração inibitória apenas para as cepas bacterianas gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*). Nos ensaios de avaliação da citotoxicidade, EAq KT apresentou atividade sobre as linhagens tumorais de HL-60, MOLT-4 e K562. Na avaliação da toxicidade aguda, EAq KT revelou não ser tóxico ao organismo. Diante desses resultados, foi possível identificar o perfil fitoquímico, avaliar a toxicidade e determinar a capacidade antioxidante, antibacteriana e antineoplásica do extrato aquoso de *K. tomentosa*, tornando esse extrato um possível futuro candidato a novo fármaco.

Palavras-chave: Plantas medicinais, Radicais livres, Antioxidante, Câncer, Antibacteriana

1. INTRODUÇÃO

A utilização de produtos derivados de plantas e o conhecimento sobre suas aplicações para fins terapêuticos vêm sendo transmitido de geração em geração (Corrêa et al., 2008). O conhecimento popular sobre o uso e a eficácia de extratos vegetais auxiliam na divulgação das propriedades terapêuticas das plantas e colaboram na seleção de espécies para estudos fitoquímicos e farmacológicos. Em todo o planeta e especificamente nos países da América do Sul, o emprego de plantas medicinais contribui significativamente nos cuidados básicos à saúde (Maciel et al., 2002). Os chineses, egípcios, hindus e gregos foram os primeiros povos a catalogar as ervas medicinais, caracterizando-as de acordo com a sua forma, cor, sabor e aroma. Dessa maneira, as plantas foram ao longo de muitas gerações sendo manipuladas e utilizadas para as mais diversas finalidades terapêuticas, produzindo assim um valioso conhecimento tradicional (Lima, 2006).

O Brasil é o país que tem a maior biodiversidade de plantas do mundo e a utilização de suas plantas medicinais foi propagada principalmente pela cultura indígena (CARVALHO et al., 2007). Sua riqueza vegetal está associada as boas condições climáticas, edáficas (solo) e hídricas, fatores que são essenciais para a produção de inúmeros metabólitos secundários com potencial atividade biológica (Zuanazzi & Mayorga, 2010). Por isso, uma grande quantidade de extratos obtidos de espécies de plantas está sendo utilizado contra diversas doenças na medicina popular e o emprego dos produtos naturais vem crescendo nas últimas décadas em decorrência de importantes pesquisas farmacêuticas (Stepp, 2004; Souza & Lorenzi, 2005).

O consumo de produtos naturais provenientes de plantas necessita de mais atenção, pois diversas plantas não foram estudadas em relação ao seu potencial toxicológico e/ou mutagênico (Simões et al., 2003). O uso da medicina popular baseado no conhecimento empírico não é suficiente para reconhecer as plantas medicinais como medicamentos seguros e eficientes. Portanto, é necessário investigar a correlação entre o risco e o benefício do uso através de estudos farmacodinâmicos e toxicológicos (Farias, 2007).

Pesquisas com o propósito de encontrar compostos com propriedades antitumoral e antimicrobiana estão sendo conduzidas há mais de 40 anos. O interesse nesses compostos cresceu bastante em virtude da resistência desenvolvida pelos microrganismos, dos fortes efeitos colaterais causados pelas drogas utilizadas no tratamento do câncer e também da resistência adquirida pelas células tumorais (Costa, 2002).

Os radicais livres possuem diversas funções no organismo vivo e então envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e

síntese de substâncias biológicas importantes. São definidos como átomos ou moléculas produzidas constantemente durante os processos metabólicos e que atuam como mediadores para a transferência de elétrons em algumas reações bioquímicas, desempenhando funções importantes no metabolismo. Quando estão em excesso, provocam efeitos prejudiciais, tais como: danos ao DNA, proteínas e organelas celulares, como mitocôndrias e membranas, causando alterações na estrutura e função celular. Estão diretamente relacionados a patologias como o câncer, envelhecimento precoce, doenças cardiovasculares, degenerativas e neurológicas, catarata, disfunções cognitivas, entre outras. Diante disso, os danos causados pelos radicais livres e sua relação com diversas doenças estimulam a procura por novas substâncias que sejam capazes de prevenir ou minimizar os efeitos nocivos provocados às células, e as plantas constituem uma boa alternativa como antioxidantes naturais (Almeida, 2006; Neves et al., 2009; Alves et al., 2010; Fernandes, 2010).

O gênero *Krameria* é constituído por 18 espécies herbáceas ou arbustivas que são exclusivamente encontradas em regiões neotropicais e restritas a zonas áridas ou sazonalmente secas das Américas (Simpson et al., 2004; Gimenes & Lobão, 2006; Giannini et al., 2011). A maior parte das espécies são encontradas no leste do México e na região centro-leste do Brasil, nos biomas Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica, abaixo de 1.500 metros de altitude (Every & Baracat, 2009). As raízes de algumas espécies desse gênero são utilizadas na medicina popular mexicana como agentes antibacterianos, anti-inflamatórios e antidiarreicos (Bombardelli et al., 2002; Silva et al., 2001). *Krameria tomentosa* A. St. -Hil. é conhecida popularmente como "ratanha de nova granada", "carrapicho de cavalo" ou "ratanha de salvanille". Sua raiz é usada na medicina popular para tratar disenterias, estomatites, diarreia, corrimentos vaginais, hemorragias, hemorroidas e afecções da boca (Braga, 1960; Correa, 1981; Simpson, 1989 e 1991). A presença de compostos como terpenos, lignanas e norneolignanas já foi relatada na família Krameriaceae (Achebach et al., 1987 e 1996).

Foi observado na literatura que algumas espécies do gênero *Krameria* são utilizadas popularmente com finalidades medicinais e considerando que ainda há poucos estudos sobre as propriedades terapêuticas da espécie *Krameria tomentosa*, este trabalho teve o objetivo de avaliar a toxicidade do extrato aquoso dessa espécie e seu potencial antioxidante, antimicrobiano e antitumoral.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta do Material Vegetal e Preparação dos Extratos

Ramos de *Krameria tomentosa* foram coletados no Parque Nacional Vale do Catimbau, em Buíque, Pernambuco. O material coletado foi levado à estufa de secagem com circulação de ar forçado (40-45°C) por um período de três a quatro dias. A amostra foi identificada conforme as técnicas taxonômicas habituais e depositadas no Herbário IPA do Instituto Agrônomo de Pernambuco. O material vegetal foi processado em moinho de bancada seguido de extração por sonicação em água destilada para obtenção do extrato aquoso, que posteriormente foi liofilizado.

2.2 Análise Fitoquímica

2.2.1 Cromatografia em Camada Delgada

O estudo do perfil fitoquímico do extrato aquoso de ramos de *krameria tomentosa* foi determinado por cromatografia em camada delgada de sílica gel. As metodologias utilizadas para identificar as classes de metabólitos secundários presentes no extrato aquoso de *k. tomentosa* estão descritas na tabela a seguir (Tabela 1).

Tabela 1: Sistemas e reveladores utilizados na cromatografia em camada delgada para identificação dos metabólitos secundários presentes no extrato aquoso de *K. tomentosa*.

Classe de Metabólitos Secundários	Padrões	Sistema de eluição	Revelador	Referências
Flavonoides, derivados cinâmicos e fenilpropanoglicosídeos	Quercetina, rutina e ácido clorogênico	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27 v/v)	NEU	Wagner & Bladt (1996) Brasseur & Angenot, (1986)
Triterpenos e Esteroides	β-sitosterol	Tolueno:AcOEt (90:10 v/v)	Lieberman & Burchard	Harborne (1998)
Mono e Sesquiterpenos	Timol	Tolueno:AcOEt (97:3 v/v)	Anisaldeído sulfúrico	Harborne (1998)
Cumarinas e Quinonas	Cumarina e lapachol	CHCl ₃ -MeOH (98:2 v/v)	KOH	Wagner & Bladt, (1996)
Alcaloides	Pilocarpina	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27 v/v)	Dragendorff	Wagner & Bladt (1996)
Proantocianidinas condensadas Leucoantocianidinas	Catequina	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27 v/v)	Vanilina clorídrica	Roberts et al (1957)
Taninos hidrolisáveis	Ácido gálico	n-BuOH-H ₂ O-AcOH (40:50:10 v/v)	Alúmen de ferro 1%	Xavier(2002) e Stiasny (1912)

2.2.2 Identificação de compostos fenólicos através da Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)

A identificação dos compostos fenólicos presentes na amostra foi determinada através de Cromatografia Líquida de Alta Performance (*Agilent 1260 Infinity*) usando uma coluna Zorbax SB-C18, 4,6 mm ID x 250 mm (5 µm) com temperatura de 30 °C. A separação cromatográfica foi realizada usando a fase móvel de gradiente: A (água acidificada) e B (acetonitrila), 0-15 min = 92% de A e 8% de B, 16-30 min = 65% de A e 35% de B, com fluxo de 2,4 mL/min, usando detector UV à 254 nm, em um volume de injeção de 5 µL. A identificação de cada composto foi estabelecida pelo tempo de retenção e pela comparação do espectro UV dos picos obtidos da amostra com os previamente obtidos pela injeção dos padrões puros (Sigma Aldrich): ácido caféico, ácido clorogênico, ácido gálico, ácido elágico, ácido trans-ferúlico, catequina, quercetina e rutina.

2.3 Dosagem de Fenóis Totais

O conteúdo de fenóis totais foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu descrito por Li et al. (2008) com algumas adaptações. O extrato aquoso de *K. tomentosa* foi dissolvido em água e testado na concentração de 1 mg/mL. No procedimento de dosagem (triplicata) 0,1 mL da solução de Folin foi misturado a 0,02 mL das amostras. Após 3 minutos, 0,08 mL de carbonato de sódio a 7,5% foi acrescentado as amostras, que em seguida ficaram em repouso e protegidas da luz por 120 minutos a temperatura ambiente. Após esse período, a leitura das absorvâncias foi realizada em espectrofotômetro à 765 nm. O branco da amostra foi obtido através da mistura de todos os reagentes citados acima, exceto o analito (extrato). O ácido gálico foi dissolvido em metanol e diluído em diferentes concentrações (0 – 1000 µg/mL) e utilizado para construir uma curva de calibração, preparada através da representação gráfica da absorvância em função da concentração, encontrando assim a seguinte equação linear ($y = 0,0066x + 0,0273$, $R^2 = 0,9859$). O conteúdo de fenóis totais no extrato foi determinado a partir da curva de calibração e expresso em miligramas equivalente de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG / g de extrato).

2.4 Dosagem de Flavonoides

O conteúdo total de flavonoides foi determinado pela técnica colorimétrica com cloreto de alumínio descrita por Woisky & Salatino (1998) com algumas adaptações. O extrato aquoso de *K. tomentosa* foi dissolvido em metanol e testado na concentração de 1 mg/mL. No procedimento de dosagem (triplicata), 0,1 mL da solução de cloreto de alumínio (2 g de cloreto

de alumínio diluído em etanol a 2%) foi misturado a 0,1 mL das amostras e em seguida ficaram em repouso e protegidas da luz por 60 minutos a temperatura ambiente. Após esse período, a leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro à 420 nm. O branco da amostra foi obtido através da mistura de todos os reagentes citados acima, exceto o analito (extrato). A quercetina foi diluída em metanol em diferentes concentrações (0 – 100 µg/mL) e utilizada para construir uma curva de calibração, preparada através da representação gráfica da absorbância em função da concentração, encontrando assim a seguinte equação linear ($y = 0,0227x + 0,0544$, $R^2 = 0,9944$). O conteúdo total de flavonoides foi determinado a partir da curva de calibração e expresso em miligramas equivalente de quercetina por grama de extrato (mg EQ / g de extrato).

2.5 Atividades Antioxidantes

2.5.1 Sequestro de Radicais Livres (DPPH)

A atividade de sequestro do radical livre DPPH foi determinada pelo método descrito por Blois (1958). Esta técnica foi medida na forma de doação de hidrogênio usando o radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). O extrato aquoso de *K. tomentosa* e os compostos de referência (Quercetina, Ácido Gálico e BHT) foram dissolvidos em água destilada e metanol respectivamente, e testados nas seguintes concentrações (1000 – 500 – 250 – 125 – 62,5 e 31,25 µg/mL). No ensaio (triplicata), 0,25 mL da solução de DPPH foi misturado a 0,04 mL das amostras, que em seguida ficaram em repouso e protegidas da luz por 25 minutos a temperatura ambiente. Após o tempo determinado, a leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro à 517 nm. O branco da amostra foi obtido pela mistura de 0,04 mL de cada concentração do extrato com 0,25 mL do solvente utilizado para dissolvê-lo (água destilada). O controle do teste foi obtido pela mistura de 0,04 mL de água destilada (extrato) ou 0,04 mL de metanol (compostos de referência) com 0,25 mL da solução de DPPH. O sequestro de radicais livres foi calculado pela seguinte fórmula: $SRL [DPPH] (\%) = [(Aa - Ac) / Ac] \times 100$, onde: Aa = Absorbância da amostra e Ac = Absorbância do controle. A partir dos resultados obtidos, foi calculado o IC₅₀ da amostra por regressão linear utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5.0.

2.5.2 Sequestro do Ânion Superóxido (SOD)

A atividade de sequestro do ânion-radical superóxido (O_2^-) foi determinada de acordo com o método descrito por Beauchamp & Fridovich (1971). A técnica é baseada na capacidade da enzima (superóxido dismutase) em converter radicais superóxidos (O_2^-) em peróxido de

hidrogênio (H₂O₂) e oxigênio molecular (O₂). Inicialmente foram preparados todos os reagentes necessários para o teste: tampão fosfato de sódio (50 mM em pH 7,8), EDTA (1 mM), NBT (1,5 mM) e riboflavina (20 mM). O extrato aquoso de *K. tomentosa* e os compostos de referência (Quercetina, Ácido Gálico e BHT) foram dissolvidos em água destilada e metanol respectivamente, e testados nas seguintes concentrações (1000 – 500 – 250 – 125 – 62,5 e 31,25 µg/mL). A primeira etapa do ensaio (triplicata) foi realizada na ausência de luz e 0,1 mL das amostras foram misturados com 0,6 mL do tampão fosfato de sódio, 0,2 mL de EDTA e 0,1 mL de NBT. O controle do teste foi obtido pela mistura de 0,1 mL de água destilada (extrato) ou 0,1 mL de metanol (compostos de referência) com todos os reagentes descritos acima nas mesmas quantidades. Em seguida, foi realizada a primeira leitura das amostras (OD1) em espectrofotômetro à 560 nm. Na segunda etapa do ensaio, 0,15 mL da solução de riboflavina foi acrescentado nas amostras e no controle, que posteriormente foram expostos a luz fluorescente durante 15 minutos. Depois do tempo estabelecido, foi realizada a segunda leitura das amostras (OD2) em espectrofotômetro à 560 nm. A atividade de sequestro do ânion superóxido foi calculada pela seguinte fórmula: $[(Ac - Aa) / Ac] \times 100$, onde: Aa = Absorbância da amostra (OD2 – OD1) e Ac = Absorbância do controle (OD2). A partir dos resultados obtidos, foi calculado o IC₅₀ da amostra por regressão linear utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5.0.

2.5.3 Atividade Antioxidante Total (TAC)

A atividade antioxidante total foi determinada através do método descrito por *Prieto et al* (1999). Esta técnica fundamenta-se na redução do molibdênio (VI) a molibdênio (V) ocorrida em presença de determinadas substâncias com capacidade antioxidante, com formação de um complexo verde entre fosfato/molibdênio (V), em pH ácido, o qual é determinado espectrofotometricamente a 695 nm. O extrato aquoso de *K. tomentosa* e os compostos de referência (Quercetina, Ácido Gálico e BHT) foram dissolvidos em água e metanol respectivamente, e testados na concentração de 1 mg/mL. No ensaio (triplicata), 0,1 mL das amostras foram misturados com 1 mL do reagente de trabalho (600 mM de ácido sulfúrico, 28 mM de fosfato de sódio e 4 mM de molibdato de amônio). O branco do teste foi obtido pela mistura de 0,1 mL de água destilada (extrato) ou 0,1 mL de metanol (compostos de referência) com 1 mL do reagente de trabalho. Em seguida, todas as amostras foram incubadas em banho-maria à 95 °C por 90 minutos. Após retornarem a temperatura ambiente, a leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro à 695 nm. A atividade antioxidante total foi

expressa em relação ao ácido ascórbico (considerado como 100% de atividade antioxidante) e calculada pela seguinte fórmula: $ATT (\%) = [(Aa - Ac) / (Aaa - Ac)] \times 100$, onde: Ac = Absorbância do controle, Aa = Absorbância da amostra e Aaa = Absorbância do ácido ascórbico.

2.5.4 Redução do Íon Férnico

A atividade antioxidante por meio da redução de íons de ferro foi determinada pelo método descrito por Benzie et al. (1996), com algumas modificações. O extrato aquoso de *K. tomentosa* e os compostos de referência (Quercetina, Ácido Gálico e BHT) foram dissolvidos em água e metanol respectivamente, e testados na concentração de 1 mg/mL. O reagente de trabalho (FRAP) foi preparado a partir da mistura do tampão acetato 300 mM em pH 3,6 (3,1 g de acetato de sódio em 16 mL de ácido acético) com a solução de TPTZ 10 mM (3,2 g de 2,4,6-Tris (2-pyridyl)-s-triazine em HCl 40 mM) e solução de cloreto férrico 20 mM na proporção de 10:1:1 (v/v). No ensaio (triplicata), 0,02 mL das amostras foram misturados a 0,180 mL do reagente de trabalho (FRAP) e em seguida foram incubadas à 37 °C por 30 minutos, protegidas da luz. Posteriormente, a leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro à 593 nm. O sulfato ferroso ($FeSO_4$) em diferentes concentrações (0 - 1000 µg/mL) foi utilizado para construção da curva de calibração e obtenção da seguinte equação linear: $y = 0,0054x + 0,1465$, $R^2 = 0,9847$. Os resultados foram expressos em miligramas equivalente de sulfato ferroso por grama de extrato (mg $FeSO_4$ (II) / g de extrato).

2.5.5 Inibição da Peroxidação Lipídica (LPIC)

O método do tiocianato férrico foi utilizado para avaliar a capacidade de inibição da peroxidação lipídica descrita por Mitsuda et al. (1967) com algumas modificações. Este ensaio monitora a quantidade de peróxido de hidrogênio no início da peroxidação lipídica, na qual o peróxido reage com o cloreto férrico e forma o íon férrico, que junta-se ao tiocianato de amônio causando a formação de tiocianato férrico, substância de cor vermelha. O extrato aquoso de *K. tomentosa* e os compostos de referência (Quercetina, Ácido Gálico e BHT) foram dissolvidos em água e metanol respectivamente, e testados na concentração de 1 mg/mL. No ensaio (triplicata), 0,2 mL das amostras foram misturados a 0,2 mL da solução de ácido linoleico (2,5 M), 0,4 mL de tampão fosfato (20 mM, pH 7) e 0,2 mL de água destilada (Volume final = 1 mL). Em seguida, as amostras foram incubadas à 40 °C por 24 horas, protegidas da luz. Após o período de incubação, 0,05 mL da solução preparada acima foi acrescentada de 0,05 mL de

etanol à 75%, 0,05 mL da solução de tiocianato de amônio (0,3 M) e 0,05 mL da solução de cloreto de ferro (20 mM). Após 3 minutos, a leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro à 500 nm. A mistura inicial voltou para incubação nas mesmas condições descritas anteriormente e o ensaio foi realizado a cada 24 h. Todo o procedimento ficou sendo repetido até o controle do teste (ácido gálico) estabilizar sua absorbância. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição da peroxidação lipídica e calculados pela seguinte fórmula: $I (\%) = [(Ac - Aa) / Ac] \times 100$, onde: Ac = Absorbância do controle, Aa = Absorbância da amostra.

2.6 Atividade Antibacteriana

2.6.1 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e da Concentração Mínima Bactericida (CMB)

A atividade antimicrobiana foi determinada pelo modelo experimental de microdiluição seriada descrita por CLSI (2014). O extrato aquoso de *k. tomentosa* foi diluído em DMSO a 2%, filtrado em membrana de 0,22 μm de porosidade para garantir esterilidade e testado nas seguintes concentrações (2000 – 1000 – 500 – 250 – 125 – e 62,5 $\mu\text{g/mL}$). *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 02), *Enterococcus faecalis* (UFPEDA 09), *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 224) e *Klebsiella pneumoniae* (UFPEDA 396) foram as cepas de bactérias utilizadas no teste. O inóculo foi preparado na concentração de 5×10^7 UFC/mL a partir da suspensão de 0.5 McFarland (10^8 UFC/mL). A suspensão de bactéria foi ajustada pela leitura da densidade óptica à 600 nm e ficou na concentração de 5×10^5 UFC/mL (5×10^4 UFC/ μL poço). Em seguida, o extrato nas concentrações descritas anteriormente e o meio de cultura Mueller-Hinton caldo foi acrescentado na microplaca (96 poços). As placas foram incubadas à 37 °C por 24 horas. No controle de crescimento da bactéria foi adicionado o meio de cultura e a bactéria, e no controle de esterilidade foi adicionado apenas o meio de cultura. Após o período de incubação, foi realizada a leitura das microplacas em espectrofotômetro à 600 nm nos tempos de 0h e 24h. O teste foi executado em quadruplicata e calculado na forma de média e desvio padrão. Para avaliar a concentração mínima bactericida, 5 μL foi retirado de cada poço da microplaca e semeado em uma placa de petri contendo meio Mueller-Hinton. Essas placas foram incubadas a 37 °C por 24h. Após esse período, foi observado se houve algum crescimento bacteriano na presença do extrato, que é considerado bactericida quando na placa há ausência total de crescimento bacteriano.

2.7 Atividade Antineoplásica

2.7.1 Citotoxicidade em Células Saudáveis do Sangue Periférico

A viabilidade celular foi determinada pelo método de redução do MTT descrito por Mosmann (1983), com algumas adaptações. Este é um ensaio colorimétrico que consiste na quantificação do crescimento, viabilidade e proliferação celular, podendo ser utilizado como indicador direto de citotoxicidade. É baseado na redução do sal brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) a cristais de formazan, por meio de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. Esse teste foi utilizado para avaliar se o extrato de *K. tomentosa* foi tóxico para células normais do sangue periférico. O ensaio de citotoxicidade do extrato aquoso de *K. tomentosa* foi realizado *in vitro* em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de 8 voluntários sadios. Foram coletados em tubos de heparina, 18 mL de sangue de cada voluntário. Durante a coleta do material biológico (sangue), foi realizado o procedimento de assepsia sobre a área da coleta (braço) e todo material utilizado foi descartável. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco e registrados na Plataforma Brasil (CAAE 63171116.7.0000.5208). Posteriormente, o material coletado foi processado para o isolamento das células mononucleares do sangue periférico (PBMC). As células foram distribuídas em microplacas de 96 poços e cada poço recebeu 5×10^5 células. Essas células foram incubadas por 24 horas em estufa de atmosfera úmida à 37 °C com 5% de CO₂. Em seguida, o extrato foi adicionado as células em diferentes concentrações (1, 10 e 100 µM) e a placa foi incubada novamente por 48 horas nas mesmas condições descritas anteriormente. Após 48 horas, foi acrescentado em cada poço 20 µL da solução de MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio) na concentração de 5 mg/mL diluída em PBS (Tampão Fosfato – Salino). As placas foram protegidas da luz e incubadas mais uma vez em estufa úmida por um período de 3 horas. A reação foi interrompida pela adição de 130 µL de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) à 20%. A leitura das absorbâncias foi realizada 24 horas depois à 570 nm em leitor de placa (ELX808, Biotek, EUA). O ensaio foi realizado em triplicata e foram incluídos controles não tratados e controles tratados apenas com DMSO (0,1%). O potencial citotóxico do extrato testado foi calculado em relação ao controle tratado com DMSO. A viabilidade celular também foi avaliada pelo método de exclusão usando o corante azul de tripan. Esse teste é baseado na contagem de células viáveis presentes numa amostra de suspensão celular em virtude de células vivas apresentarem membranas celulares intactas que excluem o corante azul de tripan, ao contrário das células mortas, que o incorporam adquirindo

uma coloração azul (Strober, 2015). Para realizar a contagem, 20 μ L da suspensão de células foi misturada a 20 μ L do azul de tripan e uma alíquota foi colocada em câmara de Neubauer e visualizada em microscópio óptico para determinação da porcentagem de células viáveis.

2.7.2 Citotoxicidade em Linhagens de Células Tumorais

Neste ensaio, a viabilidade celular foi determinada pelos mesmos métodos utilizados no teste anterior. Esse teste avaliou se o extrato aquoso dos ramos de *K. tomentosa* foi tóxico para diversas linhagens de células tumorais. Foi realizado o cultivo das seguintes linhagens de células tumorais: HL-60, MOLT-4, K562, DU145 e PANC-1. Essas células foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e mantidas a 37°C em estufa úmida contendo 5% de CO₂ em meio específico para cada linhagem com 10% de soro fetal bovino. A troca de meio foi realizada sempre que necessário para manter a viabilidade das células. As células tumorais foram distribuídas em microplacas de 96 poços e cada poço recebeu 1 x 10⁴ de células. Essas células foram incubadas por 24 horas em estufa de atmosfera úmida à 37 °C com 5% de CO₂. Em seguida, o extrato foi adicionado as células em diferentes concentrações (1, 10 e 100 μ M) e a placa foi incubada novamente por 72 horas nas mesmas condições descritas anteriormente. Após 72 horas, foi acrescentado em cada poço 20 μ L da solução de MTT (3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) na concentração de 5 mg/mL diluída em PBS (Tampão Fosfato – Salino). As placas foram protegidas da luz e incubadas mais uma vez em estufa úmida por um período de 3h. A reação foi interrompida pela adição de 130 μ L de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) à 20%. A leitura das absorbâncias foi realizada 24 horas depois à 570 nm em leitor de placa (ELX808, Biotek, EUA). O ensaio foi realizado em triplicata e foram incluídos controles não tratados e controles tratados apenas com DMSO (0,1%). O potencial citotóxico do extrato testado foi calculado em relação ao controle tratado com DMSO. No método de exclusão pelo azul de tripan, 20 μ L da suspensão de células foi misturada a 20 μ L do azul de tripan e uma alíquota foi colocada em câmara de Neubauer e visualizada em microscópio óptico para determinação da porcentagem de células viáveis.

2.8 Análise Toxicológica

2.8.1 Avaliação da Toxicidade Aguda

A toxicidade aguda do extrato foi determinada pela metodologia descrita no Guia 423 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 2001). Foram utilizados 6 camundongos Swiss fêmeas (6 - 8 semanas de idade) provenientes do biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os animais

foram mantidos em ambiente com temperatura controlada (22 ± 2 °C) e 12 horas de ciclo diurno/noturno com livre acesso a ração e água. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPE (Protocolo: 0028/2017). Os camundongos foram divididos em 2 grupos de 3 animais. Após um período de jejum de 4 horas (somente água *ad libitum*), os animais foram pesados e tratados. O grupo controle negativo recebeu solução salina por via oral e o outro grupo recebeu o extrato aquoso de *K. tomentosa* na concentração de 2000 mg/kg, em dose única. Após a administração dos tratamentos, os animais foram observados individualmente por períodos de 30 minutos, 1, 2, 3 e 4 horas e diariamente durante os 14 dias seguintes. Entre os parâmetros avaliados, estão: alterações na pele e pelos, olhos, mucosas, sistema respiratório, sistema circulatório, sistema nervoso central e autônomo, atividade somatomotora e comportamental. A massa corporal dos animais foi avaliada antes da administração do tratamento (peso inicial) e após o término dos 14 dias de avaliação (peso final) para realização dos cálculos de variação de peso corporal. O consumo de água e ração foi registrado diariamente durante todo o experimento. Após 14 dias, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg) e em seguida foi realizada a coleta do sangue por punção cardíaca. O sangue coletado foi adicionado em tubos secos e centrifugado a 3500 rpm durante 10 minutos para obtenção do soro, que posteriormente foi utilizado para realizar as análises bioquímicas seguintes: albumina, fosfatase alcalina, ureia, creatinina, glicose, ácido úrico, proteínas totais, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). As dosagens bioquímicas foram realizadas através de kits bioquímicos da Labtest. Em seguida, foi realizada a eutanásia dos animais por deslocamento cervical. Por último, fígado, baço e rins foram retirados, avaliados macroscopicamente e pesados para determinação do peso relativo dos órgãos, que foi calculado dividindo o peso de cada órgão (g) pelo peso corporal do animal (g) e multiplicando por 100.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação Fitoquímica

A investigação fitoquímica tem como principal finalidade conhecer os constituintes químicos das espécies vegetais e avaliar a presença desses compostos, indicando a importância das classes do metabolismo secundário que são responsáveis pelos princípios ativos das plantas (Simões et al., 2004).

O perfil fitoquímico do extrato aquoso de *K. tomentosa* (EAq KT) foi obtido através de cromatografia em camada delgada e está descrito na tabela 2, onde é possível observar que EAq KT revelou a presença de flavonoides, proantocianidinas condensadas, leucoantocianidinas e traços de monoterpenos e sesquiterpenos. Não foi detectada a presença de alcaloides, saponinas, derivados cinâmicos, triterpenos, esteroides, cumarinas, quinonas e taninos hidrolisáveis. A presença ou ausência de algumas classes de metabólitos secundários estão possivelmente relacionadas aos fatores abióticos naturais, como sazonalidade, ciclo circadiano, temperatura, homeostase hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, poluição atmosférica, ataque a patógenos, entre outras (Gobbo-Neto & Lopes, 2007). Leucoantocianidinas e proantocianidinas fazem parte de uma classe de flavonoides onde é possível observar estruturas condensadas (Bagchi et al., 1998). Diversos estudos indicam que os flavonoides podem ser benéficos à saúde, ajudando no combate de diversas doenças (Patil et al., 2009). Pesquisas têm demonstrado que estes compostos apresentam atividade anti-inflamatória, antioxidante, antialérgica, hepatoprotetora, antitrombótica, antiviral e antitumoral (Middleton et al., 2000; Garcya et al., 2009).

Tabela 2: Perfil fitoquímico do extrato aquoso de ramos de *K. tomentosa* A. St. -Hil. (Krameriaceae).

Classes de Metabólitos Secundários	EAq KT
Flavonoides	++ ^{1,2}
Derivados cinâmicos	-
Saponinas	-
Alcaloides	-
Triterpenos e Esteroides	-
Monoterpenos e Sesquiterpenos	tr
Cumarinas	-
Quinonas	-
Proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas	+++ ^{3,4}
Taninos hidrolisáveis	-

Legenda: ¹heterosídeos de flavonoides 3'-OH e 4'-OH; ²heterosídeos de flavonoides 3'-OH; ³proantocianidinas oligoméricas; ⁴proantocianidinas poliméricas; ⁵ácidos fenólicos livres e poliméricos. Legenda: (+++) forte; (++) médio; (+) fraco; (-) ausente; (tr) traços.

De acordo com o perfil fitoquímico do extrato aquoso de *K. tomentosa*, como os flavonoides, as proantocianidinas condensadas e as leucoantocianidinas foram encontrados em maior quantidade dentre os metabólitos identificados, os compostos fenólicos totais e os flavonoides foram quantificados em seguida. O teor de fenóis totais e flavonoides encontrados em EAq KT estão representados na tabela 3.

Tabela 3: Dosagem de fenóis totais e flavonoides do extrato aquoso de ramos de *K. tomentosa*.

Extrato	Fenóis Totais mg EAG/g de extrato	Flavonoides mg EQ/g de extrato
EAq KT	306,32 ± 0,30	7,76 ± 0,39

Legenda: EAG (equivalente de ácido gálico); EQ (equivalente de quercetina).

O conteúdo de fenóis totais foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu e expresso em miligrama equivalente de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG / g de extrato) enquanto o conteúdo de flavonoides foi expresso em miligrama equivalente de quercetina por grama de extrato (mg EQ/g de extrato). O conteúdo de fenóis totais de foi de 306,32 ± 0,30 mg EAG / g e o de flavonoides foi de 7,76 ± 0,39 mg EQ / g. O alto teor de fenóis e flavonoides encontrados em EAq KT pode ser justificado pela afinidade destas substâncias por solventes polares, pois a maioria dos compostos fenólicos não são encontrados no estado livre na natureza, mas sob a forma de ésteres ou de heterosídeos, portanto, são extraídos com mais facilidade em água e em solventes orgânicos polares (Monteiro et al., 2005). Não foi possível correlacionar o teor de fenóis totais e flavonoides encontrados em EAq KT com outras espécies da mesma família, pois não há relatos na literatura.

3.1.1 Análise Química de EAq KT por HPLC

Na análise cromatográfica, a identificação dos compostos presentes no extrato aquoso de ramos *K. tomentosa* (EAq KT) foi determinada através do cromatograma analisado no comprimento de onda de 254 nm, pois é o indicado para observação de compostos fenólicos, que de acordo com o perfil fitoquímico de EAq KT, está presente em grande quantidade. Os picos observados no cromatograma representam a intensidade do sinal, que é proporcional a concentração dos compostos presentes no extrato. No cromatograma de EAq KT (Figura 1), é possível observar um pico maior com tempo de retenção de aproximadamente 6 minutos e outros picos menores em diferentes tempos de retenção, porém, quando estes foram comparados com os picos dos compostos utilizados como padrões, não foi possível identificar quais são os

[illegible]

Legenda: (A) Cromatograma do extrato aquoso de ramos de *K. tomentosa*. (B) Espectro principal do cromatograma de EAq KT.

3.2 Avaliação da Atividade Antioxidante

As pesquisas sobre os radicais livres e o desenvolvimento de novos métodos com objetivo de avaliar a atividade antioxidante vem crescendo consideravelmente nos últimos anos. As descobertas sobre os efeitos prejudiciais causados pelos radicais livres às células e sua correlação com algumas patologias, impulsionou a procura por novas substâncias capazes de prevenir ou minimizar os danos oxidativos provocados ao organismo (Alves et al., 2010). Existem diferentes métodos para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de substâncias biologicamente ativas (Sánchez-Moreno, 2002). Esses testes estão sendo considerados ferramentas habituais e extremamente necessárias na seleção inicial de substâncias que possam ser utilizadas como futuros fármacos, auxiliando os pesquisadores na investigação do potencial antioxidante de substâncias isoladas de produtos naturais, bem como as obtidas de fontes sintéticas. Devido aos diferentes tipos de radicais livres e suas variadas formas de atuação nos organismos vivos, dificilmente haverá um único método simples e universal pelo qual a atividade antioxidante possa ser determinada precisamente. Assim, a procura por testes mais rápidos e eficientes tem originado um grande número de métodos para avaliar a atividade antioxidante de diversas substâncias (Alves et al., 2010). Em virtude disso, para determinar a atividade antioxidante do extrato aquoso de *K. tomentosa* (EAq KT), foram utilizados cinco métodos diferentes.

Em todos os métodos avaliados, ácido gálico, quercetina e BHT foram usados como compostos de referência, pois são substâncias amplamente utilizadas pela indústria farmacêutica como padrões antioxidantes comerciais. Cinco métodos baseados em diferentes princípios foram utilizados para avaliar a atividade antioxidante de EAq KT. O método do DPPH avaliou a atividade antioxidante do extrato pela capacidade em sequestrar o radical livre DPPH. Nesse ensaio, EAq KT apresentou um IC₅₀ próximo ao da quercetina e do BHT e superior ao do ácido gálico. O método de sequestro do ânion superóxido é semelhante ao anterior e avaliou a atividade antioxidante do extrato pela capacidade deste em sequestrar o ânion superóxido. O resultado desse teste também foi expresso em IC₅₀ e EAq KT apresentou um IC₅₀ bem menor que o do BHT, próximo ao da quercetina e maior do que o ácido gálico. Na avaliação da atividade antioxidante total (TAC %) do extrato pela formação do complexo fosfomolibdênio, EAq KT apresentou atividade antioxidante total maior que todos os padrões testados. O método do FRAP avaliou a capacidade do extrato em reduzir o íon Fe³⁺ em Fe²⁺, podendo prevenir ou inibir a reação de Fenton, a qual gera radicais hidroxilas livres. Nesse método, EAq KT apresentou uma atividade antioxidante maior que a da quercetina e do ácido

gálico e um pouco menor que a do BHT. O método seguinte avaliou a atividade antioxidante do extrato pelo grau de inibição da peroxidação do ácido linoleico. Nesse ensaio, EAq KT apresentou uma atividade maior que a da quercetina e do BHT e menor que a do ácido gálico, que nesse teste é considerada 100%. Todos os resultados podem ser observados na tabela a seguir (Tabela 4).

Tabela 4: Avaliação das atividades antioxidantes do extrato aquoso de ramos de *K. tomentosa* em comparação com os padrões (Quercetina, Ácido Gálico e BHT).

AMOSTRAS	DPPH IC ₅₀ (µg/mL)	ÂNION SUPERÓXIDO IC ₅₀ (µg/mL)	TAC (1 mg/mL - %)	FRAP (1 mg/mL - %)	PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (1 mg/mL - %)
KT Aq	25,72 (23,73 até 27,88)	63,05 (60,82 até 66,35)	45,24 ± 0,98	557,69 ± 2,10	42,14 ± 0,81
Quercetina	20,7 (18,5 até 23,2) ^{ns}	56,52 (53,12 até 60,14) ^{ns}	40,25 ± 0,76 ^{***}	551,57 ± 2,69 ^{***}	39,44 ± 0,39 ^{***}
Ácido Gálico	5,0 (4,5 até 5,6) ^{***}	46,18 (43,43 até 49,11) ^{***}	9,35 ± 0,73 ^{***}	546,73 ± 2,75 ^{***}	100 ^{***}
BHT	20,9 (17,8 até 24,6) ^{ns}	996,9 (991,5 até 998,3) ^{***}	11,15 ± 0,42 ^{***}	563,52 ± 2,53 ^{***}	17,89 ± 0,67 ^{***}

Legenda: Resultados expressos em média e desvio padrão. *p < 0,05 vs. quercetina, ácido gálico e BHT.

É possível observar que na maioria dos métodos utilizados, EAq KT apresentou uma atividade antioxidante tão boa ou maior que a dos padrões utilizados. Vale ressaltar que os compostos utilizados como padrões são substâncias puras já conhecidas por suas propriedades antioxidantes. A atividade antioxidante encontrada em EAq KT pode estar diretamente associada a presença de flavonoides, como pode ser observado na Tabela 2. Vários estudos estão revelando que o consumo de substâncias antioxidantes na dieta pode gerar uma proteção contra os danos provocados pelos processos oxidativos celulares. A atividade antioxidante que os flavonoides apresentam é proveniente das suas propriedades de óxido-redução, as quais desempenham uma importante função na absorção e neutralização de radicais livres (Degáspari & Waszczynskyj, 2004). Na química, os flavonoides são conhecidos como doadores de elétrons. Eles possuem estruturas químicas conjugadas em anel β, ricas em grupos hidroxilas, apresentando fortes ações antioxidantes por atuarem inativando ânions superóxido, oxigênio singleto, peróxidos lipídicos e/ou estabilizando radicais livres que estão associados ao processo oxidativo (Birt et al., 2001). Por isso, os flavonoides são considerados bastante eficientes no combate a diferentes tipos de moléculas oxidantes que estão relacionadas a danos no DNA e no desenvolvimento de tumores (Marchand, 2002)

3.3 Avaliação da Atividade Antibacteriana

Nos últimos anos, o aparecimento de bactérias resistentes a antibióticos tem despertado o interesse de muitos pesquisadores para o desenvolvimento de novas substâncias antimicrobianas (Ang et al., 2004). Por esta razão, a busca de antimicrobianos extraídos de plantas tornou-se uma alternativa importante (Ferreira, 2004). Muitos estudos nessa área estão à procura de substâncias menos tóxicas, mais eficazes contra a resistência bacteriana e capazes de combater novos patógenos (Barbosa-Filho et al., 2007; Ostrosky et al., 2008). Devido a isso, a atividade antimicrobiana do extrato aquoso de *K. tomentosa* foi avaliada em relação à duas cepas bacterianas Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*) e duas Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*). O resultado desse teste pode ser observado na tabela a seguir (Tabela 5).

Tabela 5: Concentração mínima inibitória e concentração mínima bactericida do extrato aquoso de ramos de *K. tomentosa* contra bactérias gram-positivas e gram-negativas.

Cepas Bacterianas	CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)
<i>S. aureus</i>	0,25	1
<i>E. faecalis</i>	0,25	0,5
<i>P. aeruginosa</i>	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-

Legenda: Concentração mínima inibitória (CMI) e Concentração mínima bactericida (CMB) do extrato em miligrama por mL.

A atividade antimicrobiana de EAq KT foi determinada a partir da concentração mínima inibitória (CMI) e da concentração mínima bactericida (CMB). É possível observar que EAq KT apresentou uma concentração mínima inibitória de 0,25 mg/mL para as duas cepas de bactérias gram-positivas testadas, e uma concentração mínima bactericida de 1 mg/mL para *S. aureus* e 0,5 mg/mL para *E. faecalis*. Já para as bactérias gram-negativas, EAq KT não apresentou concentração mínima inibitória nem bactericida.

Na literatura, ainda não existe um consenso que define a atividade antimicrobiana de extratos obtidos de plantas, porém, muitos estudos classificam essa atividade a partir da CMI necessária para inibir patógenos. Obtidos os valores de CMI e CMB, o extrato aquoso de *K. tomentosa* foi avaliado quanto a sua ação antimicrobiana de acordo com os valores de CMI contra os patógenos estudados, onde extratos que apresentam CMI < 0,1 mg/mL têm potencial antimicrobiano promissor (bom), CMI entre 0,1 – 0,5 mg/mL possui atividade inibitória moderada, CMI entre 0,5 – 1,0 mg/mL apresenta atividade inibitória fraca e extratos que

apresentam CMI > 1,0 mg/mL são inativos frente aos patógenos (Rios et al., 1988; Fabry et al., 1998; Holetz et al., 2002; Dall'agnol et al., 2003; Tanaka et al., 2005; Chavasco et al., 2014). Seguindo esses parâmetros, é possível concluir que EAq KT apresentou uma atividade antimicrobiana moderada frente as cepas bacterianas Gram-positivas.

Diversos estudos demonstram que compostos extraídos de plantas que apresentam ação antibacteriana, mostram-se mais efetivos contra cepas Gram-positivas do que Gram-negativas (Delaquis et al., 2002). Esta ação está relacionada com a estrutura da parede celular devido às bactérias Gram-negativas apresentarem uma membrana externa que funciona como barreira, impedindo a passagem de alguns tipos de antibióticos, enzimas digestivas, detergentes e metais pesados (Tortora et al., 2003), em contraste com a estrutura simples da parede celular das bactérias Gram-positivas.

Muitos mecanismos de ação inibitória têm sido atribuídos a compostos ativos presentes nos extratos vegetais. A ação antimicrobiana de vários extratos e de plantas já foi atribuída à presença de compostos fenólicos (Nascimento et al., 2000). Taleb-Contini e colaboradores (2003) avaliaram a atividade antimicrobiana de flavonoides isolados e constataram sua atividade principalmente frente a micro-organismos Gram-positivos. Cushnie & Lamb (2011) propõem que a atividade antibacteriana dos flavonoides está relacionada a danos na membrana citoplasmática (causada por perfuração e/ ou redução da fluidez da membrana), inibição da síntese de ácidos nucleicos (causada pela inibição da topoisomerase) e inibição do metabolismo energético (causada pela inibição da NADH-citocromo-C-redutase). E segundo Taguri e colaboradores (2004), os flavonoides também podem agir na célula bacteriana através de complexos formados entre as proteínas e a parede celular bacteriana, ocasionando assim seu rompimento.

3.4 Ensaios de Viabilidade Celular

3.4.1 Avaliação da Citotoxicidade em Células Saudáveis e Neoplásicas

O câncer está se tornando um enorme desafio para comunidade científica nos últimos tempos. Apesar do desenvolvimento de diversas formas de tratamento e criação de novas drogas, ainda há muitas questões a serem elucidadas (Sheikh et al., 2012). Em virtude dos avanços tecnológicos e do rápido desenvolvimento de técnicas e equipamentos analíticos, muitas drogas extraídas de fontes naturais com potencial anticâncer têm sido elaboradas (Tsai, 2001). Os mecanismos moleculares relacionados ao câncer estão sendo bastante estudados e isso vem permitindo a descoberta de novos compostos com atividade antineoplásica através do conhecimento

do potencial citotóxico e da seletividade sobre células cancerígenas (Sanmartín et al., 2005). A elevada seletividade no tratamento de células cancerígenas é um fator muito importante na utilização da terapia antineoplásica, visto que as células normais seriam menos afetadas e os efeitos tóxicos reduzidos (Gavamukulya et al., 2014).

Diversas metodologias *in vitro* estão sendo utilizadas para determinar a citotoxicidade de diversas substâncias em vários tipos de células, avaliando diferentes parâmetros celulares, como por exemplo, a atividade enzimática intracelular, a integridade da membrana celular e as condições metabólicas das células (Eisenbrand et al., 2002). Os métodos colorimétricos que avaliam a viabilidade celular são considerados rápidos e baratos para determinar a atividade antitumoral de muitos extratos provenientes de produtos naturais, permitindo assim direcionar o isolamento e a purificação de seus produtos bioativos (Betancur-Gavis et al., 1999).

Para investigar a citotoxicidade do extrato aquoso dos ramos de *K. tomentosa* (EAq KT), foram utilizados dois métodos distintos que avaliaram a viabilidade celular de diferentes linhagens celulares (PBMC, HL-60, MOLT-4, K562, DU-145 e PANC-1). Os resultados dos ensaios de citotoxicidade frente às linhagens de células neoplásicas e células saudáveis revelaram que EAq KT não foi tóxico para as células saudáveis (PBMC) nem para as linhagens neoplásicas de DU-145 e PANC-1, porém, apresentou uma significativa atividade citotóxica nas linhagens neoplásicas de HL-60, MOLT-4 e K562 (Tabela 6).

Tabela 6: Avaliação da citotoxicidade do extrato aquoso de ramos de *K. tomentosa* em diferentes linhagens celulares pelo ensaio colorimétrico de redução do MTT e ensaio de exclusão pelo azul de tripan.

Linhagens Celulares	MTT	TRIPAN
	IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)
PBMC	>100	>100
HL-60	56.71 ± 1.26	56.55 ± 4.35
MOLT-4	62 ± 4.15	64.13 ± 0.60
K562	59.01 ± 4.94	62.95 ± 0.62
DU-145	>100	>100
PANC-1	>100	>100

Legenda: PBMC (Células mononucleadas do sangue periférico); HL-60 (Leucemia Promielocítica Aguda); MOLT-4 (Leucemia Linfoblástica Aguda); K562 (Leucemia Mielóide Crônica); DU-145 (Câncer de próstata); PANC-1 (Câncer de pâncreas).

A atividade citotóxica de EAq KT está relacionada com a presença de alguns metabólitos encontrados na triagem fitoquímica. Portanto, é possível afirmar que os compostos presentes em EAq KT (flavonoides, proantocianidinas e leucoantocianidinas) apresentam uma

ação sinérgica, colaborando com a atividade antineoplásica observada sobre as linhagens de HL-60, MOLT-4 e K562.

Diversas atividades farmacológicas estão sendo atribuídas aos flavonoides, entre elas, pode-se destacar as propriedades anti-inflamatória, antioxidante, anti-mutagênica, quimiopreventiva e quimioterápica (Ren et al., 2003; Ravishankar et al., 2013). Vários mecanismos moleculares estão associados as propriedades antitumorais apresentadas pelos flavonoides, como por exemplo: inibição das proteínas quinases (PKs), que bloqueiam a transdução de sinal na proliferação celular e impedem a angiogênese tumoral. Também conseguem interromper o ciclo celular na fase G2/M e estimular o aumento da taxa de apoptose via mitocondrial por um mecanismo que depende da proteína p53 (Chahar et al., 2011; Batra & Sharma, 2013; Martinez-Perez et al., 2014). Além disso, a atividade antitumoral de vários flavonóides também está associada à sua eficiência em inibir as enzimas topoisomerasas I e II (Sukardiman et al., 2000), diminuir a proliferação celular como consequência de sua ligação ao receptor de estrógeno (Primiano et al., 2001), e/ou induzir apoptose e liberação do citocromo c (Lu et al., 2010). Diante dos resultados obtidos, EAq KT pode ser considerado um composto seletivo e promissor em relação a sua atividade antineoplásica.

3.5 Avaliação da Toxicidade Aguda

Os estudos toxicológicos são extremamente importantes para avaliar a capacidade de novas substâncias e produtos provocarem danos à saúde humana. Os ensaios que analisam a toxicidade sistêmica aguda são utilizados para classificar as substâncias conforme seu potencial de letalidade ou toxicidade (Valadares, 2006). Diversos estudos explicam que todas as substâncias podem apresentar elevada toxicidade de acordo com a maneira que são utilizadas, dependendo apenas das condições de exposição, como: dose, tempo, frequência e via de administração (Valadares, 2006; Zatta et al., 2009; Pires Júnior et al., 2012). Para que os resultados sejam considerados pelas agências regulatórias dos países, é fundamental que estes testes sejam realizados de acordo com os protocolos internacionalmente aprovados, como os publicados pela OECD (Sachetti et al., 2009).

A toxicidade do extrato aquoso de *K. tomentosa* (EAq KT) foi avaliada segundo o Guia da OECD (OECD, 2001), que utiliza poucos animais, apresenta boa reprodutibilidade e é capaz de classificar as substâncias de acordo com sistemas internacionais reconhecidos. No ensaio de toxicidade aguda de EAq KT (2000 mg/kg), não foi observada nenhuma morte ou sintoma clínico de toxicidade em qualquer um dos grupos avaliados nas primeiras vinte e quatro horas após a administração das substâncias e durante os 14 dias subsequentes. De acordo com

os resultados obtidos, é possível afirmar que a toxicidade oral aguda de EAq KT é maior que 2000 mg/kg, que segundo o guia 423 da OECD, pode ser classificada como categoria 5. Não foi observada nenhuma alteração significativa na massa corporal dos animais tratados com EAq KT quando comparados ao controle negativo (salina). A média do consumo de ração e água durante os 14 dias de avaliação também não mostrou nenhuma alteração significativa (Tabela 7).

Tabela 7: Média dos valores obtidos do consumo de ração e água, peso inicial, peso final e variação do peso corporal dos animais do grupo controle (solução salina) e do grupo tratado com extrato aquoso de *K. tomentosa* na dose única de 2000 mg/kg.

Grupos	Consumo de ração (g)	Consumo de água (mL)	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Variação do peso corporal (g)
Controle	18,06 ± 1,24	38,08 ± 2,53	29,7 ± 2,31	33,0 ± 1,73	1,00 ± 0,11
EAq KT	19,0 ± 1,22 ^{ns}	37,69 ± 2,59 ^{ns}	30,3 ± 2,08 ^{ns}	33,7 ± 1,53 ^{ns}	0,93 ± 0,20 ^{ns}

Legenda: Resultados expressos em média e desvio padrão. *p < 0,05 vs. grupo controle normal.

Os efeitos tóxicos de diversas substâncias podem comprometer alguns órgãos como fígado, baço e rins, provocando alterações morfológicas parcialmente características, sendo o exame histológico considerado um método complementar muito útil na confirmação diagnóstica (Tokarnia et al., 2012). Durante a análise macroscópica, não foram visualizadas alterações na coloração ou consistência dos órgãos, assim como não houve variação estatística significativa no peso relativo dos órgãos dos animais tratados com EAq KT em comparação ao do grupo controle (Tabela 8). As análises histopatológicas do fígado, baço e rins dos dois grupos não apresentaram alterações morfológicas, estando todos os órgãos dentro dos limites de normalidade histológica.

Tabela 8: Peso relativo dos órgãos dos animais do grupo controle (solução salina) e do grupo tratado com extrato aquoso de *K. tomentosa* na dose única de 2000 mg/kg.

Grupos	Fígado (g)	Baço (g)	Rins (g)
Controle	5,15 ± 0,30	0,40 ± 0,17	1,01 ± 0,17
EAq KT	5,25 ± 0,17 ^{ns}	0,50 ± 0,17 ^{ns}	0,99 ± 0,17 ^{ns}

Legenda: Resultados expressos em média e desvio padrão. *p < 0,05 vs. grupo controle normal.

O fígado é considerado o principal órgão responsável pela detoxificação e metabolização de drogas, por essa razão, estudos pré-clínicos avaliam a hepatotoxicidade para determinar o uso terapêutico de novas drogas, uma vez que o aparecimento de lesões neste

órgão vital impossibilita a utilização de novas terapias (Folgueira & Brentani, 2004). Este órgão é bastante suscetível aos efeitos causados pelos compostos químicos, já que as substâncias administradas por via oral sofrem absorção gastrointestinal e podem ser transportadas primeiramente para o fígado pela veia porta hepática (Túrmina, 2012). Já os rins, são os órgãos responsáveis pela excreção de resíduos metabólicos e atuam no controle da homeostase, regulando o volume extracelular, o metabolismo do cálcio, o equilíbrio eletrolítico e o equilíbrio ácido-básico. Portanto, o surgimento de lesões nesses órgãos pode provocar hipotensão e falência irreversível (Middendorf & Williams, 2000).

Para investigar os possíveis efeitos tóxicos causados pelo extrato aquoso de *K. tomentosa*, os parâmetros bioquímicos hepáticos e renais foram avaliados. Na análise desses parâmetros, não foram observadas alterações estatisticamente significativas nos níveis séricos hepáticos e renais (albumina, ureia, creatinina, ácido úrico, proteínas totais, fosfatase alcalina, alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase) do grupo tratado com EAq KT em relação ao grupo controle normal (Tabela 9).

Tabela 9: Avaliação das alterações bioquímicas hepáticas e renais causadas pelo extrato aquoso de ramos de *K. tomentosa* no teste de toxicidade aguda oral.

Parâmetros Bioquímicos	Grupo Controle	Grupo Tratado
Ácido úrico (mg/dl)	0,95 ± 0,03	0,52 ± 0,03 ^{ns}
ALT (U/L)	63,59 ± 1,90	60,85 ± 1,91 ^{ns}
AST (U/L)	122,60 ± 1,08	101,27 ± 2,94 ^{ns}
Creatinina (mg/dl)	0,19 ± 0,04	0,17 ± 0,03 ^{ns}
Albumina (g/dl)	2,12 ± 0,01	2,16 ± 0,03 ^{ns}
Proteínas totais (g/dl)	4,63 ± 0,08	4,42 ± 0,22 ^{ns}
Fosfatase alcalina (u/l)	97,65 ± 0,23	78,23 ± 0,62 ^{ns}
Glicose (mg/dl)	112,19 ± 0,38	120,79 ± 0,37 ^{ns}
Uréia (mg/dl)	57,90 ± 0,26	54,33 ± 0,15 ^{ns}

Legenda: Resultados expressos em média e desvio padrão. * $p < 0,05$ vs. grupo controle normal.

De acordo com os parâmetros bioquímicos avaliados, EAq KT não ocasionou comprometimento a nível hepático e renal. Diante de todos os resultados da análise toxicológica, é possível afirmar que o extrato aquoso de *K. tomentosa* não é tóxico ao organismo.

4. CONCLUSÃO

A análise fitoquímica do extrato aquoso dos ramos de *K. tomentosa* revelou a presença de flavonoides, leucoantocianidinas e proantocianidinas condensadas. Essas classes de compostos são as grandes responsáveis pelas propriedades terapêuticas apresentadas por esta espécie. Foi observado que as atividades antioxidante, antibacteriana e antineoplásica encontradas no EAq KT estão possivelmente ligadas aos seus constituintes químicos, principalmente aos compostos fenólicos (flavonoides) encontrados no mesmo, pois os teores determinados destas substâncias foram consideravelmente altos. O uso desse extrato como fonte medicinal pode ser considerado seguro quando administrado por via oral, pois este não apresentou sinais de toxicidade ao organismo animal na dose avaliada, embora seja necessário a realização de estudos mais prolongados (toxicidade sub-crônica e crônica) para investigar o desenvolvimento de prováveis danos nos sistemas fisiológicos decorrentes da administração crônica do EAq KT. Os resultados obtidos neste estudo fazem da *Krameria tomentosa* uma fonte muito promissora para aplicações na indústria farmacêutica, porém, estudos mais aprofundados devem ser realizados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achebach, H., Grob, J., Dominguez, X.A., Cano, G., Star, J.V., Brussolo, L.D.C., Munõz, G., Salgado, F., Lopez, L., 1987. *Phytochemistry*, v. 26, p. 1159–1166.
- Achebach, H., Utz, W., Lozano, B., Touche, E.M.G., Moreno, S., 1996. *Phytochemistry*, v. 43, p. 1093–1095.
- Almeida, P.P., 2006. Extração de óleo essencial de hortelã (*Mentha spicata L.*) com misturas de solventes a alta pressão. (Dissertação), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- Alves, C.Q., David, J.M., David, J.P., Bahia, M.V., Aguiar, R.M., 2010. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. *Química Nova*, São Paulo, v. 33, n. 10, p. 263-269.
- Ang, J.Y., Ezike, E., Asmar, B.I., 2004. Antibacterial resistance. *Indian Journal of Pediatrics*, v. 71, p. 229-239.
- Bagchi, D., Garg, A., Krohn, R.L., Bagchi, M., Bagchi, D.J., Balmoori, J., Stohs, S.J., 1998. Protective effects of grape seed proanthocyanidins and selected antioxidants against TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation and DNA fragmentation, and peritoneal macrophage activation in mice. *General Pharmacology*, v. 30, p. 771-776.
- Barbosa-Filho, J.M., Júnior, F.A.N., Tomaz, A.C.A., Athayde-Filho, P.F., Silva, M.S., Cunha, L., Souza, M.F.V., Batista, L.M., Diniz, M.F.F.M., 2007. Natural products with antileprotic activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.17, p.141-148.
- Batra, P., Sharma, A.K., 2013. Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives. *3 Biotech*, v. 3, n. 6, p. 439–459.
- Beauchamp, C., Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, v. 44, p. 276-287.
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J., 1996. Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, v. 239, p. 70-76.
- Betancur-Galvis, L. A., Saez, J., Granados, H., Salazar, A., Ossa, J.E., 1999. Antitumor and antiviral activity of colombian medicinal plant extracts. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94, p. 531-535.
- Birt, D.F., Hendrich, S., Wang, W., 2001. Dietary agents in cancer prevention: flavonóides and isoflavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 90, p. 157-177.
- Blois, M.S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, v. 29, p. 1199-1200.
- Bombardelli, E., Morazzoni, P., Cristoni, A., Seghizzi, R., 2002. Pharmaceutical and cosmetic formulations with antimicrobial activity. Patent US 6475536.
- Braga, R., 1960. Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará, Fortaleza, 2º Edição.

- Brasseur, T., Angenot, L., 1986. Un reactif de choix pour la revelation des flavonoides: le melange diphenylborate d'aminoethanol -PEG 400. *Journal of Chromatography*, p. 351-355.
- Carvalho, A.C.B., Nunes, D.S.G., Baratelli, T.G., Shuqair, N.S.M.S.A.Q.; Netto, E.M., 2007. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. *T&C Amazônia*, v. 5, n. 11, p. 26-32.
- Chahar, M.K., Sharma, N., Dobhal, M.P., Joshi, Y.C., 2011. Flavonoids: A versatile source of anticancer drugs. *Pharmacognosy Reviews*, v. 5, n. 9, p. 1-12.
- Chavasco, J.M., E Felipe, B.H.M.P., Cerdeira, C.D., Leandro, F.D., Coelho, L.F.L., Silva, J.J., Chavasco, J.K., Dias, A.L.T., 2014. Evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of plant extracts from southern Minas Gerais Cerrado. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 56, n.1, p. 13-20.
- CLSI., 2014. Performance Standards Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement (M100 - S24). CLSI, Wayne, PA, USA.
- Corrêa, A.D., Batista, R.S., Quintas, L.E.M., 2008. Plantas medicinais: do cultivo à terapêutica. Rio de Janeiro: Vozes, 7.
- Correa, M.P., 1981. Dicionário das Plantas úteis do Brasil, Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, p. 92.
- Costa, M.C.C.D., 2002. Aspectos Farmacológicos de *Plectranthus barbatus* Andr. (Lamiaceae): Atividade antimicrobiana, citotóxica e antitumoral. Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Cushnie, T.P.T., Lamb, A.J., 2011. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 38, n. 2, p. 99-107.
- Dall'agnol, R., Ferraz, A., Bernardi, A. P., Albring, D.C., Sarmiento, L., Lamb, L., Hass, M., Poser, G., Schapoval, E.E.S. 2003. Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. *Phytomedicine*, v. 10, p. 511-516.
- Degáspari, C.H., Waszczynskyj, N., 2004. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. *Visão Acadêmica*. Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40.
- Delaquis, P.J., Stanich, K., Girard, B., Mazza, G., 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fraction of dill, cilantro, coriander and *Eucalyptus* essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, v. 74. p. 101-109.
- Eisenbrand, G., Pool-Zobel, B., Baker, V., Balls, M., Blaauboer, B.J., Boobis, A., Carere, A., Kevekordes, S., Lhuguenot, J.C., Pieters, R., Kleiner, J., 2002. Methods of in vitro toxicology. *Food and Chemical Toxicology*, v. 40, p. 193-236.
- Every, J.L.R., Baracat, A., 2009. Neotropical Krameriaceae. In: Milliken, W., Klitgard, B., Baracat, A. Neotropikey - Interactive key and information resources for flowering plants of the Neotropics.

Fabry, W., Okemo, P.O., Ansorg, R., 1998. Antibacterial activity of East African medicinal plants. *Journal Ethnopharmacology*, v. 60, p. 79-84.

Farias, E.M.F.G., 2007. Avaliação da toxicidade aguda do extrato metanólico de folhas de *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae). Congresso Brasileiro de Química. Sociedade Brasileira de Química, Natal.

Fernandes, A.S.F., 2010. Propriedades nutricionais, nutracêuticas e antioxidantes de espécies silvestres condimentares utilizadas na gastronomia tradicional do nordeste transmontano. Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança.

Ferreira, D.T., 2004. Antimicrobial activity and chemical investigation of Brazilian *Drosera*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 99, n. 7, p. 753-755.

Folgueira, M.A.A.K., Brentani, M.M., 2004. Câncer de mama. In: Ferreira, C.G., Rocha, J.C. *Oncologia molecular*. Editora Atheneu, São Paulo, p. 135-144.

Garcya, L.A., Guillamon, E., Villares, A., Rostagno, M.A., Martyne, J.A., 2009. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflammation Research*, v. 58, p. 537-552.

Gavamukulya, Y., Abou-Elella, F., Wamunyokoli, F., AEl-Shemy, H., 2014. Phytochemical screening, anti-oxidant activity and in vitro anticancer potential of ethanolic and water leaves extracts of *Annona muricata* (Graviola). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 7, n. 1, p. 355-363.

Giannini, T.C., Takahas, A.I., Medeiros, M.C.M.P., Saraiva, A.M., Santos, I.A., 2011. Ecological niche modeling and principal component analysis of *Krameria* Loebl. (Krameriaceae) *Journal of Arid Environments*, v. 75, p. 870-872.

Gimenes, M., Lobão, C.S.A., 2006. Polinização de *Krameria bahiana* (Krameriaceae) por Abelhas (Apidae) na Restinga, BA. *Neotropical Entomology*, v. 35, n. 4, p. 440-445.

Gobbo-Neto, L., Lopes, N.P., 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-371.

Harborne, J.B., 1998. *Phytochemical Methods*. 3ª Edição. Londres: Chapman & Hall.

Holetz, F.B., Pessini, G.L., Sanches, N.L., Cortez, D.A.G., Nakamura, C.V., Filho, B.P.D., 2002. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 7, p. 1027-1031.

Li, H.B., Wong, C.C., Cheng, K.W., Chen, F., 2008. Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT- Food Science and Technology*, v. 41, p. 385-390.

Lima, L., 2006. Fitoterápicos e usos de plantas medicinais. *Jornal da Unesp*, ano XVI, n. 166.
Lu, H.P., Chie, Y.J., Yang, M.S., Lee, C.S., Fu, J.J., Yang, J.S., Tan, T.W., Wu, S.H., Ma, Y.S., Ip, S.W., Chung, J.G., 2010. Apigenin induces caspase-dependent apoptosis in human lung

cancer A549 cells through Bax- and Bcl-2-triggered mitochondrial pathway. *International Journal of Oncology*, v. 36, p. 1477-1484.

Maciel, M.A.M., Pinto, A.C., Veiga Jr, V.F., Grynberg, N.F., Echevarria, A., 2002. Medicinal plants: The need for multidisciplinary scientific studies. *Química Nova*, v. 25, p. 429–438.

Marchand, L.L., 2002. Cancer preventive effects of flavonóides – a review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 56, p. 296-301.

Martinez-Perez, C., Ward, C., Cook, G., Mullen, P., McPhail, D., Harrison, D.J., Langdon, S.P., 2014. Novel flavonoids as anti-cancer agents: mechanisms of action and promise for their potential application in breast cancer. *Biochemical Society Transactions*, v. 42, p. 1017–1023.

Middendorf, P.J., Williams, P.L., 2000. Nephrotoxicity: Toxic Responses of the Kidney. In: Williams, P.L., James, R.C., Roberts, S.M. *Principles of toxicology: environmental and industrial applications*. 2^o Edition. New York, Cap. 5, p. 120- 250.

Middleton, E.JR., Handas, W.C., Theoharides, C.T., 2000. The effect of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, Baltimore. v. 52, n. 4, p. 673-751.

Mitsuda, H., Yasumoto, K., Iwani, K., 1967. Antioxidant action of indole compounds during the autooxidation of linoleic acid. *Eiyo to Shokuryo*, n.19, p. 210-214.

Monteiro, J.M., Albuquerque, U.P., Araújo, E.L., Amorim, E.L.C., 2005. Taninos: uma abordagem química à ecologia. *Química Nova*, v. 28, nº 5, p. 892-896.

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

Nascimento, G.G.F., Locatelli, J., Freitas, P.C.D., 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 31, p. 247-256.

Neves, J.M., Matos, C.M., Moutinho, C.G., Gomes, L.R., Teixeira, T., 2009. Actividade antioxidante e avaliação in vitro da citotoxicidade de extractos aquosos de folhas de *Mentha piperita*. *Revista da Faculdade de Ciências da Saúde*. Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa, p. 344-354.

OECD., 2001. Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 423. Acute Oral Toxicity- Acute Toxic Class Method. Paris: Organization for Economic Cooperation and Development.

Ostrosky, E.A., Mizumoto, M.K., Lima, M.E.L., Kaneko, T.M., Nishikawa, S.O., Freitas, B.R., 2008. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 2, p. 301-307.

Patil, B.S., Jayaprakasha, G.K., Murthy, K.N.C., VIKRAM, A., 2009. Bioactive compounds: historical perspectives, opportunities and challenges. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Easton, v. 57, n. 18, p. 8142-8169.

Pires Junior, H.B., Borges, L.M.F., Sousa, L.A.D., Cunha, L.C., Lino Júnior, R.S., Melo, D.F.A., Pereira, M.E., 2012. Avaliação da toxicidade aguda do extrato hexânico de frutos de *Melia azedarach* (MELIACEAE) em camundongos. *Ciência Animal Brasileira*, v. 13, p. 512-519.

Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M., 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum Complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, v. 269, p. 337-341.

Primiano, T., Yu, R., Kong, A.N.T. 2001. Signal transduction events elicited by natural products that function as câncer chemopreventive agents. *Pharmaceutical Biology*, v. 39, p. 83-107.

Ravishankar, D., Rajora, A.K., Greco, F., Osborn, H.M., 2013. Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 45, n. 12, p. 2821-2831.

Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L., Zhang, L., 2003. Flavonoids: Promising Anticancer Agents. *Medicinal Research Reviews*, v. 23, n. 4, p. 519-534.

Rios, J.L., Recio, M.C., Villar, A., 1988. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 23, p. 127-149.

Roberts, E.A.H., Cartwright, R.A., Oldschool, M., 1957. Phenolic substances of manufactured tea. I. Fractionation and paper chromatography of water-soluble substances. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 8, p. 72-80.

Sachetti, C.G., Fascineli, M.L., Sampaio, J.A., Caldas, E.D., 2009. Avaliação da toxicidade aguda e potencial neurotóxico do óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, n. 4, p. 937-941.

Sanmartín, C., Echeverría, M., Mendivil, B., Cordeu, L., Cubedo, E., García-Foncillas, J., Font, M., Palop, J.A., 2005. Synthesis and biological evaluation of new symmetrical derivatives as cytotoxic agents and apoptosis inducers. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 13, n. 6, p. 2031-2044.

Sheikh, S., Srivastava, A., Tripathi, R., Tripathi, S., Trivedi, V.P., Saxena, R.C., 2012. Toxicity of a novel herbomineral preparation Las01 on human cancer cell lines and its safety profile in humans and animals. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (eCAM)*, v. 2012, ID 948375.

Silva, S.A., De Castro, J.C., Da Silva, T.G., Da Cunha, E.V., Barbosa-Filho, J.M., Da Silva, M.S., 2001. Kramentosan, a new trininorlignan from the roots of *Krameria tomentosa*. *Natural Product Letters*, v. 15, p. 323-329.

Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R., 2003. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre: UFRGS, 5ª Edição, p. 1102.

Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R., 2004. *Farmacognosia - da Planta ao Medicamento*. 5ª Edição, Editora da UFSC: Santa Catarina.

Simpson, B.B., 1989. Krameriaceae. Flora Neotropica Monograph. New York: New York Botanical Garden, v. 49, p. 2–88.

Simpson, B.B., 1991. The past and present uses of Rhatany (*Krameria*, Krameriaceae). Economic Botany, v. 43, n. 3, p. 397-409.

Simpson, B.B., Weeks, A., Helfgott, D.M., Larkin, L.L., 2004. Species relationships in *Krameria* (Kameriaceae) based on ITS sequences and morphology: implications for character utility and biogeography. Systematic Botany, v. 29, p. 97-108.

Souza, V.C., Lorenzi, H., 2005. Botânica Sistemática. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum.

Stepp, J.R., 2004. The role of weeds sources of pharmaceuticals. Journal of Ethnopharmacology, v. 92, p. 163-166.

Stiasny, E., 1912. The qualitative detection and differentiation of vegetable tannins. Collegium, p. 483-499.

Strober, W., 2015. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability Current protocols in immunology.

Sukardiman, D.A., Tanjung, M., Darmadi, M.O., 2000. Cytotoxic mechanism of flavonoid from Temu Kunci (*Kaempferia pandurata*) in cell culture of human mammary carcinoma. Clinical Hemorheology and Microcirculation, v. 23, p. 185-190.

Taguri, T., Tanaka, T., Kouno, I., 2004. Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. Biological and Pharmaceutical Bulletin, v. 27, n. 12, p.1965-1969.

Taleb-Contini, S.H., Salvador, M.J., Watanabe, E., Ito, I.Y., Oliveira, D.C.R., 2003. Antimicrobial activity of flavonoids and steroids isolated from two chromolaena species. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.39, n.4, p. 403-408.

Tanaka, J.C.A., Silva, C.C., Dias Filho, B.D., NAKAMURA, C.V., Carvalho, J.E., Foglio, M.A., 2005. Constituintes químicos de *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). Química Nova, v. 5, p. 834-837.

Tokarnia, C.H., Brito, M.F., Barbosa, J.D., 2012. Plantas tóxicas do Brasil: para animais de produção. 2º Edição. Rio de Janeiro: Editora Helianthus, p. 566.

Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L., 2003. Microbiologia. 6º Edição. Porto Alegre, ArtMed, p. 827.

Tsai, T.H., 2001. Analytical approaches for traditional chineses exhibiting antineoplastic activity. Journal of *Chromatography B*, v. 764, p. 27-48.

Túrmina, J.A., 2012. Avaliação da toxicidade subcrônica in vivo do exopolissacarídeo produzido pelo fungo *Lasioidiplodia theobromae* MMPI. Universidade Estadual do Centro-oeste.

Valadares, M.C., 2006. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL50”. Revista Eletrônica de Farmácia, v. 3, n. 2, p. 93-98.

Wagner, H., Bladt, S., 1996. Plant drug analysis -A thin layer chromatography atlas. Springer, 2º Edição, Munich.

Woisky, R.G., Salatino, A., 1998. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. Journal Apicultural Research, v. 37, p. 99-105.

Xavier, H.S., Randau, K.P., Barreto, L., Araújo, E.L., 2002. Contribuição à caracterização dos taninos hidrolisáveis. Congresso Nacional de Botânica, Recife, n. 53, p. 20.

Zatta, D.T., Pimenta, F.C.P., Tresvenzol, L.M.F., Fiuza, T.S., Bara, M.T.F., Cunha, L.C., Pucci, L.L., Garrote, C.F.D., Oliveira, F.N.M., Paula, J.R., 2009. Estudo da atividade antibacteriana contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e da toxicidade aguda das folhas da *Jacaranda decurrens*. Latin American Journal of Pharmacy, v. 28, p. 485-489.

Zuanazzi, J.A.S., Mayorga, P., 2010. Fitoprodutos e desenvolvimento econômico. Química Nova, v. 33, n. 6, p. 1421-1428.

4 CONCLUSÃO

- Foi possível identificar através do perfil fitoquímico que os flavonoides, as leucoantocianidinas e as proantocianidinas são as principais classes de metabólitos presentes no extrato aquoso de *K. tomentosa*.
- Nos testes antioxidantes realizados, o extrato aquoso de *K. tomentosa* apresentou excelente atividade antioxidante quando comparado com os padrões puros testados. Esta atividade está diretamente relacionada com o alto teor de compostos fenólicos encontrados nesse extrato.
- O extrato aquoso de *K. tomentosa* não apresentou atividade antimicrobiana frente as cepas de bactérias Gram-negativas (*P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*), porém, possui capacidade para inibir as cepas Gram-positivas (*S. aureus* e *E. faecalis*) em baixas concentrações.
- Através dos ensaios de citotoxicidade foi possível observar que o extrato aquoso de *K. tomentosa* apresentou uma significativa atividade citotóxica sobre as linhagens tumorais de HL-60, MOLT-4 e K562 e não foi tóxico para células saudáveis do sangue periférico, podendo ser considerado um composto seletivo e promissor no combate ao câncer.
- As análises toxicológicas realizadas mostraram que o extrato aquoso de *K. tomentosa* não apresentou nenhum indício de toxicidade na dose testada (2000 mg/Kg), revelando ter uma boa margem de segurança quanto a sua utilização na medicina tradicional.

REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO, S. A. et al. **Compostos bioativos e atividade antioxidante do café.** Ciência e Agrotecnologia, v. 34, p. 414-420, 2010.
- ACHENBACH, H. et al. **Lignans and neolignans from *Krameria parvifolia*.** Phytochemistry, v. 43, p. 1093– 1095, 1996.
- ACHENBACH, H. et al. **Lignans neolignans and norneolignans from *krameria cystisoides*.** Phytochemistry, v. 26, n. 4, p. 1159-1166, 1987.
- ACHENBACH, H. et al. **Neolignans, nor-neolignans and other compounds from roots of *Krameria grayi*.** Phytochemistry, v. 39, p. 413–415, 1995.
- ACHENBACH, H.; UTZ, W.; DOMÍNGUEZ, X. A. **Neolignans and nor-neolignans from *Krameria paucifolia*.** Phytochemistry, v. 34, p. 835–837, 1993.
- ALBUQUERQUE, U. P. **A etnobotânica no nordeste brasileiro.** In Tópicos atuais em Botânica. Editado por Cavalcanti, T. B. e Walter, B. M. T. Brasília: EMBRAPA, São Paulo. Sociedade Botânica do Brasil. p. 241-249, 2000.
- ALBUQUERQUE, U. P. **Re-examining hypotheses concerning the use and knowledge of medicinal plants: a study in the caatinga vegetation of NE Brazil.** Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine, v. 2, n.30, p.1-10, 2006.
- ALBUQUERQUE, U. P.; LUCENA, R. F. P. **Métodos e técnicas na pesquisa etnobotânica.** Recife. Livro Rápido/NUPEEA, 2004.
- ALBUQUERQUE, U. P et al. **Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach.** Journal of Ethnopharmacology, v. 114, p. 325–354, 2007.
- ALBUQUERQUE, U. P. **Implications of ethnobotanical studies on bioprospecting strategies of new drugs in semi-arid regions.** The Open Complementary Medicine Journal, v. 2, p. 21-23, 2010.
- 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. v.64, n.1, p.68-79, 2010.
- ALMEIDA C. F. C. B.; ALBUQUERQUE, U. P. **Uso e conservação de plantas medicinais no estado de Pernambuco: um estudo de caso no Agreste.** Interciência, 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 Enviroments, v. 62, p. 127-142, 2005.

ALMEIDA, D. A. C.; MILLER, A. N.; GUSMÃO, L. F. P. **New species and combinations of conidial fungi from the semi-arid Caatinga biome of Brazil.** Nova Hedwigia, v. 98, n. 3/4, p. 431-447, 2014.

ALMEIDA, M. Z. **Plantas medicinais.** 2ª Edição, Salvador, EDUFBA, 2003.

ALMEIDA, V. L. et al. **Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução.** Química Nova, v. 28, p. 118- 129, 2005.

ALVES, C. Q. et al. **Avaliação da atividade antioxidante de flavonoides.** Diálogos e ciência – Revista da rede ensino FTC, v.5, n.12, p. 7- 8, 2007.

ALVES, C. Q. et al. **Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos.** Quim Nova, v. 33, p. 2202-2210, 2010.

ALVES, H. M. **Plantas como fonte de fitofármacos.** Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola. v.3, 2001.

AOYAGI, H. **Application of plant protoplasts for the production of useful metabolites.** Biochemical Engineering Journal, v.56, p.1-8, 2011.

ARCOVERDE, J. H. V. et al. **Screening of caatinga plants as sources of lectins and trypsin inhibitors.** Natural Product Research, v. 28, n. 16, p. 1297-1301, 2014.

ARNONE, A. et al. **Isolation and structure determination of new active neolignans and norneolignans from Ratanhia.** Gazz. Chim. Ital., v. 11810, p. 675-682, 1988.

ATOUI, A. K. et al. **Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile.** Food Chemistry, v. 89, p. 27-36, 2005.

BARBOSA, F. R.; GUSMÃO, L. F. P. **Conidial fungi from the semi-arid Caatinga biome of Brazil. Rare freshwater hyphomycetes and other new records.** Mycosphere, v.2, n.4, p. 475-485, 2011.

BARBOSA-FILHO, J. M. et al. **Natural products with antileprotic activity.** Rev Bras Farmacogn., v. 17, p. 141-148, 2007.

BARREIROS, A. L. B. S. et al. **Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo.** Química Nova, São Paulo, v. 29, n.1, p. 113-123, 2006.

BASSETTI, M.; GINOCCHIO, F.; MIKULSKA, M. **New treatment options against Gram-negative organisms.** Crit. Care, p. 15:215, 2011.

BAYLIN, S. B. et al. **Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer.** Hum Mol Genet, v. 10, p. 687–692, 2001.

BAYLIN, S. B.; OHM, J. E. **Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction?** Nat Rev Cancer, v. 6, n. 2, p. 107-16, 2006.

BECKER, K.; HU, Y.; BILLER-ANDORNO, N. **Infectious diseases: a global challenge**. Int J Med Microbiol, v. 296, n. 4/5 p. 179-85, 2006.

BEN SGHAIERA, M. et al. **Antimutagenic, antigenotoxic and antioxidant activities of phenolic-enriched extracts from *Teucrium ramosissimum*: Combination with their phytochemical composition**. Environmental Toxicology and Pharmacology, v.31, p. 220-232, 2011.

BENAVENTE-GARCÍA, O. et al. **Uses and properties of *Citrus* flavonoids**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.45, n.12, p. 4505–4515, 1997.

BIESKI, I. G. C. **Plantas medicinais e aromáticas no sistema único de saúde da região sul de Cuiabá - MT**. Secretaria Municipal de Saúde de Cuiabá - MT. Lavras Minas Gerais – Brasil, 2005.

BLAGOSKLONNY, M. V. **Molecular theory of cancer**. Cancer Biol Ther., v.4, n. 6, p. 621-7, 2005.

BONNEFOY, M.; DRAI, J.; KOSTKTA, T. **Antioxidants to slow aging, facts and perspectives**. Presse Med., v. 31, p. 1174-1184, 2002.

BRAGA, R. **Plantas do nordeste, especialmente do Ceará**. 2º ed., Fortaleza, 1960.

BRASIL. **Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006**. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, Brasília, DF, 22 de junho, 2006. Disponível em: <https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2006/Decreto/D5813.htm>. Acesso em: 03 dez 2017.

BRAVO, L. **Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance**. Nutr Rev., v. 56, p.317-33, 1998.

BUTLER, M. S. **Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials**. Nat Prod Rep. v.25, p. 475-516, 2008.

CALIXTO, J. B. **Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents)**. Braz J Med Biol Res, v.33, p. 179-189, 2000.

CALIXTO, J. B. **Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review**. J. Ethnopharmacology, v.100, p. 131-134, 2005.

CANTÓN, R.; MOROSINI, M. I. **Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics**. FEMS Microbiol Rev, v.35, p. 977-991, 2011.

CAPECKA, E.; MARECZEK, A.; LEJA, M. **Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species**. Food Chemistry, v. 93, p. 223-226, 2005.

CARLQUIST, S. **Wood anatomy of Krameriaceae with comparisons with Zygophyllaceae: phylesis, ecology and systematic**. Botanical Journal of the Linnean Society, v. 149, p. 257–270, 2005.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. **A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives.** Food Chem Toxicol, v.51, p. 15-25, 2012.

CARTAXO, S. L.; SOUZA, M. M. A.; ALBUQUERQUE, U. P. **Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil.** Journal of Ethnopharmacology. v. 131, p. 326-342, 2010.

CASTRO, H. G. et al. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários.** Viçosa, Suprema Gráfica e Editora Ltda., 2001.

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

CHANDRA, N. et al. **Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health.** Pharmacognosy Reviews, v. 4, n. 8, p.118-126, 2010.

CHEN, L. F.; CHOPRA, T.; KEITH, S. K. **Pathogens resistant to antibacterial agents.** Infect Dis Clin North Am, v.23, p. 817-845, 2009.

CHUN, S. S. et al. **Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*.** Process Biochemistry, v.40, n.2, p.809-816, 2005.

CLÁUDIO, V. JR.; VANDERLAN, S. B.; ELIEZER, J. B. **Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna.** Química Nova, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

COHEN, F. L.; TARTASKY, D. **Microbial resistance to drug therapy: a review.** American Journal of Infection Control, v.25, p. 51-64, 1997.

CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro - Região Sul.** Brasília: MMA, 2011.

CORREA, M. P. **Dicionário das Plantas úteis do Brasil.** Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, p. 92, 1981.

COSTA, J. G. M. et al. **Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente a larvas do *Aedes aegypti*.** Rev Bras Farmacogn, v. 15 p. 304-309, 2005.

COSTA, V. P.; MAYWORM, M. A. S. **Plantas medicinais utilizadas pela comunidade do bairro dos Tenentes – município de Extrema, MG, Brasil.** Revista Brasileira de Plantas Medicinais, Botucatu, n. 3, v. 13, p. 282-292, 2011.

COSTA-LOTUFO, et al. **A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará.** Universidade Federal do Ceará. Virtual Quim, v. 2. p. 11, 2010.

- CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. **Natural Products (Secondary Metabolites)**. In: BUCHANAN B., GRUISSEM W., JONES, R. (Eds.) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, Rockville: American Society of Plant Physiologists, p.1250-1318, 2000.
- DAEMS, W. F. **Radix Ratanhiae – die Droge mit einer gesicherten Geschichte**. Deutsche Apotheker Zeitung, v.121, n.2, p.46-52, 1981.
- DAS, P. M.; SINGAL, R. J. **DNA methylation and cancer**. Clin Oncol, v. 15, p. 4632-4642, 2004.
- DECKER, E. A. **Phenolics: prooxidants or antioxidants?** Nutrition Reviews. v.55, n.11, p. 396-407, 1997.
- DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3 ed, John Wiley & Sons Ltd, p.546, 2009.
- DIONISI, H. M.; LOZADA, M.; OLIVERA, N. L. **Bioprospection of marine microorganisms: biotechnological applications and methods**. Revista Argentina de microbiologia, v. 44, n. 1, p. 49-60, 2012.
- DOMINGUEZ, X. A. et al. **Lignans and nor-neolignans from *Krameria interior***. Phytochemistry, v. 29, n. 8, p. 2651-2653, 1990.
- DÔRES, R. G. R. **Análise morfológica e fitoquímica da fava d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth)**. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – UFV, Viçosa, 2007.
- DREOSTI, J. E. **Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine**. Nutrition, v.16, n.7/8, p.692-694, 2000.
- DROGE, W. **Free radicals in the physiological control of cell function**. Physiol. Rev, v. 82, p. 47-95, 2002.
- DRUMOND, M. A.; SCHISTEK, H.; SEIFFARTH, J. A. **Caatinga: Um bioma exclusivamente brasileiro e o mais frágil**. R. I. H. U. p. 389:1-60, 2012.
- DUARTE, M. C. T. et al. **Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP**. Rev Bras Farmacogn, v. 14, n. 1, p. 6-8, 2004.
- ELISABETSKY, E.; COSTA-CAMPOS, L. **Medicinal plant genetic resources and international cooperation: the Brazilian perspective**. Journal of Ethnopharmacology. v. 51, p. 111–20, 1996.
- EVANS, W. C. **Trease and Evans Pharmacognosy**. (Ed.) XIII Edition, Bailli `ere Tindall, London, p. 39, 1989.
- FARIAS, E. M. F. G. **Avaliação da toxicidade aguda do extrato metanólico de folhas de *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae)** In: Congresso Brasileiro de Química. Sociedade Brasileira de Química, Natal, 2007.

FAURÉ, M. et al. **Antioxidant activities of lignans and flavonoids**. *Phytochemistry*, v. 29, p. 3773-3775, 1990.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo**. *Rev Ass Med Bras.*, v. 43, n. 1, p. 61-9, 1997.

FIASCHI, T.; CHIARUGI, P. **Oxidative Stress, Tumor Microenvironment and Metabolic Reprogramming: A Diabolic Liaison**. *International Journal of Cell Biology*, p. 1-8, 2012.

FLOGIO, A. M. et al. **Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar**. Universidade Estadual de Campinas. São Paulo, 2006.

FORZZA, R. C. et al. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v. 1, p. 875, 2010.

FREIRE, F. C. O.; GONCALVES, F. J. T. **A diversidade microbiológica da Caatinga Cearense**. *Essentia*, v. 14, n. 1, p. 11-34, 2012.

FREITAS, A. V. L. **Os raizeiros e a comercialização de plantas medicinais em São Miguel, Rio Grande do Norte, Brasil**. *R. Bras. Bioci.*, Porto Alegre, v. 10, n. 2, p. 147-156, 2012.

FRIEDMAN, N. D.; TEMKIN, E.; CARMELI, Y. **The negative impact of antibiotic resistance**. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 22, n. 5, p. 416-422, 2016.

FUMAGALI, E. et al. **Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernae Montana* e *Aspidosperma***. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.18, n.4, p. 627-641, 2008.

GARCIA-LAFUENTE, A. et al. **Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease**. *Inflamm. Res.*, v. 58, p. 537–552, 2009.

GARIGLIO, M. A. et al. **Uso sustentável e conservação dos recursos florestais da caatinga**. Serviço Florestal Brasileiro-SFB, 2010.

GARLET, T. M. B.; IRGANG, B. E. **Plantas medicinais utilizadas na medicina popular por mulheres trabalhadoras rurais de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil**. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 4, p. 9-18, 2001.

GERARD, D.; WRIGTH, Q. A. **Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it?** *BioMedCentral*, v.8, p.123, 2010.

GIANNINI, T. C. et al. **Análise de Componentes Principais (PCA) das variáveis climáticas da área de ocorrência de *Krameria* Loebl. (Krameriaceae)**. In: IX Congr. Ecologia do Brasil, São Lourenço, MG, UFMG, 2009.

GIANNINI, T. C. et al. **Ecological niche modeling and principal component analysis of *Krameria* Loebl. (Krameriaceae)**. *Journal of Arid Environments*, v. 75, p. 870-872, 2011.

GIMENES, M.; LOBÃO, C. S. **A Polinização de *Krameria bahiana* B.B. Simpson (Krameriaceae) por Abelhas (Apidae) na Restinga, BA.** Neotropical Entomology, v. 35, n.4, p. 440-445, 2006.

GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. **Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas.** Arquivos Instituto Biológico, v. 72, n.3, p. 353-358, 2005.

GOOBO-NETO, L.; LOPES, N. P. **Plantas Medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários.** Química Nova, v.30, n.2, p.374-381, 2007.

GROTEWOLD, E. **Plant metabolic diversity: a regulatory perspective.** Trends in Plant Science, v.10, n.2, 2005.

HALLIWELL, B. et al. **The characterization of antioxidants.** Food and Chemical Toxicology, v. 33, n. 7, p. 601-617, 1995.

HALLIWELL, B. **Free radicals and other reactive species in disease.** Encyclopedia of Life sciences. Nature Publishing Group, p. 1-7, 2001.

HALLIWELL, B. **Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence?** The Lancet, v. 344, p. 721-724, 1994.

HALLIWELL, B. **Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment.** Drugs Aging, v. 18, p. 685- 716, 2001.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. C. **Free Radicals in Biology and Medicine.** 4ª edição. New York: Oxford, 2007.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. **Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine.** Phytochemistry, v. 30, n. 12, p. 3864- 3874, 1991.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. **Hallmarks of Cancer: The Next Generation.** Cell, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HARBORNE, J. B.; BAXTER, H.; MOSS, G. P. **Phytochemical dictionary: handbook of bioactive compounds from plants.** 2ed. London: Taylor & Francis; 1999.

HARRIS, E. D. **Regulation of Antioxidant Enzymes.** FASEB Journal, v.6 p.2675-2683, 1992.

HARVEY, A. L. **Natural products in drug discovery.** Drug Discov. Today, v. 13, n. 19-20, p. 894-901, 2008.

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

HERNANDÉZ, N. M. R.; AGUILERA, M. M.; ÁLVAREZ, B. R. **Actividad antibacteriana de *Boldoa purpurascens* Cav.** Rev. Cubana Plant Med, v.9, n.2, 2004.

HO, K.Y. et al. **Antimicrobial activity of tannin components from *Vaccinium vitis-idaea* L.** J Pharm Pharmacol., v.53 p.187-191, 2001.

HOWARD, S. J. et al. **Antibiotic resistance: global response needed.** The Lancet Infectious Diseases, v. 13, n. 12, p. 1001-1003, 2013.

HUYCKE, M. M.; SAHM, D. F.; GILMORE, M. S. **Multiple-drug resistant *Enterococci*: The nature of the problem and the agenda for the future.** Emerg Infect Dis., v.4, p.239-249., 1998.

IBRAHIM, B. et al. **Antiproliferative and apoptosis inducing activity of *Markhamia tomentosa* leaf extract on HeLa cells.** Journal of ethnopharmacology, p. 1–5, 2013.

INCA. **Estimativas 2012: Incidência de Câncer no Brasil.** Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Rio de Janeiro, Brasil, p. 26, 2011a.

INCA. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer.** Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro, Brasil, p. 128, 2011b.

INCA. **Quimioterapia.** Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=101>. Acesso em: 09 set. 2017.

INCA. **Vigilância do Câncer e de Fatores de Risco.** Estatísticas do Câncer. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/vigilancia/>>. Acesso em 09 nov. 2017.

IBGE. **Mapa de biomas e de vegetação.** <<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm>> Acesso: 04 outubro de 2017, 2004.

JEMAL, A. et al. **Global Patterns of Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends.** Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, v. 19, p. 1893-1907, 2010.

JUNIOR, W. S. F.; 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, n.138, p. 238-252, 2011.

KARAKAYA, S. **Bioavailability of Phenolic Compounds.** Critical Rev. Food Sci. Nutr., v. 44, n. 6, p. 453-64, 2004.

KHODJAKOV, A.; RIEDER, C. L. **The nature of cell-cycle checkpoints: facts and fallacies.** J Biol., v. 8, n. 10, p. 88, 2009.

KUMMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N. **Robbins & Cotran Pathology Basis of Disease.** 7ª Edição, WB Saunders: China, 2004.

LAXMINARAYAN, R. et al. **Antibiotic resistance - the need for global solutions.** The Lancet Infectious Diseases, v. 13, n. 12, p. 1057- 1098, 2013.

LEE, S. J. et al. **Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties.** Food Chem., v.91, n.1, p. 131-7, 2005.

LEITÃO, S. G. et al. **Screening of Central and South American plant extracts for antimycobacterial activity by the Alamar Blue test.** Rev Bras Farmacogn., v.16, p.6-11, 2006.

LEITE, J. P. V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas.** Desenvolvimento da Fitoterapia. São Paulo: Atheneu, v.1 p. 3-20, 2008.

LEITE, L. L.; CORADIN, L. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro - Região Sul.** Brasília: MMA, p. 934, 2011.

LEMO, A. H. **Controle e Prevenção de Doenças pela Medicina Natural e Ortomolecular.** São Paulo: Editora Atheneu, 2006.

LI, S. et al. **Research progress of natural antioxidants in foods for the treatment of diseases.** Food Science and Human Wellness, v. 3, n. 3-4, p. 110–116, 2014.

LIMA, I. O. et al. **Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de Candida.** Rev Bras Farmacogn., v.16 p.197-201, 2006.

LIMA, R. K. et al. **Bactericidal and antioxidant activity of essential oils from *Myristica fragrans* Houtt and *Salvia microphylla* H.B.K.** Journal of the American Oil Chemists' Society, v. 89, p. 523-528, 2012.

LIVERMORE, D. M. **Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact.** Clin Infect Dis., v.36 (Suppl 1) p. S11-S23, 2003.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: Nativas e exóticas.** Nova Odessa – SP: Instituto Plantarum, p. 100, 2002.

LÜ, J. M. et al. **Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems.** J Cell Mol Med., v. 14, n. 4, p. 840-60, 2010.

MACHADO, H. et al. **Flavonoides e seu potencial terapêutico.** Boletim do Centro de Biologia da Reprodução, v. 27, n.1-2, p.33-39, 2008.

MACIEL, M. A. M. et al. **Plantas Medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares.** Quim. Nova. v.25, p.429-438, 2002.

MAISUTHISAKUL, P.; SUTTAJIT, M.; PONGSAWATMANIT, R. **Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants.** Food Chemistry, v. 100, p. 1409-1418, 2007.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. **Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm.** Nat Rev Câncer., v. 9, n.3, p. 153-66, 2009.

MARTINEZ, M. **Las plantas medicinales de Mexico**. 4 Ed. p. 90, Ediciones Botas, Mexico, 1959.

MARTINS, E. R. et al. **Plantas medicinales**. Viçosa: Editora UFV: Universidade Federal de Viçosa, 2000.

MARTINS, I. S.; NOGUEIRA, I. A.; CONCEIÇÃO, M. **Recomendações para o uso adequado de antimicrobianos**. Rio de Janeiro: Secretária de Estado de Saúde. Disponível em: <http://www.saude.rj.gov.br/Docs/cecih/Antimicrobianos.doc>. Acesso em: 17 de Julho de 2016, 1998.

MARTIUS, C.; EICHLER, A. G.; URBAN, I. **Flora Brasiliensis**. v.13 (3): fascicle 63, p. 27, 1874.

MENG, J. C.; ZHU, Q. X.; THAN, R. X. **New antimicrobial mono and sesquiterpenes from *Sorooseris hookeriana* subsp. *Erysimoides***. *Planta Med*, v. 66 p. 541-544, 2000.

MICHELIN, D. C. et al. **Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais**. *Rev Bras Farmacogn*, v. 15, p. 316-320, 2005.

MIDDLETON, E. JR.; HANDAS WAMI, C.; THEOHARIDES, C. T. **The effect of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation heart disease, and cancer**. *Pharmacological Reviews*, v. 52, n.4, p.673-751, 2000.

MIDDLETON, E. JR.; KANDASWAMI, C. **The impact of plant avonoidson mammalian biology: implications for immunity, in ammation and cancer**. In: HARBORNE, J. B. (Ed.). *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*. London: Chapman & Hall, p. 619-652, 1994.

MMA (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE). **Caatinga**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/sitio/index.php?ido=conteudo.monta&idEstrutura=203>>. Acesso em: 04 out. 2017.

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

MONIQUE, P. **Molecular Properties of Bacterial Multidrug Transporters**. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 64, p. 672-693, 2000.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. **Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais**. *Química Nova*, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

MONTANARI, J. I. **Aspectos da Produção Comercial de Plantas Medicinais Nativas**. CPQBA-UNICAMP. Campinas-SP – BRASIL

MONTEIRO, J. M. et al. **Local Markets and Medicinal Plant Commerce: A Review with Emphasis on Brazil**. *Economic Botany*, v.64, n.4, p.352-356, 2010.

MORAES M. O.; FONTELES, M. C.; MORAES, M. E. A. **Screening for anticancer activity of plants from the Northeast of Brazil.** Fitoterapia LXVIII, n. 3, p. 235–239, 1997.

NASCIMENTO, G. G.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C. **Antibacterial activity of plants extracts and phytochemical on antibiotic-resistant bacteria.** Braz J Microbiol, v. 31 p. 247-256, 2000.

NASS, L. L. **Recursos genéticos vegetais.** Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.

NAVARRO-MOLL, M. C. **Uso racional de las plantas medicinales.** Pharmaceutical Care, v. 2, p. 9-19, 2000.

NEVES, L. C.; ALENCAR, S. M.; CARPES, S. T. **Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonóides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*.** Braz. J. Food Technol., v.2, n.15, 2008.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. **Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years.** J. Nat. Prod., v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.

NIJVELDT, R. J. et al. **Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications.** Am. J. Clin. Nutr, v. 74, p.418-425, 2001.

OHSHIMA, H. et al. **Prevention of human cancer by modulation of chronic inflammatory processes.** Mutation Research, v. 591, p. 110-122, 2005.

OLIVEIRA, C. Z. et al. **Anticoagulant and antifibrinolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia forficata* against snake venoms.** Journal of Ethnopharmacology, v.98, p. 213-216, 2005.

OLIVEIRA, F. C. et al. **Avanços nas pesquisas etnobotânicas no Brasil.** Acta Botanica Brasilica. v. 23, p. 590–605, 2009.

OLIVEIRA, G. et al. **Conserving the Brazilian semiarid (Caatinga) biome under climate change.** Biodiversity and Conservation, v. 21, n. 11, p. 2913-2926, 2012.

OLSZEWER, E. **Clínica Ortomolecular.** 2 Ed. São Paulo: Rocca, 544p, 2008.

PATIL, B. S. et al. **Bioactive compounds: historical perspectives, opportunities, and challenges.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, Easton, v. 57, n. 18, p. 8142-8169, 2009.

PELISSARI, G. P. **Estudo farmacognóstico e avaliação das atividades antibacteriana e imunomoduladora de *Melanpodium divaricatum* (Rich. In Pers.) DC (Asteraceae).** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

PERES, L. E. P. **Metabolismo Secundário.** Brasil/Português, Homepage: <http://www.ciagri.usp.br/~lazarop2pp/FisioVegGradBio/MetSec.pdf>, 2004.

PERSSONELLE, J. G. **Cosmiatria, a ciência da beleza.** São Paulo: Revinter; 2004.

PESSINI, G. L. et al. **Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular.** Rev Bras Farmacogn, v. 13 n. 1, p.21-24, 2003.

PESSOA, C. et al. **Anticancer potencial of Northeast Brazilian Plants.** Lead Molecules from Natural Products, Elsevier, p. 15, 2006.

PIDDOCK, L. J. V. et al. **Role of mutation in the gyrA and parC genes of nalidixic-acidresistant Salmonella serotypes isolated from animals in United Kingdom.** J Antimicrobial Chemother, v. 41 p. 635-641, 1998.

PIETTA, G. **Flavonoids as antioxidants.** Journal of Natural Products, United States, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PINTO, A. C. et al. **Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas.** Quim. Nova, v. 25, p. 45-61, 2002.

PINTO, J. E. B. P.; CARDOSO, M. G.; ARRIGONI-BLANK, M. F. **Estabelecimento de cultura de células em suspensão e identificação de flavonoides em *Cordia verbenacea* DC.** Revista Brasileira Plantas Medicinais, v.11, n. 11, p. 7-11, 2009.

PITTET, D. **Promotion of hand hygiene: magic, hype, or scientific challenge?** Infect Control Hosp Epidemiol., v. 23, p. 118-119, 2002.

PODSEDEK, A. **Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review.** LWT-Food Sci. Technol, v. 40, p. 1-11, 2007.

PORTAL DA SAÚDE. **Uso de fitoterápicos e plantas medicinais cresce no SUS.** Disponível em: <http://dab.saude.gov.br/portaldab/noticias.php?conteudo=_&cod=2162>. Acesso em: 23 nov. 2017.

PUTMAN, M.; VANVEEN, H.W.; KONINGS, W.N. **Molecular properties of bacterial multidrug transporters.** Microbiology and Molecular Biology Reviews, v.64, p.672-693, 2000.

PUUPPONEN-PIMIA, R. et al. **Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries.** Journal of Applied Microbiology, v. 90, p. 494-507, 2001.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia.** 7 ed, Elsevier, 2012.

RATES, S. M. K. **Plants as source of drugs.** Toxicon, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001.

RATHEE, J. S.; HASSARAJANI, S. A.; CHATTOPADHYAY, S. **Antioxidant activity of *Mammea longifolia* bud extracts.** Food Chemistry, v. 99, p. 436-443, 2006.

RATTAN, A.; KALIA, A.; AHMAD, N. **Multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis: Molecular perspectives.** Emerg Infec Dis, v. 4, p. 195-209, 1998.

REGO JUNIOR, N. O. et al. **Compostos bioativos e atividade antioxidante de extratos brutos de espécies vegetais da caatinga.** Brazilian Journal of Food Technology, v. 14, n. 1, p. 50-57, 2011.

RIBEIRO, J. N. et al. **Avaliação dos parâmetros sanguíneos de hepatotoxicidade em coelhos normais submetidos a tratamentos com antocianina e antocianina + naringenina.** RBAC. v.38, n.1, p.23-27, 2006.

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 Medicinais, v.12, n.1, p.31-42, 2010.

ROTHHAMMER, T.; BOSSERHOFF, A. K. **Epigenetic events in malignant melanoma.** Pigment Cell Res, v. 20, n. 2, p. 92-111, 2007.

SAKAGAMI, Y.; KAJAMURA, K. **Bactericidal activities of disinfectants against vancomycin-resistant Enterococci.** J Hosp Infect., v.56 p.140-144, 2006.

SALVADOR, M.; HENRIQUES, J. A. P. **Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo.** 1ª edição. Canoas: Editora da Ulbra, pp.13-110, 2004.

SAMMAN, S.; LYONS WALL, P. M.; COOK, N. C. **Flavonoids and coronary heart disease: Dietary perspectives.** In: EVANS, C. A. R.; PACKER, L. (Ed.). Flavonoids in health and disease, p. 469-482, 1998.

SANTOS JR, A. R.; WADA, M. L. F. **Diferenciação celular.** In: A célula. São Paulo: Editora Manole Ltda, 2005.

SANTOS, R. S. D. et al. **Avaliação da relação seca/produtividade agrícola em cenário de mudanças climáticas.** Revista Brasileira de Meteorologia, v. 26, p. 313-321, 2011.

SANTOS, S. **Um estudo etnoecológico dos quintais da cidade de Alta Floresta- MT.** Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, p. 165, 2004.

SAÚDE-GUIMARÃES, D. A.; FARIA, A. R. **Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*.** Rev Bras Farmacogn, v.17 p.455-465, 2007.

SCHOLZ, E.; RIMPLER, H. **Proanthocyanidins from *Krameria triandra* Root.** Planta Med, v. 55, n. 4, p. 379-384, 1989.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications.** Lancaster: Technomic; 1995.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in food and nutraceuticals.** Flórida, U.S.A. Boca Raton: CRC Press, 2004.

SHIOMORI, T. et al. **Evaluation of bedmaking-related airborne and surface methicillin resistant *Staphylococcus aureus* contamination.** J Hosp Infect., v. 50 p. 30-35, 2002.

SHREVE, F.; WIGGINS, I. **Vegetation and Flora of the Sonora Desert**. Stanford Univ. Press, Stanford, p. 733, 1964.

SIEBER, O. M.; HEINIMANN, K.; TOMLINSON, I. P. M. **Genomic instability – the engine of tumorigenesis**. Nature Rev., v. 3, p. 701-708, 2003.

SILBERBERG, M. et al. **The bioavailability of polyphenols is highly governed by the capacity of the intestine and of the liver to secrete conjugated metabolites**. Eur J Nutr, v. 45, n. 2, p. 88- 96, 2006.

SILVA, I. L.; COELHO, L. C. B. B.; SILVA, L. A. O. S. **Biotechnological potential of the Brazilian Caatinga Biome**. Advances in Research, v. 5, n. 1, p. 1-17, 2015.

SILVA, M. L. C. et al. **Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais**. Ciências Agrárias, v.31, n.3, p.669- 682, 2010.

SILVA, S. A. S. et al. **Kramentosan, a new trinorlignan from the roots of *Krameria tomentosa***. Natural Product Letters, v. 15, n.5, p. 323-329, 2001.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª Edição, Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora UFSC, 2003.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6ª Edição, Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2007.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2ª Edição, Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2000.

SIMPSON, B. B. et al. **Species relationships in *Krameria* (Krameriaceae) based on ITS sequences and morphology: implications for character utility and biogeography**. Systematic Botany, v. 29, p. 97-108, 2004.

SIMPSON, B. B. **Flora Neotrópica**. The New York Botanical Garden, New York, v. 49, p. 85, 1989.

SIMPSON, B. B. **The past and present uses of Rhatany (*Krameria*, Kreameriaceae)**. Economic Botany, v. 43, n.3, p. 397-409, 1991.

SIMPSON, B. **Krameriaceae**. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB140>>. Acesso em 11 agosto 2017.

SOARES, S. E. **Ácidos Fenólicos como Antioxidantes**. Rev. Nutr, v.15, p.71-81, 2002.

SOARES-FILHO, B. S. **Impacto da revisão do Código Florestal: como viabilizar o grande desafio adiante?** Brasília: Secretaria de Assuntos Estratégicos, p. 28, 2013.

SOUSA, C. M. et al. **Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais**. Quim Nova, v. 30, p. 351-355, 2007.

SOUZA FILHO, A. P. S.; ALVES, S. M. **Alelopatia: princípios básicos e aspectos gerais**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2002.

SOUZA, A. V. V.; SANTOS, M. C. **Propagação in vitro de espécies da caatinga**. Informativo Abrates, v. 22, n. 3, p. 1-4, 2012.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2005.

STEPP, J. R. **The role of weeds sources of pharmaceuticals**. Journal of Ethnopharmacology, v. 92, p. 163-166, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 4 ed, Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc, 2006.

TENOVER, F. C. **Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria**. The American Journal of Medicine, v. 119, n. 6A, p. S3-S10, 2006.

TORRES, B. B. **Nutrição e esporte: uma abordagem bioquímica**. Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, USP, 2003.

TROVÃO, D. M. B. M. et al. **Variações sazonais de aspectos fisiológicos de espécies da Caatinga**. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v. 11, n. 3, p. 307-311, 2007.

VATTEM, D. A.; SHETTY, K. **Biological functionality of ellagic acid: a review**. Journal of Food Biochemistry, v. 29, p. 234-266, 2005.

VEIGA-JUNIOR, V. F. **Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população**. Rev Bras Farmacogn, v. 18, p. 308-313, 2008.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; MELLO, J. C. P. **As monografias sobre plantas medicinais**. Rev Bras Farmacogn, v. 18, p. 464-471, 2008.

WAMIQUE YUSUF, S.; NEGI, S. **Cancer and Cardiovascular Disease. A New Entity**. Journal of Clinical & Experimental Cardiology, v. 4, n. 1, p. 9880, 2012.

WHO. **Cancer**. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/index.html>>. Acesso em: setembro de 2017.

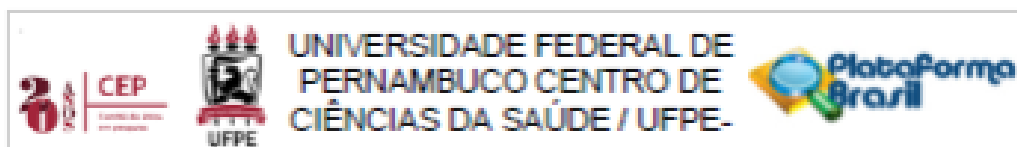
YEH, C. T.; CHING, L. C.; YEN, G. C. **Inducing gene expression of cardiac antioxidant enzymes by dietary phenolic acids in rats**. Journal of Nutritional Biochemistry, v. 20, p. 163-171, 2009.

YEH, C.; YEN, G. **Induction of hepatic antioxidant enzymes by phenolic acids in rats is accompanied by increased levels of multidrug resistance-associated protein 3 mRNA expression**. Journal of Nutrition, v. 136, p. 11-15, 2006a.

YEH, C.; YEN, G. **Modulation of hepatic phase II phenol sulfotransferase and antioxidant status by phenolic acids in rats.** Journal of Nutritional Biochemistry, v. 17, n. 8, p. 561-569, 2006b.

ZHANG, J. T. **New drugs derived from medicinal plants.** Therapie, v. 57, n. 2, p. 137–150, 2002.

ANEXO A - PARECER DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação das atividades antioxidante e antitumoral de plantas medicinais da caatinga: *Desmodium adscendens* (Sw.) DC., *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir., *Perlandra mediterrânea* (Vell.) Taub., *Cariniana legalis* (Mart.) Kuntze

Pesquisador: MARIA CECILIA LIMA VIEIRA DE MELO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 63171116.7.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.967.489

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de mestrado Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco, da mestrande Maria Cecília Lima Vieira de Melo sob orientação da Dra. Maria Tereza dos Santos Correia e co-orientação do Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo. O projeto trata da temática de avaliação biológica de Novos Produtos Sintetizados ou Extraídos de Plantas Medicinais para screening de atividade Antioxidante e Antitumoral de plantas medicinais da caatinga.

Objetivo da Pesquisa:

Identificar o perfil fitoquímico e antioxidante de plantas medicinais da caatinga e avaliar sua atividade antitumoral.

- Obter os extratos das plantas medicinais;
- Determinar o perfil fitoquímico dos extratos das plantas medicinais;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos obtidos;
- Determinar a atividade hemaglutinante dos extratos obtidos;
- Determinar a toxicidade dos extratos frente a células saudáveis;
- Avaliar o índice de seletividade em células saudáveis e tumorais;
- Determinar o potencial citotóxico dos extratos em células tumorais.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1ª andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2125-0585 **E-mail:** cepccc@ufpe.br

ANEXO B - PARECER DO CEUA



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: (55 81) 2126 4848 / 2126 4331
fax: (55 81) 2126 4350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 08 de novembro de 2017.

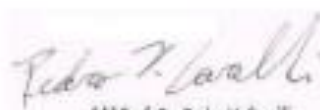
Ofício nº 110/17

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof.ª Maria Tereza dos Santos Correia**
Departamento de Bioquímica
Centro de Biociências
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 0028/2017

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do potencial antioxidante e hepatoprotetor do extrato aquoso de ramos de *Krameria romanzosana* da Caatinga de Pernambuco", registrada com o nº 0028/2017 sob a responsabilidade de Prof.ª **Maria Tereza dos Santos Correia** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 08/11/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	04/12/2017 a 05/01/2018
Espécie/ linhagem/raça	Camundongos heterogênicos Swiss
Nº de animais	36
Peso/idade	25-35g / 60 dias
Sexo	Machos (30) e fêmeas (6)
Origem	Biotério do Departamento de Antibióticos - CB/UFPE

Atenciosamente,


Prof. Dr. Pedro V. Caralli
Presidente da CEUA / CB - UFPE
UFPE - SANPE 13021/004