



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

**ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Cnidocolus* PRESENTES NO
ECOSSISTEMA CAATINGA COM POTENCIAL ATIVIDADE TERAPÊUTICA**

TADEU JOSÉ DA SILVA PEIXOTO SOBRINHO

RECIFE, 2011



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

**ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Cnidoscopus* PRESENTES NO
ECOSSISTEMA CAATINGA COM POTENCIAL ATIVIDADE TERAPÊUTICA**

TADEU JOSÉ DA SILVA PEIXOTO SOBRINHO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Profa. Dra. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim (Orientadora)

RECIFE, 2011

Sobrinho, Tadeu José da Silva Peixoto

Estudo químico e biológico de espécies do gênero *Cnidocolus* presentes no ecossistema caatinga com potencial atividade terapêutica / Tadeu José da Silva Peixoto Sobrinho. – Recife: O Autor, 2011.

111 folhas: il., fig.; 30 cm.

Orientador: Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Ciências Farmacêuticas, 2011.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Antibacteriano. 2. Antioxidante. 3. Citotoxicidade. 4. Conteúdo fenólico. 5. Toxidade seletiva. I. Amorim, Elba Lúcia Cavalcanti de. II. Título.

615.321

CDD (20.ed.)

UFPE

CCS2012-032



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

Recife, 30 de dezembro de 2011.

Defesa de Tese de Doutorado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 30 de dezembro de 2011 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE ORIENTADOR E EXAMINADOR INTERNO: Prof.ª Dr.ª. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim
(Dept.º Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: _____

SEGUNDO EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr.ª Jane Sheila Higino.
(Dept.º de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: _____

TERCEIRO EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Karina Perreth Kandau
(Dept.º de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: _____

EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Jaube Gomes de Melo,
(Dept.º de Biologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE).

Assinatura: _____

EXAMINADOR EXTERNO: Prof.ª Dr.ª. Cecília de Fátima Castelo Branco Rangel de Almeida.
(Dept.º de Biologia do Centro de Ensino Superior do Vale do São Francisco - Cesvasf)

Assinatura: _____

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Reitor

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

Vice-Reitor

Sílvio Romero de Barros Marques

Pró-Reitor para assuntos de Pesquisas e Pós-Graduação

Francisco de Sousa Ramos

Diretor do Centro de Ciências da Saúde

José Thadeu Pinheiro

Vice-Diretor do Centro de Ciências da Saúde

Márcio Antônio de Andrade Coelho Gueiros

Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas

Dalci José Brondani

Vice-Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas

Antônio Rodolfo de Faria

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Nereide Stela Santos Magalhães

Vice-Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Ana Cristina Lima Leite

Dedico esta tese aos meus pais, Fausto e Fátima Peixoto (*In Memoriam*). À minha amada esposa Thamyris “O meu amor, tem um jeito manso que é só eu...”. À minha irmã Gabriela, meu sobrinho Iuri, aos meus sogros, Ana Paula e Pedro e à minha cunhada Thais. Obrigado por toda a admiração, incentivo e por estarem presentes nestes quatro anos.

Muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por permitir mais esta conquista. “Eu sou o caminho, a verdade e a vida; ninguém vem ao Pai, senão por mim”. João 14:6.

À Universidade Federal de Pernambuco, e em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, por ter concedido a realização deste curso.

À minha grande amiga e orientadora Profa. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim, pois sem seu empenho e valorosos ensinamentos não teria conquistado o título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Ao amigo Prof. Ulysses Paulino de Albuquerque que nunca desiste de me ensinar, mesmo quando eu não consigo aprender.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela preciosa concessão de bolsa de Pós-Graduação.

Aos professores Gardênia Carmen Gadelha Militão, Maria Nelly Caetano Pisciotano, Sérgio Donizeti Ascêncio e Teresinha Gonçalves da Silva por toda a contribuição realizada no transcorrer desta tese.

Aos professores Jane Sheila Higino, Karina Perrelli Randau, Joabe Gomes de Melo, Cecília de Almeida, Janete Magali de Araújo e João Eudes do Nascimento por terem aceitado o convite e contribuírem com este trabalho.

Aos meus amigos do Laboratório de Produtos Naturais (LAPRONAT) Clarissa, Daniel, Daniela Cabral, Daniela Sena, Danielle Lima, Elvis, Irla Carla, Jenifer, Jorge, Luma, Patrícia, Sarah Raquel, Tássia, Thiago, Valéria e em especial a Carlos Henrique, Joabe e Valérium, pela crença em minhas aspirações.

A todos os professores e alunos do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em especial ao doutorando Antonio Marcos Saraiva, que contribuíram direta e indiretamente para a conclusão deste estudo.

A todos vocês, meu muito obrigado!

*“E se eu fosse o primeiro a voltar pra mudar
o que eu fiz, quem então agora eu seria?...
Ora, se não sou eu quem mais vai decidir o
que é bom pra mim?
Dispensar a previsão!
Ah, se o que eu sou é também o que eu escolhi
ser, aceito a condição”*

Rodrigo Amarante

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Exsicata do exemplar de *Cnidoscolus infestus* Pax & K. Hoffm coletado no município de Soledade/PB. (Foto do autor) 16
- Figura 2.** Exsicata do exemplar de *Cnidoscolus pubescens* Pohl coletado no município de Buíque/PE. (Foto do autor) 17
- Figura 3.** Exsicata do exemplar de *Cnidoscolus quercifolius* Pohl coletado no município de Soledade/PB. (Foto do autor) 18
- Figura 4.** Substâncias citotóxicas isoladas das cascas de *Cnidoscolus quercifolius* Pohl. 19
- Figura 5.** Indivíduo de *Cnidoscolus urens* (L.) Arthur coletado no município de Altinho/PE. (Foto do autor) 20

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1. Gênero <i>Cnidoscolus</i> Pohl	15
2.1.1. <i>Cnidoscolus infestus</i> Pax & K. Hoffm	15
2.1.2. <i>Cnidoscolus pubescens</i> Pohl	16
2.1.3. <i>Cnidoscolus quercifolius</i> Pohl	17
2.1.4. <i>Cnidoscolus urens</i> (L.) Arthur	19
2.2. Atividade antioxidante	20
2.3. Estudo de toxicidade seletiva frente <i>Artemia salina</i> Leach	21
2.4. Atividade antimicrobiana	22
2.5. Atividade citotóxica	22
3. OBJETIVOS	24
3.1. Objetivo Geral	24
3.2. Objetivos específicos	24
4. ARTIGO 1 - Espécies de Euphorbiaceae presentes em levantamentos etnofarmacológicos do nordeste do Brasil: uma perspectiva fitoquímica e farmacológica.	27
5. ARTIGO 2 - Conteúdo fenólico e capacidade antioxidante de quatro espécies de <i>Cnidoscolus</i> (Euphorbiaceae) usadas como etnomedicamentos na Caatinga, Brasil.	52
6. ARTIGO 3 - Perfil fitoquímico e atividade antibacteriana de quatro espécies de <i>Cnidoscolus</i> (Euphorbiaceae) frente a cepas padrões e isolados clínicos.	68
7. ARTIGO 4 - Atividade citotóxica e ensaio de letalidade frente às larvas de <i>Artemia salina</i> dos extratos de quatro espécies de <i>Cnidoscolus</i> Pohl (Euphorbiaceae).	85
8. CONCLUSÃO	99
REFERÊNCIAS	100
ANEXOS	105

RESUMO

Conhecidas por urtiga, as espécies pertencentes ao gênero *Cnidoscolus* despertam grande interesse científico. Possuem, entre outras, atividade antiinflamatória e antitumoral do sistema genito-urinário, antimicrobiana e anti-séptica. Os objetivos desta tese foram determinar o perfil fitoquímico e avaliar a atividade biológica dos extratos brutos e frações de quatro espécies medicinais de *Cnidoscolus* (*C. infestus* Pax & K. Hoffm., *C. pubescens* Pohl, *C. quercifolius* Pohl e *C. urens* (L.) Arthur) presentes em levantamentos etnobotânicos da Caatinga. As coletadas foram realizadas nos estados de Pernambuco (Altinho e Buíque) e Paraíba (Soledade) e o material testemunho foi depositado no Herbário UFP Geraldo Mariz do Centro de Ciências Biológicas/UFPE. O conteúdo de fenóis totais e taninos foram determinados pelo método Folin-Ciocalteu e o conteúdo de flavonóides pelo método de complexação com cloreto de alumínio. A atividade antioxidante foi analisada pelo ensaio do DPPH e ensaio quelante do íon ferroso (FIC). A caracterização fitoquímica foi realizada por cromatografia em camada delgada com eluentes e reveladores específicos. O método de difusão em ágar e Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram utilizados para determinar a atividade antimicrobiana dos extratos brutos e frações. A toxicidade seletiva foi avaliada frente às larvas de *Artemia salina* Leach e a atividade citotóxica frente às linhagens HT-29, Hep-2 e NCI-H292 pelo método do MTT. Os níveis de fenóis totais variaram de $3,58 \pm 0,16$ mg equivalentes de ácido tânico (EAT)/g nas cascas de *C. quercifolius* a $23,00 \pm 0,10$ mg EAT/g nas folhas de *C. pubescens*. As partes aéreas de *C. infestus* e cascas de *C. quercifolius* não exibiram taninos enquanto que as folhas de *C. pubescens* possuem os mais elevados níveis ($8,72 \pm 0,16$ mg EAT/g). As folhas de *C. pubescens* apresentaram o maior conteúdo de falvonóides ($39,37 \pm 0,57$ mg equivalente de rutina por grama), entretanto, suas raízes não apresentaram esta classe. O extrato bruto das raízes de *C. infestus* apresentou o melhor resultado antioxidante pelo ensaio do DPPH, enquanto que o extrato bruto das raízes de *C. pubescens* foi mais eficiente no ensaio FIC. Comparativamente, a atividade antioxidante qualitativa correlacionou-se com a atividade antioxidante quantitativa. Os fitoquímicos presentes em todas as amostras foram cumarinas e terpenóides, enquanto que alcalóides e naftoquinonas não foram confirmados. A presença de uma mesma cumarina (Rf 0,35) nas amostras sugere um padrão que poderá ser usado como marcador químico para estas espécies. Os extratos foram ativos frente às bactérias Gram-positivas e inativos frente às Gram-negativas. O extrato bruto metanólico das cascas de *C. quercifolius* apresentou CIM entre 250-500 $\mu\text{g/mL}$ frente às bactérias *Staphylococcus aureus*, *S. coagulase* negativa e *Enterococcus faecalis* e sua fração diclorometanólica apresentou CIM entre 62,5-250 $\mu\text{g/mL}$ frente às cepas de *Staphylococcus* multirresistentes. Todos os extratos foram considerados tóxicos frente às larvas de *A. salina* (CL_{50} entre 165-675 $\mu\text{g/mL}$). Os extratos de *C. infestus* (atividade frente Hep-2 e NCI-H292), das cascas de *C. quercifolius* (atividade frente HT-29 e Hep-2) e das partes aéreas de *C. urens* (atividade frente Hep-2 e NCI-H292) mostraram inibição de crescimento celular e o extrato das raízes de *C. urens* apresentou concentração inibitória média (IC_{50}) de $20,3 \pm 6,33$ $\mu\text{g/mL}$ contra a linhagem Hep-2. Esta tese fornece valiosas informações sobre substâncias com potencial antioxidante, antimicrobiano e citotóxico do gênero *Cnidoscolus* e os resultados obtidos apontam para a descoberta de novos compostos ativos.

Palavras-chave: Antibacteriano; Antioxidante; Citotoxicidade; Conteúdo fenólico; Toxicidade seletiva.

ABSTRACT

Known as nettle, the species of the genus *Cnidoscopus* arouse great scientific interest. Possess, among others, anti-inflammatory and antitumor activity of the genitourinary system, antimicrobial and antiseptic. The objectives of this thesis was to determine the phytochemical profile and evaluate the biological activity of extracts and fractions of four medicinal species of *Cnidoscopus* (*C. infestus* Pax & K. Hoffm., *C. pubescens* Pohl, *C. quercifolius* Pohl and *C. urens* [L.] Arthur) present in the Caatinga ethnobotanical surveys. Samples were collected in the states of Pernambuco (Altinho and Buíque) and Paraíba (Soledade) and the voucher specimens were incorporated in the Herbarium UFP Geraldo Mariz of the Center of Biological Sciences/UFPE. The total phenolic content and total tannin content were determined by Folin-Ciocalteu method and total flavonoid content by complexation method with aluminum chloride. The antioxidant activity was evaluated by DPPH assay and ferrous ion chelating assay (FIC). The phytochemical characterization was performed by thin layer chromatography with solvents and specific developers. The agar diffusion method and Minimal Inhibitory Concentration (MIC) were used to determine the antimicrobial activity of extracts and fractions. The selective toxicity was evaluated against the larvae of *Artemia salina* Leach and cytotoxic activity against strains to HT-29, Hep-2 and NCI-H292 by the method of MTT. The total phenolic content ranged from 3.58 ± 0.16 mg tannic acid equivalents (TAE) per gram in the barks of *C. quercifolius* and 23.00 ± 0.10 mg TAE/g in the leaves of *C. pubescens*. The aerial parts of *C. infestus* and bark of *C. quercifolius* no exhibited tannins while the leaves of *C. pubescens* have the highest levels (8.72 ± 0.16 mg TAE/g). The leaves of *C. pubescens* showed the highest total flavonoids content (39.37 ± 0.57 mg rutin equivalent per gram), however, had its roots not this class. The crude extract of the roots of *C. infestus* showed the best antioxidant result by the DPPH assay, while the crude extract of the roots of *C. pubescens* was more efficient to FIC assay. Comparatively, the qualitative antioxidant activity was correlated with quantitative antioxidant activity. The phytochemicals present in all samples were coumarins and terpenoids, while alkaloids and naphthoquinones were not confirmed. The spots of the same coumarin (Rf 0.35) in all samples suggests a pattern that can be used as a chemical marker for these species. The extracts were active against the Gram-positive bacteria and inactive against the Gram-negative. The crude methanolic extract of bark of *C. quercifolius* presented MIC between 250-500 $\mu\text{g/mL}$ against the bacteria *S. aureus*, *S. coagulase-negative* and *E. faecalis* and his dichloromethane fraction presented MIC between 62.5-250 $\mu\text{g/mL}$ against the strains of multidrug-resistant *Staphylococcus*. All extracts were considered toxic against the larvae of *A. salina* (lethal concentration between 165-675 $\mu\text{g/mL}$). The extracts of *C. infestus* (activity against Hep-2 and NCI-H292), barks of *C. quercifolius* (activity against HT-29 and Hep-2) and the aerial parts of *C. urens* (activity against Hep-2 and NCI-H292) showed inhibition of cell growth and the extract of roots of *C. urens* showed inhibitory concentration (IC_{50}) of 20.3 ± 6.33 $\mu\text{g/mL}$ against Hep-2 strain. This thesis provides valuable information on substances with antioxidant, antimicrobial and cytotoxic potential of the genus *Cnidoscopus* and the results obtained point to the discovery of new active compounds.

Keywords: Antibacterial; Antioxidant; Cytotoxic; Phenolic Content; Selective toxicity.

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

O mercado mundial de fitoterápicos vem crescendo expressivamente nos países industrializados, alcançando somas avaliadas em US\$ 20 bilhões/ano (Calixto, 2003) e isto se deve, principalmente, à elevada porcentagem de drogas a base de plantas medicinais e indiretamente aos medicamentos sintéticos que envolvem complexas moléculas relacionadas a substâncias bioativas de origem vegetal (Cechinel Filho e Yunes, 1998). Especialistas calculam que um quinto de todas as espécies do globo são encontradas no Brasil, fazendo-o ostentar o título de maior biodiversidade vegetal do planeta, dos quais, muitas potencialidades de seus ecossistemas têm sido exploradas extensivamente por comunidades tradicionais como recurso terapêutico para o tratamento de diversas enfermidades (Duarte, 2006).

Muitas pesquisas têm demonstrado que no Brasil há um elevado número de plantas medicinais usadas pela população de todos os níveis sociais. A família Euphorbiaceae é comumente encontrada em levantamentos etnofarmacológicos e apresenta espécies com grande destaque medicinal, como as pertencentes ao gênero *Cnidoscolus*, que possui 140 representantes exclusivamente da América tropical e concentrados no México e Brasil (Webster, 1994). A principal característica do gênero, cujas espécies são conhecidas popularmente por urtiga, faveleira, orelha de onça ou cansaço, é a presença de tricomas urticantes que quando estimulados pelo contato com a pele podem provocar fortes dores localizadas (Melo e Sales, 2008).

Dentre as diversas espécies de Euphorbiaceae encontradas na Caatinga nordestina, quatro espécies do gênero *Cnidoscolus* (*C. infestus* Pax & K.Hoffm., *C. pubescens* Pohl, *C. quercifolius* Pohl e *C. urens* (L.) Arthur) se destacam por apresentar diversos usos populares, como anti-séptico ocular, antitumoral do sistema genito-urinário, antiinflamatório do sistema genito-urinário e em geral, contra apendicite, doenças oftálmicas, ferimentos, fraturas, hemorróidas, infecções urinárias, pancada, problemas renais, da pele e hepáticos, reumatismo, úlceras externas e verrugas (Agra et al., 2007a; Agra et al., 2007b; Agra et al., 2008; Albuquerque, 2006; Albuquerque et al., 2007a; Albuquerque et al., 2007b; Almeida et al., 2005). Apesar de possuir interessantes atividades etnofarmacológicas, estas espécies não possuem informações científicas sobre a avaliação do seu potencial medicinal.

A presente tese de doutorado teve como objetivo abordar importantes características do gênero *Cnidocolus*, tais como análises quantitativas de fenóis totais, taninos e flavonóides, avaliação da atividade antioxidante e quelante dos extratos brutos metanólicos, potencial antimicrobiano frente a cepas padrão e isolados clínicos multirresistentes e a atividade citotóxica contra linhagens tumorais HT-29 (adenocarcinoma de colon humano), Hep-2 (carcinoma epidermóide de laringe humano) e NCI-H292 (carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano). Todo o trabalho foi baseado na comparação entre as partes dos vegetais citadas e não citadas nos levantamentos etnobotânicos para cada espécie, procurando relacioná-las com o uso popular.

2. Revisão da Literatura

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Gênero *Cnidoscolus* Pohl

A família Euphorbiaceae (Ordem Malpighiales) é constituída por ervas, arbustos, árvores e lianas com distribuição pantropical, possui cerca de 300 gêneros e quase sete mil espécies, dos quais, podemos encontrar aproximadamente 70 gêneros e mil espécies no Brasil (Souza e Lorenzi, 2005). Pertencente a esta família, o gênero *Cnidoscolus* possui 140 representantes, exclusivamente da América tropical e concentrado, principalmente, no México e Brasil (Webster, 1994). A principal característica do gênero *Cnidoscolus* é a presença de tricomas urticantes distribuídos por suas partes vegetativas e florais, com raras exceções, que quando estimulados, provocam fortes dores localizadas (Melo e Sales, 2008). Na região Nordeste do Brasil pode ser encontrado cerca de 10 espécies e na Caatinga destacamos *C. infestus* Pax & K. Hoffm., *C. pubescens* Pohl, *C. quercifolius* Pohl e *C. urens* (L.) Arthur.

2.1.1. *Cnidoscolus infestus* Pax & K. Hoffm.

Conhecida popularmente por urtiga-de-boi, *C. infestus* (**Figura 1**) é um arbusto nativo da Caatinga, o qual suas raízes e cascas são bastante utilizadas para o tratamento de processos inflamatórios urinários, da próstata e ovários (Agra et al., 2007a; Agra et al., 2007b; Albuquerque et al., 2007a). Apesar de possuir interessantes propriedades medicinais, verificamos escassez de informações sobre seus compostos ativos e estudos que comprovem os usos desta espécie.



Figura 1. Exsicata do exemplar de *Cnidocolus infestus* Pax & K. Hoffm coletado no município de Soledade/PB. (Foto do autor)

2.1.2. *Cnidocolus pubescens* Pohl

A espécie *C. pubescens* (= *Cnidocolus obtusifolius* Pohl ex Baill.; *Jatropha obtusifolia* [Pohl ex Baill.] Müll.Arg.) é uma árvore (6-8 metros de altura) decídua, muito urticante e lactescente encontrada principalmente na Caatinga arbórea, possui espinhos transparentes espalhados pelos ramos de seu tronco liso, ramificado e cilíndrico (Lorenzi, 1998). Suas folhas membranáceas são verdes, simples, alternas, glabras em ambas as faces, longo-pecioladas, de margem levemente denticulada, com flores (inflorescências em cimeiras terminais) de coloração branca e frutos do tipo cápsula trigonada, indeiscente contendo espinhos urticantes com 1-3 sementes (Lorenzi, 1998).

As folhas e flores da orelha-de-onça ou faveleira (**Figura 2**) são muito usadas contra câncer, problemas hepáticos, tumores e inflamação uterina (Albuquerque et al., 2007b; Almeida et al., 2005), entretanto, também não há estudos químicos e biológicos para esta espécie.



Figura 2. Exsicata do exemplar de *Cnidoscolus pubescens* Pohl coletado no município de Buíque/PE. (Foto do autor)

2.1.3. *Cnidoscolus quercifolius* Pohl

Planta arbórea caducifólia, pode atingir 4-8 metros de altura, espinhenta e latescente, *C. quercifolius* Pohl (= *C. phyllacanthus* (Müll.Arg.) Pax & K. Hoffm., *Jatropha phyllacantha* Müll.Arg) a favela ou urtiga-branca como é conhecida (**Figura 3**), possui tronco curto, cilíndrico e ramificado desde a base. Suas folhas alternas, simples, membranáceas, glabrescente, de contorno sinuoso e bordos lobados terminam em pequenos espinhos urticantes. A inflorescência é do tipo cimeira axilar com flores brancas unissexuais. Seu fruto deiscente é do tipo tricoca possui três sementes e pêlos urticantes (Lorenzi, 1998).

As raízes, cascas/entrecascas do caule e o látex são utilizados para o tratamento de processos inflamatórios em geral e genito-urinário (útero, ovários, próstata), como anti-séptico dermatológico e oftálmico, para infecções renais e urinárias, contusões, fraturas, ferimento, verrugas e até hemorróidas (Agra et al., 2007b; Albuquerque et al., 2007a).



Figura 3. Exsicata do exemplar de *Cnidocolus quercifolius* Pohl coletado no município de Soledade/PB. (Foto do autor)

As cascas desta espécie possuem as substâncias citotóxicas metil-favelina, favelina e deoxofavelina, três benzociclohepteno derivados (Endo et al., 1991a), favelanona, um ciclopropano-tetracíclico derivado (Endo et al., 1991b), neofavelanona, que é um ciclobuteno derivado (Endo et al., 1992), favelol, isofavelol e favelona, benzociclohepteno derivadas (Ohta et al., 1994). Também foram identificados três triterpenóides: filacantona (bis-*nor*-diterpeno), 3- β -O-cinamoil-lupeol e 3- β -O-dihidrocinaoíl-lupeol (Lemos et al., 1991). As estruturas químicas podem ser visualizadas na **Figura 4**.

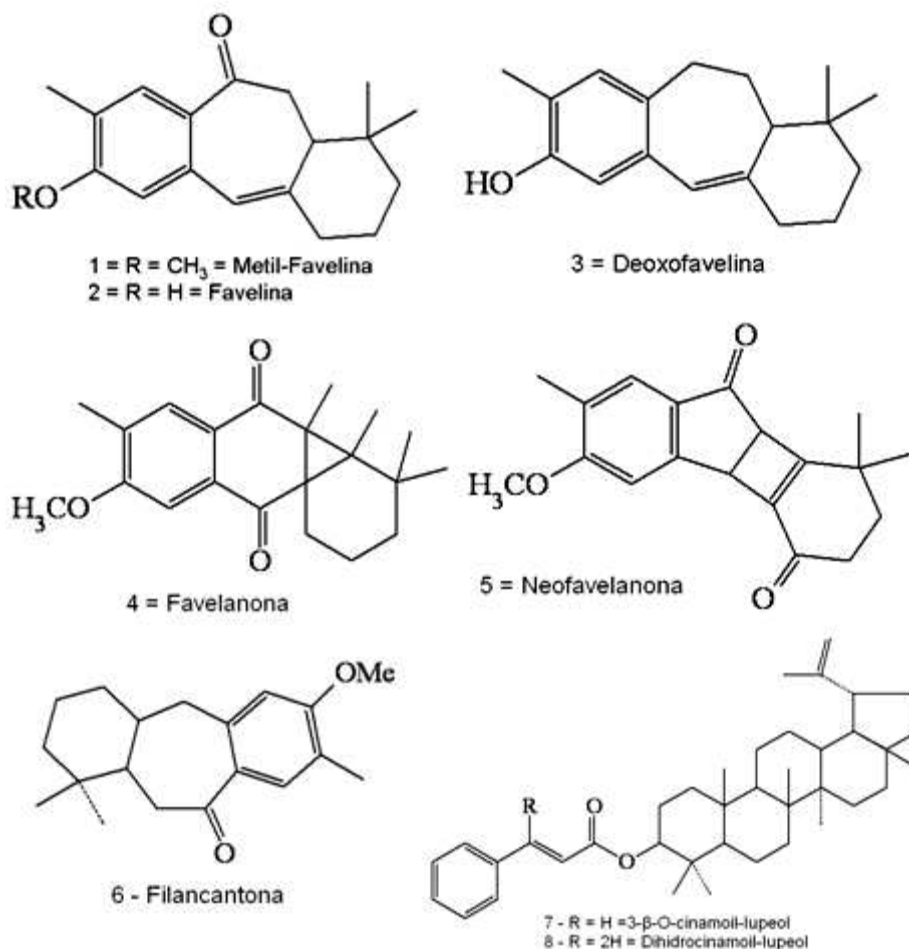


Figura 4. Substâncias citotóxicas isoladas das cascas de *Cnidocolus quercifolius* Pohl.

2.1.4. *Cnidocolus urens* (L.) Arthur

Possuidora de pêlos urticantes ao longo de um caule cilíndrico, *C. urens* (L.) Arthur (= *Jatropha urens* L.) é um subarbusto ereto, latescente que chega a atingir 1 metro de altura (Albuquerque, 1997). Suas folhas pilosas em ambas as faces, sobretudo nas nervuras da face abaxial, são simples, alternas, membranáceas, longopeciadas, com margem mucronado-dentada, verde escuro na face adaxial e verde claro na face abaxial. A inflorescência pilosa é do tipo corimbo terminal, com flores unissexuais, actinomorfas, formado por cinco tépalas brancas pilosas. O fruto tricoca é provido de pêlos urentes.

A urtiga, urtiga-branca ou cansansão (**Figura 5**) é a espécie nativa mais relatada em estudos etnofarmacológicos e suas raízes e cascas do caule apresentam inúmeras propriedades: anticancerígena e antiinflamatória do útero, ovário e próstata,

inflamações e dores em geral, problemas renais, disenteria, hemorragia, menstruação, apendicite e reumatismo (Agra et al., 2007b; Albuquerque, 2006; Albuquerque et al., 2007a; Albuquerque et al., 2007b; Albuquerque e Andrade, 2002). Contudo, o contato desta planta causa dermatite, o que pode diminuir seu uso pela população (Veiga Júnior et al., 2005).



Figura 5. Indivíduo de *Cnidocolus urens* (L.) Arthur coletado no município de Altinho/PE. (Foto do autor)

2.2. Atividade antioxidante

Os antioxidantes têm sido o objetivo de constantes pesquisas nacionais e internacionais por apresentar diversas atividades biológicas. Contudo, há certa dificuldade em padronizar uma metodologia que avalie a capacidade antioxidante devido, principalmente, a diversidade química (Pratt e Birac, 1979). Algumas metodologias utilizam a capacidade de seqüestrar os radicais livres induzidos nas reações, outras avaliam através da inibição da peroxidação lipídica por quantificar os produtos da reação, bem como dos produtos de decomposição da peroxidação lipídica ou mensurando a inibição da oxidação do lipídio do sistema pelo antioxidante a ser testado (Melo et al., 2006).

As metodologias mais comuns para se determinar a atividade antioxidante de modo prático, rápido e sensível são as que envolvem um radical cromóforo, simulando as espécies reativas de oxigênio (EROs), sendo o radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) um dos mais utilizados (Arnao et al., 2000). À medida que o DPPH sofre redução pelos componentes presentes na solução teste, observa-se mudança da coloração da solução original de violeta intensa para amarela, e o grau deste descoramento indica a habilidade do antioxidante em seqüestrar o radical livre (Blois, 1958). Outras metodologias, como o ensaio quelante do íon ferroso (FIC), avaliam o processo de quelação de metais de transição que geram radicais hidroxilas através das reações de Haber-Weiss e Fenton (Chew et al., 2009).

Os compostos fenólicos, representados principalmente por taninos e flavonóides, se destacam como os principais grupos de antioxidantes naturais, pois atuam como eficientes captadores de radicais livres e interrompem as reações em cadeia, e isto se deve ao seu potencial de agir como doadores de hidrogênio (Gazzani et al., 2008; Higdon e Frei, 2003; Delazar et al., 2006).

2.3. Estudo de toxicidade seletiva frente *Artemia salina* Leach.

Os laboratórios de produtos naturais vêm realizando constantemente ensaios biológicos complementares à investigação fitoquímica, buscando orientar a descoberta de novas drogas com potencial terapêutico. O estudo de letalidade dos extratos frente às larvas do microcrustáceo *Artemia salina* Leach é um exemplo prático destes bioensaios, que apresentam facilidade e rapidez de execução associado ao baixo custo, favorecendo estudos rotineiros nos laboratórios. Este estudo também fornece boa correlação entre citotoxicidade e atividade antitumoral (Meyer et al., 1982; McLaughlin, 1991) e antitripanossomíase (Zani et al., 1995), sendo por estas razões uma excelente ferramenta para analisar preliminarmente a toxicidade geral (Luna et al., 2005).

2.4. Atividade antimicrobiana

A resistência de muitos microorganismos patogênicos aos antibióticos tradicionais está trazendo novos rumos à investigação de plantas com potencial antimicrobiano. Espera-se que estas substâncias hajam por mecanismos diferentes dos atuais agentes antibióticos e antifúngicos, impondo a necessidade permanente de pesquisa e desenvolvimento de novas drogas (Silver e Bostian, 1993).

No mundo inteiro, estudos etnofarmacológicos orientam as pesquisas para descoberta de potentes antibióticos a partir de espécies usadas freqüentemente pelas comunidades tradicionais, como no Brasil, que mantêm programas de triagem de produtos naturais para esta atividade (Sartoratto et al., 2004). Uma vez que as plantas medicinais produzem uma variedade de substâncias com propriedades antimicrobianas, é esperado que estudos voltados à triagem possam revelar compostos candidatos para o desenvolvimento de novos antibióticos (Ahmad e Beg, 2001).

2.5. Atividade citotóxica

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

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

Neste sentido, há um crescente interesse em avaliar a ação biológica de várias plantas usadas medicinalmente como antitumorais pela população. Estes recursos utilizados secularmente por diferentes povos merecem atenção dos pesquisadores na busca e desenvolvimento de novas drogas.

3. Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Realizar estudo químico e biológico comparativo de quatro espécies medicinais nativas da Caatinga pertencentes ao gênero *Cnidoscolus* (*C. infestus* Pax & K. Hoffm., *C. pubescens* Pohl, *C. quercifolius* Pohl e *C. urens* (L.) Arthur).

3.2. Objetivos específicos

- Quantificar espectrofotometricamente o teor de fenóis totais, taninos e flavonóides das quatro espécies de *Cnidoscolus*;
- Analisar a capacidade antioxidante primária dos extratos pelo método do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e ensaio quelante do íon ferroso (FIC);
- Analisar a atividade antioxidante secundária dos extratos pelo ensaio quelante do íon ferroso (FIC);
- Caracterizar por cromatografia em camada delgada os principais grupos de metabólitos secundários presentes nas espécies de *Cnidoscolus*;
- Investigar a atividade antibacteriana das espécies frente a cepas padrões e isolados clínico multirresistentes;
- Avaliar a toxicidade seletiva dos extratos frente às larvas de *Artemia salina* Leach;
- Determinar a atividade citotóxica dos extratos das quatro espécies frente às linhagens tumorais HT-29 (carcinoma de cólon humano), Hep-2 (carcinoma de laringe humano) e NCI-H292 (câncer de pulmão humano);
- Estudar comparativamente os dados obtidos das partes do vegetal citadas e não citadas em levantamentos etnodirigidos.

4. Artigo 1

Espécies de Euphorbiaceae presentes em levantamentos etnofarmacológicos do nordeste do Brasil: uma perspectiva fitoquímica e farmacológica

4. ARTIGO 1

ARTIGO A SER SUBMETIDO A:

Revista: Brazilian Journal of Pharmacognosy (ISSN On line 1981-528X)

Autores: Tadeu José da Silva Peixoto Sobrinho e Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim

Título: Espécies de Euphorbiaceae presentes em levantamentos etnofarmacológicos do nordeste do Brasil: uma perspectiva fitoquímica e farmacológica

Espécies de Euphorbiaceae presentes em levantamentos etnofarmacológicos do nordeste do Brasil: uma perspectiva fitoquímica e terapêutica

Tadeu José da Silva Peixoto Sobrinho* & Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim

¹ Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

* Autor correspondente. Avenida Prof. Arthur de Sá - s/n, 50740-521, Recife/PE, Brasil. Tel: +55 81 21268511, Fax: +55 81 21268510. e-mail: tadeu1903@yahoo.com.br.

RESUMO: As espécies de Euphorbiaceae compõem um rico arsenal terapêutico e, apenas no nordeste brasileiro, são encontrados 43 gêneros e 192 espécie, as quais, muitas são utilizadas na medicina popular. O objetivo deste trabalho foi reunir todos os usos populares de espécies de Euphorbiaceae constantes em levantamentos etnodirigidos do nordeste brasileiro com intuito de priorizar espécies com maior importância relativa para serem estudadas fitoquímica e farmacologicamente. A revisão bibliográfica foi realizada em diversas bases de dados e foi utilizado o índice de Importância Relativa (IR) de Bennet e Prance (2000) para ordenar as espécies mais importantes. Foi observado que a maioria dos levantamentos foi conduzida em comunidades rurais da Caatinga de Pernambucana. Nesta revisão, a categoria de doenças do aparelho digestivo (14,39%) foi a mais citada. Dos 17 gêneros disponíveis, *Croton*, *Euphorbia*, *Cnidoscolus* e *Jatropha* se destacaram em número de espécies. As espécies mais citadas, em ordem decrescente, foram *Jatropha mollissima*, *Croton rhamnifolius*, *Jatropha curcas*, *Cnidoscolus urens*, *Croton blanchetianus*, *Cnidoscolus quercifolius*, *Ricinus communis*, *Croton argyrophyloides* e *Jatropha gossypifolia*, sendo as folhas (25,2%) as partes mais utilizadas de todas as espécies. Sete plantas apresentaram apenas um uso popular, enquanto que 53 foram usadas para mais de um problema de saúde, e destas, onze mostraram elevado IR (IR > 1) e são sugeridas como prioritárias para estudos de investigação fitoquímica e farmacológica.

Palavras-chaves: Bioprospecção; *Cnidoscolus*; *Croton*; *Jatropha*, Importância relativa.

1. Introdução

Euphorbiaceae (Ordem Malpighiales) é uma família botânica constituída por ervas, arbustos, árvores ou lianas com distribuição pantropical. Possui cerca de 300 gêneros e sete mil espécies e sua principal característica botânica é a presença de

vários tipos de estruturas secretoras e tricomas tectores que produzem substâncias lactescentes (Sátiro e Roque, 2008; Souza e Lorenzi, 2005). Outras importantes características morfológicas incluem flores diclinas e pistiladas, gineceu sincárpico, ovário súpero geralmente tricarpelar e fruto capsular com deiscência explosiva, abrindo-se em três mericarpos, sendo conhecido como cápsula tricoca (Sátiro e Roque, 2008).

Estudos florísticos e fitossociológicos apontam que esta família apresenta elevada diversidade e distribuição no Brasil, sendo representada por cerca de 70 gêneros e mais de mil espécies, ocorrendo em todos os tipos vegetacionais (Carneiro et al., 2002; Cordeiro, 1992, 1995; Harley e Simmons, 1986). Só no Nordeste são encontrados 43 gêneros e 192 espécies e, destes, o gênero *Croton* L. possui mais representantes (52 spp.), seguido por *Manihot* Mill. (19 spp.), *Sebastiania* Spreng. (14 spp.), *Chamaesyce* Gray (12 spp.) e *Euphorbia* L. (12 spp.) (Cordeiro e Carneiro-Torres, 2011). Ainda de acordo com Sampaio et al. (2002), a família Euphorbiaceae apresenta 17 espécies endêmicas da Caatinga.

Muitas destas espécies são usadas na medicina popular de diversas comunidades rurais e urbanas e, nos últimos anos, ciências como a etnobotânica, que estuda a inter-relação direta entre pessoas e plantas (Albuquerque, 2005), e a etnofarmacologia, que estuda os preparados tradicionais utilizados em sistemas de saúde/doença e que incluem isoladamente ou em conjunto plantas, animais, fungos ou minerais (Albuquerque e Hanazaki, 2006), contribuíram significativamente para o conhecimento científico de diferentes povos e etnias sobre os usos medicinais destas plantas. É a partir dos resultados de abordagens etnodirigidas, que a investigação para descoberta de novos fármacos pôde ser direcionada para bioensaios guiados a moléculas-alvo.

Dentre as ferramentas etnobotânicas disponíveis, as técnicas quantitativas para análise dos dados vêm ganhando popularidade entre os etnobiólogos, como a Importância Relativa, que é uma técnica de alocação subjetiva que reflete o modo de “ver ou entender” determinada espécie por uma cultura na ótica do pesquisador (Silva et al., 2010). Esta técnica determina a importância de cada espécie considerando algumas “categorias” que são criadas pelo pesquisador ou baseadas em categorias já existentes (Silva et al., 2010). Entre estas está o índice de Importância Relativa de

Bennett e Prance (2000), cujo enunciado indica que quanto maior for a versatilidade de indicações para sistemas corporais e propriedades medicinais, maior será a importância da espécie.

Baseado na superioridade das ferramentas etnodirigidas para a descoberta de substâncias naturais com ação terapêutica (Albuquerque e Hanazaki, 2006), neste trabalho foram abordadas as espécies de Euphorbiaceae constantes em levantamentos desenvolvidos no nordeste do Brasil com intuito de incentivar estudos que visem à prospecção de novos fitoquímicos e a avaliação de atividades biológicas de espécies prioritárias.

2. Material e Métodos

2.1. Área de estudo

O nordeste brasileiro possui 1.558.196 km² de área de total (equivalente a 18% do território nacional), população estimada em 53 milhões de habitantes e densidade de 32 hab/km² (IBGE, 2011). A região é composta pelos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Piauí, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Sergipe.

A região encontra-se dividida em quatro sub-regiões: litoral, zona da mata, agreste e sertão. Apresenta média anual de temperatura entre 20-28 °C e índice de precipitação entre 300-2000 mm/ano. Os climas presentes no nordeste são equatorial úmido (Af), tropical (As) e tropical semi-árido (BSh) e os ecossistemas são Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Mata dos Cocais. Esta região possui as bacias hidrográficas do São Francisco, do Parnaíba, do Atlântico Nordeste Oriental, do Atlântico Nordeste Ocidental e do Atlântico Leste.

2.2. Bancos de dados

Foi realizada uma metanálise retrospectiva da literatura, isto é, técnica estatística desenvolvida para integrar os resultados de dois ou mais estudos, sobre uma mesma questão de pesquisa, utilizando os serviços de indexação das bases de

dados *Biological abstract*, *SciELO*, *Scirus*, *Scopus* e *Web of Science*. A pesquisa foi finalizada em novembro de 2011 e não foi restringindo o ano da pesquisa.

Como critério de inclusão para a pesquisa nas bases de dados foi utilizado um descritor constituído com os seguintes termos: a) Termo I – caatinga, northeastern Brazil ou semi-arid; b) Termo II – ethnobotany, ethnopharmacology e ethnomedicine. Foram excluídos da compilação os trabalhos que apenas avaliaram o potencial medicinal de plantas medicinais citadas em levantamentos e plantas não identificadas ao nível de espécie. Todas as nomenclaturas das espécies foram consultadas na base de dados W3 Tropicos do Missouri Botanical Garden (MOBOT) e corrigidas quando necessário. Foram mantidas, sempre que possível, a descrição original utilizada pelos autores sobre os usos terapêuticos citados nos levantamentos.

2.3. Análise dos dados

Os dados obtidos foram sistematizados em um banco de dados utilizando o programa Microsoft Excel 2007 e os gráficos foram elaborados pelo programa GraphPad Prism 5.

Para avaliar quais são as espécies mais importantes de Euphorbiaceae, a Importância relativa (IR) foi calculada de acordo com índice Bennett e Prance (2000). Espécies que obtiveram os maiores valores (com 2 sendo o valor máximo que poderia ser atribuído a uma dada espécie) são consideradas mais versáteis e terão maior número de propriedades e número de sistemas corporais (Almeida et al., 2005). O Índice de IR é calculado pela seguinte equação:

$$IR = NSC + NP \quad (NSC = NSCE/NSCEV \text{ e } NP = NPE/NPEV)$$

onde NSC = número de sistemas corporais tratados por uma determinada espécie (NSCE) dividido pelo número total de sistemas corporais tratados pela espécie mais versátil (NSCEV); NP = número de propriedades atribuídas a uma determinada espécie (NPE) dividido pelo número total de propriedades atribuídas à espécie mais versátil (NPEV).

Os usos populares foram analisados no sistema de Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde (CID-10) da Organização Mundial de Saúde (Tabela 1). As indicações populares não classificadas no CID-10 foram excluídas do cálculo do IR.

Tabela 1. Lista de categorias da Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde (CID-10).

Categoria	Descrição
I	Doenças infecciosas e parasitárias
II	Neoplasias (tumores)
III	Doenças do sangue, órgãos hematopoéticos e transtornos imunitários
IV	Doenças endócrinas, nutricionais e metabólicas
V	Transtornos mentais e comportamentais
VI	Doenças do sistema nervoso
VII	Doenças do olho e anexos
VIII	Doenças do ouvido e da apófise mastóide
IX	Doenças do aparelho circulatório
X	Doenças do aparelho respiratório
XI	Doenças do aparelho digestivo
XII	Doenças da pele e do tecido subcutâneo
XIII	Doenças do sistema osteomuscular e tecido conjuntivo
XIV	Doenças do aparelho geniturinário
XV	Gravidez, parto e puerpério
XVI	Afecções originadas no período perinatal
XVII	Mal formação congênita, deformidades, anomalias cromossômicas
XVIII	Sintomas, sinais e achados anormais
XIX	Lesões, envenenamentos e algumas outras consequências de causas externas
XX	Causas externas

3. Resultados

3.1. Levantamentos etnodirigidos

Com os descritores constituídos pelos termos I e II foram obtidos 42 trabalhos os quais apresentam resultados conforme estabelecidos nos critérios de inclusão. A maioria dos trabalhos foi realizado na Caatinga (73,81%), seguido por Mata Atlântica (14,29%) e cinco trabalhos (11,90%) ocorreram em áreas mistas ou de transição, como entre os domínios Caatinga, Mata Atlântica e Cerrado. Também foi observado que aproximadamente metade dos trabalhos ocorreu em comunidades rurais (47,62%), seguido por comunidades urbanas (19,05%) e em feiras livres, raízeiros ou erveiros (14,29%). Estudos com comunidades tradicionais (indígena e quilombola) representaram apenas 4,76% dos levantamentos. Dentre os estados que compõe o Nordeste brasileiro, Pernambuco apresenta 61,90% dos trabalhos etnodirigidos, seguido por Bahia e Paraíba, ambos com 7,14%.

Nos levantamentos foram identificadas 60 etnoespécies distribuídas em 17 gêneros, sendo os mais importantes em número de táxons os gêneros *Croton* (35,0%), *Euphorbia* (13,3%), *Cnidoscolus* (8,3%) e *Jatropha* (8,3%) (Figura 1). As espécies que foram mais citadas nestes trabalhos são *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. (28), *Croton rhamnifolius* Willd. (20), *Jatropha curcas* L. (17) *Cnidoscolus urens* (L.) Arthur (15), *Croton blanchetianus* Baill. (15), *Cnidoscolus quercifolius* Pohl (13), *Ricinus communis* L. (11), *Croton argyrophyloides* Müll. Arg. (10) e *Jatropha gossypifolia* L. (10). Também foi observado que as partes mais utilizadas são folhas (25,2%), cascas (16,5%), raízes (13%), látex (12,2%) e flores (10,4%).

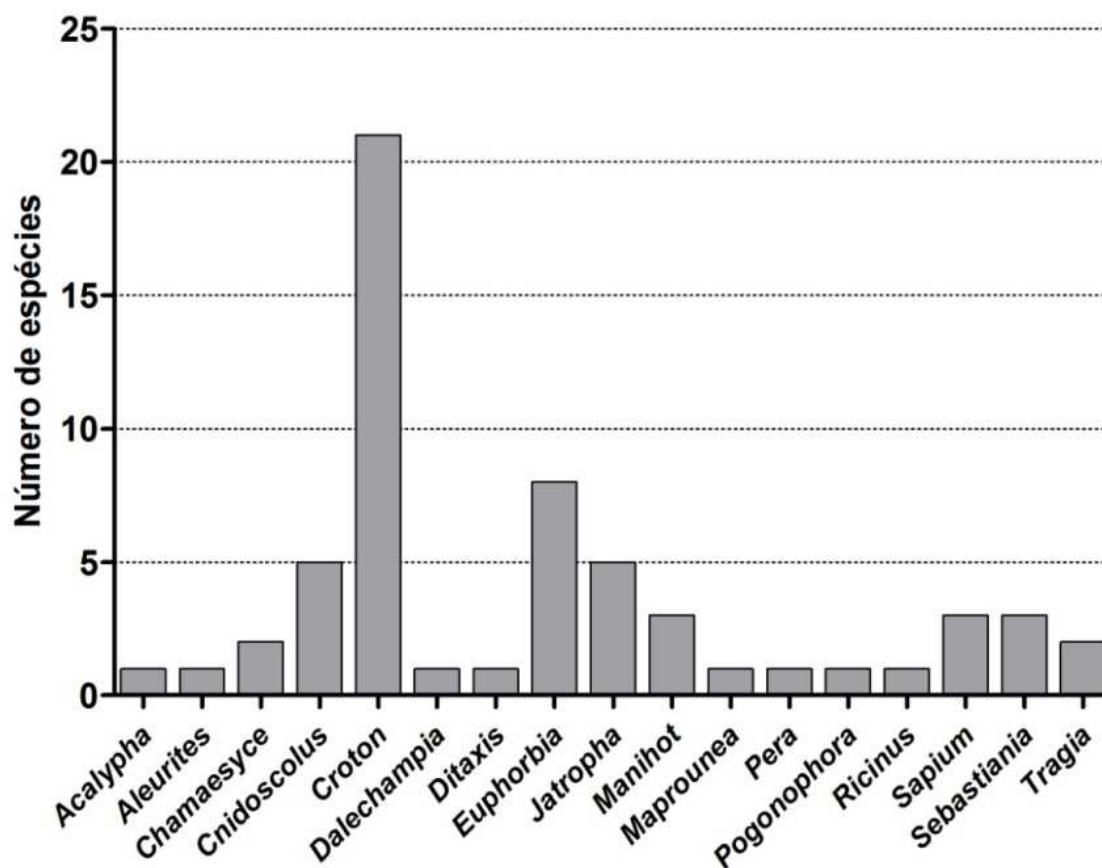


Figura 1. Lista de gêneros de Euphorbiaceae citados em levantamentos etnodirigidos do Nordeste do Brasil.

Geralmente, as categorias freqüentemente mencionadas em entrevistas para tratamentos com plantas medicinais são os transtornos do sistema digestivo e as afecções na pele (Trotter e Logan, 1986). No nosso trabalho as categorias mais citadas foram doenças do aparelho digestivo (14,4%), doenças infecciosas e parasitárias (12,9%), doenças do aparelho geniturinário (11,4%) e doenças do aparelho respiratório (10,3%), enquanto que 32 citações (11,8%) foram classificadas como sintomas, sinais e achados anormais e sete não foram classificadas (Figura 2).

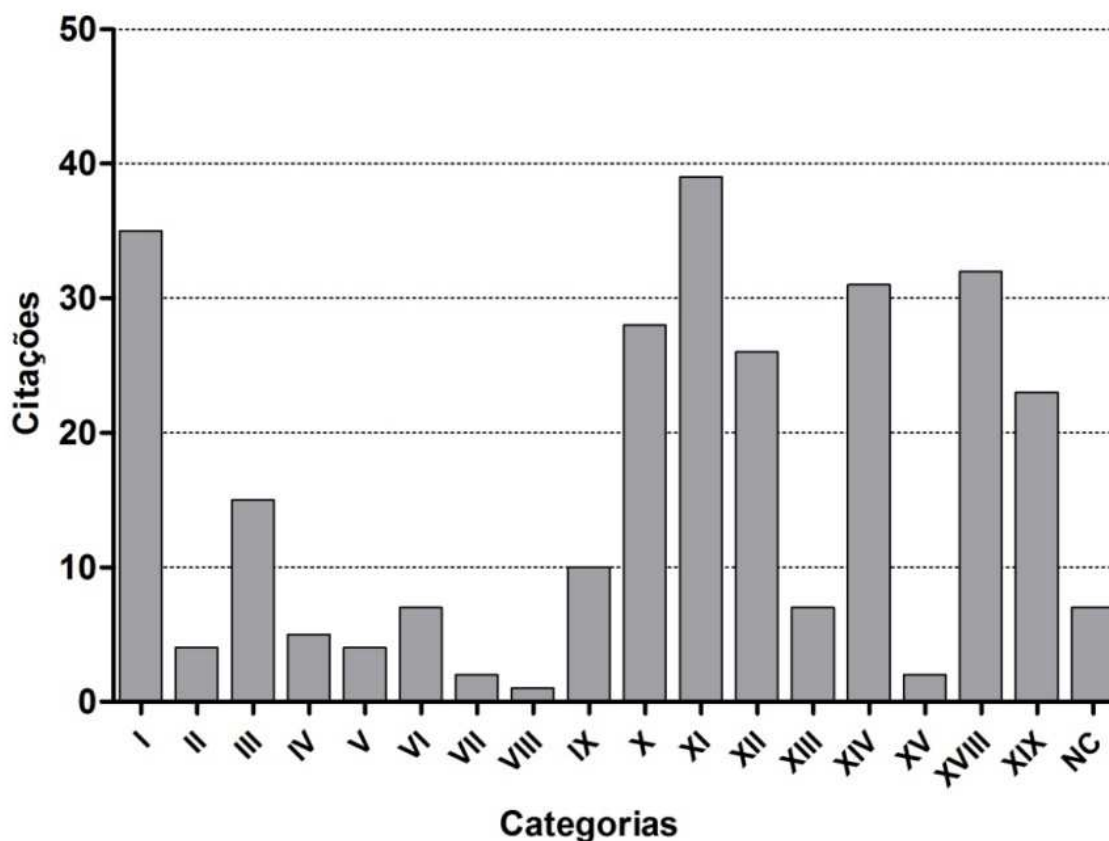


Figura 2. Lista de categorias da Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde (CID-10) de espécies de Euphorbiaceae citadas em levantamentos etnodirigidos do Nordeste do Brasil.

Entre as espécies listadas, sete espécies (11,67%) apresentaram apenas um uso popular, enquanto que a maioria das plantas medicinais (88,33%) foi usada para mais de um problema de saúde (Tabela 2). Das 53 espécies com mais de um uso popular, onze (20,74%) mostraram grande versatilidade no que diz respeito à sua utilização, possuindo elevado IR ($IR > 1$), sendo indicadas para até nove sistemas corporais. As espécies que apresentaram os maiores IR foram, em ordem decrescente, *C. rhamnifolius* (2,0), *C. quercifolius* (1,67), *C. moritibensis* (1,58), *C. urens* (1,57), *C. campestris* (1,47), *J. mollissima* (1,47), *J. ribifolia* (1,42), *C. argyrophyloides* (1,25), *C. blanchetianus* (1,14), *R. communis* (1,09) e *S. jacobinensis* (1,04). As espécies de Euphorbiaceae com seus respectivos nomes populares, partes usadas, usos populares e importância relativa (IR) são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Lista de espécies de Euphorbiaceae com os respectivos nomes populares, partes usadas, usos populares e importância relativa (IR) das espécies citadas em levantamentos desenvolvidos na nordeste do Brasil.

Espécie	Nome popular	Parte usada	Usos populares	IR	Referência ¹	Referência ²
<i>Acalypha multicaulis</i> Müll. Arg.	Canela-de-nambu	Cascas do caule e entrecasca	Acidente vascular cerebral (IX), derrame (IX), dor de dente (XI), hemorragia (XVIII) e inflamação em geral (NC)	0,54	Agra et al., 2007b; Albuquerque et al., 2007b; Almeida et al., 2006.	Albuquerque et al., 2011.
<i>Aleurites moluccanus</i> (L.) Willd.	Nogueira, nogueira-da-india, nogueira-de-bancu e nogueira-de-iguape	Raízes	Inflamações do ovário (XIV) e útero (XIV)	0,22	Agra et al., 2007b; Agra et al., 2008.	-
<i>Chamaesyce hyssopifolia</i> (L.) Small	Porca-parideira e quebra-pedra	Folhas, flores e raízes	Expelir placenta (XV), gastrite (XI), gripe (X), problemas cardíacos (IX) e tosse (XVIII)	0,82	Agra et al., 2007b; Albuquerque et al., 2007b; Almeida et al., 2006.	Albuquerque e Andrade, 2002a.
<i>Chamaesyce prostrata</i> (Aiton) Small	Bacural	Folhas	Diarréia (I) e dor de barriga (XVIII)	0,33	Franco e Barros, 2006.	-
<i>Cnidoscolus infestus</i> Pax. & K. Hoffm.	Urtiga-de-boi	Cascas do caule e raízes	Inflamações do ovário (XIV) e útero (XIV) e problemas do ovário (XIV) e útero (XIV)	0,32	Agra et al., 2007a; Agra et al., 2007b; Agra et al., 2008; Albuquerque et al., 2007b.	-
<i>Cnidoscolus loefgrenii</i> (Pax & K. Hoffm.) Pax & K. Hoffm.	Cansação-bravo	Raízes	Apendicite (XI)	0,16	Oliveira et al., 2010.	-
<i>Cnidoscolus pubescens</i> Pohl	Favela, faveleira, faveleira-mansa e orelha-de-onça	Folhas e flores	Inflamação uterina (XIV), hepática (XI) e em geral (NC), problemas hepáticos (XI) e tumores (II)	0,54	Albuquerque et al., 2007b; Almeida et al., 2005; Almeida et al., 2006.	Silva e Albuquerque, 2005.
<i>Cnidoscolus quercifolius</i> Pohl	Cansansão, favela, faveleiro, queimadeira e urtiga-branca	Cascas do caule, entrecasca, látex e raízes	Apendicite (XI), anti-séptico dos olhos (NC), câncer (II), cicatrizante (XIX), dor de dente (XI), fraturas (XIX), gastrite (XI), hemorróida (IX), indigestão (XI), infecção urinária (XIV), inflamação do ovário (XIV),	1,67	Agra et al., 2007a; Agra et al., 2007b; Agra et al., 2008; Albuquerque et al., 2007b; Cartaxo et al., 2010; Oliveira et al., 2010; Silva e Freire, 2010.	Albuquerque et al., 2008; Almeida et al., 2010; Almeida et al., 2011; Lucena et al., 2007b; Roque et al., 2010; Silva e Albuquerque, 2005.

			próstata (XIV), útero (XIV) e em geral (NC), problemas cardíacos (IX), dérmicos (XII) e renais (XIV), úlcera externa (XII) e verruga (I)			
<i>Cnidocolus urens</i> (L.) Arthur	Cansação, urtiga e urtiga-branca	Cascas do caule, folhas e raízes	Apendicite (XI), câncer (II), disenteria (I), dor em geral (XVIII), hemorragia (XVIII), inflamação da próstata (XIV) ovário (XIV) e em geral (NC), menstruação (XIV) problemas circulatórios (IX), da próstata (XIV), ovarianos (XIV), renais (XIV) e uterinos (XIV), reumatismo (XIII) e tosse (XVIII)	1,57	Agra et al., 2007b; Agra et al., 2008; Albuquerque, 2006; Albuquerque et al., 2007a; Albuquerque et al., 2007b; Gazzaneo et al., 2005; Monteiro et al., 2011; Silva e Freire, 2010.	Albuquerque e Andrade, 2002a; Albuquerque e Andrade, 2002b; Alencar et al., 2010; Almeida et al., 2010; Almeida et al., 2012; Roque et al., 2010; Silva e Andrade, 2005.
<i>Croton argyroglossus</i> Baill.	Velame-branco	N.I.	N.I.	-	-	Albuquerque et al., 2008; Albuquerque et al., 2009; Lucena et al., 2007a.
<i>Croton sect. Argyroglossum</i> Baill.	Velame-branco	N.I.	N.I.	-	-	Albuquerque e Oliveira, 2007; Lucena et al., 2007b; Siqueira et al., 2012.
<i>Croton argyrophylloides</i> Müll. Arg.	Angolinha, marmeleiro-branco, sacatinga e velame-branco	Cascas do caule, entrecasca e raízes	Afinar o sangue (III), Diabetes (IV), disenteria (I), doenças venéreas (uso externo) (I), dor de cabeça (VI) de estômago (XVIII) e na coluna (XIII), fungos (I), inflamação em geral (NC) e tóxico (XIX).	0,81	Agra et al., 2007b; Albuquerque, 2006; Albuquerque et al., 2007b; Almeida et al., 2006; Oliveira et al., 2007.	Albuquerque et al., 2008; Albuquerque e Andrade, 2002a; Albuquerque e Andrade, 2002b; Almeida e Albuquerque, 2002; Lucena et al., 2007b.
<i>Croton blanchetianus</i> Baill.	Marmeleiro, marmeleiro-preto e mermeleiro	Cascas do caule, folhas e raízes	Depurativo (III), diabetes (IV), diarreia (I), disenteria (I), doenças venéreas (uso externo) (I), dor de cabeça (VI), indigestão (XI), problemas de estômago (XVIII), e tosse (18)	1,14	Agra et al., 2007b; Cartaxo et al., 2010; Oliveira et al., 2007.	Albuquerque et al., 2008; Albuquerque et al., 2009; Albuquerque e Oliveira, 2007; Alencar et al., 2010; Almeida et al., 2010; Almeida et al., 2011; Ferreira Júnior et al., 2011; Lucena et

						al., 2007a; Lucena et al., 2007b; Roque et al., 2010; Santos et al., 2009; Siqueira et al., 2012.
<i>Croton cajucara</i> Benth.	Sacaca	Folhas e raízes	Apendicite (XI), eczema (XII), reumatismo (XIII), sífilis (uso externo) (I) e úlcera externa (XII)	0,71	Agra et al., 2007b; Agra et al., 2008.	-
<i>Croton campestris</i> A. St.-Hil.	Velame e velame-branco	Folhas, cascas do caule e raízes	Bronquite (X), congestão nasal (X), depurativo (III), eczema (XII), gripe (X), hemorróida (IX), problemas da garganta (XVIII) e intestinal (XI), reumatismo (XIII), sífilis (I) e úlcera externa (XII)	1,47	Agra et al., 2007b; Agra et al., 2008; Albuquerque et al., 2007b; Costa Neto et al., 2000; Franco e Barros, 2006.	-
<i>Croton conduplicatus</i> Kunth	Quebra-faca	Cascas do caule e folhas	Dor de cabeça (VI) e de estômago (XVIII), gripe (X), indigestão (XI) e problemas de estômago (XI)	0,71	Cartaxo et al., 2010.	-
<i>Croton glandulosus</i> L.	N.I.	Folhas e flores	Hemorragia nasal (XVIII) e sinusite (X)	0,33	Albuquerque et al., 2007b; Almeida et al., 2006.	-
<i>Croton grewioides</i> Baill.	Canelinha	Folhas e flores	Gripe (X)	0,16	Oliveira et al., 2010.	-
<i>Croton heliotropifolius</i> Kunth	Velame e velame-verdadeiro	Folhas	Sinusite (X)	0,16	Oliveira et al., 2010.	Roque et al., 2010.
<i>Croton micans</i> Sw.	Alecrim-de-vaqueiro	Folhas e flores	Dor de ouvido (VIII), gripe (X), problemas cardíacos (IX) e como sedativo (V)	0,65	Agra et al., 2007b; Albuquerque et al., 2007b; Almeida et al., 2006.	-
<i>Croton moritibensis</i> Baill.	Velame e velame-preto	Cascas do caule, folhas, látex e raízes	Afinar o sangue (III), cicatrizante (XIX), eczema (XII), gripe (X), problemas cardíacos (IX) e dérmicos (XII), reumatismo (XIII), sedativo (V), sífilis (uso externo) (I), úlcera externa (XII) e veneno de cobra (XIX)	1,58	Agra et al., 2007b; Agra et al., 2008; Albuquerque et al., 2007b; Silva e Freire, 2010.	-
<i>Croton muscicapa</i> Müll. Arg.	Cidreira-braba e	Folhas	Anti-séptico (NC) e	0,16	Agra et al., 2007b; Agra et	Almeida et al., 2010.

	velame-de-cheiro		dermatite (XII)		al., 2008; Almeida et al., 2010.	
<i>Croton pulegioides</i> Baill.	Velame	Folhas	Bronquite (X), expectorante (X) e gripe (X)	0,27	Agra et al., 2007b; Agra et al., 2008.	-
<i>Croton rhamnifolius</i> Willd.	Alecrim-de-tabuleiro, pau-de-leite, velame, velame-branco e velame-bravo	Cascas do caule, entrecasca, folhas, flores, planta inteira e sementes	Afinar o sangue (III), alergia (XIX), anemia (III), asma (X), barriga inchada (NC), bronquite (X), cicatrizante (XIX), coceira (XII), depurativo (III), diabetes (IV), diarréia (I), distúrbios menstruais (XIV), dor de estômago (XVIII), intestinal (XVIII) e na coluna (XIII), escabiose (uso externo) (I), gripe (X), hemostático (III), hipercolesterolemia (IV), inflamação (NC), rachadura nos pés (NC) e tosse (XVIII)	2,00	Agra et al., 2007b; Agra et al., 2008; Albuquerque, 2006; Albuquerque et al., 2007b; Almeida et al., 2005; Almeida et al., 2006; Oliveira et al., 2007; Oliveira et al., 2010; Silva et al., 2011.	Albuquerque et al., 2008; Albuquerque et al., 2009; Albuquerque et al., 2011; Albuquerque e Andrade, 2002a; Albuquerque e Andrade, 2002b; Alencar et al., 2010; Almeida et al., 2010; Araújo et al., 2008; Lucena et al., 2007a; Lucena et al., 2007b; Siqueira et al., 2012.
<i>Croton rhamnifolioides</i> Pax & K. Hoffm.	Quebra-faca	Cascas do caule	Inflamação em geral (NC) e problemas intestinal (XI)	0,16	Monteiro et al., 2011.	N.I.
<i>Croton sincorensis</i> Mart. ex Müll. Arg.	Marmeleiro-branco	N.I.	N.I.	-	-	Almeida et al., 2010; Almeida et al., 2011.
<i>Croton sonderianus</i> Müll. Arg.	Cansação, marmeleiro e marmeleiro-preto	Cascas do caule, folhas e planta inteira	Asma (X), antiemético (XVIII), bronquite (X), dor de estômago (XVIII) e intestinal (XVIII), diarréia (I), gripe (X), escabiose (uso externo) (I) e hemostático (III)	0,92	Agra et al., 2007b; Agra et al., 2008; Albuquerque et al., 2007b; Almeida et al., 2006; Franco e Barros., 2006; Silva e Freire, 2010.	Albuquerque e Andrade, 2002a.
<i>Croton tenuifolius</i> Pax & K. Hoffm.	Velamento e velame-santo	Folhas e raízes	Antiamebíase (I), dor no corpo (XVIII), febre (XVIII) e vermífugo (I)	0,43	Oliveira et al., 2010.	-
<i>Croton triqueteter</i> Lam.	Malva-de-cheiro	Folhas	Diarréia (I) e disenteria (I)	0,22	Agra et al., 2007b; Agra et al., 2008.	-
<i>Croton zehntneri</i> Pax & K. Hoffm.	Canelinha e mulatinha	Planta inteira	Asma (X), bronquite (X), dor intestinal (XVIII), gripe (X), escabiose (uso externo) (III)	0,65	Agra et al., 2007b; Agra et al., 2008.	-

			e hemostático (III)			
<i>Dalechampia scandens</i> L.	Urtiga-mamão	Planta inteira	Alergênico (XIX) e tóxico (XIX)	0,22	Agra et al., 2007b; Agra et al., 2008.	-
<i>Ditaxis malpighiacea</i> (Ule) Pax & K. Hoffm.	Sassafrás e sassafrás fêmea	N.I.	N.I.	-	-	Albuquerque et al., 2011.
<i>Euphorbia comosa</i> Vell.	Barbaça	Folhas, flores, planta inteira e raízes	Bronquite (X), cirrose (XI), cólica menstrual (XIV) e inflamação hepática (XI)	0,54	Agra et al., 2007b; Albuquerque et al., 2007b; Almeida et al., 2006.	-
<i>Euphorbia gymnoclada</i> Boiss.	Avelós	N.I.	N.I.	-	-	Albuquerque et al., 2008.
<i>Euphorbia hirta</i> L.	Erva-de-santa-luzia	Folhas, látex e partes aéreas	Asma (X), bronquite (X), hemorragia (XVIII), purgativo (XI) e veneno de cobra (XIX)	0,71	Agra et al., 2007b; Agra et al., 2008.	-
<i>Euphorbia hyssopifolia</i> L.	Burra-leiteira e erva-de-leite	Látex e planta inteira	Conjuntivite (VII), tosse (XVIII) e úlcera externas (XII)	0,49	Agra et al., 2007b; Agra et al., 2008.	-
<i>Euphorbia phosphorea</i> Mart.	Avelóz, cipó de fogo e pau-de-leite	Cascas do caule, látex e ramos	Afinar o sangue (III), inflamação em geral (NC) e verruga (cauterização) (I)	0,33	Agra et al., 2007b; Agra et al., 2008; Albuquerque et al., 2007b; Almeida et al., 2006; Cartaxo et al., 2010; Costa Neto et al., 2000.	-
<i>Euphorbia prostrata</i> Aiton	Quebra-pedra e sanguinho	Látex	Verruga (uso externo) (I)	0,16	Agra et al., 2007b; Albuquerque et al., 2007b; Costa Neto et al., 2000.	Albuquerque e Andrade, 2002a.
<i>Euphorbia thymifolia</i> L.	Pé-de-pombo e rins	Planta inteira	Disenteria (I) e problema renal (XIV)	0,33	Gazzaneo et al., 2005.	Silva e Andrade, 2005.
<i>Euphorbia tirucalli</i> L.	Avelós e cachorro-pelado	Látex e raízes	Câncer (II), cicatrizante (XIX), purgativo (XI), úlcera externa (XII) e verruga (cauterização) (I)	0,82	Agra et al., 2007b; Agra et al., 2008; Oliveira et al., 2010.	Albuquerque et al., 2009; Alencar et al., 2010; Almeida et al., 2012; Pinto et al., 2006.
<i>Jatropha curcas</i> L.	Pinhão, pinhão-brabo, pinhão-manso e pinhão-roxo	Folhas, látex, ramos e sementes	Abstinência de álcool (V), acidente vascular cerebral (VI), digestivo (XI), dor de cabeça (VI), hemorragia (XVIII), inapetência (XVIII) e veneno de cobra (XIX)	0,92	Agra et al., 2007b; Agra et al., 2008; Albuquerque, 2006; Albuquerque et al., 2007a; Albuquerque et al., 2007b; Franco e Barros., 2006; Monteiro et al., 2011; Oliveira et al., 2007.	Albuquerque et al., 2005; Albuquerque et al., 2008; Albuquerque et al., 2009; Albuquerque e Andrade, 2002a; Albuquerque e Andrade, 2002b; Albuquerque e Oliveira, 2007; Araújo et al., 2008;

						Lucena et al., 2007a; Lucena et al., 2007b.
<i>Jatropha gossypifolia</i> L.	Pinhão-roxo	Folhas, látex, partes aéreas e sementes	Constipação (XI), depurativo (III), dor nos olhos (VII) e cabeça (VI), hemorragia (XVIII), hepatite (I) e inflamação em geral (NC)	0,98	Agra et al., 2007b; Albuquerque et al., 2007a; Albuquerque et al., 2007b; Monteiro et al., 2011; Oliveira et al., 2010.	Albuquerque et al., 2008; Almeida et al., 2011; Almeida et al., 2012; Araújo et al., 2008; Silva e Andrade, 2005.
<i>Jatropha mollissima</i> (Pohl) Baill.	Pinhão, pinhão-de-seda, pinhão-branco, pinhão-bravo e pinhão-manso	Folhas, flores, frutos, látex, ramos e sementes	Cicatrizante (XIX), derrame (IX), dor de dente (XI), gastrite (XI), inapetência (XVIII), infecção renal (I), inflamação renal (XIV), mancha de pele (XII), picada de inseto (XIX), úlcera (XI), veneno de cobra (XIX) e verruga de picada de cobra (NC)	1,47	Agra et al., 2007a; Agra et al., 2007b; Agra et al., 2008; Albuquerque, 2006; Albuquerque et al., 2007b; Almeida et al., 2005; Almeida et al., 2006; Oliveira et al., 2007; Oliveira et al., 2010; Silva et al., 2011.	Albuquerque et al., 2005; Albuquerque et al., 2008; Albuquerque et al., 2009; Albuquerque et al., 2011; Albuquerque e Andrade, 2002a; Albuquerque e Andrade, 2002b; Albuquerque e Oliveira, 2007; Alencar et al., 2010; Almeida et al., 2010; Almeida et al., 2011; Almeida et al., 2012; Araújo et al., 2008; Ferreira Júnior et al., 2011; Lucena et al., 2007a; Lucena et al., 2007b; Roque et al., 2010; Santos et al., 2009; Silva e Andrade, 2005; Silva e Albuquerque, 2005.
<i>Jatropha mutabilis</i> (Pohl) Baill.	Pinhão-de-seda	Folhas e flores	Constipação (XI), depurativo (III), infecção intestinal (I) e purgativo (XI)	0,54	Agra et al., 2007b; Albuquerque et al., 2007b; Almeida et al., 2006.	-
<i>Jatropha ribifolia</i> (Pohl) Baill.	Pinhão, pinhão-branco e pinhão-de-purga	Folhas, flores e látex	Cicatrizante (XIX), diabetes (IV), dor de cabeça (VI), expectorante (X), gripe (X), impigem (I), inflamação da garganta (XVIII), uterina (XIV) e em geral (NC), reumatismo (XIII) e veneno de cobra (XIX)	1,42	Agra et al., 2007a; Agra et al., 2007b; Agra et al., 2008; Albuquerque et al., 2007b; Almeida et al., 2006; Oliveira et al., 2010; Silva e Freire, 2010.	-.

<i>Manihot dichotoma</i> Ule	Maniçoba	Casca	N.I.	-	N.I.	Alencar et al., 2010; Araújo et al., 2008; Lucena et al., 2007a; Lucena et al., 2007b; Silva e Albuquerque, 2005.
<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Aipim, macacheira, mandioca, mandioca-branca, mandioca-roxa, maniva e roça	Amido, folhas, látex e raízes	Afta (XI), constipação (XI), diarreia (I), erupções cutâneas em bebês (XII), gastrite (XI), inflamação em geral (NC), pênfigo (XII), úlcera (XI) e verruga (I)	0,75	Agra et al., 2007b; Agra et al., 2008; Albuquerque et al., 2007b; Cartaxo et al., 2010; Costa Neto, 2000; Silva et al., 2011.	Almeida et al., 2012; Pinto et al., 2006.
<i>Manihot glaziovii</i> Müll. Arg.	Maniçoba	Cascas do caule, folhas e flores	Anemia (III), dor de cabeça (VI), hemorragia (XVIII), infecção renal (I), problema renal (XIV) e reumatismo (XIII)	0,98	Agra et al., 2007a; Agra et al., 2007b; Agra et al., 2008; Albuquerque et al., 2007b; Almeida et al., 2005; Almeida et al., 2006.	Siqueira et al., 2012.
<i>Maprounea guianensis</i> Aubl.	Pau-leite	Cascas do caule e caule das raízes	Anorexia (V), antiabortivo (XV), cicatrizante (XIX), inflamação em geral (NC), problema sanguíneo (III) e tóxico (XIX)	0,71	Agra et al., 2007b; Agra et al., 2008; Albuquerque et al., 2007b; Monteiro et al., 2011.	Silva e Albuquerque, 2005.
<i>Pera ferruginea</i> (Schott) Müll. Arg.	Sete cascos	Planta inteira	N.I.	-	-	Cunha e Albuquerque, 2006.
<i>Pogonophora schomburgkiana</i> Miers ex Benth.	Cocão amarelo	Planta inteira	N.I.	-	-	Cunha e Albuquerque, 2006.
<i>Ricinus communis</i> L.	Carrapateira, mamona e ricino	Folhas, flores, látex e sementes	Alopecia (XII), constipação (XI), dor em geral (XVIII), furúnculo (XII), gripe (X), helmintíase (I), purgativo (XI) e veneno de cobra (XIX)	1,09	Agra et al., 2007b; Agra et al., 2008; Albuquerque et al., 2007b; Costa Neto, 2000; Franco e Barros., 2006; Lima et al., 2008; Oliveira et al., 2010.	Albuquerque et al., 2008; Almeida et al., 2012; Almeida e Albuquerque, 2002; Silva e Andrade, 2005.
<i>Sapium argutum</i> (Müll. Arg.) Huber	Burra-leiteira, pau-de-candeia e pau-de-leite	Cascas do caule	Abortivo (XIX), purgativo (XI) e úlcera externa (XII)	0,49	Agra et al., 2007b; Agra et al., 2008.	-
<i>Sapium lanceolatum</i> (Müll. Arg.) Huber	Burra-leiteira	Folhas	Cicatrizante (XIX)	0,16	Silva et al., 2011.	Silva e Albuquerque, 2005.
<i>Sapium sellowianum</i> (Müll. Arg.) Klotzsch ex Baill.	Burra-leiteira	Cascas do caule	Abortivo (XIX), purgativo (XI) e úlcera externa (XII)	0,49	Agra et al., 2007b; Agra et al., 2008.	-
<i>Sebastiania brasiliensis</i> Spreng.	Purga-de-leite	Cascas do caule e	Amenorréia (XIV), edema	0,98	Agra et al., 2007b; Agra et	Silva e Albuquerque, 2005.

		látex	(XVIII), dermatite (uso externo) (XII), diurético (XIV), eczema (XII), leucorréia (XIV), purgativo (XI) e sífilis (I)		al., 2008.	
<i>Sebastiania jacobinensis</i> (Müll. Arg.) Müll. Arg.	Leiteiro	Cascas do caule	Cicatrizante (XIX), dermatite (XII), eczema (XII), edema (XVIII), inflamação (NC), leucorréia (XIV), purgativo (XI) e sífilis (I)	1,04	Agra et al., 2007b; Oliveira et al., 2007.	Albuquerque et al., 2009; Lucena et al., 2007a; Lucena et al., 2007b.
<i>Sebastiania macrocarpa</i> Müll. Arg.	Brandão e purga-de-leite	Cascas do caule;	Dermatite (XII), eczema (XII), edema (XVIII), leucorréia (XIV), purgativo (XI) e sífilis (I)	0,87	Agra et al., 2007b.	-
<i>Tragia volubilis</i> L.	Cansação, urtiga e urtiga-de-rama	Planta inteira	Diurético (XIV)	0,16	Agra et al., 2007b; Agra et al., 2008; Lima et al., 2008.	-
<i>Tragia bahiensis</i> Müll. Arg.	Tamarina	Planta inteira	Úlcera (XI)	0,16	Albuquerque et al., 2007b; Almeida et al., 2006.	-

¹ = Referências que citam indicações populares; ² = Referências que não citam indicações populares; N.I. = Não informado na referência;

Algarismos romanos entre parênteses representam o sistema CID-10 ao qual pertencem.

4. Discussão

A população humana da região nordeste apresenta uma grande diversidade cultural devido à ocupação feita pelos diversos grupos étnicos que utilizam plantas para os mais diversos fins, como medicinal, alimentício, forrageiro, construção e combustível (Diegues e Arruda, 2001). Vários estudos tem destacado o uso de plantas em regiões tropicais, discutindo diferentes hipóteses para explicar os padrões de uso (Voeks, 1996; Stepp e Moerman, 2001; Stepp, 2004). Em geral, a manipulação de plantas por pessoas de regiões semi-áridas depende de fatores como a disponibilidade temporal dos recursos e o grau de interesse por um recurso em especial (Albuquerque e Andrade, 2002a).

O conhecimento tradicional relacionado às plantas medicinais nas diversas regiões brasileiras, que foi fortemente derivado da mistura das culturas indígenas e as influências européias e africanas do período de colonização, é à base da medicina popular (Martins et al., 2000). No nordeste brasileiro, por exemplo, diversas plantas são usadas para os mais variados usos medicinais e os resultados mostram que a Caatinga é o ecossistema mais estudado. Isto pode ser justificado pela extensão territorial que esta representa na região nordeste, abrangendo 734.478 Km², o que corresponde aproximadamente a 54% da região Nordeste e 11% do território nacional (Araujo et al., 2007). No entanto, foi nas últimas três décadas que este ecossistema vem sendo estudado de forma mais aprofundada, constatando-se sua relevância a partir do conhecimento da sua alta diversidade, além de suas potencialidades (Trovão et al., 2004).

Várias espécies apresentam muitos usos populares (ver Tabela 2) e, isto, pode ser uma decorrência do maior acesso e disponibilidade da população desta região a essas plantas e não de uma real seleção popular. O índice de importância relativa, como o apresentado neste estudo, pode ser então utilizado para correlacionar à importância destas espécies e dados fitossociológicos, mostrando que determinadas plantas merecem maior atenção de manejo (Silva e Albuquerque, 2005). No caso específico das plantas medicinais, a coleta resultante do extrativismo e o aumento na comercialização de produtos derivados dessas plantas podem resultar em declínio ou quase extinção de espécies de grande importância terapêutica (Melo et al., 2008; Andel e Havinga, 2008). Nesse sentido, a Caatinga necessita de ações voltadas à conservação da biodiversidade, pois está sob grande pressão devido ao extrativismo de

espécies medicinais, além do desmatamento e uso irracional do solo (Araújo et al., 2007; Albuquerque et al., 2008).

5. Considerações finais

Muitas espécies de Euphorbiaceae são utilizadas no nordeste do Brasil como medicinais para diversos problemas de saúde. Foi observado que, dentre os 17 gêneros, os táxons *Croton*, *Euphorbia*, *Cnidocolus* e *Jatropha* se destacam em número de espécies e, com exceção de *Euphorbia*, apresentaram espécies com maior importância relativa ($IR > 1$). Isto indica que algumas espécies destes gêneros e ainda *R. communis* e *S. jacobinensis* possuem muitos usos populares em diferentes sistemas corporais, o que nos leva a considerá-las prioritárias em estudos de prospecção fitoquímica e atividade biológica.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Ciências e Amparo a Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela bolsa de doutorado concedida a T.J.S. Peixoto Sobrinho.

Referências

AGRA, M.F.; BARACHO, G.S.; NURIT, K.; BASÍLIO, I.J.L.D.; COELHO, V.P.M. Medicinal and poisonous diversity of the flora of "Cariri Paraibano", Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p.383-395, 2007b.

AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p.114-140, 2007a.

AGRA, M.F.; SILVA, K.N.; BASÍLIO, I.J.L.D.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.3, p.472-508, 2008.

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.; ANDRADE, L.H.C; CABALLERO, J. Structure and Floristic of Homegardens in Northeast of Brazil. **Journal of Arid Environments**, v. 62, p. 491-506, 2005.

ALBUQUERQUE, U.P.; MONTEIRO, J. M.; RAMOS, M. A.; AMORIM, E. L. C. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.110, p.76-91, 2007a.

ALBUQUERQUE, U.P.; MEDEIROS, P.M.; ALMEIDA, A.L.S.; MONTEIRO, J.M.; LINS NETO, E.M.F.; MELO, J.G.; SANTOS, J.P. Medicinal plants of the Caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v.114, p.325-354, 2007b.

ALBUQUERQUE, U.P.; SILVA, V.A.; CABRAL, M.C.; ALENCAR, N.L.; ANDRADE, L.H.C. Comparisons between the use of medicinal plants in indigenous and rural caatinga (dryland) communities in NE Brazil. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 7, p. 156-170, 2008.

ALBUQUERQUE, U.P. ; ARAÚJO, T.A.S.; RAMOS, M.A.; NASCIMENTO, V.T.; LUCENA, R.F.P.; MONTEIRO, J.M.; ALENCAR, N.L.; ARAÚJO, E.L. How ethnobotany can aid biodiversity conservation: reflections on investigations in the semi-arid region of NE Brazil. **Biodiversity and Conservation**, v. 18, p. 127-150, 2009.

ALBUQUERQUE, U.P.; SOLDATI, G.T.; SIEBER, S.S.; MEDEIROS, P.M.; SA, J. C.; SOUZAF, L. C. Rapid Ethnobotanical diagnosis of the Fulni-ô indigenous lands (NE Brazil): floristic survey and local conservation priorities for medicinal plants. **Environment, Development and Sustainability**, v. 13, p. 277-292, 2011.

ALBUQUERQUE, U.P.; ANDRADE, L.H.C. Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de caatinga no estado de Pernambuco. **Acta Botanica Brasilica**, v. 16, n. 3, p. 273-285, 2002a.

ALBUQUERQUE, U.P.; ANDRADE, L.H.C. Uso de recursos vegetais da Caatinga: o caso do agreste do estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil). **Interciência**, v.27, n.7, p.336-346, 2002b.

ALBUQUERQUE, U.P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, supl, p.678-689, 2006.

ALBUQUERQUE, U.P.; OLIVEIRA, R.F. Is the use-impact on native caatinga species in Brazil reduced by the high species richness of medicinal plants? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 156-170, 2007.

ALENCAR, N.L.; ARAÚJO, T.A.S.; AMORIM, E.L.C.; ALBUQUERQUE, U.P. The inclusion and selection of medicinal plants in traditional pharmacopoeias evidence in support of the diversification hypothesis. **Economic Botany**, v. 64, p. 68-79, 2010.

ALMEIDA, C.F.C.B.R.; SILVA, T.C.L.; AMORIM, E.L.C.; MAIA, M.B.S.; ALBUQUERQUE, U.P. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the caatinga (Northeast Brazil). **Journal of Arid Environments**, v. 62, n. 1, p. 127-142, 2005.

ALMEIDA, C.F.C.B.R.; AMORIM, E.L.C.; ALBUQUERQUE, U.P.; MAIA, M.B.S. Medicinal plants popularly used in the Xingó region - a semi-arid location in Northeastern Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 2, n. 15, p. 1-9, 2006.

ALMEIDA, C.F.C.B.R.; RAMOS, M.A.; AMORIM, E.L.C.; ALBUQUERQUE, U.P. A comparison of knowledge about medicinal plants for three rural communities in the semi-arid region of northeast of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 674-684, 2010.

ALMEIDA, C.F.C.B.R.; AMORIM, E.L.C.; ALBUQUERQUE, U.P. Insights into the search for new drugs from traditional knowledge: an ethnobotanical and chemical-ecological perspective. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, p. 864-873, 2011.

ALMEIDA, C.F.C.B.R.; RAMOS, M.A.; SILVA, R.; MELO, J. G.; MEDEIROS, M. F. T.; ARAÚJO, T.A.S.; ALMEIDA, A.L.S.; AMORIM, E.L.C.; ALVES, R. R. N.; ALBUQUERQUE, U.P. Intracultural Variation in the Knowledge of Medicinal Plants in an Urban-Rural Community in the Atlantic Forest from Northeastern Brazil. **Evidence-Based Complementary and Alternative**, v. 2012, p. 1-15, 2012.

ALMEIDA, C.F.C.B.R.; ALBUQUERQUE, U.P. Uso e conservação de plantas e animais medicinais no estado de Pernambuco: um estudo de caso no Agreste. **Interciencia** (Caracas), Venezuela, v. 27, n. 6, p. 276-285, 2002.

ANDEL, T.; HAVINGA, R. Sustainability aspects of commercial medicinal plant harvesting in Suriname. **Forest Ecology and Management**, v.256, p.1540–1545, 2008.

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

BENNETT, B.C. e PRANCE, G.T.. Introduced plants in the indigenous pharmacopeia of Northern South America. **Economic Botany** v. 54, n.1, p. 90-102, 2000.

CARNEIRO, D.C.; CORDEIRO, I.; França, F. A família Euphorbiaceae na Flora de Inselbergs da região de Milagres, Bahia, Brasil. **Boletim de Botânica**, Universidade de São Paulo, v.20, p.31-47, 2002.

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.

CORDEIRO, I. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Euphorbiaceae. **Boletim de Botânica**, Universidade de São Paulo, v.13, p.169-217, 1992.

CORDEIRO, I. Euphorbiaceae. In: STANNARD, B.L. (ed.). Flora do Pico das Almas, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Kew, Royal Botanic Gardens**, pp. 300-317, 1995.

CORDEIRO, I.; CARNEIRO-TORRES, D. Euphorbiaceae. In: **Checklist das Plantas do Nordeste Brasileiro: Angiospermae e Gymnospermae**. 2011.

COSTA NETO, E.M.; OLIVEIRA, M.V.M. The use of medicinal plants in the county of Tanquinho, State of Bahia, Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.2, n.8, p.1-8, 2000.

CUNHA, L.V.F.C.; ALBUQUERQUE, U.P. Quantitative Ethnobotany in an Atlantic Forest Fragment of Northeastern Brazil- implication to conservation. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 114, n. 1/2, p. 1-25, 2006.

DIEGUES, A.C.; ARRUDA, R.S.V.; **Saberes tradicionais e biodiversidade no Brasil**. Ministério do Meio Ambiente, Brasília. São Paulo: Editora da USP. 2001.

FERREIRA JUNIOR, W.S.; LADIO, A. H.; ALBUQUERQUE, U.P. Resilience and Adaptation in the Use of Medicinal Plants with Suspected Anti-Inflammatory Activity in the Brazilian Northeast. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, p. 238-252, 2011.

FRANCO, E.A.P.; BARROS, R.F.M. Uso e diversidade de plantas medicinais no Quilombo Olho D'água dos Pires, Esperantina, Piauí. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.8, n.3, p.78-88, 2006.

GAZZANEO, L.R.S.; LUCENA, R.F.P.; ALBUQUERQUE, U.P. Knowledge and use of medicinal plants by local specialists in a region of Atlantic Forest in the state of Pernambuco (Northeast Brazil). **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 1, n. 9, p. 1-11, 2005.

HARLEY, R.M.; Simmons, N.A. Florula of Mucugê, Chapada Diamantina, Brazil. **Kew, Royal Botanic Gardens**. 1986.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: www.ibge.gov.br. Acesso em: novembro de 2011.

LIMA, S.T.C.; RODRIGUES, E.D.; MELO, T.; NASCIMENTO, A.F.; GUEDES, M.L.S.; CRUZ, T.; ALVES, C.; MEYER, R.; TORALLES, M.B. Levantamento da flora medicinal usada no tratamento de doenças metabólicas em Salvador, BA- Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.10, n.4, p.83-89, 2008.

LUCENA, R.F.P.; ARAÚJO, E.L.; ALBUQUERQUE, U.P. Does the Local Availability of Woody Caatinga Plants (Northeastern Brazil) Explain Their Use Value?. **Economic Botany**, v. 61, p. 347-361, 2007a.

LUCENA, R.F.P.; ALBUQUERQUE, U.P.; MONTEIRO, J.M.; ALMEIDA, C.F.C.B.R.; FLORENTINO, A.T.N.; FERRAZ, J.S.F. Useful plants of the semi-arid northeastern region of Brazil - a look at their conservation and sustainable use. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 125, p. 281-290, 2007b.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CATELLANE, D.C.; DIAS, J.E. **Plantas Medicinais**. Viçosa: Editora da UFV. 220p. 2000.

MELO, J.G.; AMORIM, E.L.C.; ALBUQUERQUE, U.P. Native medicinal plants commercialized in Brazil – priorities for conservation. **Environment Monitoring Assessment**, v. 156, p. 567-580, 2009.

MONTEIRO, J.M.; RAMOS, M.A.; ARAÚJO, E.L.; AMORIM, E.L.C.; ALBUQUERQUE, U.P. Dynamics of medicinal plants knowledge and commerce in an urban ecosystem (Pernambuco, Northeast Brazil). **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 178, p. 179-202, 2011.

OLIVEIRA, R.L.C.; LINS NETO, E.M.F.; ARAÚJO, E.L.; ALBUQUERQUE, U.P. Conservation priorities and population structure of woody medicinal plants in an area of caatinga vegetation (Pernambuco state, NE Brazil). **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 132, p. 189-206, 2007.

OLIVEIRA, F.C.S.; BARROS, R.F.M.; MOITA NETO, J.M. Plantas medicinais utilizadas em comunidades rurais de Oeiras, semiárido piauiense. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n.3, p.282-301, 2010.

PINTO, E.P.P.; AMOROZO, M.C.M.; FURLAN, A. Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de mata atlântica - Itacaré, BA, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.20, n.4, p.751-762. 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 Mediciniais**, v.12, n.1, p.31-42, 2010.

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

SANTOS, L. L.; RAMOS, M.A.; SILVA, S.I.; SALES, M.F.; ALBUQUERQUE, U.P. Caatinga Ethnobotany: Anthropogenic Landscape Modification and Useful Species in Brazil s Semi-Arid Northeast. **Economic Botany**, v. 63, p. 363-374, 2009.

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

SILVA, V.A.; NASCIMENTO, V.T.; MEDEIROS, M.T.F.; ALBUQUERQUE; U.P.; SOLDATI, G.T. **Técnicas para análise de dados etnobiológicos**. In: ALBUQUERQUE; U.P.; LUCENA, R.F.P.; CUNHA, L.V.F.C. (Org.). Métodos e técnicas na pesquisa etnobiológica e etnoecológica. 1ª ed. Recife: NUPEEA, p. 187-206, 2010.

SILVA, F.S.; RAMOS, M.A.; HANAZAKI, N.; ALBUQUERQUE, U.P. Dynamics of traditional knowledge of medicinal plants in a rural community in the Brazilian semi-arid region. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, p. 382-391, 2011.

SILVA, A.J.R.; ANDRADE, L.H.C. Etnobotânica nordestina: estudo comparativo da relação entre comunidades e vegetação na Zona do Litoral - Mata do Estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.19, n.1, p.45-60, 2005.

SILVA, T.S.; FREIRE, E.M.X. Abordagem etnobotânica sobre plantas medicinais citadas por populações do entorno de uma unidade de conservação da caatinga do Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n.4, p.427-435, 2010.

SIQUEIRA, C.; CABRAL, D.; PEIXOTO SOBRINHO, T.J.S.; AMORIM, E.L.C. de ; MELO, J. G.; ARAÚJO, T.A.S.; ALBUQUERQUE, U.P. Levels of tannins and flavonoids in medicinal plants: evaluating bioprospecting strategies. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 434782, 2012.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. 1ª Ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2005. 640p.

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

STEPP, J.R.; MOERMAN, D.E. The importance of weeds in ethnopharmacology. **Journal of ethnopharmacology**, v.75, p.19-23, 2001.

TROTTER, R.; LOGAN, M. **Informant consensus: new approach for identifying potentially effective medicinal plants**. In: Indigenous Medicine and Diet: Biobehavioural. Nova York: Approaches Redgravep, p.91-112, 1986.

TROVÃO, D.M.B.M.; SILVA S.C.; SILVA A.B.; JÚNIOR, R.L.V. Estudo comparativo entre três fisionomias de Caatinga no estado da Paraíba e análise do uso das espécies vegetais pelo homem nas áreas de estudo. **Revista de Biologia e Ciências da terra**, v. 4, n.2, 2004.

VOEKS, R.A. Disturbance pharmacopoeias: medicine and myth from the humid tropics. **Annals of the Association of American Geographers**, v.94, p.868-888, 2004.

5. Artigo 2

Conteúdo fenólico e capacidade antioxidante de quatro espécies de *Cnidoscolus* (Euphorbiaceae) usadas como etnomedicamentos na Caatinga, Brasil

5. ARTIGO 2**ARTIGO PUBLICADO NA:**

Revista: African Journal of Pharmacy and Pharmacology, v.5(20): 2310-2316 - (ISSN 1996-0816)

DOI: 10.5897/AJPP11.608

Autores: Tadeu J. S. Peixoto Sobrinho, Valérium T. N. A. Castro, Antonio M. Saraiva, Diego M. Almeida, Elvis A. Tavares, Elba L. C. Amorim

Título: Conteúdo fenólico e capacidade antioxidante de quatro espécies de *Cnidoscolus* (Euphorbiaceae) usadas como etnomedicamentos na Caatinga, Brasil

**Conteúdo fenólico e capacidade antioxidante de quatro espécies de *Cnidocolus*
(Euphorbiaceae) usadas como etnomedicamentos na Caatinga, Brasil**

Tadeu J. S. Peixoto Sobrinho^{1*}, Valérium T. N. A. Castro¹, Antonio M. Saraiva², Diego M. Almeida¹, Elvis A. Tavares¹, Elba L. C. Amorim¹

¹ Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil

² Laboratório de Análises Microbiológicas, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil

ABSTRACT: This study aimed to investigate the phenolic content and antioxidant capacity of four species of *Cnidocolus* used as ethnopharmacologicals in Caatinga, after comparing the results of the cited and not cited parties. The total phenolic content (CFT), total tannin content (CTT) and total flavonoid content (CDF) were analyzed by spectrophotometric method. The antioxidant activity (AOA) was measured using the qualitative antioxidant assay (EAQ), the free-radical scavenging assay (DPPH assay) and the ferrous-ion chelating (FIC) assay. The extract of leaves of *C. pubescens* had the highest levels of CFT, CDF and CTT. Extracts from the roots of *C. infestus* showed the highest antioxidant activity, while extracts from the roots of *C. pubescens* showed the highest level of chelating activity. The AOA correlated with CFT, CDF, and CTT, but these were not statistical. The parties cited by the population had, on average, the high levels of CFT, CTT, CDF and AOA, while the parties not cited showed had high levels of FIC. The results show that the antioxidant activity of plants of the genus *Cnidocolus*, specifically the Caatinga, appears to be associated with levels of phenolic compounds and these may explain its popular use.

Keywords: DPPH, FIC, Flavonoids, Folin-Ciocalteu, Polyphenols, Tannins.

1. Introdução

Muitas pesquisas etnofarmacológicas têm demonstrado que no Brasil há um elevado número de espécies vegetais usadas pela população para o tratamento de suas enfermidades e, dentre outras, a família Euphorbiaceae apresenta grande uso medicinal, sendo bastante

* Autor correspondente: Av Prof. Arthur de Sá - s/n, Recife/PE, Brasil. CEP 50740-521. Tel.: +55 81 21268511, Fax.: +55 81 21268510. E-mail: tadeu1903@yahoo.com.br.

citadas as espécies do gênero *Cnidocolus*. Conhecidas popularmente por urtiga ou favela, este gênero possui de 50-75 representantes predominantemente concentrados na América Tropical, quase exclusivamente no México e Nordeste do Brasil (Webster, 1994). Sua principal característica é a presença de tricomas urticantes que quando estimulados pelo contato com a pele podem provocar fortes dores localizadas (Melo e Sales, 2008).

Na Caatinga nordestina, o gênero *Cnidocolus* é representado por quatro espécies medicinais (*C. infestus* Pax & K. Hoffm., *C. pubescens* Pohl., *C. quercifolius* Pohl. e *C. urens* [L.] Arthur) as quais, possuem diversas indicações populares como a atividade antiinflamatória e antitumoral do sistema genito-urinário, contra infecções renais, como anti-séptico dermatológico e oftálmico, em contusões, fraturas, ferimento, verrugas, disenteria, hemorragia, menstruação, apendicite e reumatismo (Almeida *et al.*, 2005; Albuquerque, 2006; Albuquerque *et al.*, 2007; Agra *et al.*, 2008).

Estudos atuais apontam que muitos destes usos populares podem estar correlacionados com a atividade antioxidante (Soares, 2002; Hevesi *et al.*, 2009; Dreifuss *et al.*, 2010; Krishnaiah *et al.*, 2010). Os antioxidantes são compostos que retardam a oxidação de substâncias vitais do organismo por espécies reativas de oxigênio (Velioglu *et al.*, 1998) ou inibem o processo de peroxidação de moléculas biológicas ao quelar metais de transição que geram radicais hidroxilas através das reações de Haber-Weiss e Fenton (Chew *et al.*, 2009). Os compostos fenólicos, representados principalmente por taninos e flavonóides, se destacam como os principais grupos de antioxidantes naturais, pois atuam como eficientes captadores de radicais livres e interrompem as reações em cadeia, e isto se deve ao seu potencial de agir como doadores de hidrogênio (Gazzani *et al.*, 2008; Higdon e Frei, *et al.*, 2003; Delazar *et al.*, 2006).

Um estudo realizado por Mosquera *et al.* (2007) com o objetivo de avaliar a atividade antioxidante de quatro famílias de plantas da biodiversidade colombiana (Asteraceae, Euphorbiaceae, Rubiaceae e Solanaceae) mostrou que dos 75 extratos vegetais avaliados, nove (12%) tiveram valores de CI_{50} inferiores a 200.0 $\mu\text{g/mL}$ e oito destas espécies pertenciam a família Euphorbiaceae (88.8%). O ensaio fitoquímico revelou a presença de compostos fenólicos e terpenóides, sendo atribuída a estes fitoquímicos a atividade antioxidante dos extratos (Mosquera *et al.*, 2007).

Considerando os usos populares apresentado pelo gênero *Cnidocolus*, a escassez de trabalhos que avaliem seu potencial terapêutico e a busca de novas drogas, principalmente a partir de plantas medicinais, nesse estudo foram investigados o conteúdo fenólico e a

capacidade antioxidante de quatro espécies de *Cnidocolus* referenciadas em levantamentos etnofarmacológicos desenvolvidos na Caatinga.

2. Materiais e métodos

2.1. Amostras

As amostras foram coletadas com base nas indicações das partes citadas em levantamentos etnofarmacológicos e partes que não foram citadas. As coletas foram realizadas em remanescentes de Caatinga de Pernambuco e Paraíba. No município de Altinho/PE (08°35'13.5"S x 36°05'34.6"W) foram coletadas amostras de *C. urens* em 09 de julho de 2008. Amostras de *C. infestus* e *C. quercifolius* foram coletadas no município de Soledade/PB (07°04'13"S x 36°20'52"W) em 19 de setembro de 2008. No dia 27 de setembro de 2008. Em Buíque/PE (08°37'23"S x 37°09'21"W), foram coletadas amostras de *C. pubescens*. Os materiais-testemunho foram coletados e encontram-se incorporados no Herbário UFP Geraldo Mariz do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pernambuco, sob os nº. 55.098-55.101.

2.2. Reagentes, padrões de referência e equipamentos

Foram utilizados os seguintes solventes: ácido acético glacial (Merck, 99.8%), metanol (Vetec, 99.8%) e piridina (Vetec, 99%). Os reagentes utilizados foram: 2,2-difenil-1-picrilhidrazila DPPH (Aldrich, 95%), 3-(2-piridil)5,6-difenil-1,2,4-triazina-4'.4"-disulfônico Ferrozina (Fluka, 99%), carbonato de sódio anidro (Vetec, 99.5%), caseína (Vetec), cloreto de alumínio hexa-hidratado (Honeywell, 99%), Reagente Folin-Ciocalteu fenólico (Fluka, 2.0 N) e sulfato ferroso hepta-hidratado (Vetec, 99%). Como padrões foram utilizados: ácido ascórbico (Vetec, 99%), ácido etilenodiaminotetracético di-hidratado EDTA (Vetec, 99%), ácido tânico (Vetec, 99%) e rutina (Acros Organics, 97%).

As pesagens foram realizadas em balança analítica Shimadzu (AX200) e as leituras das absorvâncias em espectrofotômetro Shimadzu UV-Vis (UV mini-1240).

2.3. Preparação dos extratos brutos metanólicos

As amostras vegetais foram estabilizadas em estufa (Nova Técnica NT-503) durante dois dias a $45\pm 5^\circ\text{C}$, pulverizadas em moinho vertical de facas tipo Willye (Adamo 340) e padronizadas em tamises (Bertel), obtendo-se granulometria de 1 mm (16 Mesh).

Para quantificar o conteúdo fenólico, as amostras pulverizadas (500 mg) foram extraídas sob refluxo com 50 mL de metanol (80%, v/v) em placa de aquecimento (Tecnal TE-018) durante 30 minutos, obtendo concentração final de 10.0 mg/mL. Para avaliar a atividade antioxidante e antimicrobiana, as amostras pulverizadas foram maceradas com metanol (80%, v/v) durante 48 horas e os extratos brutos metanólicos foram obtidos a partir da concentração dos filtrados em evaporador rotativo (Marconi MA-120) sob pressão reduzida, obtendo rendimentos entre 4.01% e 22.48%. A escolha do metanol tem sido recomendada para a extração de compostos fenólicos em tecidos vegetais devido à sua capacidade de inibir a oxidação de polifenóis, que podem alterar a atividade antioxidante (Yao *et al.*, 2004).

2.4. Determinação do conteúdo fenólico total (CFT) e de taninos totais (CTT)

O CFT dos extratos foi analisado pelo método Folin-Ciocalteu e o conteúdo fenólico residual pelo método de precipitação por caseína seguida pelo método Folin-Ciocalteu, onde o conteúdo de taninos totais (CTT) corresponde à diferença entre os níveis de fenóis totais e residuais (Amorim *et al.*, 2008). O CFT foi calculado a partir de 1 mL dos extratos diluídos (10.0 mg/mL, p/v), 5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (10%, v/v), 10 mL de carbonato de sódio (7.5%, p/v) e 84 mL de água destilada. A solução foi deixada em repouso ao abrigo da luz por 30 minutos. A absorbância foi medida a 760 nm, utilizando água destilada para zerar o equipamento. Para calcular o conteúdo fenólico residual, 15 mL do extrato diluído (10.0 mg/mL, p/v) foi agitado durante três horas com 1 g de caseína, filtrado e o volume foi aferido para 25 mL com água destilada. O conteúdo fenólico residual foi determinado a partir de 5 mL deste filtrado pelo método Folin-Ciocalteu. O CFT e CTT foram expressos em mg equivalente de ácido tânico por g de amostra (mg TAE/g). As amostras foram avaliadas com seis réplicas. A equação de calibração do ácido tânico foi $y = 0.074x + 0.0044$ ($R^2 = 0.9993$).

2.5. Determinação do conteúdo de flavonóides totais (CDF)

O CDF dos extratos foi calculado pelo método colorimétrico baseado na formação do complexo flavonóide-alumínio (Peixoto Sobrinho *et al.*, 2008). O CDF foi calculado a partir de 1 mL do extrato diluído (10.0 mg/mL, p/v), 0.6 mL de ácido acético glacial, 10 mL de piridina (20.0%, v/v), 2.5 mL de cloreto de alumínio (5.0%, p/v) e 10.9 mL de água destilada. A solução foi deixada em repouso ao abrigo da luz por 30 minutos. A absorbância da solução foi medida a 420 nm, utilizando água destilada para zerar o equipamento. Os resultados foram expressos em mg equivalente de rutina por g de amostra (mg RE/g). As amostras foram avaliadas com seis réplicas. A equação de calibração da rutina foi $y = 0.0251x + 0.0139$ ($R^2 = 0.9994$).

2.6. Avaliação da atividade antioxidante

2.6.1. Ensaio antioxidante qualitativo (EAQ)

O EAQ foi avaliado através da metodologia descrita por Espín *et al.* (2000). Sobre placas cromatográficas de sílica gel foram aplicados 20 µL dos extratos (20.0 mg/mL) e dos controles-positivos rutina e ácido ascórbico (10.0 mg/mL). A fase móvel utilizada foi acetato de etila - ácido fórmico - ácido acético glacial - água (100:11:11:26). Após completa secagem do eluente, a placa foi borrifada com DPPH (40.0 µg/mL, p/v). A atividade antioxidante qualitativa foi evidenciada a partir da formação de manchas amareladas em contraste com o fundo violeta. Os resultados foram expressos com valores de 0 a 3, sendo 0 a amostra inativa e 3 para amostra que apresentou maior atividade.

2.6.2. Ensaio de remoção de radicais livres (ensaio do DPPH)

O ensaio do DPPH foi realizado em triplicata, baseado no método descrito por Sousa *et al.* (2007). Diferentes concentrações do extrato ou padrão (10.0-250.0 µg/mL), no montante de 0.5 mL, foram adicionados a 3 mL de DPPH (40.0 µg/mL p,v) em tubos de ensaio. A solução foi deixada em repouso por 30 minutos ao abrigo da luz e as absorbâncias foram medidas a 517 nm. As análises foram realizadas utilizando metanol para zerar o espectrofotômetro. As medições foram comparadas com um controle-negativo constituído pela solução de DPPH

(40.0 µg/mL p,v) e como branco foram utilizados 0.5 mL das diluições do extrato com 3 mL de metanol. A atividade antioxidante foi calculada a partir de regressão obtida através das concentrações das amostras versus porcentagens de atividade antioxidante (**Equação 1**) e expressa como CI_{50} , isto é, concentração inibitória de amostra vegetal necessária para reduzir a absorbância de controle-negativo em 50%.

$$\text{Equação 1: \%AA} = 1 - (\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}} / \text{Abs}_{\text{controle negativo}}) \times 100$$

Os resultados também foram expressos como capacidade antioxidante em equivalente de ascorbato (CAEA) conforme calculado pela **Equação 2**. A CI_{50} do ácido ascórbico foi 26.04 ± 1.16 µg/mL.

$$\text{Equação 2: CAEA (mg AA / 100 g)} = (CI_{50} \text{ ácido ascórbico} / CI_{50} \text{ amostra}) \times 100$$

2.6.3. Ensaio quelante do íon ferroso (FIC)

O ensaio FIC foi realizado em triplicata conforme descrito por Chew *et al.* (2009). Diferentes diluições do extrato (1.0-7.0 mg/mL) ou EDTA (10.0-100.0 µg/mL), no montante de 1 mL, reagiram com 1 mL de sulfato ferroso (0.1 mM, p/v) e 1 ml de Ferrozina (0.25 mM, p/v). A solução foi deixada em repouso por 10 minutos ao abrigo da luz e as absorbâncias foram medidas a 562 nm. As análises foram realizadas utilizando metanol para zerar o espectrofotômetro. As medições foram comparadas com um controle-negativo constituído por 1 mL de metanol (75%, v/v), 1 mL da solução de $FeSO_4$ (0.1 mM, p/v) e 1 ml da solução de Ferrozina. Como branco foram utilizadas as diluições dos extratos com 2 mL de metanol (75%, v/v). A capacidade da amostra em quelar os íons ferrosos foi calculada a partir de regressão obtida através das concentrações da amostra versus porcentagens de atividade quelante (**Equação 3**) e expressa como CI_{50} , isto é, a concentração da amostra necessária para reduzir a absorbância do controle negativo em 50%.

$$\text{Equação 3: \%AQ} = 1 - (\text{ABS}_{\text{amostra}} - \text{ABS}_{\text{branco}} / \text{ABS}_{\text{controle negativo}}) \times 100$$

2.7. Análise estatística

O teste Kolmogorov-Smirnov confirmou a normalidade dos dados. Os dados foram expressos como médias \pm desvio-padrão. Foram realizadas análises de variância ANOVA: *one way* seguido de comparações múltiplas pelo teste de Tukey. Foi utilizado o teste de correlação de Pearson para comparar o conteúdo fenólico e as concentrações inibitórias das amostras. As diferenças foram consideradas significativas ao nível de $p < 0.05$. O programa BioEstat 5.0 foi utilizado para realização das análises estatísticas e GraphPad Prism 5.0 para construção dos gráficos.

3. Resultados e discussão

3.1. Conteúdo fenólico total, taninos totais e flavonóides totais

De forma geral, foi observada uma ampla variação entre os níveis de CFT dos extratos analisados, sendo os mais elevados encontrados nas folhas de *C. pubescens*, enquanto que as partes aéreas de *C. infestus* e cascas de *C. quercifolius* apresentaram os menores teores. Os extratos foliares de *C. pubescens* apresentaram o maior CTT (cerca de 40% dos fenóis totais), enquanto que as cascas de *C. quercifolius* e partes aéreas de *C. infestus* não apresentaram taninos. As raízes de *C. pubescens* não apresentaram flavonóides, no entanto, suas folhas exibiram o maior conteúdo de flavonóides. O teste de correlação de Pearson apontou relação significativa entre CFT \times CTT e CFT \times CDF ($r = 0.9200$ e $r = 0.7903$, respectivamente), entretanto, CTT e CDF não se correlacionaram estatisticamente.

Tabela 1. Conteúdo fenólico total (CFT), taninos totais (CTT) e de flavonóides totais (CDF) das amostras de quatro espécies do gênero *Cnidocolus* do Nordeste do Brasil.

Espécie / Procedência Voucher number	Parte usada	Uso popular	CFT (mg TAE/g)	CTT (mg TAE/g)	CDF (mg RE/g)
<i>C. infestus</i> Soledade/PB 55.101	Partes aéreas	Não citada	4.02 \pm 0.15 a	ND	3.36 \pm 0.15 a
	Raízes	Citada	16.31 \pm 0.19 b	5.99 \pm 0.14 a	1.75 \pm 0.15 b
<i>C. pubescens</i>	Folhas	Citada	23.00 \pm 0.10 c	8.72 \pm 0.16 b	39.37 \pm 0.57 c

Buíque/PE 55.100	Raízes	Não citada	8.96 ± 0.12 d	3.70 ± 0.20 c	ND
<i>C. quercifolius</i> Soledade/PB 55.099	Cascas	Citada	3.58 ± 0.16 a	ND	0.60 ± 0.05 b
	Folhas	Não citada	18.32 ± 0.60 e	4.10 ± 0.24 c	26.51 ± 1.78 d
<i>C. urens</i> Altinho/PE 55.098	Partes aéreas	Não citada	12.10 ± 0.48 f	5.42 ± 0.79 a	0.89 ± 0.06 b
	Raízes	Citada	7.21 ± 0.28 g	2.10 ± 0.31 d	4.86 ± 0.28 e

Valores expressos como média ± desvio-padrão. Valores seguidos pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si (n=6; p<0.05). EAT = equivalente de ácido tânico; ER = equivalente de rutina; ND = não detectado.

Os resultados do conteúdo fenólico das amostras de *Cnidocolus* estão muito acima dos encontrados por Kuti e Konuru (2004) para as espécies *Cnidocolus aconitifolius* (Mill.) I.M. Johnst. e *C. chayamansa* McVaugh que apresentaram CFT de 2.91 ± 0.02 e 1.22 ± 0.02 mg/g, respectivamente. Outro estudo com amostras foliares de *C. aconitifolius* avaliadas frescas e tratadas pós-colheita apontou CFT variando entre 7.0 ± 1.0 a 12.0 ± 2.0 mg/g (Oboh, 2005). Já Ogundale *et al.* (2009) ao analisar alguns vegetais consumidos na Nigéria, confirmou que *C. aconitifolius* possui níveis de CFT de 29.4 mg/g.

Estes resultados indicam que o uso popular destas espécies pode estar associado ao conteúdo fenólico das partes citadas nos levantamentos etnofarmacológicos. Por exemplo, os resultados dos CME foliares de *C. pubescens* comparadas às partes não indicadas em estudos etnofarmacológicos, sugere que esta preferência deve estar associado ao seu elevado conteúdo fenólico (Almeida *et al.*, 2005; Albuquerque *et al.*, 2007). Em contraposição a estes resultados, as partes usadas popularmente de *C. quercifolius* (Albuquerque *et al.*, 2007; Agra *et al.*, 2008) apresentou cinco vezes menos CFT e cerca de cinquenta vezes menos CDF que a folha, indicando que o uso popular desta espécie deve estar associado a outros compostos contidos na casca (Endo *et al.*, 1991a; Endo *et al.*, 1991b; Endo *et al.*, 1992; Ohta *et al.*, 1994).

3.2. Atividade antioxidante

Os resultados do EAQ dos extratos mostraram várias regiões amareladas em contraste com fundo púrpura, o que sugere a presença de compostos com atividade anti-radicalar. As amostras de raízes de *C. infestus* e folhas de *C. quercifolius* apresentaram os resultados mais

significativos, enquanto que as amostras de partes aéreas de *C. infestus* e cascas de *C. quercifolius* não tiveram bom desempenho (**Tabela 2**).

Tabela 2. Atividade removedora de radicais livres e quelante das amostras de diferentes partes de quatro espécies de *Cnidocolus* presentes em levantamentos etnofarmacológicos da Caatinga.

Padrão / Espécie	Parte usada	Rend (%)	Atividade antioxidante			
			Remoção de radical livre DPPH			FIC (CI ₅₀ µg/mL)
			EAQ	CI ₅₀ µg/mL	CAEA mg (AA/100g)	
Rutina	-	-	-	22.96 ± 1.99 a	114.16 ± 9.84 a	-
EDTA	-	-	-	-	-	15.26 ± 0.58 a
<i>C. infestus</i>	Partes aéreas	7.73%	0	1741.68 ± 53.06 b	1.50 ± 0.05 d	239.42 ± 39.25 b
	Raiz	9.08%	3	122.87 ± 5.37 c	21.23 ± 0.94 c	398.04 ± 19.24 c
<i>C. pubescens</i>	Folha	14.23%	3	179.15 ± 4.03 d	14.54 ± 0.33 d	256.25 ± 13.28 b
	Raiz	4.55%	2	152.92 ± 3.49 e	17.04 ± 0.40 e	90.29 ± 7.12 d
<i>C. quercifolius</i>	Casca	9.30%	0	1867.24 ± 53.66 f	1.40 ± 0.04 b	299.37 ± 14.60 e
	Folha	22.48%	2	426.66 ± 42.66 g	6.15 ± 0.59 f	361.73 ± 14.58 c
<i>C. urens</i>	Partes aéreas	10.19%	1	1361.41 ± 76.06 h	1.92 ± 0.11 b	177.69 ± 11.84 f
	Raiz	4.01%	1	423.07 ± 34.43 g	6.19 ± 0.50 f	278.68 ± 35.88 be

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si (n=6; p<0.05); 0 = inativo; 1 = pouco ativo; 2 = atividade moderada; 3 = muito ativo.

Foram observadas diferenças intra e interespecíficas na atividade seqüestradora de radicais das espécies avaliadas (**Tabela 2**). De acordo com Melo et al. (2010), os resultados da atividade antioxidante podem ser classificados com base no desempenho do extrato bruto em relação ao padrão utilizado: I - boa atividade (CE₅₀ < 69 µg/mL, até três vezes a concentração inibitória do padrão); II - moderada atividade (69 µg < CE₅₀ < 161 µg/mL, entre três e sete vezes a concentração inibitória do padrão); III - baixa atividade (CE₅₀ > 161 µg/mL, superior sete vezes a concentração inibitória do padrão). Utilizando esta classificação, os extratos brutos metanólicos das raízes de *C. infestus* e *C. pubescens* apresentaram moderada atividade removedora de radicais livres, enquanto que os demais demonstraram baixa atividade anti-radicalar.

Os resultados do ensaio antioxidante qualitativo (EAQ) e o ensaio de remoção de radicais livres (DPPH assay) demonstraram elevada correlação (r= -0.8927), sugerindo que a

análise qualitativa pode ser utilizada para avaliar preliminarmente a atividade removedora de radicais livres de amostras vegetais, servindo como preditora para a descoberta de novos compostos antioxidantes. O teste de correlação de Pearson apontou relação negativa entre as concentrações inibitórias (CI_{50}) de DPPH \times CFT ($r = -0.6776$), CTT ($r = -0.6779$) e CDF ($r = -0.4112$). Estes resultados sugerem que quanto maior o conteúdo fenólico das amostras de *Cnidocolus*, maior a atividade antioxidante.

A **Figura 1** mostra que a capacidade quelante dos extratos aumentou proporcionalmente com a concentração, entretanto, foi observada uma estabilização na capacidade quelante quando a concentração do extrato atingiu 400.0 $\mu\text{g/mL}$. O resultado mais promissor foi encontrado para o CME das raízes de *C. pubescens* (**Tabela 2**), enquanto que o CME das raízes de *C. infestus* e folhas de *C. quercifolius* demonstraram baixa atividade quelante. O teste de correlação de Pearson não apontou relação entre FIC e o conteúdo fenólico e a atividade removedora de radicais livres.

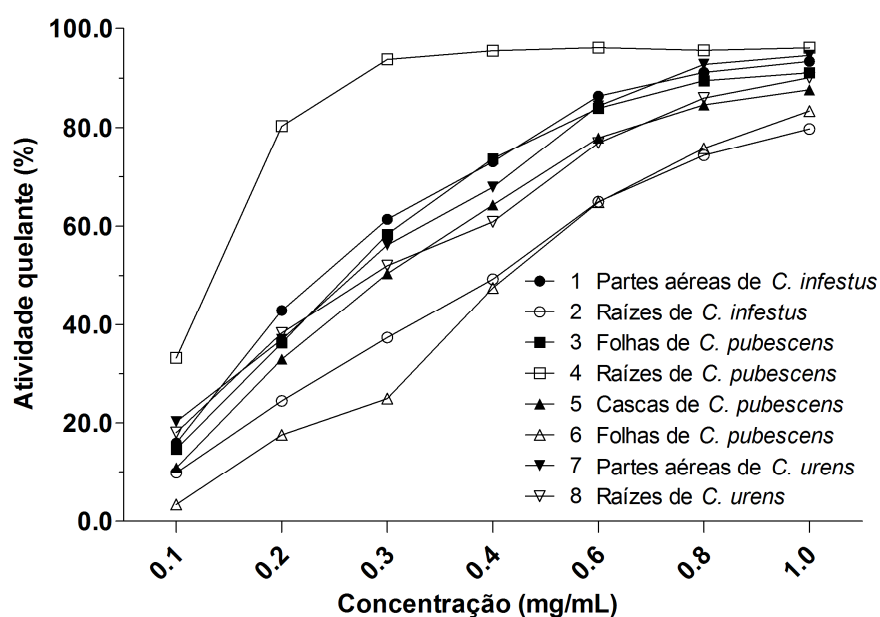


Figura 1. Capacidade quelante do íon ferroso (FIC) de diferentes partes de quatro espécies de *Cnidocolus* do Nordeste do Brasil.

Nos últimos anos, pesquisas com plantas da Caatinga usadas tradicionalmente para o tratamento de diversas enfermidades, tem demonstrado promissoras atividades farmacológicas, geralmente atribuídas a substâncias fenólicas, ficando mais nítido em espécies que possuem diversos usos medicinais e apresentam elevados níveis destes compostos,

confirmando experimentalmente a indicação popular (Almeida *et al.*, 2005; Monteiro *et al.*, 2006).

Por exemplo, um estudo realizado por Araújo *et al.* (2008) numa comunidade rural, foi observado que existe uma forte associação entre o conteúdo de taninos e o efeito sugerido popularmente para as atividades cicatrizante e antiinflamatória. No entanto, quando foram analisados comparativamente os níveis de flavonóides das plantas usadas pela população e de plantas selecionadas aleatoriamente, não foram observadas diferenças significativas, sugerindo que a indicação de plantas medicinais com finalidade cicatrizante e antiinflamatória na comunidade estudada parece não estar relacionada com flavonóides.

Muitas pesquisas tem demonstrado uma relação significativa entre o conteúdo de compostos fenólicos e a atividade antioxidante. Nazaruk (2008) observou uma elevada relação entre os extratos metanólicos ($R^2 = 0.9523$) e as frações acetato de etila ($R^2 = 0.8048$) de folhas e flores de cinco espécies de *Cirsium* (Asteraceae) provenientes da região nordeste da Polônia. Também foi verificada uma elevada relação entre a capacidade antioxidante total com CFT ($R^2 = 0.922$) e CDF ($R^2 = 0.812$) das frações acetato de etila extraídas de seis espécies de *Ficus* (Moraceae), além das frações butanólicas que demonstraram boa relação com CFT ($R^2 = 0.604$) e CDF ($R^2 = 0.678$), sugerindo que estes grupos são os responsáveis pela capacidade antioxidante das espécies (Saleh e Hameed, 2009).

Alguns autores relacionam os flavonóides à atividade antioxidante devido à presença de hidroxilas aromáticas (Vessal *et al.*, 2003), como os flavonóis rutina e quercetina, que tem apresentado melhores atividades antioxidantes quando comparados ao ácido ascórbico, que é considerado um potente redutor (Soares *et al.*, 2005). Entretanto, estudo realizado por Malenčić *et al.* (2008) com extratos acetônicos de vinte híbridos de *Glycine max* (L.) Mer. (Fabaceae) não mostrou correlação entre a atividade antioxidante e CDF, sendo, no entanto, constatado para polifenóis ($r = 0.6696$), taninos ($r = 0.7465$) e proantocianidinas ($r = 0.6538$).

Al-Duais *et al.* (2009) ao analisarem comparativamente CFT com diversas metodologias antioxidantes (DPPH, ORAC, TEAC e FRAP), mostraram que os compostos fenólicos de *Cyphostemma digitatum* (Forssk.) Desc. (Vitaceae) são pouco responsáveis pela capacidade antioxidante da espécie. Outros autores verificaram também que compostos fenólicos podem apresentar relação com a atividade quelante, como Rumbaoa *et al.* (2009) que ao avaliarem cinco variedades de *Ipomoea batatas* (L.) Lam. (Convolvulaceae) observaram correlação entre CFT e (FIC) ($r = -0.800$).

5. Conclusões

Nossos resultados mostram que as espécies e/ou partes indicadas nos levantamentos etnofarmacológicos, especificamente da Caatinga, podem servir de guia para a procura de compostos com potencial antioxidante e os níveis de compostos polifenólicos parece explicar, em parte, o uso popular destas plantas, cujas partes indicadas apresentaram resultados mais satisfatórios.

Agradecimentos

Os autores agradecem a FACEPE pela bolsa concedida a T.J.S. Peixoto Sobrinho, ao PIBIC/UFPE/CNPq pelas bolsas concedidas a D.M. de Almeida e E.A. Tavares e ao CNPq pelo suporte financeiro concedido através do “Edital Universal” a E.L.C. Amorim.

Referências

- Agra MF, Silva KN, Basílio IJLD, Freitas PF, Barbosa-Filho JM (2008). Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Braz. J. Pharmacogn.* 18(3), 472-508.
- Albuquerque UP (2006). Re-examining hypotheses concerning the use and knowledge of medicinal plants: a study in the Caatinga vegetation of NE Brazil. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 2(30): 1-10.
- Albuquerque UP, Medeiros PM, Almeida ALS, Monteiro JM, Lins Neto EMF, Melo JG, Santos JP (2007). Medicinal plants of the Caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. *J. Ethnopharmacol.* 114: 325-354.
- Almeida CFCBR, Silva TCL, Amorim ELC, Maia MBS, Albuquerque UP (2005). Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the Caatinga (Northeast Brazil). *J. Arid Environ.* 62(1): 127-142.
- Amorim ELC, Nascimento JE, Monteiro JM, Peixoto Sobrinho TJS, Araújo TAS, Albuquerque UP (2008). A simple and accurate procedure for the determination of tannin and flavonoid levels and some applications in ethnobotany and ethnopharmacology. *Functional Ecosystems and Communities.* 2(1), 88-94.

- Araújo TAS, Alencar NL, Amorim ELC, Albuquerque UP (2008). A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. *J. Ethnopharmacol.* 120, 72-80.
- Chew YL, Goh JK, Lim YY (2009). Assessment of in vitro antioxidant capacity and polyphenolic composition of selected medicinal herbs from Leguminosae family in Peninsular Malaysia. *Food Chem.* 116, 13-18.
- Delazar A, Talischi B, Nazemiyeh H, Rezazadeh H, Nahar L, Sarker SD (2006). Chrozophorin: a new acylated flavone glucoside from *Chrozophora tinctoria* (Euphorbiaceae). *Braz. J. Pharmacognosy.* 16(3), 286-290.
- Dreifuss AA, Bastos-Pereira AL, Ávila TV, Soley BS, Rivero AJ, Aguilar JL, Acco A (2010). Antitumoral and antioxidant effects of a hydroalcoholic extract of cat's claw (*Uncaria tomentosa* Willd. Ex Roem. & Schult) in an in vivo carcinosarcoma model. *J. Ethnopharmacol.* 130, 127-133.
- Espin JC, Soler-Rivas C, Wichers HJ (2000). Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *J. Agr. Food Chem.* 48(3), 648-656.
- Hevesi BT, Houghton PJ, Habtemariam S, Kéry Á (2009). Antioxidant and antiinflammatory effect of *Epilobium parviflorum* Schreb. *Phytother. Res.* 23, 719-724.
- Higdon JV, Frei B (2003). Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism and antioxidant functions. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.* 43(1), 89-143.
- Kuti JO, Konuru HB (2004). Antioxidant capacity and phenolic content in leaf extracts of tree spinach (*Cnidocolus* spp.). *J. Agr. Food Chem.* 52, 117-121.
- Malenčić D, Maksimović Z, Popović M, Miladinović J (2008). Polyphenol contents and antioxidant activity of soybean seed extracts. *Bioresource Technol.* 99, 6688-6691.
- Melo AL, Sales MF (2008). O gênero *Cnidocolus* Pohl (Crotonoideae-Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. *Acta Bot. Bras.* 22, 806-827.
- Melo JG, Araújo TAS, Castro VTNA, Cabral DLV, Rodrigues MD, Nascimento SC, Amorim ELC, Albuquerque UP (2010). Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid northeastern Brazil. *Molecules.* 15, 8534-8542.
- Monteiro JM, Albuquerque UP, Lins-Neto EMF, Araújo EL, Amorim ELC (2006). Use patterns and knowledge of medicinal species among two rural communities in Brazil's semi-arid northeastern region. *J. Ethnopharmacol.* 105, 173-186.

- Mosquera OM, Correa YM, Buitrago DC, Niño J (2007). Antioxidant activity of twenty five plants from Colombian biodiversity. *Mem. I. Oswaldo Cruz.* 102(5), 631-634.
- Nazaruk J (2008). Antioxidant activity and total phenolic content in *Cirsium* five species from northeast region of Poland. *Fitoterapia.* 79, 194-196.
- Oboh G (2005). Effect of some post-harvest treatments on the nutritional properties of *Cnidocolus acotifolus* leaf. *Pak. J. Nutr.* 4(4), 226-230.
- Ogunlade I, Tucker G, Fisk I, Ogunlade A (2009). Evaluation of antioxidant activity and vitamin E profile of some selected indigenous vegetables in Nigerian diet. *J. Food Agric. Environ.* 7(2), 143-145.
- Peixoto Sobrinho TJS, Silva CHTP, Nascimento JE, Monteiro JM, Albuquerque UP, Amorim ELC (2008). Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonóides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. *Braz. J. Pharm. Sci.* 44(4), 683-689.
- Rumbaoa RGO, Cornago DF, Geronimo IM (2009). Phenolic content and antioxidant capacity of Philippine sweet potato (*Ipomoea batatas*) varieties. *Food Chem.* 113, 1133-1138.
- Saleh ES, Hameed A (2009). Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian *Ficus* species leaf samples. *Food Chem.* 114, 1271-1277.
- Soares DG, Erezza AC, Salvador M (2005). Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. *Braz. J. Pharm. Sci.* 41, 1, 95-100.
- Sousa CMM, Silva HR, Vieira Júnior GM, Ayres MCC, Costa CLS, Araújo DS, Cavalcante LCD, Barros EDS, Araújo PBM, Breão MS, Chaves MH (2007). Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quim. Nova.* 30(2), 351-355.
- Velioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah BD (1998). Antioxidant activities and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain product. *J. Agr. Food Chem.* 46, 4113-4117.
- Webster GL (1994). Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae. *Ann Mo Bot Gard.* 81, 33-144.
- Yao L, Jlang Y, Datta N, Singanusong R, Liu X, Duan J (2004). HPLC analyses of flavonols and phenolic acids in the fresh young shoots of tea (*Camelia sinensis*) grown in Australia. *Food Chem.* 84, 253-263.

6. Artigo 3

Perfil fitoquímico e atividade antibacteriana de quatro espécies de *Cnidoscolus* (Euphorbiaceae) frente a cepas padrões e isolados clínicos

6. ARTIGO 3

ARTIGO SUBMETIDO A:

Revista: Journal of Medicinal Plants Research (ISSN 1996-0875)

Autores: Tadeu José da Silva Peixoto Sobrinho, Valérium Thijan Nobre de Almeida e Castro, Antonio Marcos Saraiva, Diego Menelau Almeida, Elvis Alves Tavares, Maria Nelly Caetano Pisciotano e Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim

Título: Perfil fitoquímico e atividade antibacteriana de quatro espécies de *Cnidoscolus* (Euphorbiaceae) frente a cepas padrões e isolados clínicos

**Perfil fitoquímico e atividade antibacteriana de quatro espécies de *Cnidocolus*
(Euphorbiaceae) frente a cepas padrões e isolados clínicos**

Tadeu José da Silva Peixoto Sobrinho¹, Valérium Thijan Nobre de Almeida e Castro¹, Antônio Marcos Saraiva², Diego Menelau Almeida¹, Elvis Alves Tavares¹, Maria Nelly Caetano Pisciotano², Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim^{1,*}

¹ Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

² Laboratório de Análises Microbiológicas, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

* Autor correspondente: E-mail: elba@ufpe.br (E. Amorim).

RESUMO: O presente trabalho teve como objetivos investigar o perfil fitoquímico e a atividade antibacteriana de quatro espécies de *Cnidocolus* (*C. infestus* Pax & K. Hoffm., *C. pubescens* Pohl, *C. quercifolius* Pohl e *C. urens* (L.) Arthur) presentes em levantamentos da Caatinga. Os extratos das espécies foram avaliados por cromatografia em camada delgada usando eluentes e reveladores específicos. Os extratos de *Cnidocolus* citados e não citados popularmente foram testados frente a cepas padrões e isolados clínicos. A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de difusão em ágar e pela concentração inibitória mínima (CIM). As classes químicas presentes em todas as amostras foram cumarinas e terpenóides, enquanto alcalóides e naftoquinonas não foram observados. A caracterização de uma mesma cumarina (Rf 0,35) em todas as amostras sugere um padrão que poderá ser usado com marcador químico. Os resultados obtidos mostraram que os extratos de *Cnidocolus* foram ativos contra as cepas padrões e isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* e *S. coagulase* negativa, sendo os resultados mais promissores encontrados para o extrato da casca de *C. quercifolius*, com CIM entre 250 e 500 µg/mL. A fração diclorometano deste extrato apresentou CIM 62,5 µg/mL frente a *S. aureus* MRSA sensível apenas a vancomicina. A atividade antimicrobiana desempenhada pelo extrato bruto e frações das cascas de *C. quercifolius* indica que os mecanismos de resistência das cepas de *Staphylococcus* não estão oferecendo proteção contra as substâncias ativas da espécie, o que motiva a realização do isolamento dos compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana.

Palavras-chaves: Antimicrobiana; Caatinga; Fitoquímica; Multirresistência; *Staphylococcus*.

1. Introdução

Doenças bacterianas causam profundo impacto econômico sobre a saúde pública, especialmente em regiões tropicais e em pacientes imunodeprimidos ou imunodeficientes (Saraiva, 2007). Apesar da existência de potentes antibióticos, o surgimento de cepas bacterianas multirresistentes acarretam infecções com alto índice de mortalidade, principalmente, em hospitais (Nascimento et al., 2000; Stapleton et al., 2004), o que impõe a necessidade permanente pesquisa voltadas à compreensão dos mecanismos genéticos de resistência e obtenção de novas drogas que hajam por mecanismos diferentes dos atuais antibióticos (Silver e Bostian, 1993; Alves et al., 2000).

No mundo inteiro, estudos etnofarmacológicos norteiam a pesquisa de novos antimicrobianos a partir de plantas medicinais utilizadas por comunidades tradicionais (Sartoratto et al., 2004). Estes estudos têm demonstrado que no Brasil há um elevado número de espécies vegetais usadas pela população para o tratamento de suas enfermidades e, dentre outras, a família Euphorbiaceae apresenta grande uso medicinal, sendo bastante citadas as espécies do gênero *Cnidoscolus*.

Conhecido popularmente por urtiga ou favela, este gênero possui de 50-75 representantes predominantemente concentrados na América Tropical, quase exclusivamente no México e Nordeste do Brasil (Webster, 1994). Sua principal característica é a presença de tricomas urticantes que quando estimulados pelo contato com a pele podem provocar fortes dores localizadas (Melo e Sales, 2008).

Na Caatinga nordestina, o gênero *Cnidoscolus* é representado por quatro espécies medicinais (*C. infestus* Pax & K. Hoffm., *C. pubescens* Pohl., *C. quercifolius* Pohl. e *C. urens* [L.] Arthur) as quais, possuem diversas indicações populares como a atividade antiinflamatória e antitumoral do sistema genito-urinário, contra infecções renais, como anti-séptico dermatológico e oftálmico, em contusões, fraturas, ferimento, verrugas, disenteria, hemorragia, menstruação, apendicite e reumatismo (Almeida et al., 2005; Albuquerque, 2006; Albuquerque et al., 2007; Agra et al., 2008).

Considerando os usos populares apresentados pelo gênero *Cnidoscolus*, a escassez de trabalhos que avaliem seu potencial terapêutico e a busca de novas drogas, principalmente a partir de plantas medicinais, nesse estudo foram avaliados os perfis fitoquímicos e atividade

antibacteriana de quatro espécies de *Cnidocolus* referenciadas em levantamentos etnofarmacológicos desenvolvidos na Caatinga.

2. Materiais e métodos

2.1. Amostras

As amostras das diferentes espécies foram coletadas com base nas indicações das partes citadas e partes que não citadas em levantamentos etnofarmacológicos. As coletas foram realizadas em remanescentes de Caatinga de Pernambuco e Paraíba. No município de Altinho/PE (08°35'13.5"S x 36°05'34.6"W) foram coletadas amostras de *C. urens* em 09 de julho de 2008. Amostras de *C. infestus* e *C. quercifolius* foram coletadas no município de Soledade/PB (07°04'13"S x 36°20'52"W) em 19 de setembro de 2008. No dia 27 de setembro de 2008. Em Buíque/PE (08°37'23"S x 37°09'21"W), foram coletadas amostras de *C. pubescens*. Os materiais-testemunho foram coletados e encontram-se incorporados no Herbário UFP Geraldo Mariz do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pernambuco, sob os nº. 55.098-55.101.

2.2. Preparação dos extratos brutos metanólicos e frações

As amostras vegetais foram estabilizadas em estufa (Nova Técnica NT-503) durante dois dias a 45±5°C, pulverizadas em moinho vertical de facas tipo Willye (Adamo 340) e padronizadas em tamises (Bertel), obtendo-se granulometria de 1 mm (16 Mesh).

Para avaliar a atividade antimicrobiana, as amostras pulverizadas foram maceradas com metanol (80%, v/v) durante 48 horas e os extratos brutos metanólicos foram obtidos a partir da concentração dos filtrados em evaporador rotativo (Marconi MA-120) sob pressão reduzida e armazenados a 4°C. A escolha do metanol tem sido recomendada para a extração de compostos fenólicos em tecidos vegetais devido à sua capacidade de inibir a oxidação de polifenóis, que podem alterar a atividade antioxidante (Yao et al., 2004). Os extratos que apresentaram melhores resultados antimicrobianos foram submetidos à cromatografia em coluna filtrante de sílica gel e eluída, sucessivamente, com hexano, diclorometano, acetato de

etila e etanol (Santos et al., 2009). Os solventes foram evaporados para a obtenção das respectivas frações.

2.3. Caracterização fitoquímica

Os extratos brutos metanólicos das quatro espécies foram aplicados com micropipeta em placas cromatográficas de sílica gel 60 F₂₅₄ com suporte de alumínio e eluídos em diferentes sistemas de solventes conforme descrito por Wagner and Bladt (1996), procurando-se evidenciar os principais grupos do metabolismo secundário (Tabela 1). As cromatoplas foram visualizadas em câmara de ultravioleta nos comprimentos de 254 e 365 nm.

Tabela 1. Sistemas de eluição e reveladores utilizados para caracterizar os principais metabólitos secundários dos extratos de quatro espécies de *Cnidocolus* por cromatografia em camada delgada (Wagner e Bladt, 1996).

Classe química	Sistema eluente	Padrão	Revelador
Alcalóides gerais	Tolueno: acetato de etila: dietilamina (70:20:10)	Ioimbina Quinina	Dragendorff
Antocianinas	Acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (100:11:11:26)	Azul de metileno	Anisaldeído-sulfúrico
Antraquinonas	Éter de petróleo: acetato de etila: ácido fórmico (75:25:1)	Antraquinona	Ácido fosfomolibdico / H ₂ SO ₄ etanólico 10%
Cumarinas	Tolueno: éter etílico (1:1 saturado com ácido acético 10%)	Escopoletina	KOH etanólico 10%
Derivados antracênicos	Acetato de etila: metanol: água (100:13,5:10)	Aloína	KOH etanólico 10%
Flavonóides e taninos hidrolisáveis	Acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (100:11:11:26)	Ácido tânico Quercetina Rutina	NEU
Lignanas	Clorofórmio: metanol: água (70:30:4)	Extrato de linhaça	Vanilina fosfórica
Mono, sesqui e diterpenos	Tolueno: acetato de etila (93:7)	Carvacrol Timol	Vanilina sulfúrica
Naftoquinonas	Tolueno: ácido fórmico (99:1)	Biflorina Lapachol	KOH etanólico 10%
Saponinas	Clorofórmio: ácido acético: metanol: água (64:32:12:8)	Saponina	Anisaldeído-sulfúrico
Triterpenos e esteróides	Tolueno: clorofórmio: etanol (40:40:10)	Lupeol Sitosterol	Lieberman-Burchard
Xantinas	Acetato de etila: metanol: água (100:13,5:10)	Cafeína	Iodo - KI - HCl

2.4. Avaliação da atividade antimicrobiana

2.4.1. Teste antibacteriano pelo método de difusão em ágar

Os extratos foram testados frente às seguintes cepas padrões e isolados clínicos pertencentes à coleção do Laboratório de Análises Microbiológicas (LAM/UFPE): *Staphylococcus aureus* - cepa padrão ATCC 6538 (AM103); *S. aureus* MRSA - isolado de secreção (AM642); *S. saprophyticus* - cepa padrão LACEN (AM245); *S. coagulase* negativa - isolado de secreção de cateter (AM789); *Enterococcus faecalis* - cepa padrão ATCC 51299 (AM1056); *E. faecalis* - isolado de urina (AM997); *Pseudomonas aeruginosa* - cepa padrão ATCC 14502 (AM206); *P. aeruginosa* - isolado de sangue (AM 428); *Klebsiella pneumoniae* - isolado de secreção de ferida cirúrgica (AM793); *K. pneumoniae* - isolado de secreção (AM410); *Escherichia coli* - cepa padrão ATCC 35218 (AM1050); *E. coli* - isolado de secreção LACEN (AM247).

Para determinar a atividade antibacteriana dos extratos foi utilizado o método de difusão em ágar pela técnica de poço (CLSI, 2009a) por ser um método que demonstra melhor desempenho, com a inibição de um maior número de bactérias (Alves et al., 2008). Os inóculos (10^8 UFC/mL) foram semeados com o auxílio de swab estéril em placas de Petri esterilizadas medindo 20 x 100 mm contendo 20 mL de meio ágar Mueller-Hinton, nas quais foram confeccionados poços de 6 mm de diâmetro e preenchidos com 50 μ L dos extratos solubilizados em DMSO (50%, v/v) a 100 e 200 mg/mL (5 e 10 mg/poço, respectivamente) (Sakagami, 2005). Como controle positivo foi utilizado 50 μ L de gentamicina a 2 mg/mL (100 μ g/poço) e como controle negativo 50 μ L de DMSO (50%, v/v). As placas foram pré-incubadas por 3 horas à temperatura ambiente para completa difusão dos extratos (Möller, 1966). Em seguida, as mesmas foram incubadas em aerobiose a 37 ± 1 °C por 24 horas e a atividade antibacteriana foi avaliada pela medição dos halos de inibição.

2.4.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A avaliação da CIM foi determinada pela metodologia da microdiluição em caldo Muller-Hinton proposta pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009b) modificada, com as bactérias que apresentaram halo de inibição superior a 13 mm e com as cepas de *S. aureus*

MRSA - isolado de secreção traqueal (AM793), *S. epidermidis* - isolado de esperma (AM235) e *E. faecalis* – ATCC 51299 (AM1058).

Foram utilizadas microplacas estéreis com 96 poços. Cada poço recebeu 90 µL de soro fisiológico, 80 µL de meio de cultura líquido caldo Muller-Hinton (Himedia), 20 µL do inóculo a 0.5 da escala McFarland (10^8 UFC/mL) e 10 µL das soluções de diferentes concentrações dos extratos brutos (31.25 a 2000.0 mg/mL) e frações (7.81 a 1000.0 mg/mL). Como controles foram utilizados: 100 µL de soro fisiológico, 80 µL de caldo Muller-Hinton e 20 µL do inóculo (controle de crescimento microbiano); 100 µL de soro fisiológico e 80 µL de caldo Muller-Hinton (controle de esterilidade); solução aquosa de gentamicina e tetraciclina nas concentrações de 0.125 µg/mL a 64.0 µg/mL (controle positivo); e 90 µL de soro fisiológico, 80 µL de meio de cultura líquido caldo Muller-Hinton, 20 µL do inóculo a 0.5 da escala McFarland e 10 µL DMSO (40%, v/v) (controle negativo). As microplacas foram incubadas a 37 ± 1 °C por 24 horas e, após esse período, foram adicionados 50 µL da solução aquosa de cloreto de 2.3.5-trifeniltetrazólio (2.5 mg/mL, p/v) como revelador.

3. Resultados e discussão

3.1. Caracterização fitoquímica

A análise fitoquímica realizada com os extratos brutos metanólicos mostraram a presença de antocianinas, antraquinonas, compostos fenólicos (fenóis simples, flavonóides e taninos), cumarinas, derivados antracênicos, esteróides, lignanas, saponinas, terpenóides (mono, sesqui, diterpenos e triterpenos) e xantinas. Não foram detectados alcalóides gerais e naftoquinonas nos extratos, enquanto que as cumarinas e os terpenóides foram confirmados em todas as amostras avaliadas (Tabela 2). Os compostos fenólicos, cumarinas e os derivados antracênicos apresentaram maior quantidade de compostos. As espécies estudadas apresentaram perfis semelhantes para algumas classes de metabólitos. O perfil fitoquímico das raízes de *C. infestus* foi idêntico às raízes de *C. urens*, o que corrobora com a semelhança fenotípica entre as duas espécies.

Table 2. Caracterização fitoquímica das quatro espécies de *Cnidocolus*. (PACI) partes aéreas de *C. infestus*; (RCI) raiz de *C. infestus*; (FCP) folha de *C. pubescens*; (RCP) raiz de *C. pubescens*; (CCQ) casca de *C. quercifolius*; (FCQ) folha de *C. quercifolius*; (PACU) partes aéreas de *C. urens*; (RCU) raiz de *C. urens*.

Grupo metabólico	PACI	RCI	FCP	RCP	CCQ	FCQ	PACU	RCU
Alcalóides gerais	-	-	-	-	-	-	-	-
Antocianinas	-	-	+++	-	-	+++	+++	-
Antraquinonas agliconas	-	-	+++	-	-	+++	+	-
Cumarinas	Traços	+++	Traços	+++	+++	++	+++	+++
Derivados antracênicos	-	++	+++	-	-	+++	+	++
Flavonóides	-	-	+++	+	-	+++	+++	-
Lignanas	-	+++	-	-	-	++	-	+++
Mono, sesqui e diterpenos	+++	+++	++	++	++	Traços	+++	+++
Naftoquinonas	-	-	-	-	-	-	-	-
Saponinas	-	+	-	-	++	-	-	++
Triterpenos e esteróides	++	Traços	++	+	+	++	++	Traços
Xantinas	++	-	+	-	-	Traços	Traços	-

- = ausente; + = baixo; ++ = moderado; +++ = forte.

A resposta negativa para alcalóides nos extratos espécies de *Cnidocolus* foi inesperada, visto que na literatura há relatos desta classe (Awoyinka et al., 2007; Rouse e Bienfang, 2006; Yakubu et al., 2008). Como esperado, as antocianinas foram encontradas nos extratos de folhas, flores e partes aéreas. Dentre os compostos fenólicos, flavonóides e taninos ocorreram com maior frequência. Yuan et al. (2007) realizando uma investigação fitoquímica com *C. texanus* (Müll. Arg.) Small isolaram 26 compostos, sendo quinze flavonóides, quatro triterpenóides, três cumarinas, três derivados do ácido cumárico e um fitoesterol. Coincidentemente, houve a caracterização de uma mesma cumarina em todas as amostras (Rf = 0.35), o que pode ser utilizado como marcador químico para estas espécies.

3.2. Atividade antibacteriana

Os resultados da atividade antibacteriana foram avaliados através da medição dos halos de inibição conforme os parâmetros sugeridos por Alves et al. (2000): halos < 9 mm, inativo; 9-12 mm, pouco ativo; 13-18 mm, ativo; > 18 mm muito ativo. Os extratos analisados foram inativos frente aos microorganismos *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *E. coli*. As amostras de *C. infestus*, folhas de *C. pubescens* e raízes de *C. urens* não apresentaram atividade frente às bactérias testadas. O extrato das partes aéreas de *C. urens* na concentração de 10 mg/poço apresentou baixa atividade frente a *S. aureus* e *S. coagulase* negativa. Os dois extratos de *C. quercifolius* foram ativos frente às cepas de *S. aureus*, *S. coagulase* negativa e pouco ativo contra *E. faecalis*. O extrato das raízes de *C. pubescens* foi ativo contra *S. aureus* e *S. coagulase* negativa. Os resultados das amostras de *Cnidocolus* frente às cepas padrões e isolados clínicos são apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Halos de inibição (em mm) do ensaio antibacteriano das amostras de *Cnidocolus* frente a cepas padrões e isolados clínicos.

Espécie Voucher number	Parte usada	Conc/Poço	<i>S. aureus</i>		<i>S. coagulase negative</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>K. pneumoniae</i>		<i>E. coli</i>	
			AM103	AM642	AM245	AM789	AM997	AM1056	AM206	AM428	AM379	AM410	AM1050	AM247
<i>C. infestus</i> 55.098	Partes aéreas	5 mg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		10 mg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Raízes	5 mg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		10 mg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. pubescens</i> 55.099	Folhas	5 mg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		10 mg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Raízes	5 mg	13	10	12	12	-	-	-	-	-	-	-	-
		10 mg	14	13	14	12	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. quercifolius</i> 55.100	Casca	5 mg	15	14	13	11	-	-	-	-	-	-	-	-
		10 mg	16	14	14	13	12	12	-	-	-	-	-	-
	Raízes	5 mg	14	15	10	11	-	-	-	-	-	-	-	-
		10 mg	16	16	12	15	11	12	-	-	-	-	-	-
<i>C. urens</i> 55.101	Partes aéreas	5 mg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		10 mg	-	10	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-
	Raízes	5 mg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		10 mg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DMSO	-	40%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Gentamicina	-	0,1 mg	23.5	23.75	23.5	28.75	-	-	21,5	-	20,5	21,25	22,25	22

Extratos vegetais são considerados com bom potencial antimicrobiano quando apresentam CIM < 100 µg/mL, moderada atividade com CIM de 100-500 µg/mL, fraca atividade com CIM de 500-1000 µg /mL e inativos com CIM > 1000 µg /mL (Tanaka et al., 2005). O extrato das folhas de *C. quercifolius* foi inativo contra *S. aureus* e *S. coagulase negativa*, enquanto o extrato das raízes de *C. pubescens* apresentou atividade contra as duas cepas de *S. aureus* (AM103 e AM642) e foi inativo frente às demais. O extrato das cascas de *C. quercifolius* foi ativo frente a todas as cepas, com CIM entre 250 e 500 µg/mL. A fração diclorometano das cascas de *C. quercifolius* foi a mais ativa com CIM variando entre 62.5 e 250 µg/mL, sendo o resultado mais promissor frente à cepa de *S. aureus* MRSA sensível apenas a vancomicina (Saraiva, 2007). Portanto, de acordo com o padrão estabelecido, o extrato bruto metanólico das cascas de *C. quercifolius* apresentou os resultados mais satisfatórios sobre as espécies Gram-positivas, uma vez que as CIM são consideradas excelentes ferramentas para determinar a susceptibilidade dos organismos aos antimicrobianos (Andrews, 2001).

Tabela 4. Concentrações inibitórias mínimas (CIM, em µg/mL) dos extratos brutos metanólicos das raízes de *C. pubescens*, extratos brutos metanólicos das folhas e cascas de *C. quercifolius* e frações obtidas do extrato bruto metanólico das cascas de *C. quercifolius*.

Espécie	Parte usada / Fração	<i>S. aureus</i>			<i>S. coagulase negativa</i>		
		AM103	AM642	AM793	AM245	AM789	AM235
<i>C. pubescens</i>	Raízes	500	500	1000	2000	2000	2000
	Folhas	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
	Cascas	250	250	250	500	250	500
<i>C. quercifolius</i>	HEX	>1000	>1000	>1000	500	>1000	500
	DCM	125	500	62.5	250	125	125
	AcOEt	500	500	125	500	250	250
	EtOH	>1000	>1000	500	>1000	1000	>1000
Gentamicina (µg/mL)		0.125	0.25	>64.0	1.0	0.125	1.0
Tetraciclina (µg/mL)		0.25	0.0625	>32.0	0.25	0.25	0.25

HEX = fração hexano; DCM = fração diclorometano; AcOEt = fração acetato de etila; EtOH = fração etanol.

O crescimento da resistência bacteriana aos antibióticos é uma ameaça a população mundial, aumentando as recorrências por doenças infecciosas, devido ao surgimento de bactérias multirresistentes que dificultam o tratamento quimioterápico (Aqil, 2005). Por

exemplo, as infecções nosocomiais produzidas por *Staphylococcus*, principalmente *S. aureus* Meticilina Resistente (MRSA), é bastante reconhecida pela sua freqüência, morbidade, mortalidade e principalmente pela dificuldade de tratamento (Nascimento et al., 2000). Virtualmente, as cepas de MRSA são resistentes aos β -lactâmicos, macrolídeos, tetraciclina, aminoglicosídeos, sendo os glicopeptídeos a única alternativa de tratamento das infecções por *S. aureus* MRSA multirresistentes (Shibata, 2005).

Neste sentido, *C. quercifolius* demonstrou resultados muito promissores, especialmente contra as bactérias Gram-positivas, uma vez que apresentou efeito inibidor sobre as cepas de bactérias sensíveis e também sobre as mais resistentes. Por exemplo, a cepa de *S. aureus* MRSA (AM793), sensível apenas ao glicopeptídeo vancomicina, antimicrobiano que apresenta significativa toxicidade e exige monitoramento em sua administração (Soares et al., 2000). A atividade inibitória do extrato das cascas de *C. quercifolius* sobre *S. epidermidis* (AM235), importante microorganismo relacionado com a ocorrência de endocardites, bacteremias, sepse e outras graves infecções envolvidas com dispositivos médicos implantados, tais como cateteres e próteses (Marangoni, 1997), revela o potencial antibacteriano da espécie.

Ao verificar a literatura, foi observado que muitos estudos relatam propriedades antimicrobianas de espécies da família Euphorbiaceae, na qual o gênero *Cnidocolus* se encontra. Kuete et al. (2010), ao estudar a atividade antimicrobiana de *Thecacoris annobonae* Pax & K. Hoffm, mostraram que o extrato metanólico da casca impediu o crescimento de todos os organismos testados, indicando que o mesmo pode ser uma fonte potencial de novas drogas contra a tuberculose e algumas doenças bacterianas e fúngicas. Em outro estudo, o extrato hidroalcolico, frações e alguns dos compostos isolados de *Croton urucurana* Baillon mostraram excelente atividade antibacteriana frente a cepas de *S. aureus* e *Salmonella typhimurium* (Peres et al., 1997). Aiyelaagbe (2000) ao avaliar a atividade antibacteriana das raízes de *Jatropha multifida* L. extraída sucessivamente com hexano, acetato de etila, clorofórmio e metanol, constatou que os extratos inibiram o crescimento de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Os extratos metanólicos de folhas, flores, caules e raízes de *Euphorbia hirta* L foram ativos frente a bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e a *Candida albicans*, apresentando CIM entre 3.13 e 100 mg/mL (Rajeh et al., 2010).

Mesmo tendo apresentando resultados promissores, os extratos brutos metanólicos foram inativos frente às bactérias Gram-negativas e isto pode ter ocorrido por dois motivos: ausência ou concentrações relativamente baixas de substâncias potencialmente ativas e diferenças estruturais que este grupo apresenta em relação às Gram-positivas que podem dificultar a ação dos componentes ativos dos extratos (Ayres et al. 2008).

5. Conclusões

A atividade antimicrobiana dos extratos e frações das cascas de *C. quercifolius* sugere que os diferentes mecanismos de resistência das cepas de *S. aureus* e *S. coagulase negativa* não estão oferecendo proteção contra as substâncias presentes na espécie. Estes resultados motivam a realização de estudos de isolamento os constituintes químicos responsáveis por tais atividades, com o intuito de encontrar uma nova droga com ação antimicrobiana frente a estes patógenos.

A abordagem realizada neste estudo forneceu valiosas informações a cerca das espécies medicinais do gênero *Cnidocolus*, o que pode promover estudos que visem o isolamento de substâncias ativas que poderão enriquecer o arsenal terapêutico, além de disponibilizar informações cientificamente validadas sobre o uso popular de plantas da Caatinga e promover o uso consciente deste ecossistema.

Agradecimentos

Os autores agradecem a FACEPE pela bolsa concedida a T.J.S. Peixoto Sobrinho, ao PIBIC/UFPE/CNPq pela bolsa concedida a E.A. Tavares.

Referências

- Agra MF, Silva KN, Basílio IJLD, Freitas PF, Barbosa-Filho JM 2008. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn* 18(3): 472-508.
- Aiyelaagbe OO 2000. Antibacterial activity of *Jatropha multifida* roots. *Fitoterapia* 72: 544-546.

- Albuquerque UP 2006. Re-examining hypotheses concerning the use and knowledge of medicinal plants: a study in the Caatinga vegetation of NE Brazil. *J Ethnobiol Ethnomed* 2(30): 1-10.
- Albuquerque UP, Medeiros PM, Almeida ALS, Monteiro JM, Lins Neto EMF, Melo JG, Santos JP 2007. Medicinal plants of the Caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. *J Ethnopharmacol* 114: 325-354.
- Almeida CFCBR, Silva TCL, Amorim ELC, Maia MBS, Albuquerque UP 2005. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the caatinga (Northeast Brazil). *J Arid Environ* 62(1): 127-142.
- Alves TMA, Silva AF, Brandão M, Grandi TSM, Smânia EFA, Smânia Jr A, Zani CL, 2000. Biological screening of brazilian medicinal plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 367-373.
- Alves EG, Vinholis AHC, Casemiro LA, Furtado NAJC, Silva MLA, Cunha WR, Martins CHG 2008. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. *Quim Nova* 31(5): 1224-1229.
- Andrews JM 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother* 48: 5-16.
- Aqil F, Khan MSA, Owais M, Ahmad I 2005. Effect of certain bioactive plant extracts on clinical isolates of β -lactamase producing methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J Basic Microbiol* 45: 106-114.
- Awoyinka OA, Balogun IO, Ogunnowo AA 2007. Phytochemical screening and in vitro bioactivity of *Cnidocolus aconitifolius* (Euphorbiaceae). *J Med Plants Res*, 1, 63-65.
- Ayres MCC, Brandão MS, Vieira-Júnior GM, Menor JCAS, Silva HB, Soares MJS, Chaves MH 2008. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. *Braz J Pharmacogn* 18(1): 90-97.
- CLSI 2009a. *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests*. Approved Standard 10 ed. CLSI document M2-A10. 29(1).
- CLSI 2009b. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*. Approved Standard—8 ed. CLSI document M7-A8. 29(2).
- Kuete V, Poumale HM, Guedem AN, Shiono Y, Randrianasolo R, Ngadjui BT 2010. Antimycobacterial, antibacterial and antifungal activities of the methanol extract and compounds from *Thecacoris annobonae* (Euphorbiaceae). *S Afr J Bot* 76: 536-542.
- Marangoni DV 1997. *Staphylococcus aureus*. In Rodrigues EAC, Mendonça JS, Amarante JMB, Alves Filho MB, Grinbaum RS, Richtmann R (org.) *Infecções Hospitalares Prevenção e Controle*. São Paulo: Sarvier, p.573-591.
- Melo AL, Sales MF 2008. O gênero *Cnidocolus* Pohl (Crotonoideae-Euphorbiaceae) no Estado de Pernambuco, Brasil. *Acta Bot Bras* 22(3): 806-827.

- Möller AJR 1966. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. *Odontol Tidskr* 74: 1-38.
- Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Braz J Microbiol* 31: 247-256.
- Peres MTLP, Monache FD, Cruz AB, Pizzolatti MG, Yunes RA 97. Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). *J Ethnopharmacol* 56: 223-226.
- Rajeh MAB, Zuraini Z, Sasidharan S, Latha LY, Amutha S 2010. Assessment of *Euphorbia hirta* L. leaf, flower, stem and root extracts for their antibacterial and antifungal activity and brine shrimp lethality. *Molecules* 15: 6008-6018.
- Rouse SH, Bienfang R 2006. A note on the phytochemical study of the root of *Cnidocolus texanus* (Muell. Arg.) small. *J Am Pharm Assoc*, 43, 699-700.
- Sakagami Y, Iinuma M, Piyasena KGNP, Dharmaratne HRW 1998. Anti-MRSA activity of sophoraflavanone G and synergism with other antibacterial agents. *Lett Appl Microbiol* 27: 98-100.
- Santos AKL, Magalhães TS, Monte FJQ, Mattos MC, Oliveira MCF, Almeida MMB, Lemos TLG, Braz-Filho R 2009. Alcaloides iboga de *Peschiera affinis* (Apocynaceae) – atribuição inequívoca dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono. *Quim Nova* 32(7): 1834-1838.
- Saraiva AM 2007. *Estudo farmacognóstico e determinação da atividade biológica de Caesalpinia pyramidalis Tull. e Schinopsis brasiliensis Engl. frente a cepas de Staphylococcus aureus MRSA multirresistentes*. Recife, 184p. Dissertação de Mestrado, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco.
- Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG 2005. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz J Microbiol* 35: 275-280.
- Shibata H, Kondo K, Katsuyama R, Kawazoe K, Sato Y, Murakami K, Takaishi Y, Arakaki N, Higuti T 2005. Alkyl gallates, intensifiers of β -Lactam susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 49(2): 549-555.
- Silver LL, Bostian KA 1993. Discovery and development of new antibiotics: the problem of antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 37(3): 377-383.
- Soares MJS, Silva-Carvalho MC, Ferreira-Carvalho BT, Figueiredo MAS 2000. Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* belonging to the Brazilian epidemic clone in a general hospital and emergence of heterogenous resistance to glycopeptide antibiotics among these isolates. *J Hosp Infect* 44: 301-308.

- Stapleton PD, Shah S, Anderson JC, Hara Y, Hamilton-Miller JM, Taylor PW 2004. Modulation of β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus* by catechins and gallates. *Int J Antimicrobial Agents* 23: 462-467.
- Tanaka JCA, Silva CC, Dias Filho BP, Nakamura CV, Carvalho JE, Foglio AA 2005. Constituintes químicos de *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). *Quim Nova* 28(5): 834-837.
- Wagner H, Bladt S 1996. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. Berlin Heidelberg: Springer Verlag. 384p.
- Webster GL 1994. Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae. *Ann. Miss. Bot. Garden* 81, 33-144.
- Yakubu MT, Akanji MA, Oladiji AT, Olatinwo AWO, Adesokan AA, Yakubu MO, Owoyele BV, Sunmonu TO, Ajao MS 2008. Effect of *Cnidocolous aconitifolius* (Miller) I.M. Johnston leaf extract on reproductive hormones of female rats. *Iranian J Reprod Med*, 6, 149-155.
- Yao L, Jlang Y, Datta N, Singanusong R, Liu X, Duan J 2004. HPLC analyses of flavonols and phenolic acids in the fresh young shoots of tea (*Camelia sinensis*) grown in Australia. *Food Chem* 84, 253-263.
- Yuan W, Li S, Ownby S, Zhang Z, Wang P, Zhang W, Beasley RS 2007. Flavonoids, coumarins and triterpenes from the aerial parts of *Cnidocolous texanus*. *Planta Med*, 73, 1304-1308.

7. Artigo 4

Atividade citotóxica e ensaio de letalidade frente às larvas de *Artemia salina* dos extratos de quatro espécies de *Cnidoscolus* Pohl (Euphorbiaceae)

7. ARTIGO 4

ARTIGO A SER SUBMETIDO A:

Revista: Phytopharmacology (ISSN 2046-1194)

Autores: Tadeu J. S. Peixoto Sobrinho, Elvis A. Tavares, Valérium T. N. A. Castro, Jorge Veras Filho, Gardênia C. G. Militão, Teresinha G. Silva and Elba L. C. Amorim

Título: Atividade citotóxica e ensaio de letalidade frente às larvas de *Artemia salina* dos extratos de quatro espécies de *Cnidoscolus* Pohl (Euphorbiaceae)

Atividade citotóxica e ensaio de letalidade frente às larvas de *Artemia salina* dos extratos de quatro espécies de *Cnidocolus* Pohl (Euphorbiaceae)

Tadeu J. S. Peixoto Sobrinho^{1,*}, Elvis A. Tavares¹, Valérium T. N. A. Castro¹, Jorge Veras Filho², Gardênia C. G. Militão³, Teresinha G. Silva³ and Elba L. C. Amorim¹,

¹ Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

² Laboratório de Pesquisas Toxicológicas, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

³ Laboratório de Farmacologia e Cancerologia Experimental, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

*Autor correspondente: Email: tadeu1903@yahoo.com.br, Tel: (+55) 81 2126-8511, Fax: (+55) 81 2126-8510.

RESUMO: Os objetivos deste estudo foram avaliar a letalidade frente larvas de *Artemia salina* Leach e verificar a citotoxicidade *in vitro* frente a três linhagens tumorais dos extratos brutos de quatro espécies de *Cnidocolus* utilizados na caatinga como etnomedicamentos. O bioensaio com as larvas de *A. salina* foi baseado no método descrita por Meyer et al. (1982). A citotoxicidade frente às linhagens HT29, Hep-2 e NCI-H292 foi avaliada pelo método do MTT. As concentrações letais médias (CL₅₀) da toxicidade frente às larvas de *A. salina* variaram 165,03-675,08 µg/mL. As amostras de *C. infestus* (Hep-2 e NCI-H292), cascas de *C. quercifolius* (HT-29 e Hep-2) e parte aérea de *C. urens* (Hep-2 e NCI-H292) mostraram inibição de crescimento celular. O extrato das raízes de *C. urens* mostrou um IC₅₀ de 20,3 ± 6,33 µg/mL contra a linhagem Hep-2. Os resultados mostram que as espécies de *Cnidocolus* indicadas nos levantamentos etnofarmacológicos apresentaram resultados bastante promissores e podem guiar a descoberta de compostos bioativos.

Palavras-chaves: Brine shrimp; Caatinga; Etnofarmacologia; Linhagens tumorais.

1. Introdução

A bioprospecção, principalmente a partir de plantas medicinais, é uma tendência mundial na qual os pesquisadores realizam triagens visando determinar diversas atividades biológicas e identificar substâncias ativas. Um exemplo prático destes bioensaios é o estudo de toxicidade aguda com larvas do microcrustáceo *Artemia salina* Leach, pois apresenta facilidade de execução, confiabilidade, baixo custo e por ter demonstrado uma boa correlação com várias atividades biológicas, como antitumoral (McLaughlin, 1991; McLaughlin et al., 1991; McLaughlin et al., 1993) e antitripanossomíase (Zani et al., 1995), sendo por estas razões uma excelente ferramenta para analisar preliminarmente a toxicidade geral (Luna et al., 2005).

A análise de citotoxicidade *in vitro* pelo método do MTT vem sendo utilizada no programa de *screening* do National Cancer Institute dos Estados Unidos (Skehan et al., 1990). Este é um método que apresenta rapidez, sensibilidade e baixo custo, sendo descrito primeiramente por Mosman (1983), tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (Berridge et al., 1996).

Muitos estudos etnofarmacológicos têm demonstrado que no Brasil há um elevado número de plantas medicinais usadas pela população e, dentre outras, as plantas do gênero *Cnidocolus* Pohl (Euphorbiaceae) são comumente encontradas nestas abordagens. Popularmente conhecidos por “urtiga” ou “favela”, este gênero possui de 50-75 representantes predominantemente concentrados na América Tropical, quase exclusivamente no México e nordeste do Brasil (Webster, 1994). Sua principal característica é a presença de tricomas urticantes que quando estimulados pelo contato com a pele podem provocar fortes dores localizadas (Melo e Sales, 2008).

Dentre as espécies que podem ser encontradas no ecossistema Caatinga (Cordeiro e Seco, 2010), quatro possuem diversos usos medicinais (*Cnidocolus infestus* Pax e K. Hoffm., *C. pubescens* Pohl, *C. quercifolius* Pohl e *C. urens* (L.) Arthur) como a atividade antiinflamatória e antitumoral do sistema genito-urinário, contra infecções renais, como anti-séptico dermatológico e oftálmico, em contusões, fraturas, ferimento, verrugas, disenteria, hemorragia, menstruação, apendicite e reumatismo (Almeida et al., 2005; Albuquerque, 2006; Albuquerque et al., 2007; Agra et al., 2008).

Considerando o fato de que o gênero *Cnidocolus* é usado para um grande número de remédios populares e o crescente interesse na avaliação biológica de plantas medicinais usadas pela população, investigamos a letalidade frente a larvas de *Artemia salina* Leach e a citotoxicidade dos extratos brutos de quatro espécies de *Cnidocolus* referenciados em pesquisas etnofarmacológicas realizadas na Caatinga. Além disso, comparamos as partes de plantas comumente citadas e não citadas como remédios populares.

2. Material e métodos

2.1. Material vegetal

A escolha das amostras vegetais foi baseada em abordagens etnofarmacológicas. Para cada espécie vegetal, foram coletadas partes usadas e não usadas tradicionalmente como remédios populares. As amostras de raízes e partes aéreas de *C. urens* foram coletadas no município de Altinho (Agreste de Pernambuco/Brasil - 08°35'13.5"S x 36°05'34.6"W) no dia 09 de julho de 2008. No município de Soledade (Agreste da Paraíba/Brasil - 07°04'13"S x 36°20'52"W), as amostras das raízes e partes aéreas de *C. infestus*, assim como cascas e folhas de *C. quercifolius* foram coletadas em 19 de setembro de 2008. Em Buíque (Sertão de Pernambuco/Brasil - 08°37'23"S x 37°09'21"W) foram coletadas amostras de folhas e raízes de *C. pubescens* no dia 27 de setembro de 2008. No mesmo período, os materiais-testemunhos foram coletados, identificados pela curadora Marlene Barbosa através de comparação e incorporados ao Herbário UFP Geraldo Mariz do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pernambuco, sob os nº. 55.098-55.101.

2.2. Preparação dos extratos

As amostras vegetais foram estabilizadas em estufa (Nova Técnica NT-503) durante dois dias a 45 ± 5 °C, pulverizadas em moinho vertical de facas tipo Willye (Adamo 340) e padronizadas em tamises, obtendo-se granulometria de 16 Mesh. As amostras pulverizadas foram extraídas por maceração com metanol 80% durante 48 horas e os extratos brutos metanólicos resultantes foram concentrados em evaporador rotativo até *secura* (Marconi MA-120) sob pressão reduzida, obtendo rendimentos entre 4,01 e 22,48% (Tabela 1).

2.3. Solventes e reagentes

Os solventes dimetilsulfóxido e metanol foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Para o ensaio citotóxico foram comprados Dulbecco Modified Eagle Medium Gibco (Grand Island, NY, EUA), soro fetal bovino Gibco (Grand Island, NY, EUA), glutamina Sigma (St. Louis, MO, EUA), penicilina Fluka (Buchs, AG, Suíça), estreptomicina Sigma (St. Louis, MO, EUA) e 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium brometo Sigma (St. Louis, MO, EUA).

2.4. Ensaio de letalidade

O ensaio de toxicidade frente os metanúplios de *A. salina* foi baseado no método descrito por Meyer et al. (1982). A água salina foi preparada com sal marinho (30 g/L em água destilada; pH entre 7 e 8). Os cistos de *A. salina* (20 mg) foram incubados em uma cuba atóxica com água salina e submetidos à luz artificial durante 48 horas. Dez larvas de *A. salina* foram transferidas para tubos de ensaio contendo 5 mL de diferentes concentrações dos extratos de *Cnidocolus* dissolvido em água salina (5-10 µg/mL) ou controle negativo (apenas água salina). As larvas que não tinham movimento durante a observação após 24 h foram consideradas mortas e a análise Probit foi usada para calcular o valor da concentração letal (CL₅₀) definida como a concentração da amostra que causa a morte de 50% das larvas. As análises foram realizadas em triplicata.

2.5. Ensaio da citotoxicidade *in vitro*

A atividade citotóxica foi avaliada pela metodologia baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas (Mosmann, 1983). As linhagens tumorais utilizadas, HT29 (carcinoma de cólon humano), Hep-2 (carcinoma de laringe humano) e NCI-H292 (câncer de pulmão humano), foram obtidas do Banco de células do Rio de Janeiro. As linhagens foram cultivadas em Minimum Essencial Medium Eagle modificado Dulbecco's (DMEM), suplementado com 10% de soro

fetal bovino, 1% de L-glutamina 200 mM e 1% de antibióticos (penicilina a 100 U/mL e estreptomicina a 250 µg/mL), mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

Foi realizado um screening inicial para determinação do potencial antitumoral dos extratos brutos metanólicos na concentração de 50 µg/mL. As suspensões celulares contendo 1×10^5 células/mL (225 µl/poço) e extratos ou frações (25 µl/poço) foram distribuídas em microplacas com 96 poços e incubadas durante 72 horas em estufa a 37 °C com atmosfera enriquecida com 5% de CO₂. Em seguida, foram adicionados 25 µL da solução de MTT em tampão fosfato salino (5 mg/mL) e as placas foram incubadas por 3 horas. A leitura óptica foi realizada em leitor automático de placas do tipo Multiskan a 595 nm após dissolução dos cristais de formazan com 100 µL de dimetilsulfóxido estéril (Alley et al., 1988). A densidade óptica média (DO) das amostras foi comparada com a densidade óptica média controle e cada amostra foi testada em triplicata.

2.6. Análise estatística

Os dados foram expressos como média ± desvio-padrão. Os dados foram analisados pelo teste Kolmogorov-Smirnov e ANOVA: one way seguido de comparações múltiplas pelo teste de Tukey. Para obtenção das concentrações letais médias (CL₅₀) foi utilizada a análise Probit, calculada a partir de regressão obtida com as concentrações versus porcentagens de larvas de *A. salina* vivas. O teste de correlação de Pearson foi usado para comparar os resultados da toxicidade aguda e a citotoxicidade *in vitro*. Foi utilizado um nível de significância de $p < 0.05$. O programa GraphPad Prism 5 foi utilizado para realização das análises estatísticas e construção dos gráficos.

3. Resultados

3.1. Ensaio de letalidade

Meyer et al. (1982) estabeleceram uma correlação entre a concentração letal média (CL₅₀) sobre as larvas de *A. salina* e o nível de toxicidade apresentada por extratos vegetais, sendo considerado tóxico valores de CL₅₀ ≤ 500 µg/mL, moderadamente tóxico CL₅₀ entre 500-1000 µg/mL e atóxico CL₅₀ ≥ 1000 µg/mL. Neste estudo foi observada uma ampla

variação na toxicidade aguda, como valores de CL_{50} compreendidos entre 165.03 ± 17.21 e 675.08 ± 40.10 $\mu\text{g/mL}$. Seis extratos (75%) apresentaram $CL_{50} < 300$ $\mu\text{g/mL}$ e dois (25%) tiveram CL_{50} compreendidos entre 600 e 700 $\mu\text{g/mL}$, indicando que a maioria dos extratos apresentou elevados níveis de toxicidade (Tabela 1).

Tabela 1. Valores de rendimento (em %) e concentrações letais médias (CL_{50} , em $\mu\text{g/mL}$) dos extratos brutos de *Cnidocolus* frente a larvas de *Artemia salina* Leach.

Espécie	Parte usada	Uso popular*	Rendimento	CL_{50}
<i>C. infestus</i>	Partes aéreas	Não citada	7,73	$232,76 \pm 11,10$
55.101	Raízes	Citada	9,08	$247,28 \pm 2,50$
<i>C. pubescens</i>	Folhas	Citada	14,23	$236,90 \pm 19,70$
55.100	Raízes	Não citada	4,55	$293,18 \pm 18,98$
<i>C. quercifolius</i>	Cascas	Citada	9,30	$165,03 \pm 17,21$
55.099	Folhas	Não citada	22,48	$675,08 \pm 40,10$
<i>C. urens</i>	Partes aéreas	Não citada	10,19	$266,72 \pm 21,28$
55.098	Raízes	Citada	4,01	$644,03 \pm 39,04$

* Citadas como remédios medicinais em abordagens etnofarmacológicas.

Os quatro extratos das partes citadas pela população apresentaram toxicidade média (CL_{50} $320,97 \pm 199,32$ $\mu\text{g/mL}$) relativamente superior aos extratos das partes não citadas (CL_{50} $366,94 \pm 188,39$ $\mu\text{g/mL}$), no entanto, estes não diferem estatisticamente. Foi observado um considerável número de óbitos das larvas de *A. salina* nas concentrações mais elevadas após 24 horas de exposição aos extratos, exceto nos extratos de folhas de *C. quercifolius* e raízes de *C. urens*. A análise visual revelou considerável diminuição na movimentação larval nas concentrações de 750 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ em relação ao controle negativo, demonstrando que concentrações elevadas dos extratos têm influência direta sobre a movimentação larval de *A. salina* (Figura 1).

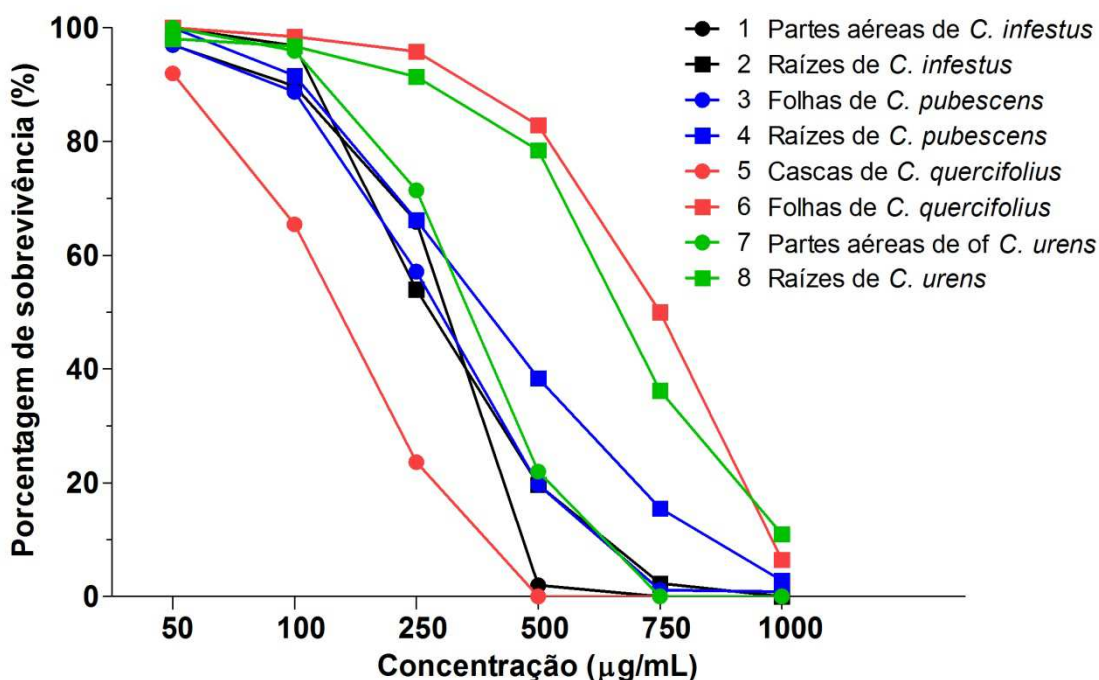


Figura 1. Comparação das porcentagens de sobrevivência (%) das larvas de *Artemia salina* Leach aos extratos de *Cnidioscolus* nas concentrações de 50-1000 µg/mL.

3.2. Ensaio da citotoxicidade in vitro

A escala do National Cancer Institute (NCI-USA) foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas. Amostras inativas (1 a 20% de inibição), pouco ativas (inibição de crescimento celular variando de 20 a 50%), atividade moderada (inibição de crescimento celular variando de 50 a 70%) e muito ativas (inibição de crescimento variando de 70 a 100%).

Os extratos das partes aéreas e raízes de *C. infestus* na concentração de 50 µg/mL foram ativos contra as linhagens Hep-2 e NCI-H292, respectivamente. O extrato da casca de *C. quercifolius* foi ativo contra as linhagens HT-29 e Hep-2 linhas. O extrato de partes aéreas de *C. urens* foi ativo contra Hep-2 e NCI-H292. As demais amostras foram ativas, porém, não superiores a 70% de inibição (Tabela 2). De acordo com o NCI-EUA, um extrato é considerado ativo quando possui $CI_{50} < 20$ µg/mL e para compostos isolados, este valor deve ser inferior a 4 µg/mL (Suffness e Pezzuto, 1991). Entre as amostras testadas pelo CI_{50} , o extrato das raízes de *C. infestus* foi ativo contra a linhagem Hep-2 ($CI_{50} = 20.3 \pm 6.33$ µg/mL),

enquanto os outros extratos apresentaram $CL_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 2). Em geral, extratos com elevada toxicidade frente às larvas de *A. salina* apresentam também alto potencial citotóxico o que não foi confirmado neste estudo ($CL_{50} \times \text{HT-29}$, $r = -0.4188$; $CL_{50} \times \text{NCI-H292}$, $r = -0.3232$; $CL_{50} \times \text{Hep-2}$, $r = -0.2435$). Os percentuais de inibição das linhagens HT-29 \times Hep-2 tiveram elevada correlação ($r = 0.7174$, $p < 0.05$), o que indica que os extratos das espécies desempenham efeito citotóxico semelhante em ambos.

Tabela 2. Valores de porcentagem de inibição do crescimento celular na dose única de 50 $\mu\text{g/mL}$ dos extratos de *Cnidocolus* frente às linhagens HT-29 (adenocarcinoma de cólon humano), Hep-2 (carcinoma epidermóide de laringe humano) e NCI-H292 (carcinoma mucoepidermóide pulmonar humano).

Espécie	Parte usada	HT-29	Hep-2	NCI-H292
<i>C. infestus</i>	Partes aéreas	44,0 \pm 16,2	82,6 \pm 1,8	9,2 \pm 5,3
	Raízes	6,8 \pm 13,2	16,2 \pm 0,1	85,3 \pm 1,8
<i>C. pubescens</i>	Folhas	18,1 \pm 17,0	25,3 \pm 5,3	21,5 \pm 0,1
	Raízes	24,6 \pm 2,1	64,0 \pm 4,2	70,6 \pm 1,8
<i>C. quercifolius</i>	Cascas	78,2 \pm 35,8	76,0 \pm 4,8	15,2 \pm 1,5
	Folhas	17,1 \pm 11,2	61,3 \pm 19,1	9,2 \pm 5,3
<i>C. urens</i>	Partes aéreas	50,0 \pm 8,3	88,9 \pm 2,1	85,3 \pm 1,8
	Raízes	26,2 \pm 0,7	25,9 \pm 3,6	21,5 \pm 0,1

Tabela 3. Valores de concentração inibitória (CI₅₀, em µg/ml) de extratos de *Cnidocolus* frente às linhagens HT-29 (adenocarcinoma de cólon humano), Hep-2 (carcinoma epidermóide de laringe humano) e NCI-H292 (carcinoma mucoepidermóide pulmonar humano).

Extrato	HT-29	Hep-2	NCI-H292
Partes aéreas de <i>C. infestus</i>	>50	>50	>50
Raízes de <i>C. infestus</i>	>50	20,3 ± 6,33	>50
Cascas de <i>C. quercifolius</i>	>50	>50	>50
Partes aéreas de <i>C. urens</i>	>50	>50	>50

4. Discussão

Os extratos de *Cnidocolus* possuem elevada porcentagem de inibição do crescimento celular. Estas espécies são comumente usadas para tratar tumores e inflamação (Agra et al, 2008; Albuquerque et al, 2007). Estudos anteriores com a espécie *C. quercifolius* possibilitaram a identificação de substâncias citotóxicas na casca, como favelina, favelina-metil-éter e deoxofavelina (Endo et al. 1991a), favelanona (Endo et al, 1991b), neofavelanona (Endo et al., 1992), favelol, isofavelol e favelona (Ohta et al., 1994). Também foram identificados terpenóides como filacantona, 3β-O-cinamoil-lupeol e 3β-O-dihidrocinamoil-lupeol (Lemos et al., 1991).

Em um estudo recente, nosso grupo (dados não apresentados) mostrou a presença de cumarinas nos extratos de *Cnidocolous* e estes compostos também pode realizar diferentes atividades biológicas, tais como indicadas para as espécies investigadas. Por exemplo, Silveira et al. (2009) avaliaram os extratos de *Pterocaulon alopecuroides* (Lam.) DC. (Asterarceae) e *Bidens segetum* Mart. ex Colla (Asterarceae) e descobriram que ambos mostraram elevada citotoxicidade contra células RBL-2H3 (leucemia de ratos) e no extrato de *P. alopecuroides* foi possível isolar a 7-(2',3'-dihidroxi-3'-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina que exibiu efeito antiproliferativo. Os extratos e frações (hexano, metanol, n-butanol e aquosa) de *Glehnia littoralis* F. Schmidt ex Miq. (Apiaceae) apresentaram efeito inibitório sobre a proliferação celular de HT-29 e esses resultados foram atribuídos a três

furanocoumarinas e quatro álcoois poliacetileno isolados a partir de frações de *G. littoralis* (Um et al., 2010).

Seis cumarinas α -metileno- γ -butirolactonas sintetizadas foram avaliadas frente à atividade citotóxica, sendo possível determinar que a cumarina 4-il- α -metileno- γ -butirolactona exibiu o melhor potencial antiproliferativo sobre o crescimento das linhagens MCF7 (câncer de mama humano), NCI-H460 (carcinoma de células não-pequenas de pulmão humano) e SF-268 (câncer do sistema nervoso central humano), com valores CI_{50} de 6,97, 14,68 e 8,36 mM, respectivamente, e apresentou efeito citotóxico mais eficiente que suas contrapartes 7-il e 6,7-dimetil derivadas (Chen et al., 2010). Este estudo também observou que para as cumarinas 7-il derivadas, os congêneres γ -metilados foram menos ativos, indicando que a substituição na posição γ diminui a citotoxicidade das mesmas (Chen et al., 2010).

Os resultados deste estudo confirmam que as plantas indicadas em pesquisas etnofarmacológicas podem servir como um guia para a busca de compostos bioativos, como os extratos de *C. infestus* e *C. quercifolius* que têm potencial citotóxico, porém, elevada toxicidade ($CL_{50} < 300 \mu\text{g/mL}$). Estes resultados são muito promissores uma vez que existe uma grande quantidade de substâncias presentes nos extratos e, após o isolamento dos compostos responsáveis pela atividade poderá aumentar o potencial medicinal, permitindo uma redução na concentração e aumento da atividade.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação FACEPE pela bolsa concedida a TJS Peixoto Sobrinho e VTNA Castro e a CAPES pela bolsa concedida a J Veras Filho.

Referências

- Agra MF, Silva KN, Basílio IJLD, Freitas PF, Barbosa-Filho JM. (2008). Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 18(3), 472-508.
- Albuquerque UP. (2006). 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* 2(30), 1-10.

- Albuquerque UP, Medeiros PM, Almeida ALS, Monteiro JM, Lins Neto EMF, Melo JG, Santos JP. (2007). Medicinal plants of the Caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. *Journal of Ethnopharmacology* 114, 325-354.
- Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, Abbott BJ, Mayo JG, Shoemaker RH, Boyd MR. (1988). Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Research* 48, 589-601.
- Almeida CFCBR, Silva TCL, Amorim ELC, Maia MBS, Albuquerque UP. (2005). Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the Caatinga (Northeast Brazil). *Journal of Arid Environments* 62(1): 127-142.
- Berridge MV, Tan AS, McCoy KD, Wang R. (1996). The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica* 4: 14-19.
- Chen YL, Lu CM, Lee SJ, Kuo DH, Chen IL, Wang TC, Tzeng CC. (2005). Synthesis, antiproliferative, and vasorelaxing evaluations of coumarin α -methylene- γ -butyrolactones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 13, 5710-5716.
- Cordeiro I, Secco R. (2010). *Cnidoscolus*. In: Lista de espécies da flora do Brasil. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB017491>, Acesso em: setembro de 2010.
- Endo Y, Ohta T, Nozoe S. (1991a). Favelines, novel tricyclic benzocycloheptenes with cytotoxic activities from brazilian plant, *Cnidoscolus phyllacanthus*. *Tetrahedron Letters* 32(26), 3083-3086.
- Endo Y, Ohta T, Nozoe S. (1991b). Favelanone, a novel tetracyclic cyclopropane derivative from the brazilian plant, *Cnidoscolus phyllacanthus*. *Tetrahedron Letters* 32(40), 5555-5558.
- Endo Y, Ohta T, Nozoe S. 1992. Neofavelanone, A novel tetracyclic cyclobutene derivative from the Brazilian plant, *Cnidoscolus phyllacanthus*. *Tetrahedron Letters* 33(3), 353-356.
- Lemos TLG, Silveira ER, Oliveira MF, Braz Filho R, Hufford C. (1991). Terpenoids from *Cnidoscolus phyllacanthus* Pax et Hoff. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 2(3), 105-110.
- Luna JS, Santos AF, Lima MRF, Omena MC, Mendonça FAC, Bieber LW, Sant'ana AEG. (2005). A study of larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 97, 199-206.
- Mclaughlin JL. (1991). Crown gall tumours on potato discs and brine shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractions, in: Dey PM, Harbone JB. (Eds.), *Methods in Plant Biochemistry*. New York: Academic Press, pp. 1-32.
- Mclaughlin JL, Chang CJ, Smith DL. (1991). "Bench-top" bioassays for the discovery of bioactive natural products: an update, in: Rahman A. (Eds.), *Studies in Natural Product Chemistry*. Amsterdam: Elsevier, pp. 383-409.

- Mclaughlin JL, Chang CJ, Smith DL. (1993). Simple bench-top bioassays (BS e PD) for discovery of plant antitumor compounds-review of recent progress, in: Kinghorn AD, Balandrin MF. (Eds.), Human medicinal agents from plants. Nova York: Kinghorn and Balandrini, pp. 112-137.
- Melo AL, Sales MF. (2008). O gênero *Cnidoscolus* Pohl (Crotonoideae-Euphorbiaceae) no Estado de Pernambuco, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 22(3), 806-827.
- Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, Mclaughlin JL. (1982). Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta medica* 45, 31-34.
- Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunology Methods*, 65, 55-63.
- Ohta T, Endo Y, Kikuchi R, Kabuto C, Harada N, Nozoe S. (1994). Absolute stereochemistry of benzocycloheptenone derivatives from *Cnidoscolus phyllacanthus*. *Tetrahedron Letters* 50(19), 5659-5668.
- Silveira CS, Martins FO, Costa CS, Romanos MTV, Kaplan MAC, Menezes FS. (2009). *In vitro* cytotoxic, antioxidant and antiviral effects of *Pterocaulon alopecuroides* and *Bidens segetum* extracts. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 19(Suppl 2A), 343-348.
- Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bodesch H, Kenney S, Boyd MR. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer - drug screening. *Journal of the National Cancer Institute* 82(13), 1107-1112.
- Suffness M, Pezzuto, JM. (1991). Assays related to cancer drug discovery, in: Methods in Plant Biochemistry. (Eds.), Biological Techniques. London: Academic Press, pp. 71-131.
- Um YR, Kong CS, Lee JI, Kim YA, Nam TJ, Seo Y. (2010). Evaluation of chemical constituents from *Glehnia littoralis* for antiproliferative activity against HT-29 human colon cancer cells. *Process Biochemistry* 45, 114-119.
- Webster GL. (1994). Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 81, 33-144.
- Zani CL, Chaves PPG, Queiroz R, Mendes NM, Oliveira AB, Cardoso JE, Anjos AMG, Grandi TS. (1995). Brine shrimp lethality assay as a prescreening system for anti-*Trypanosoma cruzi* activity. *Phytomedicine* 2, 47-50.

8. Conclusão

8. CONCLUSÃO

Os resultados mostram que as espécies e/ou partes indicadas nos levantamentos etnofarmacológicos, especificamente da Caatinga, podem servir de guia para a procura de compostos bioativos e as plantas com grande potencial geralmente apresentam altos níveis de compostos fenólicos, o que parece explicar, em parte, o uso popular destas plantas, cujas partes indicadas apresentaram resultados mais elevados de conteúdo fenólico. Contudo, nos testes fitoquímicos de alguns órgãos vegetais não foram observados conteúdo fenólico que justifique o uso popular, o que nos leva a acreditar que, nestes casos, outros grupos químicos estão envolvidos nas atividades terapêuticas. A atividade antimicrobiana do extrato bruto e frações das cascas de *C. quercifolius* sugere que os diferentes mecanismos de resistência das cepas de *S. aureus* e *S. coagulase* negativa não oferecem proteção contra as substâncias presentes na espécie. Também ficou claro que os extratos brutos de *Cnidocolus* possuem potencial antiproliferativo e citotóxico, entretanto, também apresentaram elevada toxicidade frente às larvas de *A. salina*, o que sugere moderação em relação ao uso popular.

Todos estes resultados são bastante promissores e motivam a realização de estudos de isolamento dos constituintes químicos responsáveis por tais atividades, visto que no extrato há uma grande quantidade de substâncias e depois de isolados podem ter seu potencial medicinal melhor avaliado, possibilitando uma redução na concentração e aumento da eficiência, o que poderá contribuir com o arsenal terapêutico no futuro.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABDULLAEV, et al. Pattern of childhood cancer mortality in Mexico. **Archives of Medical Research**, v.31, p.526-531, 2000.
- AGRA, M.F. et al. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p.114-140, 2007a.
- AGRA, M.F. et al. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p.383-395, 2007b.
- AGRA, M.F. et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.3, p.472-508, 2008.
- AHMAD, I.; BEG, A. Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, v.74, n.2, p.113-123, 2001.
- ALBUQUERQUE, U. P. **Folhas Sagradas: as plantas litúrgicas e medicinais nos cultos afro-brasileiros**. Recife: Ed. Universitária UFPE, 1997. 195p.
- 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. et al. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.110, p.76-91, 2007a.
- 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, 2007b.
- ALBUQUERQUE, U.P.; ANDRADE, L.H.C. Uso de recursos vegetais da Caatinga: o caso do agreste do estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil). **Interciência**, v.27, n.7, p.336-346, 2002.

ALMEIDA, C. F. C. B. R. et al. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the Caatinga (Northeast Brazil). **Journal of Arid Environments**, v.62, n.1, p.127-142, 2005.

ARNAO, M. B. et al. A method to measure antioxidant activity in organic media: application to lipophilic vitamins. **Redox Report**, v.5, n.6, p.365-370, 2000.

BLOIS, M. S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. **Nature**, v.181, p.1199-1200, 1958.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v.55, n.3, p.37-39, 2003.

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

CHEW, Y.L. et al. Assessment of in vitro antioxidant capacity and polyphenolic composition of selected medicinal herbs from Leguminosae family in Peninsular Malaysia. **Food Chemistry**, v.116, p.13-18, 2009.

DANTAS, A. L. A. et al. In Vitro Study of *Vellozia pusilla* Pohl (Velloziaceae), a Brazilian Plant Species: Antitumoral Activity and Labeling of Blood Elements. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.48, p.57-61, 2005.

DELAZAR, A. et al. Chrozophorin: a new acylated flavone glucoside from *Chrozophora tinctoria* (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.3, p.286-290, 2006.

DUARTE, M.C.T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista Multiciência**, v.7, p.1-16, 2006.

ENDO, Y. et al. Favelanone, a novel tetracyclic cyclopropane derivative from the Brazilian plant, *Cnidocolus phyllacanthus*. **Tetrahedron Letters**, v.32, n.40, p.5555-5558, 1991b.

ENDO, Y. et al. Favelines, novel tricyclic benzocycloheptenes with cytotoxic activities from Brazilian plant, *Cnidocolus phyllacanthus*. **Tetrahedron Letters**, v.32, n.26, p.3083-3086, 1991a.

ENDO, Y. et al. Neofavelanone, A novel tetracyclic cyclobutene derivative from the Brazilian plant, *Cnidocolus phyllacanthus*. **Tetrahedron Letters**, v.33, n.3, p.353-356, 1992.

GAZZANI, G. et al. Protective activity of water soluble components of some common diet vegetables on rat liver microsomes e the effect of thermal treatment. **Journal of Biology and Chemistry**, v.46, p.4123-4127, 1998.

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

HIGDON J.V.; FREI, B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism and antioxidant functions. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.43, n.1, p.89-143, 2003.

LEMOS, T.L.G. et al. Terpenoids from *Cnidocolus phyllacanthus* Pax et Hoff. **Journal of the Brazilian Chemistry Society**, v.2, n.3, p.105-110, 1991.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Vol. 2. 2ª Ed. São Paulo: Plantarum, 1998. 352p.

LUNA, J. S. et al. A study of larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, p.199-206, 2005.

MCLAUGHLIN. J.L. Crown gall tumours on potato discs and brine shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractions. In DEY, P.M.; HARBONE, J.B. (eds.). **Methods in Plant Biochemistry**. New York: Academic Press, p. 1-32, 1991.

MELO, A.L.; SALES, M.F. O gênero *Cnidocolus* Pohl (Crotonoideae-Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasílica**, v.22, n.3, p.806-827, 2008.

MELO, E.A. et al. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Ciência & Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.3, p.639-644, 2006.

MEYER, B.N. et al. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medida**, v.45, p.31-34, 1982.

OHTA, T. et al. Absolute stereochemistry of benzocycloheptenone derivatives from *Cnidocolus phyllacanthus*. **Tetrahedron Letters**, v.50, n.19, p.5659-5668, 1994.

PRATT, D. E.; BIRAC, P. M. Source of antioxidant activity of soybeans and soy products. **Journal of Food Science**, v.44, p.1720-1722, 1979.

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

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, p.275-280, 2005.

SILVER, L.L.; BOSTIAN. K.A. Discovery and development of new antibiotics: the problem of antibiotic resistancet. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.37, n.3, p.377-383, 1993.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. 1ª Ed.** São Paulo: Instituto Plantarum, 2005. 640p.

VEIGA JUNIOR, V.F. et al. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v.28, n.3, p.519-528, 2005.

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

ZANI, C. L. et al. Brine shrimp lethality assay as a prescreening system for anti-*Trypanosoma cruzi* activity. **Phytomedicine**, v.2, p.47-50. 1995.

ANEXOS

Full Length Research Paper

Phenolic content and antioxidant capacity of four *Cnidocolus* species (Euphorbiaceae) used as ethnopharmacologicals in Caatinga, Brazil

Tadeu J. S. Peixoto Sobrinho^{1*}, Valérium T. N. A. Castro¹, Antonio M. Saraiva², Diego M. Almeida¹, Elvis A. Tavares¹ and Elba L. C. Amorim¹

¹Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

²Laboratório de Análises Microbiológicas, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

Accepted 21 November, 2011

This study aimed to investigate the phenolic content and antioxidant capacity of four species of *Cnidocolus* (*C. infestus* Pax & K. Hoffm., *C. pubescens* Pohl, *C. quercifolius* Pohl and *C. urens* [L.] Arthur) used as ethnopharmacologicals in the Caatinga. The total phenolic content (TPC), total tannin content (TTC) and total flavonoid content (TFC) were analyzed by spectrophotometric method. The antioxidant activity (AOA) was measured using the qualitative antioxidant assay (QAA), the free-radical scavenging assay (DPPH assay) and the ferrous-ion chelating (FIC) assay. The extract of the leaves of *C. pubescens* had the highest levels of TPC, TFC and TTC. Extracts from the roots of *C. infestus* showed the highest antioxidant activity, while extracts from the roots of *C. pubescens* showed the highest level of chelating activity. The AOA was correlated with TPC, TFC and TTC, but these were not statistical. The parties cited by the population had on average high levels of TPC, TTC, TFC and AOA, while the parties non-cited had high levels of FIC. The results show that the antioxidant activity of plants of the genus *Cnidocolus*, specifically of the Caatinga, appears to be associated with levels of phenolic compounds and these may explain its popular use.

Key words: 2,2-diphenyl 1-2-picryl-hydrazyl (DPPH), FIC, flavonoids, Folin-Ciocalteu, polyphenols, tannins.

INTRODUCTION

Many ethnopharmacological studies in Brazil have shown that a large number of plant species are used by the local population to treat their diseases; particularly, the family Euphorbiaceae has great medicinal use, as well as the highly cited genus *Cnidocolus*. This genus, popularly known as "urtiga" or "favela", has 50 to 75 representatives, which are predominantly concentrated in tropical America, almost exclusively in Mexico and Northeastern Brazil (Webster, 1994). The distinct feature of this genus is the presence of stinging trichomes that

when stimulated by contact with skin, can cause severe and localized pain (Melo and Sales, 2008).

In Caatinga, the genus is represented by four *Cnidocolus* medicinal species *C. infestus* Pax & K. Hoffm., *C. pubescens* Pohl, *C. quercifolius* Pohl and *C. urens* [L.] Arthur), which are utilized for a variety of indications, including an anti-inflammatory, an antitumor agent for the genito-urinary system, an antiseptic and to treat kidney infections, dermatological and ophthalmic lesions, bruises, fractures, wounds, warts, dysentery, hemorrhage, appendicitis and rheumatism (Agra et al., 2008; Albuquerque, 2006; Albuquerque et al., 2007; Almeida et al., 2005).

Current studies indicate that many of these folk used, may have high levels of antioxidant activity (Dreifuss et

*Corresponding author. E-mail: tadeu1903@yahoo.com.br. Tel: +55 81 21268511. Fax: +55 81 21268510.

al., 2010; Hevesi et al., 2009). Antioxidants inhibit the formation of damaging reactive oxygen species in the body (Velioglu et al., 1998). Antioxidants can also inhibit the peroxidation of biological molecules by chelating transition metals that generate hydroxyl radicals through the Haber-Weiss and Fenton reactions (Chew et al., 2009). Phenolic compounds, represented mainly by tannins and flavonoids, stand out as the major group of natural antioxidants. They act as efficient scavengers of free radicals and, due to their ability to act as hydrogen donors, they interrupt oxidative chain reactions (Delazar et al., 2006; Higdon and Frei, 2003). A study by Mosquera et al. (2007) evaluated the antioxidant activity of four plant families of Colombian biodiversity (Asteraceae, Euphorbiaceae, Rubiaceae and Solanaceae). The study found that, of the 75 plant extracts that were evaluated, 9 (12%) had IC₅₀ values of less than 200 µg/ml and 8 of these species belonged to the family Euphorbiaceae (88.8%).

The purpose of this study was to investigate the phenolic content and antioxidant capacity of four species of *Cnidocolus* referenced in ethnopharmacological surveys performed in the Caatinga, comparing the results of the cited and non-cited parties popularly as ethnopharmacologicals.

MATERIALS AND METHODS

Study area and plant material

Determination of the samples of plant species (*C. infestus*, *C. pubescens*, *C. quercifolius* and *C. urens*) to be collected was based on the results of previous ethnopharmacological surveys. For each plant species, parts of the plant traditionally used for folk remedies and parts, which are not traditionally used, were collected. The collections were made in the regions of Caatinga of Northeastern Brazil. In the municipality of Altinho-Pernambuco (08°35'13"S × 36°05'34"W), samples of *C. urens* were collected on July 9, 2008. Samples of *C. infestus* and *C. quercifolius* were collected in the municipality of Soledade-Paraíba (07°04'13"S × 36°20'52"W) on September 19, 2008. Samples of *C. pubescens* were collected in Buíque-Pernambuco (08°37'23"S × 37°09'21"W) on September 27, 2008. The voucher specimens were collected and incorporated into the Herbarium UFP Geraldo Mariz, Department of Botany, Federal University of Pernambuco, numbers 55.098-55.101.

Chemicals and reagents

Anhydrous sodium carbonate, casein, ferrous sulfate heptahydrate, glacial acetic acid, methanol and pyridine were purchased from Vetec (Brazil). Aluminum chloride hexahydrate was purchased from Honeywell (USA). The reagents 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 3-(2-pyridyl)-5,6-di(2-furyl)-1,2,4-triazine-4',4''-disulfonic acid disodium salt (Ferrozine) and Folin-Ciocalteu phenol reagent were obtained from Fluka (Switzerland). The standards ascorbic acid, ethylenediaminetetraacetic acid dihydrate (EDTA), rutin and tannic acid were purchased from Vetec (Brazil).

Weights were measured on a Shimadzu analytical balance (AX200) and absorbance readings were performed on a spectrophotometer Shimadzu UV-Vis (UV mini 1240).

Preparation of extracts

The samples of *Cnidocolus* species were stabilized in an oven for 3 days at 45 ± 5°C, powdered utilizing a Willy mill with vertical knives and standardized by size using sieves, yielding a particle size of 1 mm (16 Mesh). To quantify the phenolic content, the powdered samples (500 mg) were extracted by heating with 50 ml of methanol (80%, v/v) on a hot plate for 30 min, obtaining a final concentration of 10 mg/ml. To evaluate the antioxidant, the pulverized samples were macerated with methanol (80%, v/v) for 48 h and the extracts were obtained following concentration of the filtrates in a rotary evaporator under reduced pressure, obtaining yields between 4.01 and 22.48%. The choice of methanol has been recommended for extraction of phenolic compounds in plant tissues due to its ability to inhibit the oxidation of polyphenols, which may alter the antioxidant activity (Yao et al., 2004).

Determination of the total phenolic content (TPC) and total tannin content (TTC)

The TPC of the extracts was determined by the Folin-Ciocalteu method and the residual phenolic content was determined by the method of precipitation of casein followed by Folin-Ciocalteu, where the TTC is the difference between the levels of the total and residual phenols (Amorim et al., 2008). The TPC was calculated from 1 ml of diluted extract (10 mg/ml, w/v), 5 ml of aqueous solution of Folin-Ciocalteu (10%, v/v), 10 ml of aqueous solution of sodium carbonate (7.5%, w/v) and 84 ml of distilled water. The solution was allowed to stand in the dark for 30 min and the absorbance was measured at 760 nm. To calculate the residual phenolic content, 15 ml of diluted extract (10 mg/ml, w/v) was agitated for 3 h with 1 g of casein, filtered and adjusted to a final volume of 25 ml with distilled water. The residual phenolic content was determined with 5 ml of the filtrate by the Folin-Ciocalteu method. TPC and TTC were expressed as 1 mg of tannic acid per each gram of sample (mg TAE/g). The samples were evaluated with six replicates. The calibration equation of tannic acid was $y = 0.074x + 0.0044$ ($R^2 = 0.9993$).

Determination of total flavonoid content (TFC)

The TFC of the extracts was estimated by a colorimetric method based on the formation of a flavonoid-aluminum complex (Peixoto Sobrinho et al., 2008). The TFC was calculated using 1 ml of diluted extract (10 mg/ml, w/v), 0.6 ml of glacial acetic acid, 10 ml of pyridine in methanol (20%, v/v), 2.5 ml of aluminum chloride in methanol (5%, w/v) and 10.9 ml of distilled water. The solution was allowed to stand in the dark for 30 min and the absorbance was measured at 420 nm. The results were expressed as 1 mg of rutin per each gram of sample (mg RE/g). Six replicated samples were evaluated. The rutin calibration equation was $y = 0.0251x + 0.0139$ ($R^2 = 0.9994$).

Evaluation of antioxidant activity (AOA)

Qualitative antioxidant assay (QAA)

The QAA was performed using the methodology described by Espin et al. (2000). Aliquots of the extract (20 mg/ml) and the positive controls rutin and ascorbic acid (10.0 mg/ml) were applied to thin layer plates of silica gel. The mobile phase was ethyl acetate: formic acid: glacial acetic acid: water (100:11:11:26). After the solvent was completely dry, the plates were sprayed with

methanolic solution of DPPH (40 µg/ml, w/v). The antioxidant activity was qualitatively measured by visually scoring the formation of yellow spots in contrast to the deep violet. The results were expressed as values from 0 to 3, with 0 being the inactive sample and 3 for sample that showed the greatest activity.

Free-radical scavenging activity (DPPH assay)

The DPPH assay was performed in triplicate, based on the method described by Sousa et al. (2007) and modified by Saraiva et al. (2011). Different concentrations of the extract or control (25 to 250 µg/ml), in amount of 0.5 ml, were added to 3 ml of DPPH in methanol (40 µg/ml, w/v). The solution was allowed to stand for 30 min in the dark and then the absorbance was measured at 517 nm. Measurements were compared with a negative control solution of DPPH and were then used as blank concentrations of 0.5 ml of the extract or control with 3 ml of methanol. The final result of the DPPH assay was calculated from a calibration curve obtained for the percentage of radical scavenging activity (Equation 1) versus concentrations of extract or control, and it was expressed as the IC₅₀, that is, the inhibitory concentration of the sample required to reduce the absorbance of the negative control by 50%.

$$\text{RSA (\%)} = \frac{\text{ABS}_{\text{negative control}} - (\text{ABS}_{\text{sample}} - \text{ABS}_{\text{blank}})}{\text{ABS}_{\text{negative control}}} \times 100 \quad (1)$$

Results were also expressed as ascorbic acid equivalent antioxidant capacity (AEAC) in mg/100 g and were calculated by Equation 2. The IC₅₀ of ascorbic acid used for calculation of AEAC was 26.04 ± 1.16 µg/ml.

$$\text{AEAC (mg AA/100g)} = \frac{\text{IC}_{50 \text{ acid ascorbic}}}{\text{IC}_{50 \text{ sample}}} \times 100 \quad (2)$$

The ferrous-ion chelating (FIC) assay

The FIC assay was performed in triplicate as described by Chew et al. (2009). Different dilutions of the extract (1000 to 7000 µg/ml) or control (10 to 100 µg/ml), in amount of 1 ml, were mixed with 1 ml of FeSO₄ in methanol (0.1 mM, v/v), followed by 1 ml of ferrozine in methanol (0.25 mM, v/v). The solution was allowed to stand for 10 min in the dark and the absorbance was measured at 562 nm. Measurements were compared with a negative control consisting of 1 ml of methanol (75%, v/v), 1 ml of FeSO₄ in methanol (0.1 mM, w/v) and 1 ml of ferrozine in methanol (0.25 mM, w/v). The extract or EDTA was used to dilute the samples with 2 ml of methanol (blank). The capacity of the sample to chelate ferrous ions was calculated from a calibration curve obtained for the percentage of chelating activity (Equation 3) versus concentrations of extract or control, and this capacity was expressed as the IC₅₀, that is, the sample concentration required to reduce absorbance of the negative control by 50%.

$$\text{CA (\%)} = \frac{\text{ABS}_{\text{negative control}} - (\text{ABS}_{\text{sample}} - \text{ABS}_{\text{blank}})}{\text{BSA}_{\text{negative control}}} \times 100$$

Statistical analysis

The Kolmogorov-Smirnov test confirmed the normality of the obtained data. Data were expressed as means ± standard deviation and were analyzed using ANOVA (one-way followed by a multiple comparisons Tukey test). A Pearson correlation test was used to

compare the phenolic content with the inhibitory concentrations of the samples. $p < 0.05$ value was considered as significant difference. The GraphPad Prism 5 software was used to perform statistical analysis and graphs.

RESULTS AND DISCUSSION

Phenolic content

Overall, there was a wide variation between the levels of TPC in the extracts analyzed, with the highest levels in the leaves of *C. pubescens*, while the aerial parts of *C. infestus* and the bark of *C. quercifolius* contained the lowest levels. Leaf extracts of *C. pubescens* had the largest TTC (about 40% of total phenols), while the aerial parts of *C. infestus* and roots of *C. quercifolius* did not contain detectable tannins. The roots of *C. pubescens* did not contain detectable flavonoids; however, their leaves exhibited the highest content of flavonoids. The Pearson correlation test showed a significant relationship between TPC × TTC and TPC × TFC ($r = 0.9200$ and $r = 0.7903$, respectively); however, TTC and TFC did not correlate statistically. The results of the phenolic content are as shown in Table 1.

Our results show that the phenolic content of *Cnidoscopus* samples are far above those found by Kuti and Konuru (2004) for *Cnidoscopus aconitifolius* (Mill.) IM Johnst and *Cnidoscopus chayamansa* McVaugh, which had measured TPCs of 2.91 ± 0.02 and 1.22 ± 0.02 mg/g, respectively. Another study of leaf samples from *C. aconitifolius*, where the evaluated samples were fresh and treated post-harvest, showed TPC ranging from 7.0 ± 1.0 to 12.0 ± 2.0 mg/g (Obboh, 2005). Previously, Ogundade et al. (2009) analyzed a set of vegetables consumed in Nigeria and they confirmed that *C. aconitifolius* has a TPC of 29.4 mg/g.

These results indicate that the popular use of these species may be associated with the phenolic content of the plant parties cited in the ethnopharmacological surveys. For example, the results from the extracts of the leaves of *C. pubescens* that are compared with samples not listed in ethnopharmacological studies suggest that choice should be linked to its high phenolic content (Albuquerque et al., 2007; Almeida et al., 2005). In recent years, research on plants of Caatinga that are traditionally used to treat various diseases has identified promising pharmacological activities. These activities have been generally attributed to the presence of phenolic substances because several species that have medicinal uses also contain high levels of these compounds (Almeida et al., 2005; Monteiro et al., 2006). For example, a study by Araújo et al. (2008), in a rural community, observed that there is a strong association between the content of tannins and the healing and anti-inflammatory activities effects popularly attributed to the plants. However, when the levels of flavonoids of the plants in folk remedies and randomly selected plants were

Table 1. Total phenolic content (TPC), total tannins content (TTC) and total flavonoids content (TFC) of the samples of four species of the genus *Cnidoscopus* used as ethnopharmacologicals in the Caatinga, Northeastern Brazil.

Species (Voucher number)	Part used	Popular usage*	TPC (mg TAE/g)	TTC (mg TAE/g)	TFC (mg RE/g)
<i>C. infestus</i> Pax & K. Hoffm. (55.101)	Aerial parts	Non-cited	4.02 ± 0.15 ^a	ND	3.36 ± 0.15 ^a
	Roots	Cited	16.31 ± 0.19 ^b	5.99 ± 0.14 ^a	1.75 ± 0.15 ^b
<i>C. pubescens</i> Pohl (55.100)	Leaves	Cited	23.00 ± 0.10 ^c	8.72 ± 0.16 ^b	39.37 ± 0.57 ^c
	Roots	Non-cited	8.96 ± 0.12 ^d	3.70 ± 0.20 ^c	ND
<i>C. quercifolius</i> Pohl (55.099)	Barks	Cited	3.58 ± 0.16 ^a	ND	0.60 ± 0.05 ^b
	Leaves	Non-cited	18.32 ± 0.60 ^e	4.10 ± 0.24 ^c	26.51 ± 1.78 ^d
<i>C. urens</i> (L.) Arthur (55.098)	Aerial parts	Non-cited	12.10 ± 0.48 ^f	5.42 ± 0.79 ^a	0.89 ± 0.06 ^b
	Roots	Cited	7.21 ± 0.28 ^g	2.10 ± 0.31 ^d	4.86 ± 0.28 ^e

Values are mean ± standard deviation. Values followed by the same letter in column are not statistically different (n = 6, p < 0.05); TAE = tannic acid equivalent; RE = rutin equivalent. ND = not detected. *Cited or non-cited as folk remedy in ethnopharmacologic surveys.

Table 2. Free-radical scavenging (DPPH assay) and ferrous-ion chelating (FIC) activity of samples from different parts of four species of the *Cnidoscopus* identified in ethnopharmacological surveys in the Caatinga, Northeastern Brazil.

Standard/Species	Part used	Yield (%)	Antioxidant activity (AOA)			
			Free-radical scavenging (DPPH assay)			FIC assay
			QAA	IC ₅₀ (µg/ml)	AEAC (mg AA/100g)	(IC ₅₀ µg/ml)
Rutin	-	-	-	22.96 ± 1.99 ^a	114.16 ± 9.84 ^a	-
EDTA	-	-	-	-	-	15.26 ± 0.58 ^a
<i>C. infestus</i> Pax & K. Hoffm.	Aerial parts	7.73	0	1741.68 ± 53.06 ^b	1.50 ± 0.05 ^d	239.42 ± 39.25 ^b
	Roots	9.08	3	122.87 ± 5.37 ^c	21.23 ± 0.94 ^c	398.04 ± 19.24 ^c
<i>C. pubescens</i> Pohl	Leaves	14.23	3	179.15 ± 4.03 ^d	14.54 ± 0.33 ^d	256.25 ± 13.28 ^b
	Roots	4.55	2	152.92 ± 3.49 ^e	17.04 ± 0.40 ^e	90.29 ± 7.12 ^d
<i>C. quercifolius</i> Pohl	Barks	9.30	0	1867.24 ± 53.66 ^f	1.40 ± 0.04 ^b	299.37 ± 14.60 ^e
	Leaves	22.48	2	426.66 ± 42.66 ^g	6.15 ± 0.59 ^f	361.73 ± 14.58 ^c
<i>C. urens</i> (L.) Arthur	Aerial parts	10.19	1	1361.41 ± 76.06 ^h	1.92 ± 0.11 ^b	177.69 ± 11.84 ^f
	Roots	4.01	1	423.07 ± 34.43 ^g	6.19 ± 0.50 ^f	278.68 ± 35.88 ^{be}

Values are expressed as mean ± standard deviation. Values followed by the same letter in column are not statistically different (n = 6, p < 0.05); QAA = Qualitative antioxidant assay; 0 = inactive; 1 = low active; 2 = moderately active; 3 = very active; IC₅₀ = inhibitory concentration; AEAC = ascorbic acid equivalent antioxidant capacity; FIC = ferrous-ion chelating activity.

compared, no significant differences were observed. This result suggests that the healing and anti-inflammatory indications of medicinal plants in the community are not related to flavonoids.

Antioxidant activity

The results of the QAA analysis of the extracts showed that several *Cnidoscopus* samples contained antioxidant activity. Samples of roots from *C. infestus* and leaves

from *C. pubescens* showed the highest level of antioxidant activity, whereas samples of aerial parts from *C. infestus* and bark from *C. quercifolius* did not have detectable antioxidant activity (Table 2).

Plant phenolics constitute one of the major groups of compounds acting as primary antioxidant or free radical terminators (Cao et al., 1997), because it inhibit directly the formation of damaging reactive oxygen species at body (Velioglu et al., 1998). The DPPH assay evaluates the ability of the extract to donate hydrogen or to scavenge free radicals (Almey et al., 2010).

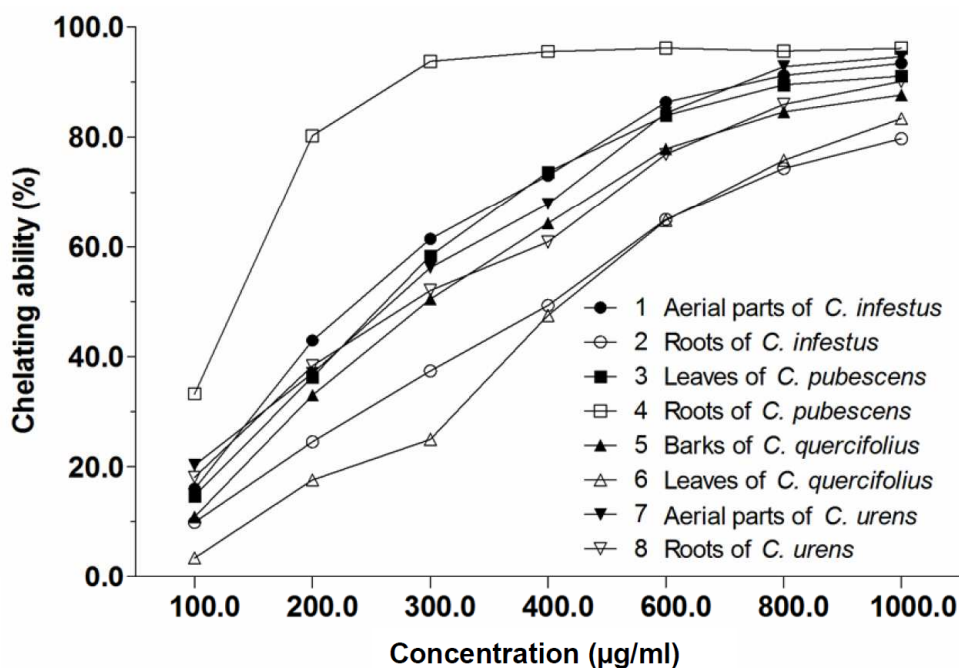


Figure 1. Results of the ferrous-ion chelating (FIC) assay of different parts of four species of *Cnidocolus* from Northeastern Brazil.

Differences were observed in the radical scavenging activity of the species evaluated (Table 2). According to Melo et al. (2010), the results of the antioxidant activity can be classified based on the performance of the crude extract as compared to the control used: 1) good activity ($IC_{50} < 68.88 \mu\text{g/ml}$, up to three times the inhibitory concentration of the control); 2) moderate activity ($68.88 \mu\text{g/ml} < IC_{50} < 160.72 \mu\text{g/ml}$, between three and seven times the inhibitory concentration of the control); 3) low activity ($IC_{50} > 160.72 \mu\text{g/ml}$, exceeding seven times the inhibitory concentration of the control). Using this classification, the extract from the roots of *C. infestus* and *C. pubescens* showed moderate free-radical scavenging activity, while the other plant species showed low antioxidant activity.

The results of the QAA and the free-radical scavenging assay (DPPH assay) were highly correlated ($r = -0.8927$), suggesting that qualitative analysis can be used to preliminarily evaluate the free-radical activity of plant tissues, serving as a predictor for the discovery of new antioxidant compounds. The Pearson correlation test showed a negative relationship between the inhibitory concentrations (IC_{50}) of DPPH \times TPC ($r = -0.6776$), TTC ($r = -0.6779$) and TFC ($r = -0.4112$). These results suggest, in part, that the higher the phenolic content of *Cnidocolus* samples, the higher the antioxidant activity.

Differently from the activity performed by DPPH (primary antioxidant), the FIC assay is considered

secondary antioxidant (Chan et al., 2007), because it act in the inhibition of the peroxidation of biological molecules by chelating transition metals that generate hydroxyl radicals through the Haber-Weiss and Fenton reactions, preventing the formation of reactive oxygen species (Chew et al., 2009).

The Figure 1 shows that the chelating capacity of the extracts increased proportionally to the concentration; however, for the extract of the roots of *C. pubescens*, the chelating capacity was statistically stabilized when the concentration reached $300 \mu\text{g/ml}$ ($p < 0.0001$). The highest chelating activity was found for the extract of the roots of *C. pubescens* (Table 2), while the extract from the roots of *C. infestus* and the leaves of *C. quercifolius* showed low chelating activity. The Pearson correlation test did not reveal any relationship between FIC assay and the phenolic content and free-radical scavenging activity.

Much research has shown a significant relationship between the phenolic content in plant extracts and antioxidant activity. Nazaruk (2008) observed a strong relationship between the methanol extracts ($R^2 = 0.9523$) and ethyl acetate fractions ($R^2 = 0.8048$) of leaves and flowers of five species of *Cirsium* (*Asteraceae*) from Northeastern Poland. In addition, a separate study showed a strong relationship between the total antioxidant capacity and the TPC and TFC of the ethyl acetate fractions extracted from six species of *Ficus*

(*Moraceae*). The butanol fractions showed a strong association between TPC and TFC, suggesting that these groups are responsible for the antioxidant capacity of the samples (Saleh and Hameed, 2009).

Some authors have proposed that the antioxidant activity of the flavonoids is due to the presence of an aromatic hydroxyl group. For example, the flavonols rutin and quercetin have higher antioxidant activities than ascorbic acid, which is considered a powerful reducer (Soares et al., 2005). However, a study by Malenčić et al. (2008) with acetone extracts of twenty samples from the hybrid plant *Glycine max* (L.) Mer. (*Fabaceae*) showed no correlation between the antioxidant activity and the TFC; however, a correlation was observed for polyphenols ($r = 0.6696$), tannins ($r = 0.7465$) and proanthocyanidins ($r = 0.6538$).

Al-Duais et al. (2009) examined TPC using different antioxidant methodologies (DPPH, ORAC, TEAC and FRAP) and showed that phenolic compounds of *Cyphostemma digitatum* (Forssk.) Desc. (*Vitaceae*) are not responsible for the antioxidant capacity of the species. Other authors also found that the presence of phenolic compounds may be related to the chelating activity. For example, Rumbaoa et al. (2009) assessed the five varieties of *Ipomoea batatas* (L.) Lam (*Convolvulaceae*) and observed a correlation between TPC and FIC ($r = -0.800$).

Conclusion

Our results show that the species identified in the ethnopharmacological surveys conducted specifically in Caatinga can serve as a guide to search for compounds with antioxidant activity. The levels of polyphenolic compounds in these species may explain, in part, the popular use of these plants, because the plants popularly used as folk remedies had a higher level of antioxidant activity.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank FACEPE, the scholarship awarded to T. J. S. Peixoto Sobrinho, MEC/SESU for the scholarships awarded to V. T. N. A. Castro and A. M. Saraiva, PIBIC/UFPE/CNPq for the scholarships granted to D. M. de Almeida and E.A. Tavares.

REFERENCES

- Agra MF, Silva KN, Basílio IJLD, Freitas PF, Barbosa-Filho JM (2008). Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Rev. Bras. Farmacogn.* 18(3): 472-508.
- Albuquerque UP (2006). Re-examining hypotheses concerning the use and knowledge of medicinal plants: a study in the Caatinga vegetation of NE Brazil. *J. Ethnobiol. Ethnomed.*, 2(30): 1-10.
- Albuquerque UP, Medeiros PM, Almeida ALS, Monteiro JM, Lins Neto EMF, Melo JG, Santos JP (2007). Medicinal plants of the Caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. *J. Ethnopharmacol.*, 114: 325-354.
- Al-Duais M, Müller L, Böhm V, Jetschke G (2009). Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: use of different assays. *Eur. Food Res. Technol.*, 228: 813-821.
- Almeida CFCBR, Silva TCL, Amorim ELC, Maia MBS, Albuquerque UP (2005). Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the Caatinga (Northeast Brazil). *J. Arid Environ.*, 62(1): 127-142.
- Almey AAA, Khan CAJ, Zahir IS, Suleiman KM, Aisyah MR, Rahim KK (2010). Total phenolic content and primary antioxidant activity of methanolic and ethanolic extracts of aromatic plants' leaves. *Int. Food Res. J.*, 17: 1077-1084.
- Amorim ELC, Nascimento JE, Monteiro JM, Peixoto Sobrinho TJS, Araújo TAS, Albuquerque UP (2008). A simple and accurate procedure for the determination of tannin and flavonoid levels and some applications in ethnobotany and ethnopharmacology. *Functional Ecosystems Communities*. 2(1): 88-94.
- Araújo TAS, Alencar NL, Amorim ELC, Albuquerque UP (2008). A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. *J. Ethnopharmacol.* 120: 72-80.
- Cao G, Sofic E, Prior RL (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. *Free Radical Biol. Med.*, 22: 749-760.
- Chan EWC, Lim YY, Chew YL (2007). Antioxidant activity of *Camellia sinensis* leaves and tea from a lowland plantation in Malaysia. *Food Chem.*, 102: 1214-1222.
- Chew YL, Goh JK, Lim YY (2009). Assessment of in vitro antioxidant capacity and polyphenolic composition of selected medicinal herbs from Leguminosae family in Peninsular Malaysia. *Food Chem.*, 116: 13-18.
- Delazar A, Talischi B, Nazemiyeh H, Rezazadeh H, Nahar L, Sarker SD (2006). Chrozophorin: a new acylated flavone glucoside from *Chrozophora tinctoria* (Euphorbiaceae). *Rev. Bras. Farmacogn.*, 16(3): 286-290.
- Dreifuss AA, Bastos-Pereira AL, Ávila TV, Soley BS, Rivero AJ, Aguilar JL, Acco A (2010). Antitumoral and antioxidant effects of a hydroalcoholic extract of cat's claw (*Uncaria tomentosa* Willd. Ex Roem. & Schult) in an *in vivo* carcinosarcoma model. *J. Ethnopharmacol.*, 130: 127-133.
- Espin JC, Soler-Rivas C, Wichers HJ (2000). Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils e oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *J. Agric. Food Chem.*, 48(3): 648-656.
- Hevesi BT, Houghton PJ, Habtemariam S, Kéry Á (2009). Antioxidant and antiinflammatory effect of *Epilobium parviflorum* Schreb. *Phytother. Res.*, 23: 719-724.
- Higdon JV, Frei B (2003). Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism and antioxidant functions. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 43(1): 89-143.
- Kuti JO, Konuru HB (2004). Antioxidant capacity and phenolic content in leaf extracts of tree spinach (*Cnidoscolus* spp.). *J. Agric. Food Chem.*, 52: 117-121.
- Malenčić D, Maksimović Z, Popović M, Miladinović J (2008). Polyphenol contents and antioxidant activity of soybean seed extracts. *Bioresour. Technol.*, 99: 6688-6691.
- Melo AL, Sales MF (2008). O gênero *Cnidoscolus* Pohl (Crotonoideae-Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. *Acta Bot. Bras.*, 22: 806-827.
- Melo JG, Araújo TAS, Castro VTNA, Cabral DLV, Rodrigues MD, Nascimento SC, Amorim ELC, Albuquerque UP (2010). Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid northeastern Brazil. *Molecules*, 15: 8534-8542.
- Monteiro JM, Albuquerque UP, Lins-Neto EMF, Araújo EL, Amorim ELC (2006). Use patterns and knowledge of medicinal species among two rural communities in Brazil's semi-arid northeastern region. *J. Ethnopharmacol.*, 105: 173-186.
- Mosquera OM, Correa YM, Buitrago DC, Niño J (2007). Antioxidant activity of twenty-five plants from Colombian biodiversity. *Mem. I. Oswaldo Cruz.*, 102(5): 631-634.

- Nazaruk J (2008). Antioxidant activity and total phenolic content in *Cirsium* five species from northeast region of Poland. *Fitoterapia*, 79: 194-196.
- Oboh G (2005). Effect of some post-harvest treatments on the nutritional properties of *Cnidioscolus acotifolus* leaf. *Pak. J. Nutr.*, 4(4): 226-230.
- Ogunlade I, Tucker G, Fisk I, Ogunlade A (2009). Evaluation of antioxidant activity and vitamin E profile of some selected indigenous vegetables in Nigerian diet. *J. Food Agric. Environ.*, 7(2): 143-145.
- Peixoto Sobrinho TJS, Silva CHTP, Nascimento JE, Monteiro JM, Albuquerque UP, Amorim ELC (2008). Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonóides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. *Braz. J. Pharm. Sci.*, 44(4): 683-689.
- Rumbaoa RGO, Cornago DF, Geronimo IM (2009). Phenolic content and antioxidant capacity of Philippine sweet potato (*Ipomoea batatas*) varieties. *Food Chem.*, 113: 1133-1138.
- Saleh ES, Hameed A (2009). Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian *Ficus* species leaf samples. *Food Chem.*, 114: 1271-1277.
- Saraiva AM, Castro RHA, Cordeiro RP, Peixoto Sobrinho TJS, Castro VTNA, Amorim ELC, Xavier HS, Pisciotano MNC (2011). *In vitro* evaluation of antioxidant, antimicrobial and toxicity properties of extracts of *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardiaceae). *Afr. J. Pharm. Pharmacol.*, 5(14): 1724-1731.
- Soares DG, Erazza AC, Salvador M (2005). Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. *Braz. J. Pharm. Sci.*, 41(1): 95-100.
- Sousa CMM, Silva HR, Vieira Júnior GM, Ayres MCC, Costa CLS, Araújo DS, Cavalcante LCD, Barros EDS, Araújo PBM, Breão MS, Chaves MH (2007). Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quim. Nova.*, 30(2): 351-355.
- Velioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah BD (1998). Antioxidant activities and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J. Agric. Food Chem.*, 46: 4113-4117.
- Webster GL (1994). Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae. *Ann. Mo. Bot. Gard.*, 81: 33-144.
- Yao L, Jlang Y, Datta N, Singanusong R, Liu X, Duan J (2004). HPLC analyses of flavonols and phenolic acids in the fresh young shoots of tea (*Camellia sinensis*) grown in Australia. *Food Chem.*, 84: 253-263.