

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS APLICADA À SAÚDE

GRAZIELLE ESTEVES RIBEIRO

TRIAGEM FITOQUÍMICA, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE E
CITOTOXICIDADE DE EXTRATOS HIDROETANÓLICOS DE *Euphorbia cotinifolia*
(Leiteiro vermelho).

Alfenas/MG

2014

GRAZIELLE ESTEVES RIBEIRO

TRIAGEM FITOQUÍMICA, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE E
CITOTOXICIDADE DE EXTRATOS HIDROETANÓLICOS DE *Euphorbia cotinifolia*
(Leiteiro vermelho).

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicada à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Doenças infecciosas e parasitárias.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Kleber Chavasco

Co-orientadora: Dra. Ingridy Simone Ribeiro Cabral

Alfenas/MG

2014

Ribeiro, Grazielle Esteves.
Triagem fitoquímica, atividade antimicrobiana, antioxidante e citotoxicidade de extratos hidroetanólicos de *Euphorbia cotinifolia* (Leiteiro vermelho). / Grazielle Esteves Ribeiro - 2014.
64 f. -

Orientador: Jorge Kleber Chavasco.
Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.
Bibliografia.

1. *Euphorbia*. 2. Compostos fenólicos. 3. Antioxidantes.
4. Produtos com ação antimicrobiana. 5. Produtos biológicos.
I. Chavasco, Jorge Kleber. II. Título.

CDD: 616.9

GRAZIELLE ESTEVES RIBEIRO

TRIAGEM FITOQUÍMICA, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE E
CITOTOXICIDADE DE EXTRATOS HIDROETANÓLICOS DE *Euphorbia cotinifolia*
(Leiteiro vermelho).

Banca examinadora abaixo-assinada aprova a
Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia Aplicada à Saúde pela Universidade
Federal de Alfenas. Área de concentração:
Doenças infecciosas e parasitárias.

Aprovada em: 14/02/14

Profº. José Albeus Chaves

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:



Profº. Amanda Batorcia Franck Dias

Instituição: UNIFAL-MG

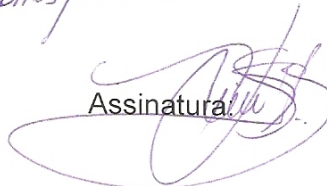
Assinatura:



Profº. Marcelo Roberto Gomes Picillo

Instituição: UNIFENAS

Assinatura:



Dedico a Deus, pois sem Ele eu nada seria. Aos meus pais Marlene e Raimundo, minha irmã Gisele e amigos pelo apoio e incentivo durante esta caminhada.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me dar a vida, força, saúde e sabedoria. Aos meus pais, pelo amor e incentivo. Essa conquista só foi possível pela dedicação de vocês.

Agradeço a Universidade Federal de Alfenas por disponibilizar os laboratórios e recursos para realização desse trabalho e ao Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicada à Saúde.

À FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Ao meu querido Orientador Dr. Jorge Kleber Chavasco pela paciência, compreensão e conhecimentos transmitidos.

A minha Co-orientadora Dr^a. Ingridy Simone Ribeiro Cabral pelo carinho e ensinamentos.

A minha amiga Natália Maria Noronha pela colaboração no trabalho.

Aos Professores Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho, Dr. Marcos José Marques, Dr. Marcelo Henrique dos Santos e Dra. Tati Ishikawa e aos técnicos de laboratório Ana Flávia da Silva e Silvia Helena Martelli Dias pela colaboração e disponibilização dos laboratórios.

A todos o meu muito obrigado e que Deus abençoe suas vidas.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais volta ao seu tamanho original”.
Albert Einstein.

RESUMO

Euphorbia cotinifolia apresenta muitas atividades biológicas sendo utilizada na medicina popular para cauterizar feridas e como um purgante em pequenas doses. O presente estudo teve como objetivo determinar o teor de compostos fenólicos e flavonoides, a atividade antimicrobiana, antioxidante e a toxicidade dos extratos hidroetanólicos de raiz, caule, folha e fruto de *E. cotinifolia*. Foi realizada triagem fitoquímica, dosagem de compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu, flavonoides pelo método de cloreto de alumínio e análise química por CLAE. A atividade antimicrobiana foi determinada pela técnica de difusão em ágar e a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de diluição em caldo utilizando cepas padrões. Foi determinada também a concentração microbicida mínima (CMM). A atividade antioxidante foi determinada pelo método do sequestro do radical livre DPPH. A citotoxicidade foi avaliada pelo método MTT em cultura celular BHK. Todos os extratos hidroetanólicos de *Euphorbia cotinifolia* apresentaram compostos fenólicos, bem como a presença de metabólitos secundários como taninos e flavonoides, atividade antimicrobiana e antioxidante. A análise em CLAE sugeriu a presença de ácido cafeico para os extratos de folha fresca e seca e demonstrou uma maior concentração de compostos fenólicos na folha seca. Nenhum dos extratos apresentou atividade antimicrobiana e citotoxicidade *in vitro*.

Palavras chaves: *Euphorbia cotinifolia*. Atividade antimicrobiana. Atividade antioxidante. Compostos fenólicos.

ABSTRACT

Euphorbia cotinifolia has many biological activities being used in folk medicine to cauterize wounds and as a purgative in small doses. The present study aimed to determine the content of phenolic compounds and flavonoids, antimicrobial and antioxidant activity and toxicity of hydroethanolic extracts of root, stem, leaf and fruit of *E. cotinifolia*. Was performed chemical screening, measurement of phenolic compounds by Folin-Ciocalteu reagent method, flavonoids by aluminum chloride method, chemical analysis by HPLC. The antimicrobial activity was determined by agar diffusion and minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution technique using standard strains. The minimum microbicidal concentration (CMM) was also determined. The antioxidant activity was determined by the kidnapping of DPPH free radical method. Cytotoxicity was assessed by the MTT method in BHK cell culture. All hydroethanolic extract of *Euphorbia cotinifolia* presented phenolic compounds, as well as presence of secondary metabolites such as tannins and flavonoids, antimicrobial and antioxidant activity. The HPLC analysis suggested the presence of caffeic acid for extracts of dry leaf and fresh. Dry leaf showed a higher concentration of phenolic compounds. None of the extracts showed antimicrobial activity and cytotoxicity *in vitro*.

Keywords: *Euphorbia cotinifolia*. Antimicrobial activity. Antioxidant activity. Phenolic compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Principais vias do metabolismo secundário das plantas e suas interligações.....	20
Figura 2- Estrutura geral dos principais flavonoides.....	22
Figura 3- <i>Euphorbia cotinifolia</i>	25
Figura 4- Triagem fitoquímica para taninos	38
Figura 5- Triagem fitoquímica para flavonóides	38
Figura 6- Teor de compostos fenólicos (mg ácido gálico/g amostra) nos extratos hidroetanólicos de <i>Euphorbia cotinifolia</i>	39
Figura 7- Teor de flavonoides totais (mg AG/g amostra) dos extratos hidroetanólicos de <i>Euphorbia cotinifolia</i>	41
Figura 8- Cromatogramas	43
Figura 9- Teste de difusão em ágar com <i>M. luteus</i> frente aos extratos de <i>Euphorbia cotinifolia</i>	45
Figura 10- Teste de difusão.....	45
Figura 11- Microplaca de CIM após adição de resazurina	47
Figura 12- Determinação da Concentração Microbicida Mínima (CMM)	47
Figura 13- Valores de EC ₅₀ (µg/mL) para o sequestro de radical livre DPPH dos extratos hidroetanólicos de <i>Euphorbia cotinifolia</i>	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Triagem fitoquímica dos extratos de <i>Euphorbia cotinifolia</i>	37
Tabela 2- Teor de compostos fenólicos totais (mg de ácido gálico /g) nos extratos de <i>Euphorbia cotinifolia</i>	39
Tabela 3- Teor de flavonoides totais (mg quercetina/g) nos extratos de <i>Euphorbia cotinifolia</i>	41
Tabela 4- Tempo de retenção, área e altura dos picos obtidos por CLAE do extrato de folha fresca e seca de <i>Euphorbia cotinifolia</i>	44
Tabela 5- Atividade antimicrobiana dos extratos de <i>E. cotinifolia</i> pelo método de difusão em ágar.....	44
Tabela 6- Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) em mg/mL dos extratos de <i>Euphorbia cotinifolia</i>	49
Tabela 7- Atividade antioxidante dos extratos hidroetanólicos de <i>Euphorbia cotinifolia</i>	51

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS -	2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-acido sulfônico).
BAAR -	Bacilo álcool ácido resistente
BHA -	butil-hidroxi-anisol
BHT -	butil-hidroxi-tolueno
CLAE -	Cromatografia líquida de alta eficiência
CIM -	Concentração inibitória mínima
CMM -	Concentração microbicida mínima
DPPH -	2,2-difenil-1- picrilidrazil
EC -	eletroforese capilar
ERO's -	Espécies reativas do oxigênio
ESI-MS -	Espectometria de massa
FCR -	Reagente de Folin-Ciocalteu
FRAP -	Poder antioxidante de redução do ferro
MTT-	(3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina).
MDRs-	proteínas de resistência a múltiplas drogas
ORAC -	Capacidade de absorção de radicais oxigênio
TB -	Tuberculose
TBHQ -	Butil-hidroquinona-terciaria
RMN -	Ressonância magnética nuclear
UV -	espectometria no ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 PRODUTOS NATURAIS	14
2.2 ANTIMICROBIANOS E RESISTÊNCIA.....	15
2.3 TUBERCULOSE.....	16
2.4 ANTIOXIDANTES.....	17
2.5 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE PRODUTOS NATURAIS	19
2.5.1 Compostos fenólicos	20
2.6 GÊNERO <i>Euphorbia sp.</i> E ATIVIDADES BIOLÓGICAS	22
2.7 <i>Euphorbia cotinifolia</i> E ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	25
3 OBJETIVOS	27
3.1 OBJETIVO GERAL.....	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4 MATERIAL E MÉTODO	28
4.1 OBTENÇÃO E CADASTRAMENTO DA PLANTA.....	28
4.2 PREPARO DOS EXTRATOS DA PLANTA	28
4.2.1 Extrato da planta fresca.....	28
4.2.2 Extrato da planta seca e granulometria	29
4.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA	30
4.3.1 Triagem fitoquímica dos extratos.....	30
4.3.2 Dosagem de compostos fenólicos totais	30
4.3.3 Determinação do teor de flavonoides	31
4.3.4 Caracterização química por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ...	31
4.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS	32
4.4.1 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos	32
4.4.2 Avaliação da atividade antimicobacteriana.....	33
4.4.3 Atividade antioxidante (sequestro de radical livre DPPH)	34
4.4.4 Avaliação da atividade citotóxica dos extratos sobre cultura celular	34
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1 ANÁLISE GRANULOMÉTRICA DOS PÓS	36
5.2 TRIAGEM FITOQUÍMICA, COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONÓIDES	36
5.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	42
5.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIMICOBACTERIANA	44
5.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	50
5.6 CITOTOXICIDADE	52
6 CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais no tratamento de doenças é uma estratégia antiga utilizada por praticamente todas as populações do mundo. Entre 25 a 30% de todos os medicamentos disponíveis na terapêutica são derivados de produtos naturais (plantas, microrganismos e animais) (RAMOS et al., 2008)

O aumento da resistência aos antimicrobianos disponíveis tem atraído a atenção da comunidade científica para investigar novas drogas eficazes de origem natural (BITU et al. 2012).

O Brasil apresenta uma das maiores biodiversidade vegetal do mundo sendo uma importante fonte de produtos naturais com potencial terapêutico. O maior gênero da família Euphorbiaceae é o gênero *Euphorbia*. Possuem predileção por regiões áridas sendo encontradas na América do Sul e nos continentes africano e asiático. São encontradas como ervas daninhas, em jardins, ou como elementos decorativos, em casas. As plantas do gênero *Euphorbia* são tradicionalmente utilizadas como plantas medicinais, uma vez que possuem vários compostos bioativos em suas constituições, tais como flavonoides, alcaloides, taninos e terpenos (WANG et al., 2006; PUSTZTAI et al., 2007; ZHANG et al., 2008; SHLAMOVITZ; GUPTA; DIAZ, 2009).

Euphorbia cotinifolia é um arbusto perene com ramos lenhosos e delicadas folhas ovais, seiva leitosa e pequenas flores. É utilizada na medicina popular para cauterizar feridas e como purgante em pequenas doses (MORTAN, 1962). A *E.cotinifolia* apresenta atividade moluscida (PEREIRA; SOUZA; MENDES, 1978), antiviral (BETANCUR-GALVIS et al., 2002) e antimicrobiana (JAYALAKSHMI; RAVEESHA; AMRUTHESH, 2011).

O presente estudo teve como objetivo determinar o teor de compostos fenólicos e flavonoides, a atividade antimicrobiana, antioxidante e a toxicidade dos extratos hidroetanólicos de raiz, caule, folha e flor de *Euphorbia cotinifolia*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PRODUTOS NATURAIS

Os produtos naturais são considerados como uma das maiores fontes de diversidade química. Um dos mais importantes fatores para o sucesso no descobrimento de um novo fármaco é a diversidade química dos compostos a serem selecionados, cujas fontes podem ser sintéticas, naturais, ou originadas de química combinatória (TREVISAN et al., 2003).

De acordo com Caierão (2004) o desenvolvimento de novos fármacos consiste basicamente em modificações estruturais nas moléculas já existentes. A descoberta de novos antimicrobianos é difícil, pois é altamente dispendiosa para as indústrias e demanda anos de pesquisa.

De acordo com Guimarães; Momesso; Pupo (2010) as plantas podem contribuir na descoberta de novos antibióticos, pois, produtos naturais antimicrobianos podem ser biossintetizados para prevenir e/ou combater o ataque de microrganismos patogênicos às plantas. Produtos naturais vegetais têm sido apontados como inibidores de bombas de efluxo, conhecidas como "bombas de resistência a múltiplos fármacos", tornando-se assim um novo alvo na busca de antibióticos.

Segundo Ramos et al. (2008) os produtos naturais de origem vegetal sempre foram uma importante fonte de agentes terapêuticos. Atualmente, de 25 a 30% de todos os medicamentos disponíveis na terapêutica são derivados de produtos naturais (plantas, microrganismos e animais).

A busca por novos agentes farmacologicamente ativos em fontes naturais, tais como extratos de plantas e microrganismos levou à descoberta de muitos fármacos clinicamente úteis e desempenham papel importante no tratamento de doenças humanas (MAHESH; SATISH, 2008).

Estima-se que o Brasil hospede entre 15 e 20% de toda a biodiversidade mundial, sendo considerado o maior do planeta em número de espécies endêmicas (BARREIRO, 2009). Esta biodiversidade é considerada uma fonte de substâncias biologicamente ativas e sua preservação é fundamental tanto pelo valor intrínseco

dessa imensa riqueza biológica como pelo seu enorme potencial como fonte de novos fármacos.

No Brasil somente 8% das espécies vegetais nativas foram analisadas com o propósito de obter novas moléculas bioativas. O desenvolvimento de novos fármacos a partir de produtos naturais tem apresentado alguns benefícios como maior eficácia terapêutica, diminuição de possíveis efeitos colaterais, variedade de estruturas químicas e homólogas que possam ser incorporadas aos medicamentos (NEWMAN; CRAGG, 2012).

Segundo Costa et al. (2008) espécies nativas do Brasil podem ser novas fontes de substâncias de baixa toxicidade, podendo ser uma alternativa viável, de baixo custo e de fácil acesso pelas comunidades carentes, da região onde tais espécies são encontradas.

2.2 ANTIMICROBIANOS E RESISTÊNCIA

Antibióticos são compostos naturais ou sintéticos capazes de levar a morte do microrganismo sendo classificados como bactericidas, ou capazes de inibir o crescimento, sendo classificados como bacteriostáticos (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO; 2010).

De acordo com Mota et al. (2005) e Silveira (2006), a descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos eficientes no combate à infecções bacterianas no decorrer das últimas décadas revolucionaram o tratamento e foram importantes na redução da morbidade e mortalidade pelas doenças infecciosas. Porém, a disseminação do uso de antibióticos fez com que as bactérias também desenvolvessem defesas relativas aos agentes antibacterianos, com o consequente aparecimento de resistência.

A descoberta da penicilina por Alexander Fleming em 1928 foi o grande marco no tratamento das infecções bacterianas, porém este composto foi descrito como antibiótico em 1929 e introduzido como agente terapêutico somente nos anos de 1940 (NICOLAOU; MONTAGNON, 2008; PROJAN; SHLAES, 2004).

No início da antibioticoterapia a resistência às drogas era pouco frequente. No entanto, tornou-se um importante problema com a introdução e a ampla utilização de inúmeros antimicrobianos na década de 1950. Houve expansão com a introdução dos novos antibióticos beta-lactâmicos a partir de 1960. E agravou-se, com o surgimento de novas formas de resistência e a disseminação de microrganismos multirresistentes nas décadas de 1980 e 1990 (TAVARES, 2000).

A resistência bacteriana emerge como um problema mundial de saúde pública, pois impõe sérias limitações às opções para o tratamento de infecções bacterianas. É causada pela mutação espontânea e recombinação de genes, que criam variabilidade genética sobre a qual atua a seleção natural dando vantagens aos mais aptos, atuando como agentes seletivos. Esta resistência prolifera-se rapidamente por meio da transferência genética. Atinge algumas das principais bactérias Gram-positivas, como enterococos, estafilococos e estreptococos (MOTA et al., 2005; SILVEIRA, 2006; PASTOR-SÁNCHEZ, 2006).

Apesar da ampla disponibilidade de antibióticos clinicamente úteis e análogos semi-sintéticos, a pesquisa contínua de novos agentes anti-infecciosos permanece indispensável. A combinação da versatilidade genética dos microrganismos e o uso indiscriminado dos antibióticos têm levado ao aumento da resistência clínica de microrganismos previamente sensíveis e a emergência de infecções anteriormente incomuns (ÁVILA, 2008).

As diferenças nas estruturas de bactérias Gram positivas e Gram negativas podem causar danos diferenciados quando a bactéria é submetida a compostos antimicrobianos e está relacionada principalmente com as propriedades de permeabilidade e com os componentes de superfície (WU et al., 2008).

2.3 TUBERCULOSE

O *M. tuberculosis* é o principal agente etiológico da tuberculose (TB) e também é conhecido como Bacilo de Koch (BK) em homenagem a Robert Koch, que foi o primeiro cientista a isolar e identificar o mesmo em 1882 (SOUZA; VASCONCELOS, 2005).

A transmissão ocorre por meio de gotículas geradas por um indivíduo com doença pulmonar ativa. O maior risco de transmissão ocorre entre os pacientes com lesão cavitária ou com amostras de bacilo álcool ácido resistente (BAAR) positivas, no entanto, pacientes com esfregaços negativos, mas com cultura positivas podem transmitir a doença. Os fatores dos hospedeiros contribuem para a susceptibilidade de contrair a doença primária ou evoluir para doença ativa. Pessoas imunossuprimidas (HIV positivos, em uso de corticóides ou agentes quimioterápicos), com doenças crônicas (diabetes, doença renal crônica, etc.), desnutridos e usuários de drogas são mais susceptíveis a adquirir a doença (IRENE et al., 2010).

Os fármacos disponíveis para o tratamento da TB são isoniazida (INH), rifampicina (RMP) e pirazinamida (PZA). Ocorre a associação destes fármacos durante dois meses, seguida por quatro meses com INH e RMP. No entanto a monoterapia, prescrição imprópria da associação dos fármacos ou falta de colaboração do paciente para o uso correto do esquema terapêutico podem levar ao surgimento de linhagens de *M. tuberculosis* resistentes a um ou mais fármacos (multirresistência, MDR) dificultando ainda mais o tratamento. As estratégias de programas governamentais para o controle da tuberculose consistem, basicamente, em diagnosticar e tratar os casos de TB rapidamente, a fim de interromper a transmissão e evitar a difusão da doença (IRENE et al., 2010).

Vários compostos com atividade antimicobacteriana têm sido encontrados entre as plantas, bactérias, fungos e organismos marinhos (PAULI et al., 2005) os quais são alvos de muitos estudos.

2.4 ANTIOXIDANTES

Os antioxidantes estão presentes naturalmente na maioria dos alimentos não processados e conferem a eles proteção contra o ataque oxidativo. Os mais ativos e frequentemente encontrados nos vegetais, são os compostos fenólicos, tais como os flavonoides (PRADO, 2009).

Os antioxidantes fenólicos podem atuar de várias formas: combatendo os radicais livres por meio da doação de um átomo de hidrogênio de um grupo hidroxila

(OH) da sua estrutura aromática, que possui a capacidade de suportar um elétron desemparelhado por meio do deslocamento deste ao redor de todo o sistema de elétrons da molécula; quelando metais de transição, como o Fe^{2+} e o Cu^+ ; interrompendo a reação de propagação dos radicais livres na oxidação lipídica; modificando o potencial redox do meio e reparando a lesão das moléculas atacadas por radicais livres (SUCUPIRA et al., 2012). Agem tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (DORMAN et al., 2003).

Em geral, existem duas categorias básicas de antioxidantes: os naturais e os sintéticos. Os antioxidantes sintéticos mais comumente usados são o butil-hidroxi-anisol (BHA), o butil-hidroxi-tolueno (BHT) e o butil-hidroquinona-terciária (TBHQ). E os naturais são principalmente os tocoferóis e o ácido ascórbico (PRADO, 2009).

As indústrias de alimentos utilizam os antioxidantes para evitar a deterioração dos produtos e manter o valor nutricional. Os antioxidantes também são de grande interesse para os bioquímicos e profissionais da saúde, pois auxiliam na proteção do organismo contra os danos causados pelas espécies reativas do oxigênio (ERO's) e doenças degenerativas (RIBEIRO et al., 2005).

As ERO's são várias formas de oxigênio ativado, entre as quais se incluem os denominados radicais livres. Nos organismos vivos as várias formas de ERO's podem ser constituídas de diversas maneiras. As fontes exógenas produtoras de radicais livres incluem-se a fumaça do tabaco, radiações ionizantes, solventes orgânicos e pesticidas (RIBEIRO et al., 2005).

O estresse oxidativo está associado com um distúrbio no balanço pró-oxidante/antioxidante em favor do pró-oxidante. A ocorrência de espécies reativas de oxigênio, conhecidas como pró-oxidantes, é um atributo da vida aeróbica normal. A existência e desenvolvimento de células em ambiente contendo oxigênio poderia não ser possível sem a presença de sistemas de defesa que incluem enzimas e antioxidantes não enzimáticos. A vida aeróbica é caracterizada por uma formação constante de pró-oxidantes sendo sua neutralização balanceada por antioxidantes (GOTTLIEB et al., 2010).

Diversos estudos têm demonstrado que o consumo de substâncias antioxidantes na dieta, pode produzir uma ação protetora efetiva contra os processos oxidativos que naturalmente ocorrem no organismo. Os mecanismos endógenos de defesa (ou mediadores de redox tais como: superóxido dismutase, catalase, peroxidase e metaloproteínas) podem ser auxiliadas favoravelmente com a

introdução de antioxidantes por meio da dieta (PEREIRA; VIDAL; CONSTANT, 2009).

Os antioxidantes sintéticos são muito efetivos e muito estáveis, entretanto, o uso deles como aditivos é restrito em muitos países devido à possibilidade de causarem efeitos indesejáveis em enzimas dos órgãos humanos. Como resultado, há um grande interesse de se encontrar novos antioxidantes que sejam seguros e provenientes de fontes naturais inclusive as plantas (TIVEROM, 2010).

2.5 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE PRODUTOS NATURAIS

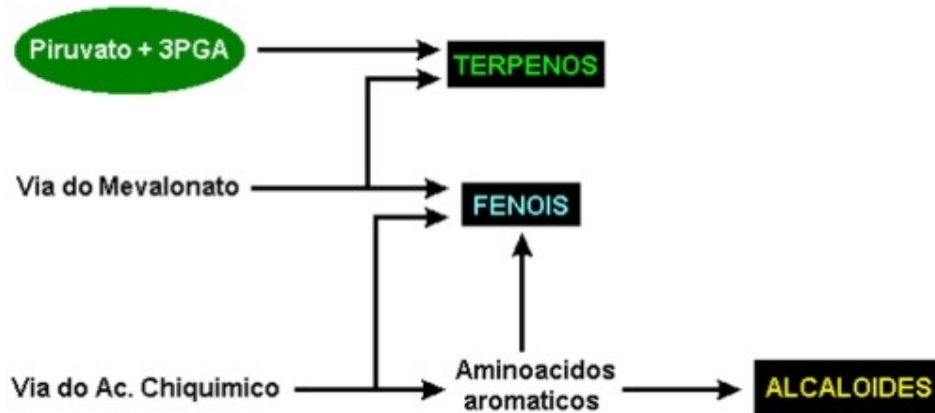
Os vegetais possuem metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários estão relacionados com sobrevivência do vegetal e exercem função ativa nos processos de fotossíntese, respiração e assimilação de nutrientes. Os metabólitos secundários estão intimamente associados às estratégias de defesa das plantas e têm despertado o interesse de pesquisadores de vários campos da ciência que veem neles uma fonte particularmente promissora de novas moléculas potencialmente úteis ao homem (NASS, 2007).

Podemos destacar os seguintes grupos de substâncias envolvidos com os efeitos biológicos: compostos fenólicos simples e heterosídicos; flavonóides; óleos voláteis; cumarinas; taninos; alcaloides; saponinas; cromonas e xantonas; quinonas; polissacarídeos; lignanas e neo-lignanas; heterosídeos cardiotônicos; compostos com enxofre e metilxantinas (VALGAS, 2002).

Os principais metabólitos secundários de acordo com sua rota biossintética são distribuídos em três grupos: terpenos, compostos fenólicos e compostos contendo nitrogênio (SILVA et al., 2010).

Os terpenos são metabolizados a partir do ácido mevalônico (no citoplasma) ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto). Os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico ou ácido mevalônico. Por fim, os alcalóides são derivados de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), os quais são derivados do ácido chiquímico, e também de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina) (FIGURA 1) (PERES, 2005).

Figura 1 - Principais vias do metabolismo secundário das plantas e suas interligações.



Fonte: PERES (2005).

2.5.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são sintetizados a partir de duas rotas metabólicas principais: a via do ácido chiquímico e a vida do ácido mevalônico, a qual é menos significativa (PERES, 2005). Podem ser definidos como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilas. Estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas. Englobam uma gama enorme de substâncias, entre elas os ácidos fenólicos, os quais, por sua composição química, possuem propriedades antioxidantes (OLIVEIRA, 2011).

São responsáveis pelo sabor, odor e coloração de diversos vegetais, sendo amplamente utilizados na indústria de alimentos. São atrativos para animais que fazem polinização ou dispersão de sementes. Além disso, esse grupo de compostos é importante para proteger as plantas contra os raios UV, insetos, fungos, vírus, bactérias e inibindo o crescimento de outras plantas competidoras (JAKIEMIU, 2008).

São classificados em: pouco e largamente distribuídos na natureza. No grupo dos poucos distribuídos na natureza, está um número reduzido deles. Já no grupo dos largamente distribuídos na natureza, estão os fenólicos encontrados geralmente em todo o reino vegetal. Esses compreendem os chamados flavonóides

e derivados e os ácidos fenólicos (ácido benzóico, cinâmico e seus derivados e cumarinas) (SOARES, 2002).

Variações na estrutura dos flavonóides acabam subdividindo este grupo em flavonol, flavona, flavanol e isoflavonas. Em comum, esses quatro grupos possuem hidroxilas ligadas nas posições 5 e 7 do anel A. Os flavonóis, como a quercetina e o kaempferol, possuem uma hidroxila na posição 3 e grupamento carboxila na posição 4 (anel C). Flavonas, como luteolina, são semelhantes aos flavonóis, porém sem a hidroxila ligada na posição 3. Os flavanóis, como a catequina, não possuem a dupla ligação com oxigênio no anel C, mas possuem uma hidroxila da posição 3. E isoflavonas, como genisteína, apresentam o anel B ligado no carbono da posição 3 do anel C (FIGURA 2) (MEDINA, 2009).

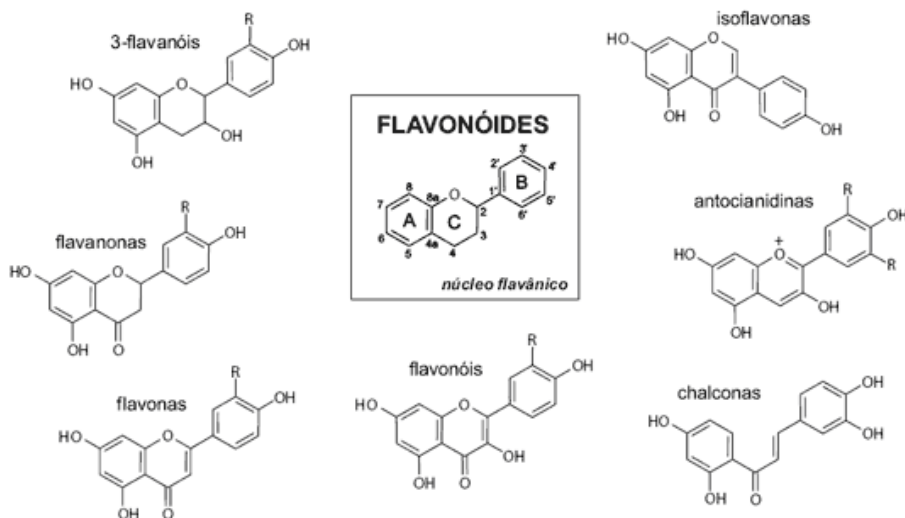
Os ácidos fenólicos caracterizam-se por possuir um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula. Estão divididos em dois grupos, derivados do ácido hidroxibenzoico, que tem estrutura comum C6-C1 (como exemplo os ácido gálico, vanílico e siríngico), e derivados do ácido hidroxicinâmico, que são compostos aromáticos com três carbonos que formam uma cadeia lateral com estrutura C6-C3 (os mais comuns são os ácidos caféico, ferúlico e p-cumárico) (ANGELO; JORGE, 2007).

Alguns estudos (EINBOND et al., 2004; BANERJEE; DASGUPTA, 2005; CHOI et al., 2006) relatam que muitas atividades biológicas, assim como a antioxidante e antimicrobiana, são devidas ao teor de fenóis totais, como taninos e flavonóides.

A estrutura e a composição química dos compostos fenólicos afetam seu modo de ação e atividade antibacteriana, principalmente no que se refere à posição e ao número de grupamentos hidroxila no anel fenólico. Além disso, interações químicas entre os componentes antimicrobianos também são observadas, evidenciando efeitos sinérgicos, mas também efeitos antagônicos (BURT, 2004).

O mecanismo de ação de compostos fenólicos pode ser explicado por sua ação na degradação da parede celular bacteriana, danos à membrana citoplasmática, ao extravasamento de material celular, à coagulação do citoplasma, e à desregulação do sistema de transporte de íons e elétrons no sistema membranário (BURT, 2004).

Figura 2 - Estrutura geral dos principais flavonoides.



Fonte: MATEUS (2009).

Os polifenóis têm como importante característica sua hidrofobicidade, o que lhes permite a difusão em lipídeos de membrana celular bacteriana, de mitocôndrias e de outros componentes celulares como proteínas e enzimas, desestabilizando as estruturas e tornando-as mais permeáveis (BURT, 2004). O rompimento da membrana citoplasmática provoca a saída de elementos vitais à célula como fosfatos, íons, purinas e ácidos nucleicos ou a entrada de substâncias nocivas ao metabolismo bacteriano (TAVARES, 1999).

A eficiência de compostos fenólicos como anti-radicais e antioxidantes é variada e depende de vários fatores, tais como o número, a posição da ligação e a posição do(s) grupo(s) hidroxila no anel aromático. Quanto menor o número de hidroxilas ligadas ao anel aromático, menor a atividade antioxidante e anti-radical (SROKA; CISOWSKI, 2003).

2.6 GÊNERO *Euphorbia* sp. E ATIVIDADES BIOLÓGICAS

A família Euphorbiaceae apresenta um total de 8.000 espécies, distribuídas em 317 gêneros. Possui representantes nas regiões tropicais e temperadas de todo

o planeta. Estão agrupados em 49 tribos e cinco subfamílias (WEBSTER, 1994), possuindo hábito heterogêneo, nas quais incluem árvores, arbustos, ervas e trepadeiras (LEME, 1994).

Segundo Santos; Machado; Lopes (2005) e Oliveira; Gimenez; Godoy (2007) a família Euphorbiaceae tem como características botânicas a produção de plantas lactescentes. Em número de espécie é a segunda família mais representativa da Caatinga. Os gêneros mais representativos em número de espécie são: *Acalypha*, *Phyllanthus*, *Croton*, *Macaranga*, *Euphorbia*, *Mallotus* e *Jatropha*.

O maior gênero da família Euphorbiaceae é o gênero *Euphorbia*. Possuem predileção por regiões áridas sendo encontradas na América do Sul e nos continentes africano e asiático. São encontradas como ervas daninhas, em jardins, ou como elementos decorativos, em casas. As plantas do gênero *Euphorbia* são tradicionalmente utilizadas como plantas medicinais, uma vez que possuem vários compostos bioativos em suas constituições, tais como flavonoides, alcaloides, taninos e terpenos (SHLAMOVITZ; GUPTA; DIAZ, 2009; PUSTZTAI et al., 2007; ZHANG et al., 2008; WANG et al., 2006). Algumas espécies são utilizadas na medicina popular para tratar doenças de pele, gonorreia, enxaquecas, parasitas intestinais e verrugas (SINGLA; PATHAK, 1990).

O gênero *Euphorbia* possui potentes compostos ativos responsáveis pela atividade antibacteriana, suportando o uso popular destas plantas na medicina tradicional para o tratamento de várias doenças como febre, infecções de feridas, e intestinais (ROJAS et al., 2008).

A espécie *E. tirucalli* é utilizada no tratamento de doenças virais (BENTACUR-GALVIS et al., 2002) e a *E. hirta* é utilizada em doenças respiratórias (SINGH, 2006).

As plantas do gênero *Euphorbia* apresentam diversas atividades biológicas, entre as quais se destacam a antiviral e antitumoral (AVELAR, 2010).

Foi isolado a partir de diferentes espécies de *Euphorbia* vários diterpenóides macrocíclicos com atividade antibacteriana, anticâncer, antiviral, analgésica, PGE2-inibitório, anti-tuberculose multi-resistente, inibitória prolil endopeptidase, antialimentar e analgésica (HOHMANN et al, 2002; HOHMANN et al, 2003).

Extratos etanólicos e metanólicos das folhas e da planta inteira de *E. hirta* mostraram significativa atividade contra bactérias gram-positivas (KUMAR; MUTYALA; RAJA, 2010). O extrato aquoso de *E. hirta* mostrou atividade contra

Escherichia coli, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (HORE et al., 2006; SUDHAKAR, 2006).

Extratos acetônicos e metanólicos de *E. fusiformis* apresentaram atividade contra algumas bactérias patogênicas humanas (RAMACHANDRAN et al., 2008). Os extratos metanólicos e de acetona de *E. fusiformis* mostraram inibição do crescimento de *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*, *Salmonella typhii A* e *S. typhii B*. (NATARAJAN et al., 2005).

Extrato etanólico de *E. australis* apresentou atividade contra *Bacillus cereus*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *S. typhimurium* (PALAMBO; SEMPLE, 2001).

O extrato aquoso das partes frescas de *E. tirucalli* teve ação antimicrobiana contra *Erwinia carotovora* pv *carotovoea*, *Xanthomonas campestris* pv *campestris*, e *P. solanacearum* (LIRIO; HERMANO; FONTANILLA, 1998).

Extratos metanólicos de *E. macroclada* (DARWISH et al., 2002) mostraram efeitos inibitórios contra *S. aureus*. Já a mistura complexa de quatro glicocerebrosídeos extraídos de *E. peplis* tiveram atividade antifúngica contra *Candida spp.* e *Cryptococcus neoformans* (CATENI et al., 2003).

O tratamento com compostos isolados de *E. lagascae* e *E. tuckeyana* reduziu a expressão dos genes que comandam a síntese de proteínas de resistência a múltiplas drogas (MDRs), porém, os mecanismos para essa modulação ainda não foram descritos (WESOLOWSKA et al., 2007).

De acordo com Hohmann et al. (2002); Lage et al. (2010) produtos de algumas plantas do gênero *Euphorbia* parecem ter a capacidade de modular a expressão dos MDRs, proteínas que diminuem a concentração intracelular de fármacos antibióticos e quimioterápicos, e assim promovem um prejuízo à eficácia terapêutica. Dessa forma, tais plantas poderiam ser úteis no campo quimioterápico, uma vez que proporcionariam a manutenção dos fármacos no interior das células (WESOLOWSKA et al., 2007).

Estudos relatam a atividade antioxidante de *E. tirucalli* (MACHADO, 2007) e *E. hirta* (SUBRAMANIAN; BHUVANESHWARI; PRASATH, 2011).

Basma et al. (2011) avaliaram a atividade antioxidante e composição química de folha, flor, raiz e caule de *E. hirta*. O extrato de folha apresentou maior teor de fenólicos totais ($206,17 \pm 1,95$ mg AG/g), seguido de flor ($117,08 \pm 3,10$ mg AG/g), raiz ($83,15 \pm 1,19$ mg AG/g) e caule ($65,70 \pm 1,72$ mg AG/g). O extrato de

folha exibiu sequestro de DPPH máximo de 72,96% (\pm 0,78), seguido pela flor 52,45% (\pm 0,66), raiz 48,59% (\pm 0,97) e caule 44,42% (\pm 0,94). A EC50 para os extratos de folha, flor, raiz, caule e BHT foram 0,803, 0,972, 0,989, 1,358 e 0,794 mg /mL, respectivamente. O poder redutor do extrato de folha foi comparável com a do ácido ascórbico e verificou-se ser dependente da dose. Análise fitoquímica do extrato de folha de *E. hirta* revelou a presença de açúcares redutores, terpenóides, alcalóides, esteróides, taninos, flavonóides e compostos fenólicos.

2.7 *Euphorbia cotinifolia* E ATIVIDADES BIOLÓGICAS

E. cotinifolia é um arbusto perene com ramos lenhosos, delicadas folhas ovais, com seiva leitosa e pequenas flores (FIGURA 3). As folhas mais velhas apresentam cor bordô escuro, enquanto a folhagem nova tem um tom vermelho brilhante (BAILEY, 1949).

Figura 3 - *Euphorbia cotinifolia*. Folha, Flor e Fruto.



Fonte: http://www.westafricanplants.senckenberg.de/root/index.php?page_id=14&species=2324

É utilizada na medicina popular para cauterizar feridas e como um purgante em pequenas doses (MORTAN, 1962).

A *E. cotinifolia* apresenta atividade moluscida (PEREIRA; SOUZA; MENDES, 1978). O extrato em diclorometano mostrou atividade antiviral com moderada propriedades citotóxicas (BETANCUR-GALVIS et al., 2002).

Jayalakshmi; Raveesha; Amruthesh (2011) relataram atividade antimicrobiana de *E. cotinifolia* contra bactérias fitopatogênicas, sendo as frações

metanólica e acetato de etila as que apresentaram maior atividade. O estudo fitoquímico das diferentes frações demonstrou a presença de flavonóides, terpenóides, taninos e esteróides.

Rojas et al. (2008) avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato de folhas extraídas com álcool isopropílico e fracionados de *E. caracasana* e *E. cotinifolia*. O extrato de *E. caracasana* apresentou atividade antibacteriana contra *S. aureus* ATCC 25923, em concentrações de 336 mg/mL e 33,6 mg/ml, porém não foi observado atividade antimicrobiana contra nenhuma das bactérias testadas para *E. cotinifolia*.

Em estudos realizados por Bentacur-Galvis et al. (2002), *E. cotinifolia* e *E. tirucalli* exibiram ação antiherpética, na qual a eficiência desses extratos diluídos em água/metanol foi sete vezes superior ao fármaco Aciclovir tratado no grupo controle, usualmente utilizado no tratamento de herpes simples.

Marzouk et al. (2012) isolaram polifenóis incluindo dois elagitaninos novos e um glucosilkaempferol trigalloil de *E. cotinifolia* e estes apresentaram potente atividade no ensaio de DPPH com valores de EC 50 menores que o do ácido ascórbico e também atividade anticâncer.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar composição química e atividades biológicas dos extratos hidroetanólicos da folha, caule, raiz e flor de *Euphorbia cotinifolia*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar triagem fitoquímica, dosagem de compostos fenólicos totais e de flavonóides dos extratos de *Euphorbia cotinifolia*;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos de *Euphorbia cotinifolia*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos hidroetanólicos de *Euphorbia cotinifolia*, frente a cepas bacterianas Gram-positivas, Gram-negativas, micobacterias e de leveduras;
- Avaliar a citotoxicidade dos extratos de *Euphorbia cotinifolia* sobre cultura celular BHK.
- Avaliar a composição química por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

4 MATERIAL E MÉTODO

Os métodos utilizados foram:

4.1 OBTENÇÃO E CADASTRAMENTO DA PLANTA

A coleta de amostras da raiz, caule, folha e fruto de *E. cotinifolia* foi realizada no município de Alfenas-MG (21° 27' 50.70" S e 45° 55' 33.48" O), a uma elevação de 908 m, no mês de novembro de 2012.

Após a coleta, a planta foi identificada, cadastrada e arquivada pelo Prof. Dr. Marcelo Polo no Herbário UALF da Universidade Federal de Alfenas, recebendo o número 2337 do tombo da exsicata (SILVA et al., 2010).

4.2 PREPARO DOS EXTRATOS DA PLANTA

Foram preparados dois tipos de extrato, utilizando a planta fresca e a planta seca.

4.2.1 Extrato da planta fresca

As partes da planta (raiz, caule, folha e fruto) foram lavadas em água corrente e cortadas manualmente com auxílio de uma faca de metal. Foram preparados extratos hidroetanólicos a 20% (m/v), utilizando álcool etílico a 70% (v/v). Os extratos preparados foram macerados por sete dias e mantidos ao abrigo da luz, com agitação diária. Após maceração, os extratos foram filtrados em filtro de "nylon" e em seguida, em filtro de papel. Posteriormente, o extrato foi submetido à concentração em rota-evaporador à pressão negativa de 500 mmHg e temperatura de 60 °C. Após a concentração, foram distribuídos 5 mL em frascos de vidro, congelados e liofilizados. Os frascos foram pesados antes da liofilização para

determinar a massa do extrato em mg/mL. A concentração foi ajustada a 50 mg/mL (p/v) (SILVA et al., 2010).

4.2.2 Extrato da planta seca e granulometria

As partes da planta (raiz, caule, folha e fruto) foram lavadas em água corrente, cortadas manualmente com auxílio de uma faca de metal e desidratadas a temperatura de 37°C até manter peso constante. As amostras foram trituradas até a obtenção de um pó e submetidas a granulometria. A granulometria dos pós foi estabelecida de acordo com a Farmacopeia Brasileira 5ªed. (2010), utilizando Agitador de Peneiras – Eletromagnético (ErTel®) com conjunto de tamises com malhas variando de 250 a 850 µm sob a vibração pré-estabelecida anteriormente por um período de 15 minutos. Primeiramente foi determinada a vibração adequada a se empregar para a análise granulométrica, ou seja, a vibração na qual se obteve maior rendimento do pó. Foram pesados 30 gramas de cada droga vegetal na forma de pó e submetidos a passagem forçada nas intensidades 3, 5, 7 e 9. Verificou-se que a vibração de 9 para o pó da folha, caule e raiz e 3 para o fruto de *E. cotinifolia* apresentaram maior rendimento sendo estabelecidas como padrões para as análises granulométricas. Foram elaboradas planilhas no software Excel®, onde foram calculadas as frequências percentuais e também as frequências percentuais cumulativas. O pó obtido foi submetido à remaceração (maceração por quatro vezes) na concentração de 20% (m/v), utilizando álcool etílico a 70% (v/v). Após cada remaceração, os extratos foram filtrados em filtro de “nylon” e em seguida, em filtro de papel. Posteriormente, os extratos foram submetidos à concentração em rota-evaporador à pressão negativa de 500 mmHg e a temperatura de 60 °C. Após a concentração, os mesmos foram distribuídos em frascos de vidro com 5 mL, congelados e liofilizados. Os frascos foram pesados antes da liofilização para determinar a massa do extrato em mg/mL. No momento das análises a concentração foi ajustada a 50 mg/mL (m/v) (SILVA et al., 2010).

4.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

A composição química foi avaliada pelos seguintes métodos:

4.3.1 Triagem fitoquímica dos extratos

O extrato hidroetanólico de *E. cotinifolia* (raiz, caule, folha e fruto) foi submetido aos testes fitoquímicos baseados em técnicas colorimétricas e de precipitação para detecção dos principais constituintes bioativos: antraquinonas, flavonoides, taninos, esteróides, saponinas e alcaloides. Para antraquinonas foi usada a reação Bornträger direta. Para taninos foram utilizados os métodos de precipitação com sais de ferro, acetato de chumbo, alcaloides, gelatina e acetato de cobre. Para flavonóides, foram usadas as reações de cloreto de alumínio e Shinoda que apresentam cor específica quando há a presença destes compostos. Os esteróides foram identificados pela reação de Liebermann-Burchard e as saponinas pela agitação do extrato aquoso com formação de espuma persistente. Os alcalóides foram detectados pelo método de precipitação, usando os reativos de Bertrand, Bouchardat, Dragendorf e Mayer (COSTA, 1994).

4.3.2 Dosagem de compostos fenólicos totais

Para a determinação do teor de compostos fenólicos totais, uma alíquota de cada um dos extratos (0,5 mL) a 0,1 mg/mL foi misturada com 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (diluído em água destilada 1:10) e 2,0 mL de Na₂CO₃ 4% (m/v) em água destilada. Após 2 h de incubação ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 750 nm. Os resultados do teor de compostos fenólicos totais foram expressos como equivalentes de ácido gálico (mg AG/g), calculados por meio de uma curva construída com concentrações que variaram de 5 a 100 µg/mL (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS, 1999).

4.3.3 Determinação do teor de flavonoides

O teor de flavonoides foi determinado de acordo com Kalia et al. (2008). Uma alíquota de 0,5 mL dos extratos (na concentração de 1,5 mg/ mL) foi misturada com 1,5 mL de etanol, 0,1 ml de cloreto de alumínio ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 10% (m/v), 0.1 ml de acetato de potássio 1 M e 2,8 mL de água destilada, totalizando 5 mL de reação. Após de 30 minutos, a absorvância da mistura foi medida a 425 nm. A curva padrão para flavonoides totais foi feita utilizando soluções em diferentes concentrações de quercetina. O total de flavonoides foi expresso como equivalentes de quercetina (mg quercetina/g extrato), e os valores foram apresentados como media das análises em triplicata.

4.3.4 Caracterização química por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A análise foi realizada em cromatógrafo Shimadzu acoplado ao detector de arranjo díodos (DAD) e coluna Shimadzu C18 ODS (250 x 4,5 mm; 5 μm de tamanho de partícula). Os eluentes utilizados foram solução de ácido acético 5 % v/v (eluente A) e metanol (eluente B) o volume de injeção foi de 25 μL e fluxo de 1,0 mL/min.

A análise iniciou a 10% de metanol e seguiu gradiente linear até 100% de metanol em 35 min. A concentração de metanol foi mantida até 50 min. Depois a concentração de metanol foi retomada à inicial para preparar a coluna para a próxima análise. Os extratos analisados foram dissolvidos na fase móvel. Os padrões utilizados foram ácido ascórbico, ácido cafeico, quercetina, ácido benzoico e ácido gálico.

4.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

As atividades biológicas foram avaliadas pelos seguintes métodos:

4.4.1 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos

Foram utilizadas treze amostras de bactérias e duas de leveduras: *Candida albicans* ATCC 10231, *Sacharomyces cerevisiae* ATCC 2601, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Enterococcus faecalis* ATCC51299, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Serratia marcescens* LMI–UNIFAL, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Enterobacter cloacae* LMI-UNIFAL, *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177 (H37Ra) e *M. bovis* ATCC 27289 (BCG).

Os testes microbiológicos foram realizados no Laboratório de Microbiologia, da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). A ação antimicrobiana foi avaliada por difusão em ágar segundo metodologia M7A6 (CLSI, 2003); M44-A2 (CLSI, 2009) com pequenas alterações realizadas por Silva et al. (2010). Foi preparada uma suspensão bacteriana em soro fisiológico (solução de NaCl a 0,9%) com turvação correspondente ao tubo 0,5 da Escala de Mac Farland e inoculada na superfície do meio de cultura ágar Mueller Hinton para bactérias e ágar Mueller Hinton, suplementado com 2% de glicose, para as leveduras, com auxílio de swab. Quarenta microlitros dos extratos foram colocados nos poços de 4 mm de diâmetro feitos com tubo de metal superfície da placa de meio de cultura. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após a incubação, foi realizada a leitura dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano, utilizando como controle positivo, solução de clorexidina a 0,12% (v/v) e como controle negativo, água destilada.

Os extratos foram submetidos ao teste de determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de microdiluição em caldo conforme metodologia proposta nos documentos M27A3 (CLSI, 2008) e M7A6 (CLSI, 2003). Foram utilizadas placas de 96 poços. Os extratos foram diluídos no caldo Mueller Hinton em

microplaca, a partir da concentração de 25 mg/mL até 0,05 mg/mL. As placas foram incubadas por 24 horas, a 37°C. Foi realizada a leitura visual, observando a inibição ou crescimento bacteriano pela turvação do meio de cultura. Após a leitura visual, foram adicionados 15 µL do corante resazurina (0,01% m/v) para identificar os poços com crescimento bacteriano. Nos poços onde não houve mudança de cor do corante foi considerado ausência de bactérias viáveis. A concentração microbicida mínima (CMM) foi realizada com base nos resultados da CIM, utilizando-se as suspensões provenientes dos poços das placas após leitura visual, antes da adição de resazurina. Alíquotas de 10 µL de cada poço foram inoculadas em placas contendo ágar nutriente. Após a incubação por 24 horas a 37°C, a CMM foi considerada a menor concentração na qual não houve crescimento visível no ágar. Os testes difusão em Ágar, CIM e CMM foram realizados em triplicata.

4.4.2 Avaliação da atividade antimicobacteriana

A atividade antimicobacteriana sobre *M. tuberculosis* ATCC 25177 (H37Ra) e *M. bovis* ATCC 27289 (BCG) foi determinada pela técnica de difusão em meio Middlebrook 7H10 Agar adicionado de Middlebrook OADC Enrichment. Os extratos foram solubilizados em DMSO com concentração de 50 mg/mL e adicionados em discos de papel de filtro de 10 mm de diâmetro e secos na estufa a 37°C. O ágar Middlebrook 7H10 foi inoculado com uma suspensão de *M. tuberculosis* e *M. bovis* em soro fisiológico com turvação correspondente ao tubo 2,0 da Escala de Mac Farland com auxílio de pérolas de vidro para desagregação das colônias. Foram utilizadas como controle as soluções de Rifamicina 50 µg e água destilada. As culturas foram incubadas a 37°C por 28 dias. Após a incubação, foi realizada leitura dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano. Os ensaios foram realizados em triplicata (CLSI- M24-A2, 2011).

4.4.3 Atividade antioxidante (sequestro de radical livre DPPH)

A propriedade dos extratos hidroetanólicos de *E. cotinifolia* de sequestrar radicais livres DPPH foi avaliada de acordo com o método descrito por Yen; Chang; Duh (2005). Diferentes concentrações dos extratos (entre 400 e 1,56 µg/mL, em diluição seriada de razão 2) em uma solução etanólica (2 mL) foram misturados com 0,5 mL de DPPH (0,5 mM, diluído em etanol). Depois da incubação por 30 min, ao abrigo da luz, em temperatura ambiente, a absorbância foi medida em 517 nm. O branco do teste foi composto por todos os reagentes, exceto os extratos. Ácido ascórbico, quercetina e BHT foram utilizados como controles positivos. A propriedade de sequestro foi calculada em porcentagem de radicais DPPH sequestrados, usando a seguinte equação:

Sequestro de radical DPPH (%) = [(absorbância do branco – absorbância da amostra)/ (absorbância branco)] x 100.

Os valores foram apresentados como média das análises em triplicata. O valor EC50 é a concentração efetiva que pode sequestrar 50% dos radicais DPPH da solução. O valor DPPH remanescente refere-se à porcentagem de DPPH restante na solução, após a ação da amostra (igual a 100 - porcentagem de sequestro).

4.4.4 Avaliação da atividade citotóxica dos extratos sobre cultura celular

A citotoxicidade foi avaliada por meio do método que se baseia na medida da atividade das enzimas desidrogenases mitocondriais, a qual quando ativa, é capaz de metabolizar o reagente MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) em um composto colorido denominado formazan. Neste teste foram semeadas 1×10^5 da linhagem celular de rim de camundongos neonatos (BHK-21) por poço, em placas de 96 poços contendo meio de cultura MEM, acrescido de 10% de soro fetal bovino e antibióticos. Após 24 h de incubação a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ foi observado a formação de monocamada e o meio de

cultivo foi removido e adicionado à cultura 0,1 mL de meio MEM contendo 1% de soro fetal bovino com diluições decrescentes dos extratos (5mg/mL a 0,039 mg/mL). As microplacas foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ por 48h. Após esse período foi acrescentado 10 µL de MTT a uma concentração de 5mg/mL e incubou-se por 4 h a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ para a incorporação do MTT e formação dos cristais de formazan. Posteriormente foi removido cuidadosamente o meio de cultura e solubilizado os cristais de formazan pela adição de 100 µL de dimetil sulfoxido (DMSO). A análise espectrofotométrica foi realizada em um leitor de microplacas com comprimento de onda de 600 nm. A porcentagem de citotoxicidade foi calculada utilizando a fórmula $[(A-B) / A \times 100]$, onde A e B são valores das densidades ópticas das células controle e tratadas, respectivamente. A concentração citotóxica para 50% das células (CC₅₀) foi estimada a partir de curvas de concentração-efeito após análise de regressão linear (ARAUJO et. al., 2008). Os testes foram realizados em duplicata juntamente com o controle da viabilidade celular.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A avaliação estatística dos resultados de fenólicos e flavonoides foi realizada por meio do *software* SISVAR 5,3, pela análise de variância (ANAVA) e aplicado o Teste de Scott-Knott para observar as diferenças significativas entre os valores médios ($p < 0,05$) (SCOTT; KNOTT, 1974).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos estão descritos abaixo.

5.1 ANÁLISE GRANULOMÉTRICA DOS PÓS

O grau de divisão ou a granulometria de pós é expresso pela referência à abertura nominal da malha do tamis utilizado (FARMACOPEIA, 2010).

A avaliação granulométrica do material moído é um parâmetro importante a ser estabelecido, pois representa influência direta sobre a eficiência no processo extrativo. Interfere na superfície de contato da droga vegetal e o líquido extrator, propiciando a interação dos mesmos e interferindo tanto no rendimento final do extrato quanto no teor de compostos ativos (MIGLIATO et al., 2007).

O tamanho médio para folha, caule, raiz e fruto foram 204,43, 218,04, 216,39 e 200,20 mm respectivamente. Foram classificados como moderadamente grosso, no qual partículas passam em sua totalidade pelo tamis de 710 μm e, no máximo 40% pelo tamis com abertura nominal de malha de 355 μm (FARMACOPEIA, 2010).

5.2 TRIAGEM FITOQUÍMICA, COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONÓIDES

A triagem fitoquímica revelou a presença de flavonoides e taninos para os extratos de folha fresca e seca, caule fresco e seco, e raiz seca. O extrato de raiz fresco não apresentou flavonoides, porém houve a presença de taninos (TABELA 1, FIGURA 4 e FIGURA 5).

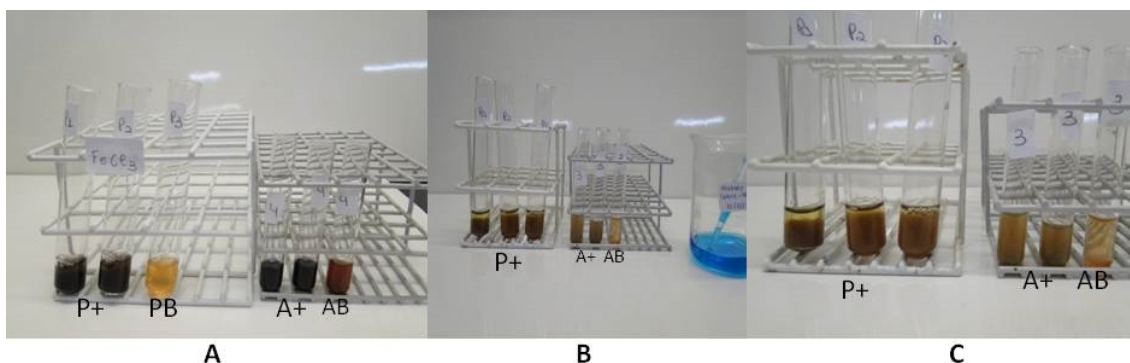
Em estudos realizados por Jayalakshmi; Raveesha; Amruthesh (2011) e Jayalakshmi; Raveesha; Amruthesh (2012), o extrato da folha de *E. cotinifolia* apresentou flavonoides, terpenóides, taninos e esteroides.

Tabela 1- Triagem fitoquímica dos extratos de *Euphorbia cotinifolia*.

Extratos/ Compostos	Antraquinonas	Flavonóides			Taninos			Saponinas	Alcalóides
		Shinoda	AlCl ₃	FeCl ₃	Proteínas	Acetato	Alcalóides		
Folha fresca	-	+	+	+	-	+	-	-	-
Folha seca	-	+	+	+	-	+	+	-	-
Caule fresco	-	-	+	+	+	+	+	-	-
Caule seco	-	+	+	+	-	+	-	-	-
Raiz fresca	-	-	-	+	-	+	-	-	-
Raiz seca	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Fruto fresco	-	+	+	+	-	+	+	-	-
Fruto seco	-	+	+	+	-	+	+	-	-

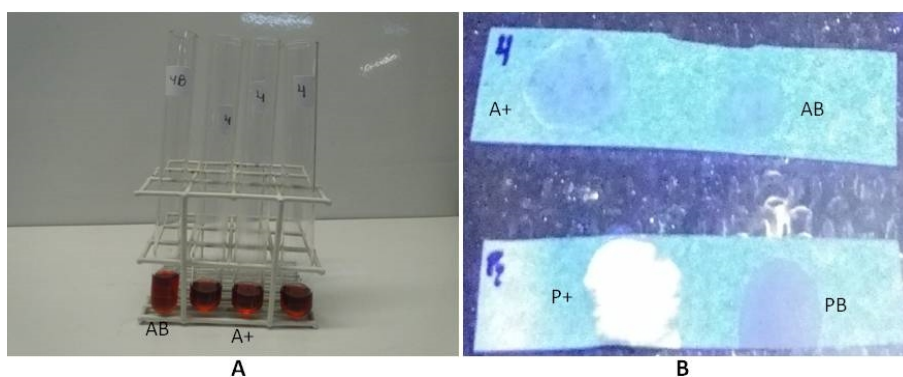
- ausência + presença

Figura 4 – Triagem fitoquímica para taninos: A) Reação com cloreto de férrico do extrato de folha seca; B) Reação de acetato de cobre do extrato de caule fresco; C) Reação de precipitação de alcalóides do extrato de caule fresco. P+: Padrão positivo PB: branco do padrão A+: amostra positiva AB: branco da amostra.



Fonte: Do autor.

Figura 5 – Triagem fitoquímica para flavonóides: A) Reação de Shinoda; B) Reação com cloreto de alumínio. P+: Padrão positivo PB: branco do padrão A+: amostra positiva AB: branco da amostra.



Fonte: Do autor.

O teor de compostos fenólicos dos extratos hidroetanólicos variaram de 71,66 a 335,64 mg ácido gálico/g. O caule seco apresentou o maior teor (TABELA 2 e FIGURA 6). A extração com a planta seca foi estatisticamente maior quando comparado com a extração com a planta fresca, exceto para o fruto, no qual as concentrações de fenólicos foram maiores no extrato fresco.

Isso pode ser explicado pelo fato que no fruto há uma maior concentração de açúcares que após o aquecimento pode ocorrer Reação de Maillard que é caracterizada pela junção do grupo carbonila dos açúcares redutores com o grupo amínico das proteínas, de peptídios ou de aminoácidos (SHIBAO; BASTOS, 2011). Misnawi; Jamilah; Nazamid (2005) verificaram diminuição de 3% no teor de polifenóis totais durante a torração de licor de cacau a 120°C por 45 minutos,

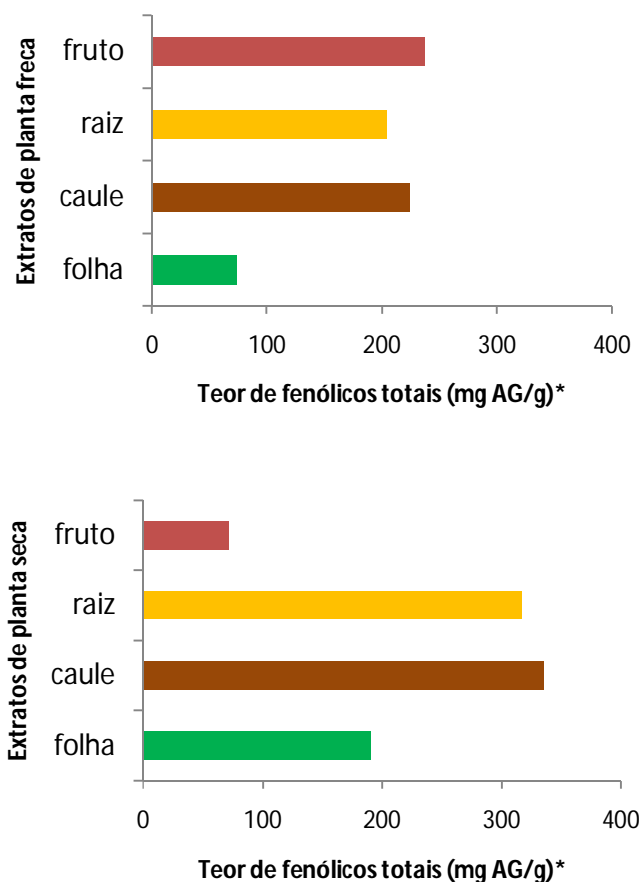
sugerindo que os polifenóis possam se ligar às pirazinas (compostos formados pela Reação de Maillard).

Tabela 2- Teor de compostos fenólicos totais (mg de ácido gálico /g) nos extratos de *Euphorbia cotinifolia*.

Amostra / Extratos hidroetanólicos	Teor de fenólicos totais (mg AG/g)*	
	Extrato fresco	Extrato seco
Folha	73,81 ± 5,0 ^a	190,23 ± 7,9 ^b
Caule	224,30 ± 7,7 ^d	335,64 ± 8,1 ^g
Raiz	204,45 ± 6,5 ^c	316,86 ± 12 ^f
Fruto	237,45 ± 6,8 ^e	71,66 ± 1,7 ^a

* Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=3). Médias com letras diferentes são estatisticamente diferentes (Scott-Knott p<0,05).

Figura 6- Teor de compostos fenólicos (mg ácido gálico/g amostra) nos extratos hidroetanólicos de *Euphorbia cotinifolia*.



Fonte: Do autor.

Com relação ao teor de flavonoides o extrato de folha seca apresentou o maior teor ($18,52 \pm 0,5$ mg quercetina/g) e raiz fresca o menor ($1,01 \pm 0,2$ mg quercetina/g). Os extratos secos apresentaram valores estatisticamente maiores que os extratos frescos, corroborando com os resultados de compostos fenólicos (TABELA 3 e FIGURA 7).

Basma et al. (2011) avaliaram a composição química da folha, flor, raiz e caule de *E. hirta*. O extrato de folha apresentou maior teor de fenólicos totais 206,17 mg AG/ g ($\pm 1,95$), seguido da flor 117,08 mg AG/g ($\pm 3,10$), raiz 83,15 mg AG/g ($\pm 1,19$) e caule 65,70 mg AG/g ($\pm 1,72$). Análise fitoquímica do extrato de folha de *E. hirta* revelou a presença de açúcares redutores, terpenóides, alcalóides, esteróides, taninos, flavonóides e compostos fenólicos.

O teor de compostos fenólicos foi maior para os extratos testados neste estudo. O extrato de caule seco de *E. cotinifolia* foi o que apresentou maior teor de fenólicos, enquanto que no estudo de Basma et al. (2011) foi o extrato da folha. Isso pode ser explicado pela diferença de espécie. Sabe-se que cada espécie apresenta uma composição química diferente, podendo haver ainda diferenças decorrentes do solo, clima e sazonalidade.

Diversas atividades biológicas, como a antioxidante e antimicrobiana, podem ser relacionadas ao teor de fenóis, como taninos e flavonoides (EINBOND et al., 2004; BANERJEE; DASGUPTA, 2005; CHOI et al., 2006).

Compostos fenólicos e flavonoides de plantas exibem atividade antimicrobiana ao inibir o crescimento bacteriano, reagem com o DNA e interferem na replicação do DNA (MALEKI et al., 2008; SEYYEDNEJAD et al., 2008).

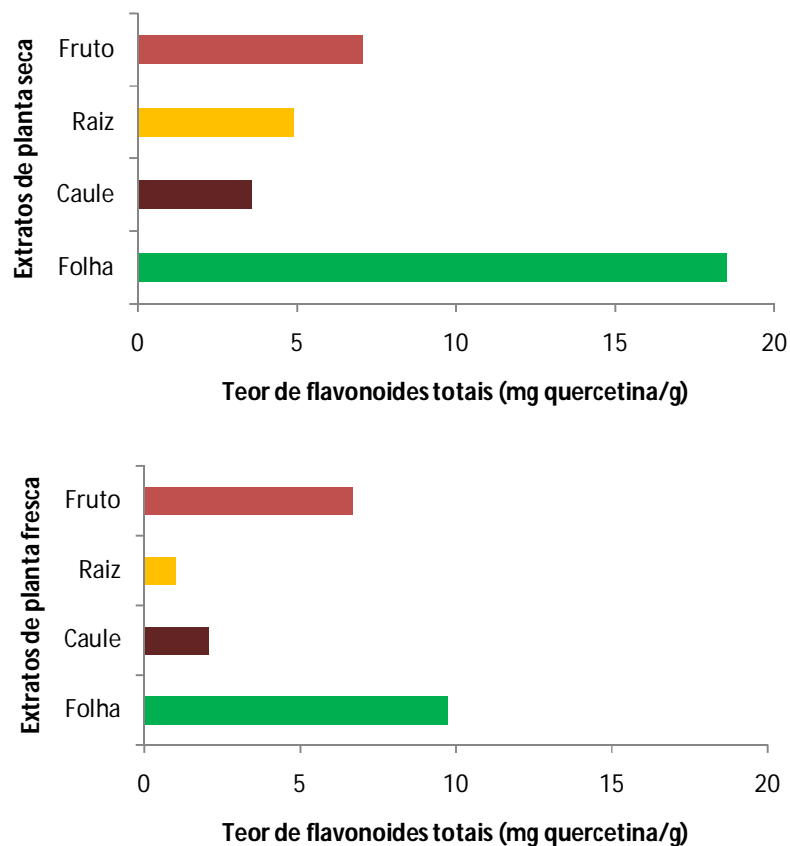
Os taninos, presentes em células vegetais, são potentes inibidores de muitas enzimas hidrolíticas usadas por fitopatógenos (KAMBA; HASSAN, 2010).

Tabela 3 - Teor de flavonoides totais (mg quercetina/g) nos extratos de *Euphorbia cotinifolia*.

Amostra /Extratos hidroetanólicos	Teor de flavonoides totais (mg quercetina/g)*	
	Extrato fresco	Extrato seco
Folha	9,75 ± 0,7 ^b	18,52 ± 0,5 ^a
Caule	2,06 ± 0,1 ^f	3,60 ± 0,1 ^e
Raiz	1,01 ± 0,2 ^g	4,90 ± 0,5 ^d
Fruto	6,69 ± 0,7 ^c	7,09 ± 0,9 ^c

* Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=3). Médias com letras diferentes são estatisticamente diferentes (Scott-Knott p<0,05).

Figura 7 - Teor de flavonoides totais (mg AG/g amostra) dos extratos hidroetanólicos de *Euphorbia cotinifolia*.



Fonte: Do autor.

5.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).

Diversos pesquisadores têm trabalhado na separação, identificação, quantificação e utilização dos compostos fenólicos em plantas, enfrentando muitos problemas metodológicos, pois além de englobarem muitas substâncias, como fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides, taninos e ligninas, estes compostos apresentam, na maioria, polaridade elevada, são muito reativos e suscetíveis à ação de enzimas (SOARES, 2002).

Levando em consideração a maior atividade biológica, os extratos de planta fresca e seca foram selecionados para análise da composição química em CLAE.

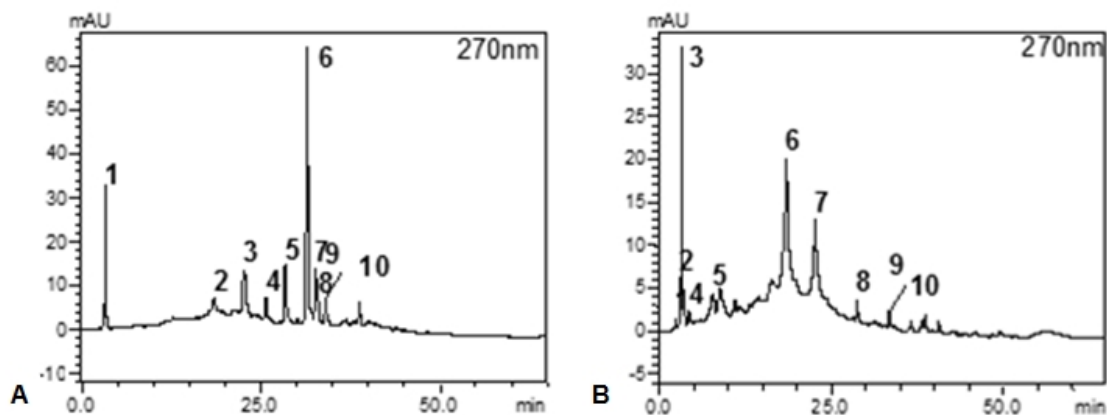
Pode-se observar nos cromatogramas (FIGURA 8) que os compostos eluídos primeiramente apresentam características de maior polaridade e os posteriores apresentam menor polaridade, sendo necessária uma maior concentração de metanol para o arraste dessas substâncias. Ao se considerar os compostos fenólicos, substâncias caracterizadas nos extratos, sugere-se que os picos eluídos inicialmente correspondem a estes, por apresentarem espectros com absorção na região ultravioleta.

Ao se comparar os picos próximos de 18 min. de tempo de retenção da folha fresca (pico 2; FIGURA 8A, TABELA 4) e da folha seca (pico 6; FIGURA 8B, TABELA 4), a área deste pico na folha seca é em torno de 10 vezes maior que da folha fresca. Isso evidencia uma maior quantidade de compostos fenólicos na folha seca. De acordo com Mabry; Markham; Thomas (1970), os compostos fenólicos, de modo geral, apresentam pico de absorção da luz ultravioleta na faixa de 250 e 350 nm, e a análise dos extratos foi realizada em 270 nm.

De acordo com padrões utilizados, foi possível identificar a presença do ácido cafeico para a folha fresca (pico 2; FIGURA 8A) e para a folha seca (pico 6; FIGURA 8B).

O resultado obtido pela cromatografia líquida confirma os resultados expressos na análise de compostos fenólicos totais pelo método Folin-Ciocalteau.

Figura 8- Cromatogramas; A) Extrato de folha fresca; Pico 2- ácido cafeico B) Extrato de folha seca; Pico 6 – ácido cafeico.



Fonte: Do autor.

Foram isolados a partir do extrato de folha de *E. cotinifolia* 17 polifenóis incluindo dois novos elegantininos e uma trigaloil-glucosilcampferol por espectrometria no ultravioleta (UV), espectrometria de massa (ESI-MS), ressonância magnética nuclear (RMN 1H) e 1D/2D RMN. As estruturas destes compostos foram caracterizados como 1-O-galoil-3,6-hexahidroxidifenol-DB1, 4 - glicopiranosose, 1-O-galoil-3, 4-B1-D-glicopiranosose e campferol 3-O-(2", 3", 6 "-tri-O-galoil)-β-D-glicopiranosídeo (MARZOUK et al., 2012).

A estrutura de um novo glicosídeo galotanino, ácido gálico 4-O-(2', 3', 6'-tri-O-galoil)-β-D-glicopiranosídeo e um novo glicosídeo trigaloil-flavonol e isoquercitrina 2", 3", 6 "-tri-O 8-galato foi isolado a partir da porção solúvel em metanol do extrato acetônico da folha de *E. cotinifolia*. Além disso, doze taninos e flavonoides glicosilados também foram isolados e as suas estruturas foram estabelecidas por processos químicos e espectrais por meio de (UV, ESI/MS, RMN 1D e 2D) (MARZOUK, 2008).

A análise química do óleo essencial da folha de *E. cotinifolia* apresentou beta-cariofileno (39.3 %), germacrene-D (21.5 %) e alpha-copaene (9.3%) (ROJAS et al., 2009).

Estes estudos evidenciaram que há um grande número de compostos bioativos nos extratos de *E. cotinifolia*.

Tabela 4 - Tempo de retenção, área e altura dos picos obtidos por CLAE do extrato de folha fresca e seca de *Euphorbia cotinifolia*.

Pico	Extrato de folha fresca			Extrato de folha seca		
	Tempo de Retenção	Área	Altura	Tempo de Retenção	Área	Altura
1	3.313	220242	31978	2.410	4986	1046
2	18.466	50763	2310	2.963	30075	5519
3	22.613	340208	9760	3.241	333656	32367
4	25.720	85041	4804	4.348	21618	1306
5	28.387	234536	12446	7.788	38297	1625
6	31.417	982442	61119	18.481	520472	14211
7	32.649	174460	11609	22.646	248823	7944
8	33.024	86802	4840	28.716	35426	2414
9	34.020	70213	5207	33.379	24868	1860
10	38.805	71418	4818	36.555	8437	891

5.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIMICOBACTERIANA

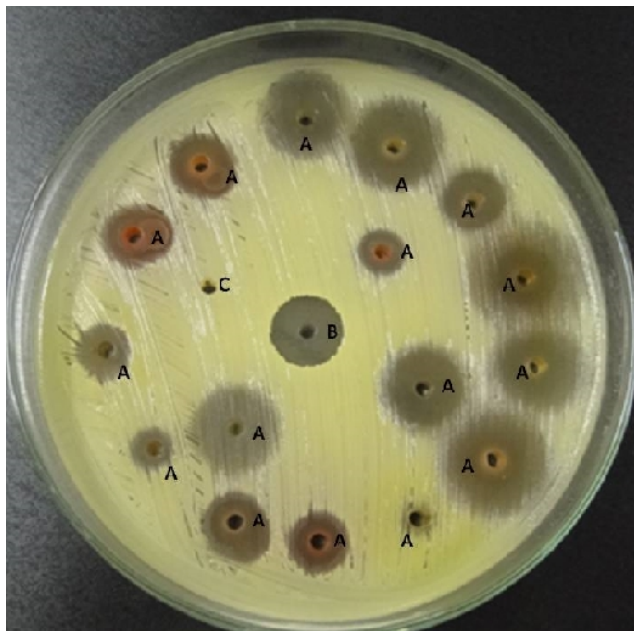
Os resultados do teste de difusão em ágar demonstraram que as bactérias *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis* foram sensíveis aos diferentes extratos testados, apresentando halos variáveis para cada extrato. Não houve inibição das leveduras.

Os extratos secos apresentaram maiores halos de inibição e maior espectro de ação quando comparados com os extratos frescos.

Os extratos da folha fresca e da folha seca tiveram o mesmo espectro de ação, porém o da folha seca apresentou halos maiores para *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus* e *Proteus mirabilis* (TABELA 5; FIGURA 9).

Nenhum dos extratos apresentou atividade antimicobacteriana nas concentrações testadas (TABELA 5 e FIGURA 10).

Figura 9 – Teste de difusão em ágar com *M. luteus* frente aos extratos de *Euphorbia cotinifolia*. A) Extratos; B) Clorexidina (controle positivo); C) Água destilada (controle negativo).



Fonte: Do autor.

Figura 10 - Teste de difusão. Controle positivo (rifampicina) e negativo (água destilada) do cultivo de *M. bovis*.



Fonte: Do autor.

Tabela 5- Atividade antimicrobiana dos extratos de *E. cotinifolia* pelo método de difusão em ágar (halos de inibição em milímetros).

Microrganismos		Folha		Caule		Raiz		Fruto		Clo* 0,12%	Rifamicina
		Fresco	Seco	Fresco	Seco	Fresco	Seco	Fresco	Seco		
Gram-positivos											
<i>B. subtilis</i>	ATCC 6633	9,5	9,0	10,0	8,0	0	5,0	9,0	0	15	NT
<i>B. cereus</i>	ATCC 11778	7,0	7,5	7,0	0	0	7,0	0	0	12	NT
<i>M. luteus</i>	ATCC 9341	17,5	20,0	20,0	0	10,0	20,0	17,5	15,0	19	NT
<i>E. faecalis</i>	ATCC 51299	0	0	0	0	0	0	0	0	19	NT
<i>S. aureus</i>	ATCC 6538	10,0	10,0	9,0	0	0	10,0	0	0	18	NT
Gram-negativos											
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	0	0	0	0	0	0	0	0	9	NT
<i>E. aerogenes</i>	LMI-UNIFAL	0	0	0	0	0	0	0	0	6	NT
<i>S. marcescens</i>	LMI-UNIFAL	0	0	0	0	0	0	0	0	12	NT
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853	0	0	0	0	0	0	0	0	10	NT
<i>P. mirabilis</i>	ATCC 25922	12,0	13,0	10,0	12,5	10,0	13,0	12,5	12,0	-	NT
<i>S. typhimurium</i>	ATCC 14028	0	0	0	0	0	0	0	0	9	NT
Leveduras											
<i>C. albicans</i>	ATCC 10231	0	0	0	0	0	0	0	0	14	NT
<i>S. cerevisiae</i>	ATCC 2601	0	0	0	0	0	0	0	0	18	NT
Micobactérias											
<i>M. tuberculosis</i>	ATCC 25177 (H37Ra)	0	0	0	0	0	0	0	0	NT	20
<i>M. bovis</i>	ATCC 27289 (BCG)	0	0	0	0	0	0	0	0	NT	20

*Clo: clorexidina.

NT: não testado.

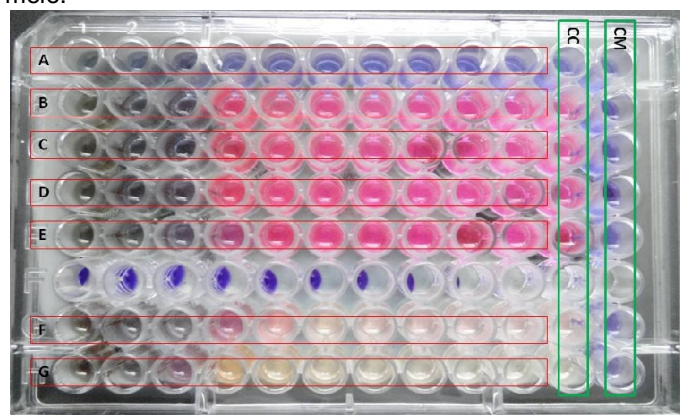
Os valores de CIM estiveram abaixo de 6,25 mg/mL e a CMM entre 25 e 3,12 mg/mL. *M. luteus* apresentou CIM entre 0,05 a 0,78 mg/mL (TABELA 6; FIGURA 11; FIGURA 12).

Todos os microrganismos foram sensíveis aos extratos testados, porém dependente da concentração.

Os extratos secos apresentaram menores valores de CIM e CMM quando comparados aos extratos frescos (TABELA 6).

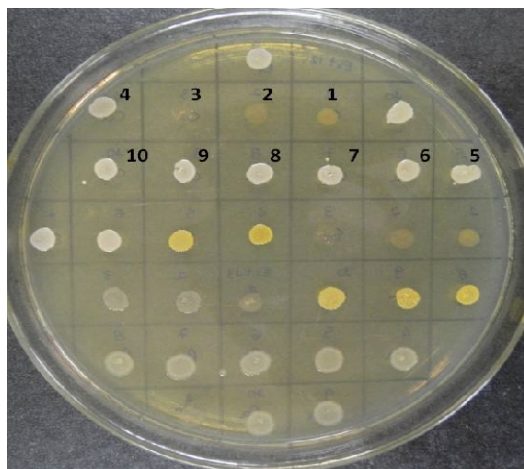
A maior concentração de compostos fenólicos e flavonoides para os extratos secos sugere uma possível ação antimicrobiana mediada por esses compostos.

Figura 11 – Microplaca de CIM após adição de resazurina. A) Controle de esterilidade do extrato; B) C) D) E) F) G) Microrganismos com diferentes concentrações do extrato; CC) Controle de crescimento; CM) Controle de esterilidade do meio.



Fonte: Do autor.

Figura 12 – Determinação da Concentração Microbicida Mínima (CMM); 2) CMM a 12,5 mg/mL para o extrato de caule fresco de *Euphorbia cotinifolia*.



Fonte: Do autor.

Tabela 6- Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) em mg/mL dos extratos de *Euphorbia cotinifolia*.

Microrganismos	Folha				Caule				Raiz				Fruto			
	Fresco		Seco		Fresco		Seco		Fresco		Seco		Fresco		Seco	
	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM
Gram-positivos																
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	6,25	25,0	3,12	3,12	3,12	3,12	6,25	ND	6,25	12,5	6,25	25,0	6,25	12,5	3,12	6,25
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	3,12	ND	0,78	0,78	1,56	12,5	3,12	ND	3,12	ND	3,12	ND	3,12	25,0	1,56	ND
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	0,097	12,5	0,05	0,78	0,05	6,25	0,19	0,78	1,56	12,5	3,12	ND	0,097	12,5	3,12	12,5
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299	6,25	12,5	6,25	12,5	6,25	12,5	12,5	12,5	12,5	ND	6,25	ND	6,25	6,25	6,25	6,25
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	3,12	12,5	3,12	12,5	6,25	12,5	6,25	6,25	3,12	12,5	3,12	ND	6,25	12,5	6,25	6,25
Gram-negativos																
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	3,12	25,0	6,25	12,5	6,25	12,5	6,25	25,0	6,25	6,25	3,12	ND	6,25	12,5	3,12	6,25
<i>Enterobacter aerogenes</i> LMI-UNIFAL	3,12	6,25	6,25	12,5	6,25	6,25	6,25	12,5	6,25	12,5	6,25	ND	6,25	12,5	6,25	6,25
<i>Serratia marcescens</i> LMI-UNIFAL	3,12	6,25	3,12	12,5	3,12	ND	3,12	ND	6,25	ND	6,25	ND	6,25	12,5	6,25	12,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	6,25	25,0	6,25	25,0	6,25	25,0	6,25	25,0	6,25	ND	6,25	ND	6,25	25,0	6,25	12,5
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25922	6,25	25,0	3,12	1,56	6,25	25,0	6,25	12,5	3,12	ND	6,25	ND	6,25	12,5	6,25	12,5
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	3,12	25,0	6,25	25	6,25	25,0	6,25	6,25	6,25	ND	6,25	ND	6,25	25,0	6,25	25,0
Leveduras																
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	3,12	6,25	3,12	6,25	3,12	12,5	3,12	6,25	3,12	3,12	3,12	ND	3,12	6,25	3,12	6,25
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 2601	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	25,0	6,25	6,25	12,5	12,5	6,25	ND	3,12	12,5	6,25	12,5

ND: não detectado nas concentrações testadas.

Os polifenóis têm como importante característica sua hidrofobicidade, o que lhes permite a difusão em lipídeos de membrana celular bacteriana, de mitocôndrias e de outros componentes celulares como proteínas e enzimas, desestabilizando as estruturas e tornando-as mais permeáveis (BURT, 2004). O rompimento da membrana citoplasmática provoca a saída de elementos vitais à célula como fosfatos, íons, purinas e ácidos nucleicos ou a entrada de substâncias nocivas ao metabolismo bacteriano (TAVARES, 1999).

As bactérias *E. coli*, *E. aerogenes*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium* e as leveduras *C. albicans* e *S. cerevisiae* não apresentaram halos de inibição no teste de difusão em agar, porém foram sensíveis no teste de microdiluição em caldo. No entanto, estas apresentaram altas CIM se comparadas com as bactérias que foram sensíveis no teste de difusão.

É interessante salientar que o teste de difusão em ágar é um teste qualitativo, no qual as substâncias de caráter apolar podem não se difundirem bem no meio, já o teste de microdiluição em caldo é um teste quantitativo, portanto mais sensível.

Há poucos relatos na literatura sobre a atividade antimicrobiana de *E. cotinifolia*. No entanto, vários estudos comprovam a atividade antimicrobiana de diferentes espécies do gênero *Euphorbia* (GONÇALVES et al., 2006; SUDHAKAR et al., 2006). Ramachandran et al. (2008) observaram atividade dos extratos acetônicos e metanólicos de *E. fusiformis* contra bactérias patogênicas humanas. A atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas foi relatada para extrato metanólico de *E. thymifolia* (JAYAVEERA et al., 2010). Extratos metanólicos e etanólicos de *E. hirta* apresentaram significativa atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas (KUMAR; MUTYALA; RAJA, 2010).

Em estudos realizados por Jayalakshmi; Raveesha; Amruthesh (2011), o extrato metanólico da folha de *E. cotinifolia* apresentou atividade contra bactérias fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas* sp., *Agrobacterium* sp., *Erwinia* sp. e *Pseudomonas* sp., com halos que variaram entre 16 a 19 mm. O extrato metanólico apresentou o maior espectro de ação. No teste de microdiluição em caldo os extratos metanólicos e de acetato de etila apresentaram as menores concentrações inibitórias mínimas.

Os extratos metanólicos e de acetato de etila da folha de *E. cotinifolia* apresentaram atividade antimicrobiana para *E. coli* (MTCC 7410), *K. pneumoniae*

(MTCC 7407), *B. subtilis* (MTCC 121), *B. cereus* (MTCC 1272), *S. typhi* (MTCC 733), *E. aerogenes* (MTCC 7325) e *S. aureus* (MTCC 7443). As CIM variaram entre 0,312 a 1,25 mg/mL. Embora tenham utilizado as mesmas bactérias apresentaram CIM menores, no entanto são linhagens diferentes o que pode levar a essas variações de concentração e também utilizaram metanol e acetato de etila para a extração. (JAYALAKSHMI; RAVEESHA; AMRUTHESH, 2012).

5.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os resultados demonstraram que os extratos hidroetanólicos de folha fresca e folha seca foram os que apresentaram atividade antioxidante estatisticamente significativa, com as maiores porcentagens de sequestro de radical DPPH e menores valores de EC 50, sendo o extrato da folha seca mais efetivo que o da folha fresca, apresentando EC50 menores que o ácido ascórbico e quercetina (TABELA 7 e FIGURA 13).

Os extratos secos apresentaram maiores porcentagens de sequestro de radical DPPH e menores valores de EC 50 se comparados com extratos frescos, exceto para o caule (TABELA 7 e FIGURA 13). Os extratos secos apresentaram maior concentração de compostos fenólicos totais e flavonoides. Isso explica o fato de haver maior atividade antioxidante para os mesmos, já que os compostos fenólicos estão intimamente ligados a atividade antioxidante.

Embora a folha seca não apresentasse a maior concentração de compostos fenólicos, possui a maior concentração de flavonoides entre os extratos testados sugerindo uma justificativa de sua alta atividade antioxidante.

Antioxidantes fenólicos funcionam como sequestradores de radicais e algumas vezes como quelantes de metais (SHAHIDI; JANITHA; WANASUNDARA, 1992; SOARES, 2002), sendo provavelmente estes os responsáveis pela atividade antioxidante dos extratos de *E. cotinifolia*.

Estudos relatam a atividade antioxidante de *E. tirucalli* (MACHADO, 2007) e *E. hirta* (SUBRAMANIAN; BHUVANESHWARI; PRASATH, 2011).

Basma et al. (2011) avaliaram a atividade antioxidante e composição química de folha, flor, raiz e caule de *E. hirta*. A EC 50 para os extratos de folha, flor,

raiz, caule e BHT foram 0,803, 0,972, 0,989, 1,358 e 0,794 mg/mL, respectivamente. O poder redutor do extrato da folha foi comparável com a do ácido ascórbico e verificou-se ser dependente da dose.

Marzouk et al. (2012) isolaram polifenóis, incluindo dois elagitaninos novos e um glucosilcampferol trigaloil de *E. cotinifolia* e estes apresentaram alta atividade no ensaio de DPPH, com valores de EC 50 menores que o do ácido ascórbico.

Em estudo realizado por Jayalakshmi; Raveesha; Amruthesh (2012) o extrato de clorofórmio *E.cotinifolia* foi o mais ativo com um valor de IC50 de 15 ug/mL seguido por éter de petróleo, acetato de etila e metanol, com valores de IC50 de 17, 18 e 19 µg/mL, respectivamente. Estes extratos mostraram atividade de eliminação de radicais mais elevado em comparação com o ácido ascórbico com valor de IC50 de 25 µg/mL.

Tabela 7- Atividade antioxidante dos extratos hidroetanólicos de *Euphorbia cotinifolia*.

Extratos Etanólicos	% Sequestro de radical DPPH (a 100 µg/mL)*	EC ₅₀ (µg/mL)	DPPH remanescente (%)
Folha fresca (FF)	86,57 ± 0,2 ^f	11,59	13,43
Folha seca (FS)	85,59 ± 0,1 ^f	7,32	14,41
Caule fresco (CF)	74,51 ± 0,9 ^d	66,69	25,49
Caule seco (CS)	54,35 ± 2,1 ^a	103,54	45,65
Raiz fresca (RF)	62,84 ± 1,9 ^c	82,27	37,16
Raiz seca (RS)	85,93 ± 0,1 ^f	25,03	14,07
Fruto fresco (FrF)	59,17 ± 0,8 ^b	78,26	40,83
Fruto seco (FrS)	80,31 ± 1,1 ^e	39,25	19,69
Quercetina	81,44 ± 0,2 ^e	4,57	18,56
Ácido Áscórbico	90,43 ± 0,3 ^g	6,49	9,57
BHT	63,7 ± 0,10 ^c	70,11	36,30

* Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=3). Médias com letras diferentes são estatisticamente diferentes (Scott-Knott p<0,05).

Figura 13- Valores de EC₅₀ (µg/mL) para o sequestro de radical livre DPPH dos extratos hidroetanólicos de *Euphorbia cotinifolia*.



Fonte: Do autor.

5.6 CITOTOXICIDADE

A avaliação da citotoxicidade é uma etapa essencial no processo de desenvolvimento de novas drogas, pois, permite determinar a concentração a ser utilizada e fornece dados importantes quanto aos possíveis danos celulares (ARAÚJO et al., 2008).

Os resultados demonstraram que nenhum dos extratos apresentou toxicidade contra as células BHK nas concentrações testadas, quando comparado com o controle.

Poucos estudos foram encontrados na literatura sobre a avaliação da citotoxicidade de *E. cotinifolia*.

Betancur-Galvis et al. (2002) avaliaram a atividade citotóxica utilizando o método MTT de várias espécies do gênero *Euphorbia*, dentre elas a *E. cotinifolia*. O extrato de diclorometano da folha e etanólico do caule apresentou CC50 (50% da concentração citotóxica) de 150.3 e 120.5 mg/mL respectivamente. Os extratos hidrometanólicos da folha e caule não apresentaram citotoxicidade. Este estudo corrobora com nossos resultados, pois também apresentaram ausência

citotoxicidade. Pode-se observar também que no trabalho de Betancur-Galvis et al. (2002), as concentrações foram maiores que neste trabalho e mesmo assim não houve toxicidade.

6 CONCLUSÃO

- Extratos hidroetanólicos de *Euphorbia cotinifolia* apresentaram atividade antimicrobiana, antioxidante, compostos fenólicos e metabólitos secundários.

- A análise em CLAE sugere a presença de ácido cafeico para os extratos de folha fresca e seca e demonstrou uma maior concentração de compostos fenólicos na folha seca.

- A extração com a planta seca favoreceu altas concentrações de compostos fenólicos e flavonoides com potenciais atividades biológicas.

- O extrato da folha seca apresentou menores valores de CIM e CMM para a atividade antimicrobiana e menores valores de EC50 para a atividade antioxidante.

- Extratos hidroetanólicos de *E. cotinifolia* mostraram ausência de atividades antimicobacterianas (*M. bovis* e *M. tuberculosis*) e ausência de potencial citotoxicidade *in vitro*.

REFERÊNCIAS

ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 232-240, 2007.

ARAÚJO, S. A. C. de. et al. Avaliação *in vitro* da atividade citotóxica de drogas antivirais em fibroblastos caprinos. **Ciência Animal**, Ceará, v. 18, n. 1, p.25-31, 2008.

AVELAR, B. A. **Detecção *in vitro* de citocinas intracitoplasmáticas (interferon gama, fator de necrose tumoral, interleucina 4 e interleucina 10) em leucócitos humanos tratados com extrato bruto diluído de *Euphorbia tirucalli***. 54 f. 2010. Dissertação (Mestrado do Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas). Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina.

ÁVILA, H.P. **Atividade antibacteriana de chalconas**. 78 f. 2008. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

BAILEY, L. H. **Manual of Cultivated Plants, Revised edition**. New York: McMillan, p. 88, v. 1, 1949.

BANERJEE, A., DASGUPTA, N.B. *In vitro* study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. **Food Chem.**, v. 90, p. 727-33, 2005.

BASMA, A. A. et al. Atividade antioxidante e triagem fitoquímica do extrato metanólico de *Euphorbia hirta* L. **Asian Pac J Trop Med.** , v. 4, n. 5, p. 386-90, 2011.

BARREIRO, E. J. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Quim. Nova**, v. 32, n. 3, p.679-688, 2009.

BETANCUR-GALVIS, L. A. et al. Cytotoxic and antiviral activities of Colombian medicinal plant extracts of the *Euphorbia* genus. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 4, p. 541-546, jun. 2002.

BITU, V. et al. Phytochemical screening and antimicrobial activity of essential oil from *Lippia gracillis*. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 22, n. 1, p. 69-75, 2012.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods — a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223–253, 2004.

CAIERÃO, J. Novos Antimicrobianos: realidade e perspectivas. **NewsLab** - edição 66 – 2004.

CATENI, F. et al. New cerebroside from *Euphorbia peplis* L.: antimicrobial activity evaluation. **Bioorg Med Chem Lett**, v.13, n. 24, p.4345-4350, dez. 2003.

CHOI, Y.M. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. **LWT**, v. 39, p. 756-61, 2006.

COSTA, J. G. M. et al. Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton zehntneri* (variedade estragol). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n.4, p.583-586, Out./Dez. 2008.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 5. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, p. 1031, 1994.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **M24-A2 Susceptibility testing of *Mycobacteria*, *Nocardiae*, and other aerobic Actinomycetes**; Approved Standard - Second Edition, 2011.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard- Sixth edition. M7-A6. Wayne, PA, USA: CLSI, 2003.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**. Approved standard- Third edition. M27-A3. Wayne, PA, USA: CLSI, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts**. Approved Guideline-Second Edition. M44-A2. Wayne, PA, USA: CLSI, 2009.

DARWISH, R. et al. Screening of antibiotic resistant inhibitors form local plant material against two strains of *Staphylococcus aureus*. **J Ethnopharmacol.**, v. 79, p. 359-364, 2002.

DORMAN, H. J. D. et al. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, Hybrids, Varieties, and Cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 16, p. 4563-4569, 2003.

EINBOND, L.S. et al. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. **Food Chem**, v. 84, p. 23-8, 2004.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

GONÇALVES B. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. **Rev Bras Cienc Farm.**, v. 42, p. 195-202, 2006.

GOTTLIEB, M.G.V. et al. Estresse oxidativo como fator de risco cardiometabólico emergente. **Scientia Medica**, v. 20, n. 3, p. 243-249, 2010.

GUIMARÃES, D. O; MOMESSO, L. S; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quím. Nova**, v. 33, n. 3, 2010.

HOHMANN, J. et al. Discovery and biological evaluation of a new family of potent modulators of multidrug resistance: reversal of multidrug resistance of mouse lymphoma cells by new natural jatrophone diterpenoids isolated from *Euphorbia* species. **J Med Chem**, v. 45, n. 12, p. 2425-2431, Jun. 2002.

HOHMANN J. et al. Jatrophone diterpenoids from *Euphorbia mongolica* as modulators of the multidrug resistance of L5128 mouse lymphoma cells. **J Nat Prod.**, v. 66, p. 976-979, 2003.

HORE, S. et al. Effect of aqueous *Euphorbia hirta* leaf extract on gastrointestinal motility. **Fitoterapia**, v. 77, p. 35-38, 2006.

IRENE, G. S. et al. Current Concepts in the Management of Tuberculosis. **Mayo Clin Proc.**, v. 86, n. 4. p. 348-361, 2010.

JAKIEMIU. E.A.R. **Uma contribuição ao estudo do óleo essencial e do extrato de tomilho (*Thymus vulgaris* L.).** 90f. 2008. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

JAYALAKSHMI, B; RAVEESHA, K. A; AMRUTHESH, K. N. Phytochemical analysis and antibacterial activity of *Euphorbia cotinifolia* Linn. leaf extracts against phytopathogenic bacteria. **Journal of Pharmacy Research**, v. 4, n. 10, p. 3759-3762, 2011.

JAYALAKSHMI, B; RAVEESHA, K. A; AMRUTHESH, K. N. Evaluation of antibacterial and antioxidant potential of *Euphorbia cotinifolia* linn. leaf extracts. **Scientific Paper**, p. 1-26, 2012.

JAYAVEERA, K. N. et al. Phytochemical screening, antibacterial activity and physico-chemical constants of ethanolic extracts of *E. thymifolia*. **International J. Pharmacy and Pharmaceutical Sci.**, v. 2, p. 8-82, 2010.

KALIA, K. et al. Effects of extraction methods on phenolic contents and antioxidant activity in aerial parts of *Potentilla atrosanguinea* Lodd. and quantification of its phenolic constituents by RP-HPLC. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 56,10129 – 10134, 2008.

KAMBA, A.S.; HASSAN, L.G., Phytochemical screening and antimicrobial activities of *Euphorbia balasamifera* leaves stems and root against some pathogenic microorganisms. **African J. Pharma. Sci and Pharmacy**, v. 1, p. 57-64, 2010.

KUMAR, O. A; MUTYALA, L. N.; RAJA, K.G.R. Antibacterial evaluation of snake weed (*Euphorbia hirta* L). **J. Phytology**, v. 2, p. 8-12, 2010.

LAGE, H. et al. Antitumor activity of terpenoids against classical and atypical multidrug resistant cancer cells. **Phytomedicine**, v. 17, v. 6, p. 441-448, Mai. 2010.

LEME, C. L. D. **Anatomia Comparada do lenho do caule, raiz e ramo de algumas espécies de Euphorbiaceae da Mata Atlântica**. 73 p. 1994. Dissertação (Mestrado), Instituto de Biociências-USP, São Paulo, 1994.

LIRIO, L. G., HERMANO, M. L., FONTANILLA, M. Q. Antibacterial activity of medicinal plants from the Philippines. **Pharmaceutical Biology**, v. 36, n. 5, p. 357-359, mai. 1998.

MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. **The systematic identification of flavonoids**. Berlin: Springer-Verlag, 1970. 354 p.

MACHADO, M.M. Avaliação preliminar da *Euphorbia tirucalli* L.: screening, concentração de polifenóis, taninos e atividade antioxidante. In: I CONGRESSO DE FARMÁCIA DE MARINGÁ. 2006. **Anais...**Arq Mudi. 2007;11(Supl 1).

MAHESH, B.; SATISH, S. Antimicrobial activity of some important medicinal plant against plant and human pathogens. **World J. Agric. Sci.**, v. 4, n. 5, p. 839-843, 2008.

MALEKI, S. et al. Antibacterial activity of the fruits of Iranian *Torilis leptophylla* against some clinical pathogens. **Pakistan J. Biol. Sci.**, v. 11, p. 1286-1289, 2008.

MARZOUK M. S. A. Acylated flavonol glycosides and hydrolysable tannins from *Euphorbia cotinifolia* L. leaves. **Bull. Fac. Pharm. Cairo Univ.**, v. 46, p. 191 – 201, 2008.

MARZOUK, M.S. et al. Identificação espectroscópica de elagitaninos novos e um trigalloyl-glucosylkaempferol de um extrato de *Euphorbia cotinifolia* L. com antitumoral e antioxidante atividade. **Z Naturforsch C.**, v.67, n. 3-4, p. 151-62, 2012.

MEDINA, A. L. **Atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de araçá** (*Psidium cattleianum*). 2009. 65 f. Dissertação (Mestrado Ciência e Tecnologia Agroindustrial)- Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2009.

MIGLIATO, K. F. et al. Controle da qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Brasil. 17(1): 94-101, Jan./Mar. 2007.

MISNAWI, J.S.; JAMILAH, B.; NAZAMID, S. Changes in polyphenol ability to produce astringency during roasting of cocoa liquor. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 85, n. 6, p. 917-924, 2005

MORTAN, J.F. Ornamental plants with toxic and/or irritant properties II. **Florida State Horticultural Society**, p. 484-488, 1962.

MOTA, R. A. et al. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Braz J vet Res anim Sci**, São Paulo, v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.

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

NATARAJAN, D. et al. Anti-bacterial activity of *Euphorbia fusiformis*. A rare medicinal herb. **J Ethnopharmacol.**, v. 102, p. 123-126, 2005.

NEWMAN, D.J; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J Nat Prod.**, v. 75, n. 3, p. 311-35, 2012.

NICOLAOU, K. C.; MONTAGNON, T. **Molecules that changed the world**. Wiley-VCH: Weinheim, 2008, cap. 13.

OLIVEIRA, A.M.C. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e atividade antifúngica de pimentas do gênero *Capsicum* spp.** 81 f. 2011. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.

OLIVEIRA, R. B. de; GIMENEZ, V. M. M.; GODOY, S. A. P. de. Intoxicações com Espécies da Família Euphorbiaceae. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n.1, p. 69-71, 2007.

PALAMBO, E.; SEMPLE, S. Antibacterial activity of traditional medicinal plants. **J Ethnopharmacol.**, v. 77, p.151-157, 2001.

PASTOR-SÁNCHEZ, R. Alteraciones del nicho ecológico: resistencias bacterianas a los antibióticos. **Gaceta Sanitaria**, v. 20, p. 175-181, 2006.

PAULI, G.F. et al. New perspectives on natural products in TB drug research. **Life Sci.**, v.78, n. p.485-494, 2005.

PEREIRA, J. P.; SOUZA, C. P.; MENDES, N. M. Propriedades moluscicidas da *Euphorbia cotinifolia* L. . **Rev. Bras. Pesq. Méd. Biol.**, v. 11, p. 345-51,1978.

PERES, L.E.P. **Metabolismo secundário**. 2005. Disponível em: <http://www.ufpel.edu.br/biotecnologia/gbiotec/site/content/paginadoprofessor/uploads/professor/ce5449dfcf0e02f741a5af86c3c5ae9a.pdf?PHPSESSID=faaa31248d8149ee235c5eb0cb54830e>. Acesso em: 20 de julho de 2013.

PEREIRA, A. L. F.; VIDAL, T. F.; CONSTANT, P. B. L. Dietary antioxidants: chemical and biological importance. **Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr. = J. Brazilian Soc. Food Nutr.**, v. 34, n. 3, p. 231-247, dez. 2009.

PUSZTAI, R. et al. Macrocyclic lathyrane diterpenes as antitumor promoters. **Anticancer Res**, v. 27, n. 1A, p. 201- 205, Jan./Fev. 2007.

PRADO, A. **Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais**. 2009. 106f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo- Escola superior de agricultura Luiz de Queirós, Piracicaba, 2009.

PROJAN, S. J.; SHLAES, D. M. Antibacterial drug discovery: is it all downhill from here? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, n. s4, p. 18-22, nov. 2004.

RAMACHANDRAN, A. et al. Screening for antibacterial activity of combined extracts of *Euphorbia fusiformis* from Tamil Nadu, India: a new application. **J. Biol. Res.- Thessalon**, v. 9, p. 97-102, 2008.

RAMOS, D. F. et al. Investigation of the antimycobacterial activity of 36 plant extracts from the brazilian Atlantic Forest. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, out./dez., 2008.

RIBEIRO, S.M.R. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Biosci. J.**, v. 21, n.3, p. 133-149, 2005.

ROJAS, J. et al. Evaluation of antibacterial activity on different solvent extracts of *Euphorbia caracasana* Boiss and *Euphorbia cotinifolia* L. (Euphorbiaceae) collected in Venezuela. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v.7, n.4, p.199 – 202, 2008.

ROJAS, J. et al. The chemical composition of the essential oils of *Euphorbia caracasana* and *E. cotinifolia* (Euphorbiaceae) from Venezuela. **Nat Prod Commun.**, v. 4, n. 4, p. 571-2, 2009.

SANTOS, M. J.; MACHADO, I. C.; LOPES, A. V. Biologia reprodutiva de duas espécies de *Jatropha* L. (Euphorbiaceae) em Caatinga, Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, n. 2, p. 361-373, 2005.

SCOTT, A.; KNOTT, M. Cluster-analysis method for grouping means in analysis of variance. **Biometrics**, Washington D.C., v.30, n.3, p.507-512, 1974.

SEYYEDNEJAD, S.M. et al. Antibacterial activity of *Prunus mahaleb* and Parsley (*Petroselinum crispum*) against some pathogen. **Asian J. Biol. Sci.**, v. 1, p. 51-55, 2008.

SILVEIRA, G. P. Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana. **Quim Nova**, v. 29, p. 844-855, 2006.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P.K.; WANASUNDARA, P.D. Phenolic antioxidants. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.32, n.1, p.67-103, 1992.

SHIBAO, J; BASTOS, D.H.M. Produtos da reação de Maillard em alimentos: implicações para a saúde. **Rev. Nutr.**, v.24, n. 6, Campinas, nov./dez. 2011.

SHLAMOVITZ, G. Z; GUPTA, M; DIAZ, J. A. A case of acute keratoconjunctivitis from exposure to latex of *Euphorbia tirucalli* (pencil cactus). **J Emerg Med**, v. 36, n. 3, p. 239-241, Abr. 2009.

SILVA, R. B. et al. Antimicrobial Activity Evaluation and MIC Determination of *Bixa Orellana* L Liophilized Hydroalcoholic Extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p.171-174, Abr.-mai., 2010.

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

SINGLA, A; PATHAK, K. Phytoconstituents of *Euphorbia* species. **Fitoterapia**, v. 61, p. 483–516, 1990.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M.. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, New York, v. 299, p. 152–178, 1999.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidants. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 15, n.1, p.71-81, jan./abr., 2002.

SOUZA, M. V. N; VASCONCELOS, T. R. A. Fármacos no combate à tuberculose: passado, presente e futuro. **Quim. Nova**, v. 28, n. 4, p. 678-682, 2005.

SINGH, G. D. Inhibition of early and late phase allergic reactions by *Euphorbia hirta* L. **Phytother Res**, v. 20, n. 4, p. 316-321, abr. 2006.

SROKA, C.; CISOWSKI, W. Hydrogen peroxide scavenging antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. **Food Chem. Toxicol.**, v. 41, p. 753-758, 2003.

SUBRAMANIAN, S.P.; BHUVANESHWARI, S.; PRASATH, G.S. Antidiabetic and antioxidant potentials of *Euphorbia hirta* leaves extract studied in streptozotocin-induced experimental diabetes in rats. **Biophys Gen Physiol.**, v. 30, n. 3, p. 278-85, 2011.

SUDHAKAR M. et al. Antimicrobial activity of *Caesalpinia pulcherrima*, *Euphorbia hirta* and *Asystasia gangeticum*. **Fitoterapia**, v. 77, p. 378-380, 2006.

SUCUPIRA, N. R. et al. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **Cient. Ciênc. Biol. Saúde**, v. 14, n. 4, p. 263-9, 2012.

TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos**. 2º ed. São Paulo: Atheneu, 1999.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 3, p. 281-301, mai/jun. 2000.

TIVERON, A. P. **Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil**. 2010. 102f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queirós, Piracicaba, 2010.

TREVISAN, M. T. S. et al. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. **Quim. Nova**, v. 26, n. 3, p. 301-304, 2003.
VALGAS, C. **Avaliação de métodos de triagem para determinação de atividade antibacteriana de produtos naturais**. 2002. 91 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina - Centro de Ciências da Saúde, Florianópolis, 2002.

ZHANG, W. K. et al. Chemical constituents with antibacterial activity from *Euphorbia sororia*. **Nat Prod Res**, v. 22, n.4, p. 353-359, Mar. 2008.

WEBSTER, G.L. Classification of the Euphorbiaceae. **Annals of Missouri Botanical Garden**, v. 81, p. 3-32, 1994.

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

WESOLOWSKA, O. et al. Inhibition of MRP1 transport activity by phenolic and terpenic compounds isolated from *Euphorbia* species. **Anticancer Res**, v. 27, n. 6B, p. 4127- 4133, Nov./Dez. 2007.

WU, V. C. et al. Antibacterial effects of American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) concentrate on foodborne pathogens. **Food Science and Technology**, v. 41, p. 1834-1841, 2008.

YEN, W.J.; CHANG, L.W, DUH, P.D. Antioxidant activity of peanut seed testa and its antioxidative component, ethyl protocatechuate. **Food Sci Technol**. v.38, n.1, p. 193-200, 2005.