



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
CAMPUS DIADEMA



RAQUEL SILVEIRA BERTOLUCI

AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA E EFICÁCIA “*in vitro*” DA
Cuscuta racemosa Martius

DIADEMA
 2017

RAQUEL SILVEIRA BERTOLUCI

AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA E EFICÁCIA “*in vitro*” DA
Cuscuta racemosa Martius

Dissertação apresentada como exigência parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* do Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas da Universidade Federal de São Paulo- Campus Diadema.

DIADEMA

2017

Bertoluci, Raquel

Título: Avaliação da segurança e eficácia "*in vitro*" da *Cuscuta racemosa*
Martius/ Raquel Silveira Bertoluci - -

Diadema, 2017.

92f.

Mestrado —

Universidade Federal de São Paulo- Campus Diadema, 2017.

Orientadora: Patricia Santos Lopes

1. *Cuscuta racemosa* Mart. 2. Citotoxicidade. 3. Fototoxicidade. 4. Antimicrobiana 5. Antitumoral I. Título

CCD 615.321.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

BANCA DE AVALIAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Prof(a) Dra. Patrícia Santos Lopes- (orientadora)

Prof(a) Dra. Monica Beatriz Mathor- Avaliadora Titular

Prof Dr.Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno - Avaliador Titular

Prof(a) Dra. Telma Mary Kaneko - Avaliadora Titular

Dedico este trabalho aos meus pais, em especial minha mãe Maria Aparecida, que despertaram em mim a paixão pelos livros e com eles me apresentaram ao universo das possibilidades. A meu irmão André, melhor amigo, sempre presente em minha vida, ao Thiago meu companheiro, leal, dedicado, carinhoso. “ *In memoriam*” à Homero e Rogério que se fazem presentes nas lembranças.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Patrícia Santos Lopes, por me acolher no programa de pós-graduação, por toda atenção dispensada a mim no decorrer deste processo, pelos ensinamentos, paciência e perseverança na realização deste trabalho.

À professora Dra. Helena Onishi Ferraz, co-orientadora deste trabalho, por compartilhar seu conhecimento sobre a planta estudada e por se dispor em meu auxílio em seu laboratório e nas correções, para tornar possível a execução deste projeto.

Aos professores que participaram da banca de qualificação Prof. Dr. Márcio A. Andréo, coordenador do programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas da UNIFESP- Diadema e à profa. Dra. Andréa Cecília Dorion Rodas, por suas significativas contribuições à melhoria do desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores que aceitaram contribuir com este trabalho compondo a banca de avaliação, Dra. Monica Beatriz Mathor, Dra. Telma Mary Kaneko e Dr. Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno.

Aos professores que aceitaram a receber este trabalho como avaliadores suplentes na qualificação e apresentação da dissertação: Dra. Liliam Fernandes, Dr. Luiz Elídio Gregório e Dr. Newton Andréo Filho.

Ao professor Dr. Marcelo Duque, pela orientação sobre a aplicação das ferramentas estatísticas na análise dos resultados.

Aos professores e aluno do Laboratório de Imunologia Celular e Bioquímica de Fungos e Protozoários da UNIFESP campus Diadema -SP, pelo auxílio, apoio e contribuições e amizade construída neste período.

Aos professores do Laboratório de Farmacotécnica e Cosmetologia da UNIFESP campus Diadema -SP pelo apoio e assistência durante o período que foi necessário compartilhar os recursos deste laboratório para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos técnicos da UNIFESP do campus Diadema -SP., sempre atenciosos e disponíveis em auxiliar no que é pertinente para o desenvolvimento das nossas pesquisas.

Aos professores do programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, por inspirar e enriquecer minhas possibilidades de trabalho, com suas aulas, palestras e experiência acadêmica.

À professora Dra. Rosangela Simão-Bianchini do Herbário do Instituto de Botânica de São Paulo por me receber em seu laboratório, por suas orientações e pela identificação da amostra.

À aluna mestranda Gabriela Trindade de Souza e Silva, pela realização da técnica que possibilitou a identificação dos compostos na amostra estudada, por sua amizade e apoio desde o primeiro momento na universidade.

Aos colegas mestrandos e demais alunos da equipe de pesquisa Fúlvio Gabriel Corazza, Júlia Vaz Ernesto, Carolina Andrea Leiva Dalsin Fiore, Gabriela Gomes Glinglani, pelo apoio para a realização dos experimentos, pelo auxílio na realização das tarefas do laboratório, pelo aprendizado e pela amizade que construímos neste tempo de convívio.

Aos colegas mestrandos Fábria Lopes, Gilson Costa dos Santos, Maytê Toledo e Palloma Mendes, por sua amizade e apoio no tempo em que pudemos conviver.

À minha mãe, Maria Aparecida Silveira Bertoluci, pelo apoio fundamental, da coleta do material à correção deste trabalho, pelo suporte nas tarefas cotidianas, por sua amizade, compreensão e amor incondicional.

À meu irmão, André Silveira Bertoluci, por disponibilizar um pouco de seu tempo a me ajudar a coletar o material de estudo e, por desde sempre, estimular meu pensamento crítico.

À Thiago Felipe Araújo dos Santos, pelo incentivo, pela amizade, pelo amor e pela compreensão ao tempo dedicado por mim na realização desta pesquisa.

A todos que embora não mencionados individualmente, tornaram possível a realização deste trabalho, o aprimoramento em minha carreira e, pelo incentivo à área de pesquisa.

À Deus pela inspiração e força nas horas de desânimo e esmorecimento.

RESUMO

Cuscuta racemosa, Mart é uma planta parasita pertencente à família Convolvulaceae, conhecida no Brasil pelas sinonímias populares de "cipó chumbo" e "fio de ovos". Popularmente é usada por suas ações anti-inflamatórias e cicatrizantes, aplicada à distúrbios diurético e digestivo e se apresenta como uma alternativa da biodiversidade para ser usado em medicamentos e cosméticos. O presente estudo verificou a avaliação *in vitro* da segurança e eficácia do extrato de *Cuscuta racemosa* para possíveis aplicações cosméticas e medicamentosas. Ensaios foram realizados a partir do extrato bruto e da fração alcaloídica de *Cuscuta racemosa* para avaliar a citotoxicidade e a fototoxicidade, assim como determinação da atividade antimicrobiana e antitumoral. Os ensaios de citotoxicidade e fototoxicidade foram realizados de acordo com as normas preconizadas pela Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), utilizando células 3T3 BALB. As análises microbiológicas foram conduzidas com *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. A avaliação da atividade anti-microbiana foi realizada em meios líquido e sólido. Os ensaios de atividade antitumoral foram realizados com as linhagens HeLa, MDA-DB e Sk-Mel. Os testes de citotoxicidade revelaram ação citotóxica do extrato bruto nas concentrações de 34,01 e 50 mg/mL, mas em concentrações mais baixas não apresentaram ação significativa, o que indica sua segurança para possíveis aplicações cosméticas e medicinais. Ambas as amostras testadas não apresentaram fototoxicidade. A dose letal estimada em 50% das células calculada para o extrato bruto foi de 352,25mg/Kg. Com relação a atividade antimicrobiana, as amostras não apresentaram zona de inibição em meio de cultura sólido nas concentrações testadas para nenhum dos microrganismos testados. O extrato bruto se mostrou citotóxico em todas as suas concentrações em linhagens tumorais. Os resultados indicam a possibilidade de uso das amostras em cosméticos, uma vez que a fração alcaloídica apresentou ausência de fototoxicidade e ausência de citotoxicidade, embora as amostras não tenham apresentado significativa antimicrobiana nas concentrações testadas. Com relação a atividade antitumoral, estudos complementares são necessários direcionando o ativo apenas para o local de ação, minimizando os riscos de atuação do extrato nas células normais.

Palavras chaves: *Cuscuta racemosa* Mart., citotoxicidade, fototoxicidade, antimicrobiana, antitumoral.

ABSTRACT

Cuscuta racemosa, Mart is a parasitic plant belonging to the family Convolvulaceae, known in Brazil for the popular synonymy of "cipó chumbo" and "yarn of eggs". It is popularly used for its anti-inflammatory and healing actions, applied to diuretic and digestive disorders and presents itself as an alternative of biodiversity for use in medicines and cosmetics. The present study verified the in vitro evaluation of the safety and efficacy of the *Cuscuta racemosa* extract for possible cosmetic and drug applications. Assays were carried out from crude extract and alkaloids fraction from *Cuscuta racemosa* to evaluate cytotoxicity, and phototoxicity, as well as determination of antimicrobial and antitumor activity. Cytotoxicity and phototoxicity assays were performed according to the standards recommended by the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) using 3T3 BALB cells. Microbiological analyzes were conducted with *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. The evaluation of antimicrobial activity was performed in liquid and solid media. Antitumor activity assays were performed with the HeLa, MDA-DB and Sk-Mel lines. Cytotoxicity tests revealed a cytotoxic effect of the crude extract at concentrations of 34.01 and 50 mg / mL, but at lower concentrations did not present significant action, indicating its safety for possible cosmetic and medicinal applications. Both samples tested showed no phototoxicity. The lethal dose estimated at 50% of the cells calculated for the crude extract was 352.25mg / kg. With respect to the antimicrobial activity, the samples did not present zone of inhibition in solid culture medium in the concentrations tested for none of the tested microorganisms. The crude extract was cytotoxic in all its concentrations in tumor lines. The results indicate the possibility of using the samples in cosmetics, since the alkaloid fraction showed absence of phototoxicity and absence of cytotoxicity, although the samples did not present significant antimicrobial in the concentrations tested. With respect to antitumor activity, complementary studies are necessary directing the active only to the place of action, minimizing the risks of performance of the extract in normal cells.

Keywords: *Cuscuta racemosa* Mart., Cytotoxicity, phototoxicity, antimicrobial, antitumor

Lista de Ilustrações

QUADROS

Quadro 1- Distribuição geográfica das principais espécies pertencentes ao gênero <i>Cuscuta</i> relatadas na literatura científica.	26
Quadro 2- Variedade e distribuição de espécies pertencentes ao gênero <i>Cuscuta</i> no Brasil	27
Quadro 3- Componentes fitoquímicos isolados e/ou identificados nas espécies do gênero <i>Cuscuta</i> e ações biológicas a eles atribuídos.	31
Quadro 4 - Linhagens de Células ATCC para ensaio de avaliação antitumoral	75

FIGURAS

Figura 1- <i>Cuscuta racemosa</i> Mart. conhecida “Cipó <i>chumbo</i> ” ou “ <i>Fios-de-ovos</i> ”	29
Figura 2- Esquema demonstrativo sobre a ação da Citocalasina B em teste de Micronúcleo.	54
Figura 3- Fluxograma ilustrativo das Etapas que envolvem o processo de Percolação.	59
Figura 4 - Processamento e obtenção do Extrato de <i>Cuscuta racemosa</i> Martius.	71
Figura 5 – Representação esquemática da estrutura básica de flavonas e flavonóis e seus respectivos espectros de absorção UV-vis.	75
Figura 6- Cromatograma obtido por CLAE-DAD do EB de <i>C. racemosa</i> Martius	76
Figura 7 – Gráfico da avaliação de Citotoxicidade EB (A) e FA (B) de <i>C. racemosa</i> .	78
Figura 8 - Gráficos comparativos dos resultados da avaliação da citotoxicidade entre EB e FA de <i>C. racemosa</i> Mart.	79
Figura 9- Gráficos da avaliação da fototoxicidade de EB e FA <i>C. racemosa</i> .	81
Figura 10– Gráfico comparativo da avaliação fototóxica das amostras expostas e não expostas à radiação UV.	82
Figura 11 - Células Binúcleadas e micronúcleo.	83
Figura12: Ensaio preliminar pelo Método Difusão em ágar	85
Figura13 - Ensaio de micro diluição seriada com EB <i>C. racemosa</i> Mart.	86
Figura14 - Ensaio de micro diluição seriada com FA da <i>C. racemosa</i> Mart.	86
Figura 15 – Gráficos do ensaio para avaliação da atividade Fotoprotetora da <i>C. racemosa</i> Mart.	89
Figura 16- Gráficos comparativos entre grupos tratados com EB de <i>C. racemosa</i> expostos ou não à radiação UV.	90
Figura17- Gráficos da avaliação de viabilidade celular de Linhagens tumorais x <i>C. racemosa</i> Martius.	92

Lista de Tabelas

Tabela1- Sistema de gradiente exploratório <i>Eluente A</i> : Água com ácido acético a 1%(v/v); <i>Eluente B</i> : <i>Metanol</i> .	61
Tabela 3 - Cálculo do rendimento EB <i>C. racemosa</i>	72
Tabela 4 - Resultados de fototoxicidade reportados pelo programa Phototox®	79
Tabela 5 - Valor da Concentração Inibitória Mínima (MIC) <i>C. racemosa</i>	87
Tabela 6 - Valores IC ₁₀ e IC ₅₀ do Extrato de <i>C racemosa</i> Mart. em linhagens tumorais	91

Lista de abreviaturas e Símbolos

µL: microlitro

3T3 NRU: 3T3 Neutral Red Phototoxicity test (teste de fototoxicidade pelo corante vital vermelho neutro)

ANVISA: Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC: *American Type Culture Collection*

B: Branco

BALB 3T3-A31 (CCL163): células fibroblastos de tecido embrionário de rato
Mus musculus

C. racemosa – Cuscuta racemosa

CC: Controle De Células

CE: Crude extract

CHO-K1: *Chinese hamster ovary* (célula de ovário de *hamster* chinês)

CIT-B: Citocalasina B

COLIPA : *The European Cosmetics Association*;

COX-2: Ciclooxygenase -2

CTFA : *Cosmetic, Toiletries and Frangrance Association*

D10: DMEM (meio nutriente) suplementado com 10% de SFB

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium (meio de cultura nutriente)

EB: Extrato bruto

ECVA: *European Committee for Validation of Alternative Methods*

EDTA: *Ethylenediamine Tetraacetic acid* (Ácido Etilenodiamino tetra-acético)

EM: Extrato metanólico

EA: Extração direcionada para extração de alcalóides

FAE: Fração de Acetato de etila

g: gramas

HELA: linhagem de célula tumoral uterina

Hep-3B: linhagem de célula de fígado (hepatócito)

ICCVAM: *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*

LPA : lipopolissacarídeo

MCF- 7: linhagem de célula tumoral de Mama

MDA: linhagem de célula tumoral de Mama agressivo

mg/mL: miligramas/mililitros

MPE Efeito Fototóxico Médio

NaCl : Solução de Cloreto de sódio (a 0,9% - solução salina)

NTF- α : Fator de Necrose Tumoral alfa

OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development

p/v: parte por volume

PBS: Phosphate Buffered Saline (solução salina tamponada)

PIF -Fator de Irritação Fototoxico

R10: Roswell park memorial institute (meio de cultura – série 1640)

suplementado com 10% de SFB

RPM: Rotações por minuto

RPMI-1640: Roswell park memorial institute (meio de cultura – série 1640)

S9: sistema da ativação metabólica obtido de lisado de fígado

S9-: sem ativação metabólica S9

S9+: com ativação metabólica S9

SFB: soro fetal bovino

SK: linhagem de célula tumoral de Melanoma Humano

SRB: Sulforrodamina B

SUS : Sistema único de Saúde

THP-1: linhagem de célula tumoral Leucemia

TTC: 3,5-trifenil tetrazólio (corante)

UFC : Unidades Formadoras de Colônia

UNIFESP: Universidade Federal DE SÃO PAULO

UVA- : sem Radiação Ultravioleta A

UVA + : com Radiação Ultravioleta A 315 nm – 400 nm

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	16
1.1. Revisão da literatura	18
1.1.1. Família Convolvulacea, gênero Cuscuta	18
1.1.2. Cuscuta racemosa Mart. (Família Convolvulaceae)	25
1.2 Atividades Biológicas encontradas para o Gênero Cuscuta	26
1.3. Estudos de Citotoxicidade e Fototoxicidade.	42
1.4. Avaliação antiproliferativa	45
2. OBJETIVOS:	46
2.1. Objetivos Específicos	46
3. MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1. Coleta do Material.....	47
3.2.1. Perfil do extrato bruto por CLAE-DAD.....	50
3.2.1.1. Preparo da amostra.....	50
3.2.1.2. Desenvolvimento dos métodos CLAE	50
3.2.1.3. Ensaio preliminar: Caracterização de Alcaloides.....	51
3.3 Ensaio de Citotoxicidade e Fototoxicidade	51
3.3. 1 Preparo das suspensões celulares.....	51
3.3.2 Testes de citotoxicidade e pré-determinação da DL50.....	52
3.3.3 Teste de Fototoxicidade.....	53
3.4 Ensaio Microbiológicos	54
3.4.1. Preparo das Amostras	54
3.4.2. Difusão em Ágar.....	55
3.4.3 Micro diluição seriada	55
3.5. Teste de Fotoproteção	56
3.6. Teste de avaliação do potencial antitumoral.....	57
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59

4.1. Obtenção do extrato:	59
4.2. Análise exploratória para confirmar Compostos fenólicos na amostra.	60
4.3. Rendimento do extrato	60
4.4. Perfil do extrato bruto por CLAE-DAD.....	60
4.5. Fototoxicidade	67
4.7 Atividade Fotoprotetora	74
4.9. Atividade antitumoral.....	76
5. CONSTATAÇÕES	81
6. CONCLUSÃO	82
7.REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	83
ANEXO I.....	92
Cópia do Parecer de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa assinada	92

1- INTRODUÇÃO

A espécie *Cuscuta racemosa* Martius, é uma holoparasita do da família *Cuscuta*, pertencente ao gênero *Convolvulaceae*. As espécies vegetais pertencentes este gênero, são estudadas em várias universidades e institutos através do mundo, com o objetivo de elucidar suas características fitoquímicas e verificar suas aplicações para potencial uso cosmético ou terapêutico (ISLAM *et al.*, 2015; KANG *et al.*, 2014; SHARMA *et al.*, 2014). As plantas do gênero *Cuscuta*, por sua característica de parasitas obrigatórias, possuem compostos químicos similares aos de suas hospedeiras, e também compostos que surgem ser oriundos de sua adaptação à diferentes situações climáticas. As várias espécies de *Cuscuta* são constituídas por compostos fenólicos como flavonoides, taninos entre outros. Popularmente a *Cuscuta* é usada topicamente por suas propriedades cicatrizantes, antissépticas e anti-inflamatórias, fato este que desperta o interesse na área científica quanto a seu uso como matéria-prima de origem vegetal processada em uma composição cosmética ou dermatológica (DONNAPEE *et al.*, 2014).

Para uso de novos ingredientes em cosmético são requeridos testes validados que comprovem sua segurança para aplicação tópica, conforme descritos no Guia para Avaliação de Segurança de produtos Cosméticos (ANVISA, 2012). Após avaliação e comprovação da segurança do ativo de origem vegetal, seguems-e os testes para avaliação da eficácia. Estes testes também são preliminares para avaliação terapêutica da droga vegetal.

Considera-se droga vegetal a planta medicinal, ou sua parte que contenha substância ou classe de substâncias com ação terapêutica após as etapas que envolvem seu processamento da coleta à pulverização (RDC 16, 2014). As drogas vegetais são isentas de prescrição médica, uma vez que seu uso é destinado ao consumidor final através de material seco ou pulverizado.

A ação terapêutica das plantas medicinais encontra-se amparada na literatura especializada que divulga seu uso tradicional. Define-se como Planta Medicinal a espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com objetivos terapêuticos (RDC 14, 2014). Para a matéria-prima vegetal de interesse ser considerada um medicamento fitoterápico, faz-se necessária sua avaliação por

meio de testes que confirmem sua segurança e eficácia para uso na saúde humana ou animal. De acordo com a mesma Resolução, estes testes são validados por meio de levantamento de uso etnofarmacológico, evidências clínicas e documentação científica (RDC 26, 2014).

No Brasil, desde 2006, é regulamentado o uso de fitoterápicos no Sistema Único de Saúde (SUS) e, recentemente foi publicado o Memento Fitoterápico, parte integrante da Farmacopeia Brasileira 2016, que disponibiliza monografias de 28 plantas aprovadas para uso na área de saúde pública). Este documento surge após 10 anos da implantação da política Nacional de Plantas Medicinais, para consolidar e fortalecer o uso de plantas medicinais inseridas no âmbito da atenção primária à saúde como recurso terapêutico no uso tradicional presente nas práticas integrativas.

“Fitoterápico é um medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de uso, assim como pela reprodutibilidade e constância da sua qualidade. Sua eficácia e segurança é validada através de levantamento etnofarmacológico de utilização, documentação técnico-científicas em publicações ou ensaios clínicos” (ALONSO, 2008).

A definição de Alonso (2008) está em concordância com a RDC 26, 2014 que regulamenta a área de medicamentos fitoterápicos e produtos de uso tradicional fitoterápico. De acordo com esta RDC, são considerados medicamentos fitoterápicos os obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais cuja segurança e eficácia sejam baseadas em evidências clínicas e que sejam caracterizados pela constância de sua qualidade, e estes diferem dos fitoterápicos de uso tradicional, tem suas ações baseadas em publicações científicas quanto a sua segurança. Plantas como as que compõem o gênero *Cuscuta*., ao serem usadas como produto com a finalidade terapêutica ou cosmética respaldada pelo conhecimento tradicional, podem apresentar potencial atividade tóxica, atribuídas a seus constituintes químicos quando usadas sem padronização de dosagem

Os estudos validados contribuem para elucidar quais possíveis constituintes químicos apresentam interesse terapêutico para exploração

comercial, o que favorece estudos sobre modificações estruturais simples a partir dessas substâncias ativas, em geral originadas do metabolismo secundário (CRAGG, GROTHAUS, & NEWMAN, 2009) que podem estimular o desenvolvimento de novas moléculas com interesse terapêutico (BOGGO, 2012).

Plantas como as que compõem o gênero *Cuscuta*, ao serem usadas como produto com a finalidade terapêutica ou cosmética, respaldada apenas pelo conhecimento tradicional, podem apresentar potencial atividade tóxica, atribuídas a seus constituintes químicos quando usadas sem padronização de dosagem (VEIGA JUNIOR, 2005).

1.1. Revisão da literatura

1.1.1. Família Convolvulacea, gênero *Cuscuta*

A família que foi descrita por Jussieu em 1789, na obra *Genera Plantarum*, pertence a classe Magnopsida ou Angiosperma, é composta por espécies distintas que se encontram distribuídas em vários continentes nas regiões tropicais e subtropicais (SILVA & SIMÃO-BIANCHINI, 2013), a exemplo do cerrado e da caatinga no Brasil, sendo raras em regiões temperadas (HEYWOOD, 1993; SILVA & SIMÃO-BIANCHINI, 2013). Esta Família compreende 55 gêneros com cerca de 2000 espécies, porém o gênero *Cuscuta* é o único com características de holoparasita (BARBOSA, 2012; BIWAS, 2012), caracterizado por não produzir clorofila, depende totalmente dos nutrientes produzidos pela hospedeira (KAISER et al., 2015).

Estima-se que as espécies do gênero *Cuscuta* tenham se desenvolvido a partir de um ancestral autotrófico comum, diversificando-se através de uma especialização para adaptar-se a diferentes espécies hospedeiras, das quais retiram água, nutrientes e metabólitos para seu desenvolvimento (KIM, 2015), mostrando assim uma alta capacidade de adaptar-se a diferentes ecossistemas, que podem estar expressos nas distintas atividades terapêuticas a ela atribuídas. (ASEA, et al., 2013)

Todas as plantas do gênero *Cuscuta* são heterotróficas e não sintetizam clorofila (ANDRADE, ARAUJO & NEVES, 2009), são trepadeiras com caules

constituídos por longos filamentos capilares, mais ou menos ramificados, variando da coloração amarelada à avermelhada, raramente branco ou esverdeados, com raras folhas. (CORREA, 1984), características que podem ser observadas na Figura 1. Para nutrição e reprodução dependem da seiva elaborada que obtém parasitando o sistema vascular da planta hospedeira (ANDRADE, ARAUJO & NEVES, 2009) através de estruturas denominadas haustórios., e por serem essencialmente parasitas despertaram a atenção de comunidades tradicionais e da comunidade científica, em suas mais variadas espécies, para verificar se de fato seu extrato possui atividades terapêuticas atribuídas as plantas em que se hospedam (CORREA, 1984).

FIGURA 1- *Cuscuta racemosa* Mart. conhecida “ *Cipó chumbo*” ou “ *Fios-de-ovos*”.



Características da *C. racemosa* Martius (A) (B)., *C. racemosa* M. propagação em Canteiro rasteiro à calçada em frente à Subprefeitura do Ipiranga(C) e em frente à Biblioteca Municipal (D). *C. racemosa* M. in *Lagestroemia indica* Ipiranga, São Paulo (E) e em detalhe (F). Fonte: Fotos da autora, agosto 2015.

Em 1932, Yuncker, havia relatado sobre o Gênero *Cuscuta* na revista “*Memoirs of the Torrey Botanical Club*”, indicando a existência de cerca de 158 espécies distribuídas mundialmente, do Canadá ao México, e do Chile à Argentina além de Europa e Ásia, passando pelo Cabo Sul na África e nas Índias, Pacífico e Austrália, destacando cerca de 20 novas das espécies dentre as já relatadas.

Atualmente, estima-se que esta família botânica seja composta por cerca de 200 espécies diferentes de *Cuscuta* que se encontram geograficamente distribuídas por diferentes regiões do planeta. Embora a grande maioria das espécies, cerca de 140, se localize, preferencialmente, em climas tropicais e subtropicais (YUNCKER, 1932; COSTEA & TARDIF, 2004) estas também podem estar presentes na Europa em zonas frias de clima temperado (SILVA & SIMÃO-BIANCHINI, 2013), (Quadro 01), o que aponta para uma possível característica adaptogênica deste gênero à diferentes climas e hospedeiras (ASHIGH & MARQUEZ, 2010).

QUADRO1 – Distribuição geográfica das principais espécies pertencentes ao gênero *Cuscuta* relatadas na literatura científica.

<p>Ásia- <i>C. reflexa</i> (nativa Índia e Nepal), <i>C. chinensis</i> (nativa China, Índia, Coreia, Paquistão, Tailândia, Vietnã), <i>C. campestris</i>, <i>C. epithymum</i> (nativa s na China, porém introduzida no Japão), <i>C. epilinum</i>, <i>C. australis</i> (nativa no sul da China)</p> <p>Europa- <i>C. campestris</i>, <i>C. gronovii</i> (curso das águas), <i>C. epithymum</i> (nativa), <i>C. epilinum</i>.</p> <p>Oceania- <i>C. campestris</i> (Austrália), <i>C. epithymum</i> (Austrália)</p> <p>África- <i>C. campestris</i>, <i>C. epithymum</i>, <i>C. epilinum</i> (esporádica)</p> <p>América do Norte- espécies nativas Canada: <i>C. campestris</i>, <i>C. pentagona</i>, <i>C. gronovii</i> (Canadá e EUA), <i>C. umbrosa</i>, <i>C. epilinum</i> (esporádica no Canadá)</p> <p>América do Sul- <i>C. campestris</i>, <i>C. epithymum</i>, <i>C. racemosa</i> (Brasil e Chile), <i>C. taimensis</i> (Brasil e Uruguai).</p>
--

Fonte: Adaptado de Simão-Bianchini, 2015.

Yuncker (1932), relatou ainda, que a possibilidade de distribuição da *Cuscuta* em novos ambientes, se deu por meio da disseminação das sementes, resultado da comercialização (exportação ou importação) de plantas de cultivo

ou ornamentais, que como hospedeiras, carregam para as novas regiões as sementes da parasita.

No Brasil, são catalogadas 24 espécies, dentre estas 06 são endêmicas conforme demonstrado no Quadro 2. Yuncker (1932) propôs que o gênero *Cuscuta* fosse dividido em 03 subgêneros classificados conforme características taxonômicas de flores e inflorescências das espécies que poderiam ser agrupadas, com base no estigma floral. São eles: *Gramminica*, *Monogyana* e *Cuscuta*. Classifica-se como *Gramminica*, subgênero que comporta espécimes com estigmas mais globulosos e distintos das demais, podendo apresentar um formato de cápsula irregular com estigmas cônicos e alongados; o subgênero *Monogyana*, apresenta espécies com cápsula circunscrita com estigmas de formas variadas (porém não linear) e *Cuscuta*, gênero que insere a espécie estudada *C. racemosa* M., caracterizado pela presença de flores raras e pequenas de coloração amarelada, agrupadas em forma de cacho e pedunculadas, originando o nome racemosa.

QUADRO 2- Variedade e distribuição de espécies pertencentes ao gênero *Cuscuta* no Brasil

	Espécie/ variedade	Distribuição:	Região
1.	<i>C. americana</i> L	nativa; não endêmica.	Nordeste (PE, BA), Centro-Oeste (MT, GO), Sudeste (MG); Cerrado
2.	<i>C. boliviana</i> Yunck.	nativa; não endêmica.	Sul (PR); Mata Atlântica
3.	<i>C. bracteata</i> Yunck.	nativa; endêmica.	Centro-Oeste (GO); Cerrado
4.	<i>C. corniculata</i> Engelm.	nativa; não endêmica	Nordeste (BA), Centro-Oeste (GO), Sul (RS); Caatinga, Cerrado, Pampa
5.	<i>C. cristata</i> Engelm.	nativa; não endêmica	Sul (PR).
6.	<i>C. globosa</i> Ridl.	nativa; endêmica	Nordeste (PB, PE); Caatinga, Mata Atlântica.
7.	<i>C. glomerata</i> Choisy	nativa; não endêmica	Centro-Oeste (DF); Cerrado
8.	<i>C. goyaziana</i> Yunck.	nativa; endêmica	Centro-Oeste (GO); Cerrado
9.	<i>C. incurvata</i> Progel	nativa; não endêmica	Sudeste (MG); Cerrado
10.	<i>C. indecora</i> Choisy var. <i>neuropetala</i> Engelm.)	subespontânea; não endêmica	Sul (PR); Cerrado
11.	<i>C. insquamata</i> Yunck.	nativa; não endêmica	Nordeste (PE); Caatinga
12.	<i>C. obtusiflora</i> Kunth	nativa; não endêmica	Centro-Oeste (MT), Sudeste (MG, SP), Sul (RS); Cerrado, Mata Atlântica

13.	<i>C. odorata</i> Ruiz & Pav.	nativa; não endêmica;	Norte, Centro-Oeste (MS), Sudeste (MG), Sul (SC); Cerrado, Mata Atlântica
14.	<i>C. orbiculata</i> Yunck.	nativa; endêmica	Nordeste (PE), Centro-Oeste (GO); Cerrado
15.	<i>C. partita</i> Choisy	nativa; não endêmica	Norte (AC), Nordeste (MA, PI, BA, SE), Centro-Oeste (MT, GO); Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica
16.	<i>C. parviflora</i> Engelm. var. <i>elongata</i> Engelm.	nativa; endêmica	Centro-Oeste (GO); Cerrado
	<i>C. parviflora</i> Engelm. var. <i>parviflora</i>	nativa; endêmica	Centro-Oeste (GO, DF), Sudeste (MG, SP, RJ); Cerrado, Mata Atlântica
17.	<i>C. platyloba</i> Progel	nativa; não endêmica	Centro-Oeste (GO), Sudeste (MG, RJ), Sul (PR, SC, RS); Cerrado, Mata Atlântica.
18.	<i>C. racemosa</i> Mart. var. <i>miniata</i> Engelm.	nativa; endêmica	Centro-Oeste (GO, MT), Sudeste (MG, SP), Cerrado
	<i>C. racemosa</i> Mart. var. <i>nuda</i> Engelm.	nativa; endêmica	Sudeste (MG, SP, RJ), Sul (PR, SC), Mata atlântica
	<i>C. racemosa</i> Mart. var. <i>racemosa</i> Mart	nativa; endêmica	Sudeste (RJ) Cerrado, Mata-atlântica
19.	<i>C. serrata</i> Yunck.	nativa; endêmica	Centro-Oeste (GO); Cerrado
20.	<i>C. taimensis</i>	Não informado	Sul extremo (RS)
21.	<i>C. tinctoria</i> Mart.	subespontânea; não endêmica	Nordeste, Sudeste (MG); Cerrado
22.	<i>C. trichostyla</i> Engelm.	nativa; não endêmica	Norte (PA); Amazônia
23.	<i>C. umbellata</i> Kunth var. <i>desertorum</i> Engelm.;	nativa; não endêmica	Nordeste (PI, CE); Cerrado
24.	<i>C. xanthochortos</i> Mart.	nativa; não endêmica	Sul (RS); Pampa

Fonte: adaptado de Forzza *et al.*, 2010 e Simão-Bianchini & Ferreira, 2015; Ferreira, *et al.*, 2014.

Estudos realizados em 2006 por técnicas de identificação genética incluíram novas espécies na classificação taxonômica, tais como a *C. salina*, *C. mediterranea*, *C. umbrosa*, e uma nova variação brasileira, *C. taimensis* (FERREIRA, 2015).

As várias espécies deste gênero podem parasitar copa de árvores e arbustos ornamentais, como por exemplo a *Lagerstroenia indica* (Resedá) e o *Hibiscus rosa-sinensis* (Hibisco) ou ainda em culturas de *Solanum lycopersicum* (Tomate), *Avena sativa* (Aveia), *Vaccinium macrocarpon* (Cranberry) entre outras (KIM & WESTWOOD, 2015).

As plantas deste gênero também apresentam uma alta capacidade de propagação a partir da hospedeira inicial, partindo de suas extremidades em formas de fios que crescem e se propagam às adjacências, ampliando seu raio

de parasitismo a diferentes unidades de uma mesma planta e a plantas de diferentes espécies (LIMA, 1996), conforme exemplificado na Figura 1. Para cada hospedeira parasitada a *Cuscuta* lança em sua fase produtiva cerca de 16.000 unidades de sementes, que permanecem viáveis em contato com o solo por um longo período, dormentes aguardando um momento mais adequado para seu crescimento, o que confere às espécies deste gênero, uma ampla capacidade de perpetuar a espécie e adaptação ao meio (PITELLI, 1985 *in* EMBRAPA; CORREA, 1984).

Estudos publicados tentaram elucidar o mecanismo de parasitismos das espécies que compõem este gênero e as plantas hospedeiras, de acordo com Kim e Westwood (2015) a parasita parece estabelecer uma conexão com a hospedeira que permite a transferência de material proteico como mRNA, além de água e nutrientes essenciais ao seu desenvolvimento. (KIM & WESTWOOD, 2015; BARBOSA et.al., 2012).

Dada a diversidade de espécies pertencentes a este gênero e a dificuldade em se identificar a espécie considerando a semelhança entre elas, para se obter um extrato padronizado para estudos, é interessante tornar a espécie cultivável, para se obter dados consistentes sobre melhor habitat, melhor época para obtenção do extrato, formas de controle e propagação da espécie e melhor compreensão de seu papel biológico na simbiose com as plantas hospedeiras.

As plantas da família Convolvulacea apresentam os seguintes compostos químicos: alcalóides indólicos (subgrupo ergolina), antocianinas aciladas, com um radical ácido, compostos cianogênicos, ácido caféico e compostos relacionados, não apresentam iridóides e nem taninos, tanto proantocianinas quanto o ácido elágico e raramente produzem saponinas (CRONQUIST 1981).

Loffler, Czygan e Prokch em 1997, identificaram em um estudo comparativo com 09 diferentes espécies pertencentes ao gênero, cultivadas (*C. reflexa* Roxb, *C. platyloba* Progel, *C. campestris* Yunck., *C. odorata*, R&P, *C. chinensis* L., *C. pedicellata* Illedeb) e selvagens (*C. europeae* L, *C. gronovii* Wild., *C. lupuliformis* Krock) a presença de compostos fenólicos como quercetina e ácidos hidroxâmicos em diferentes concentrações, porém presentes em todas as espécies.

A presença de alcalóides em plantas do gênero *Cuscuta* parece estar diretamente relacionada a fatores como a hospedeira e períodos sazonais de chuvas (PEREZ-AMADOR, et al.1996), a identificação da espécie através de marcadores taxonômicos está limitada à avaliação da flor madura, ou inflorescência. No Quadro 2 pode-se observar diferentes tipos de compostos identificados ou isolados de diferentes espécies do gênero *Cuscuta* e, nota-se a predominância de compostos fenólicos nas diferentes espécies e eventualmente presença de outros compostos, a depender da hospedeira parasitada.

QUADRO 3- Componentes fitoquímicos isolados e/ou identificados nas espécies do gênero *Cuscuta* e ações biológicas a eles atribuídas.

Espécie	Compostos identificados	Ação atribuída	Referências
<i>C. australis</i> (sementes)	Flavonoides: Hiperosídeos	Melhora imunológica	Gu et al., 2001
<i>C. campestris</i> Yunck. (sementes)	Flavonoides: quercetina, Polissacarídeos e Alcalóides	Anti-inflamatória	Lee et al., 2011.
<i>C. chinensis</i> Lam. (Frutos)	Alcaloides e Flavonoides: quercetina, quercetina-3-0-galactoside, quercetina -3-0- apiosyl-(1+2)-galactoside; canferol-3-0-glucoside, hiperosídeo. Compostos fenólico: ácido clorogênico, ácido cafeico, e ácido p-coumarico, Lignanas: pinoresinol, (+) epipinoresinol, (-) pinoresinol 4-O-glucosideo Hidroquinona: arbutina	Tonificante do Yang (Medicina Tradicional Chinesa)	Yahara et al.,1994,
<i>C. chinensis</i> Lam. (sementes)	Flavonoides: quercetina, canferol, isorhamnetina, hiperosídeo, astragalina.	Anti-osteoporose, proliferação celular e estrogênica	Jian-Hui et al., 2003; Yanget, 2009.; Lijuan et al. 2011
	Flavonoides	Proliferativa em tumor de mama (MC7-T47D)	Umerhara et al., 2004;
	Flavonol	Antioxidante	Yen et al., 2008b
	Flavonoides: quercetina, Polissacarídeos e Alcalóides	Melhora imunológica, antioxidante e antiproliferativa	Lee et al., 2011.
	Flavonoides	Proliferativa em células Hela	Yang et al., 2011;
	Glicosídeos: isolados dímeros tipo -éster de resina glicosídica	Citotóxica em linhagens celulares: MG-63, MCF-7, SMMC-7721	Donnapee et al., 2014
<i>C. chinensis</i> Lam. (partes aéreas)	compostos fenólicos	Antitumoral (Hela, HT-29 e MDA-MB-468)	Jafarian, Ghannadi, e Mohebi, 2014.
<i>C. chinensis</i> Lam. (planta toda)	Cumarinas	Antitumoral (pele)	Nisa et al., 1986;
<i>C. corymbosa</i> var. <i>stylosa</i>	Amida, ácido lisérgico, lisergol, ácido amídico isolisérgico, turboculina, glicoresinas, alcalóides ergolinicos, glicosídeos carvanóicos.	Não há referência neste estudo	Pérez-Amador et al., 1996;
<i>C. epithimum</i> L. (caule)	Flavonóides, alcaloides, carboidratos, glicosídeos, saponinas e esteróis.	Moderada atividade antimicrobiana	Biwas et al., 2012.; Al-Snafi, 2016.
<i>C. epithimum</i> Murr.	Polifenois, flavonoides, glicosídeos, alcaloides, carboidratos, saponinas,	Anticonvulsivante	Al-Snafi.2016; Mehrabani et al.,2007

	fitoesteróis, triterpenóides e esteróis.		
<i>C. epithymum</i> Murr. (partes aéreas)	Compostos fenólicos	Antitumoral (Hela, HT-29 e MDA-MB-468)	Jafarian, Ghannadi, e Mohebi, 2014.
<i>C. japonica</i> Choisy (sementes)	Hiperosídeos	Neurogênese e melhora cognitiva	Moon, et al., 2016
	Isolados: ácido 3,5-Di-O-cafeoilquinico, metil 3,5-Di-O-cafeoilquinato, ácido 3,4-Di-O-cafeoilquinico, metil 3,4-Di-O-cafeoilquinato	Antihipertensiva	Oh, et al., 2002
<i>C. pedicellata</i> Illedeb.	naringenina, canferol, aromadenderina, quercetina, 3,5,7,30,50-pentahidroxi-flavanone, naringenina-7-O-β-D-glucosídeo, aromadenderina-7-O-β-D-glucosídeo, Taxifolina -7-O-β-D-glucosídeo, canferol -3-O-β-D-glucosídeo (astragalina), quercetina-3-O-β-D-glucosídeo (isoquercetina).	Redutora de peso e redutora de colesterol	Zekry, et al., 2015
<i>C. racemosa</i> Martius (planta toda)	Compostos fenólicos, lignanas, derivados do ácido hidroxicinâmico, flavonóides, 9α-hidroxysesamina, 9β-hidroxysesamina, canferol, acuminatolide, pinosinol, quercetina.	Antimicrobiana, antifúngica, antiviral, antitumoral, antioxidante, anti-inflamatória, imunossupressora, tônica cardiovascular, praguicida, inseticida.	Sousa et al., 2012.
	Flavonóides: 4-metoxiquercetina, taninos e alcalóides	Antimicrobiana	Ferraz et al., 2011b.
<i>C. reflexa</i> Roxb.	Cuscutina, amarbelina, β-esterol, stigmasterol, canferol, dulcitol, miricetina, quercetina, coumarina e ácido oleanólico	Modulador quimioterápico.	Prasad et al., 2016
	escoparone, ácido p-coumarina, estigmasta-3,5- diene e 1-O-p-hidroxicinamoilglucose.	Antiproliferativa moderada.	Riaz, et al., 2017
<i>C. reflexa</i> Roxb. (planta toda)	flavonóides, saponinas, alcalóides, terpenóides, antraquinonas e taninos.	Nefroprotetor e anti-edema.	Niazi et al., 2017.
	terpenóides, compostos fenólicos, traços de alcalóide.	Anti-inflamatória e antimicrobiana	Raza et al., 2015.
<i>C. reflexa</i> Roxb. (partes aéreas)	carboidratos (teste de Molisch), saponinas (teste de Frothing), taninos (teste com FeCl ₃), flavonóides (teste de Schinoda), esteróides (teste de Salkowski), glicosídeos (teste de Keller-Killiani) alcalóides (teste com reagentes de Wagner) e terpenóides (teste de Salkowski).	Controle de glicemia no sangue	Rath et al., 2016
<i>C. reflexa</i> Roxb. (caule)	fenóis, polifenóis e flavonóides	Anti-inflamatória	Udavant, et al., 2012a.
	Esteróides, alcalóides, flavonóides e taninos	Anti-helmíntico	Udavant, et al., 2012.b
	Esterol	Anticalvice	Pandit et al., 2008
	Alcalóides, carboidratos e alguns glicosídeos, flavonóides, taninos, compostos fenólicos, esteróides.	Antimicrobiana para Gram- e fungos.	Inamdae et al., 2011; Sharma et al. 2014.

1.1.2. *Cuscuta racemosa* Mart. (Família Convolvulaceae)

A *C. racemosa* Martius é uma holoparasita (parasita total, que retira todos os nutrientes necessários ao seu metabolismo da seiva elaborada produzida pela planta hospedeira, pois não realizam fotossíntese) pertencente à família Convolvulaceae, ramo este subdividido por alguns autores como pertencente à família Cuscutaceae (CORREA, 1984).

A espécie é originária do Chile, porém ocorre no Brasil nas regiões sudeste e sul do país, de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul e pode ser encontrada em áreas de matas, campos, praças e sobre as árvores nas ruas (CORREA, 1984;). Popularmente a *C. racemosa* Martius é conhecida pelas seguintes sinonímias: cipó-chumbo, fios-de-ovos, cipó-dourado, aletria, cuscuta, espaguete e tinge-ovos (CORREA, 1984) nomes atribuídos a sua coloração amarelada, e aspecto de distribuição da parasita em suas hospedeiras (Figura 1).

A espécie apresenta 03 variedades (subespécies) nativas endêmica no Brasil, conforme indicada na Quadro2, são elas: *C. racemosa* var. *miniata* Engelm, *C. racemosa* var. *nuda* Engelm e *C. racemosa* var. *racemosa* Mart.

1.2 Atividades Biológicas encontradas para o Gênero Cuscuta

O uso de plantas para finalidades curativas e medicinais é tão antigo como a história da humanidade (ALONSO, 2008), ato justificável uma vez que as mesmas são de fácil acesso à maioria da população que por vezes, acredita que por sua origem ser natural não possuem ações adversas e contra-indicações quando comparados aos medicamentos (SILVEIRA et al., 2014). Porém os usos inadequados destes recursos podem causar ações de toxicidade no organismo e interações com outros medicamentos (CORDEIRO et al., 2005). Considerando a necessidade de maior informação sobre as plantas a serem usadas para fins terapêuticos, nota-se um esforço de agências regulatórias e de profissionais da área de saúde em ampliar os estudos sobre produtos naturais, assegurando maior segurança e eficácia à saúde da população (MACIEL, et al., 2002). Nesta conjuntura há um campo para desenvolvimento de pesquisa e validação científica para avaliar segurança e eficácia destes recursos na produção de medicamentos, alimentos e cosméticos (FLOGIO et al., 2006), com maior

respaldo nos últimos anos de projetos financiados por órgãos públicos e privados.

Para tentar assegurar o melhor uso e a não extinção das espécies medicinais da flora brasileira, foi implantado no país, em 2009, o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que tem como grande objetivo, buscar a inserção dos medicamentos à base de plantas no Sistema Único de Saúde – SUS, sendo a ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, a responsável pela legalização (ANVISA, 2009).

Cabe ressaltar a necessidade em delimitar melhor os campos de estudo na área de manejo (cultivo) das espécies parasitas, deixando de obter material para estudo exclusivamente de forma extrativista e passando a cultivar de modo a controlar os vários parâmetros que influenciam na obtenção de compostos padronizados para estudo científico das plantas que envolvem esta espécie.

Em 2016, com a publicação do Memento Fitoterápico, foram apresentadas monografias de 28 espécies de plantas medicinais e seus estudos de segurança e eficácia. Como exemplos de espécies já utilizadas no SUS, que tem ações similares às atribuídas à *Cuscuta racemosa* Mart., de ação anti-úlceras, ação cicatrizante e, alívio à distúrbios hepáticos, é possível citar a *Maytenus ilicifolia* M., a *Stryphnodendron adstringens* Mart., e a *Peumus boldus* Molina, respectivamente.

No Brasil a *C. racemosa* é popularmente usada por sua ação cicatrizante, para fechar feridas abertas, bem como por outras propriedades a ela atribuídas, tais como: ações adstringentes, anti-inflamatória, diurética, aliviadora de distúrbios hepáticos e estomacais e anti-inflamatória da garganta e cicatrização de feridas (CORREA, 1984; SOUSA et al., 2012). Os indígenas de origem guarani a chamam de “*yguarã haimbe*” e a usam por suas propriedades cicatrizantes, destacado por Correa (1984):

“..._ as espécies deste gênero, naturalmente por sua forma estranha e bizarra, despertaram sempre a atenção ou curiosidade dos indígenas ou aborígenes de seu extenso *habitat*, o qual apenas não inclui as regiões frígidas do globo; e dessa curiosidade, naturalmente aguçada pelo interesse ou necessidade de medicamentos que trouxessem alívio às dores físicas, dá-nos a idéia nítida a enumeração das virtudes terapêuticas atribuídas a estas plantas, sendo que muitas delas têm sido cientificamente experimentadas e algumas devidamente comprovadas...” (CORREA, 1984).

Essa curiosidade, interesse e uso medicinal de espécies do gênero *Cuscuta*, citada por Correa (1984), vem sendo comprovadas há muito tempo, como por exemplo a *C. chinensis* Lam. e *C. reflexa* Roxb., utilizadas de longa data na Medicina Tradicional Chinesa (MTC) e na Medicina Ayurveda, por suas inúmeras ações terapêuticas similares às atribuídas à *C. racemosa* Mart. e outras espécies deste gênero. Estas, portanto, são as duas espécies em que foi encontrado maior número de artigos publicados, disponíveis nas bases de dados Web of Science, Pubmed e Scopus, conduzindo estudos “*in vitro*” e “*in vivo*”, realizados com o objetivo de investigar as atividades terapêuticas e, avaliar dados toxicológicos dos diferentes extratos e frações das plantas. (Quadros 3 e 4)

De acordo com Uddavanti e colaboradores (2012) a *C. reflexa* é utilizada na medicina tradicional Ayurveda por sua atividade depurativa para tratamento de distúrbios hepáticos, redução de tosse e prurido e por sua ação vermífuga. Somam-se a estas atividades, o uso da *C. chinensis* Lam., conhecida na MTC por “*Tu-Si-Zi*” e empregada como tônica hepática, depurativa renal, antiabortiva, antidiarreica, afrodisíaca, prevenção ao envelhecimento, ação antibacteriana, cicatrizante e anti-inflamatória. Estas atividades podem ser relacionadas, provavelmente a presença de compostos fenólicos e flavonoides, comuns às diferentes espécies que compõem este gênero (YAHARA et al., 1994; YEN et al., 2008; RAZA et al., 2015; NIAZI et al., 2017)

Há indícios que corroboram mostrando que as atividades de interesse das plantas deste gênero, descritas em estudos realizados, realmente podem estar relacionadas as ações de taninos, flavonoides e outros fenólicos presentes nas amostras testadas. (INAMDAE et al., 2011; LEE, 2011; UDAVANT et al., 2012b; SHARMA et al., 2014)

Compostos fenólicos derivados do ácido cafeico, p-cumarico e hidroxicinamatos (C6-C3), foram encontrados nas espécies *C. chinensis* Lam (YAHARA et al., 1994;) e *C. reflexa* Roxb. (RIAZ, et al., 2017), e em *C. racemosa* Mart. (SOUSA et al., 2012). Flavonóides como quercetina e derivados e canferol, foram -apresentados em *C. reflexa* Roxb (PRASSAD et al.,2016;), *C. chinensis* Lam. em frutos (YAHARA et al., 1994;), sementes (LEE et al.,2011, JIAN-HUI et al.,2003; YANGET, 2009.; LIJUAN et al.,2011) em *C. epithymum* Murr

(SNAFI.2016; MEHRABANI *et al.*, 2007) em sementes de *C. campestris* nas sementes (LEE *et al.*,2011) e caule (LEE *et al.*, 2011), na *C. racemosa* Mart. (SOUSA *et al.*,2012; FERRAZ *et al.*, 2011b).

Ao realizar a revisão da literatura, conforme dados disponíveis no Quadro 4, verificou-se que de fato, conforme Löffler (1997) e colaboradores haviam verificado em seus estudos, os compostos fenólicos são componentes presentes e descritos em sua maioria em diferentes espécies do gênero *Cuscuta*, variando em concentrações e compostos de acordo com a planta hospedeira. Constatou-se haver variabilidade destes compostos ou em suas porcentagens quando a *Cuscuta* está associada à diferentes espécies de hospedeiras, ou na mesma hospedeira em diversas épocas de coleta e/ou alterações climáticas (LÖFFLER, *et al.*,1997).

Em 2011, Ferraz e colaboradores publicaram dois estudos avaliando extrato bruto liofilizado e extrato metanólico obtidos a partir do caule da *C. racemosa* Mart., investigando atividades antioxidantes e antiinflamatória, atribuída à presença de compostos fenólicos, notadamente nas frações de flavonóides e alcalóides. (FERRAZ *et al.*, 2011a; FERRAZ *et al.*, 2011b).

O pó do material vegetal seco obtido de *Cuscuta racemosa* Mart., é usada popularmente no Brasil, na Índia e na China para cicatrização de feridas, atividade atribuída a presença de flavonoides e saponinas. É interessante destacar que a atividade cicatrizante destes compostos encontrados, está relacionada a aplicação do extrato de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* M.), de uso exclusivamente externo, indicado para cicatrização de feridas e assepsia em afecções cutâneas superficiais. Estudos descrevem efeito cicatrizante do extrato da casca, devido à presença de saponinas e flavonoides.

A ação antioxidante destes compostos, presentes nas espécies que compõem o gênero vêm sendo bastante estudadas, tanto em modelos de cultura celular ou em modelos de experimentação animal. Szeto e colaboradores (2011) avaliaram a ação protetora antioxidante do extrato de semente da *Cuscuta chinensis* Lam. em cultura de linfócitos do baço e ação redutora de dano ao DNA mitocondrial causado pelo envelhecimento em modelos de experimentação animal com ratos envelhecidos.

Ferraz e colaboradores (2011b) relacionou a atividade bacteriostática também aos compostos fenólicos presentes na planta *C. racemosa* Mart. frente algumas cepas de microrganismos presentes na microbiota cutânea.

A ação antimicrobiana dos extratos etanólico e clorofórmico de *C. reflexa* Roxb. foi testada em ensaio de difusão em ágar frente as cepas de microrganismos *E.coli* (ATCC-25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC-25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-27853), *Proteus vulgaris* (ATCC 6380), *Salmonella paratyphi* (ATCC-9150), *Shigella sonnei* (ATCC-25931), *Salmonella typhimurium* (ATCC-25241) e *Klebsiella pneumonia* (ATCC-27736), mostrando melhor atividade, na concentração 55 mg/mL quando comparados ao cloranfenicol (MATEEN, SURESH & AHMED, 2011). A semente desta espécie também foi avaliada por sua atividade antimicrobiana, ação que foi atribuída à presença de compostos hidrocarbonetos mono e sesquiterpênicos, tais como piperitona, cariofilena, cânfora, entre outros, identificados através da GC-MS (SHARMA et al., 2014).

Estudos para identificação de compostos químicos, não identificaram a presença de óleos essenciais nos extratos de *C. racemosa* (SOUSA et al., 2012), porém foram isolados da *C. racemosa* Mart. lignanas e flavonóides (quercetina, camferol, accuminatolida, pinosresinol, 9 α -hydroxysesamin e 9 β -hydroxysesamin) utilizando a Droplet Counter-Current Chromatography (DCCC). As lignanas são estrutura químicas, caracterizadas como fenilpropanóides (ALONSO, 2008), anteriormente estudadas por sua associação a possíveis ações de defesa da planta frente a diversos microrganismos, apresentando ação antifúngica e propriedades inseticidas (WILTER et al., 2006; SOUSA et al., 2012) e por suas atividades antitumorais, anti-inflamatórias e antioxidante (PAN et al., 2009).

Extrato bruto e frações da *C. racemosa* apresentaram ação antiulcerogênica, sendo que a fração flavonoídica testada apresentou maior efetividade (FERRAZ et al., 2011a). Ação antiulcerogênica dos flavonóides quercetina e catequinas, presentes na *Maytenus ilicifolia* Mart., popularmente conhecida como Espinheira santa, e utilizada por sua ação protetora da mucosa gástrica, foi avaliada anteriormente em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*, mostrando ação inibidora da secreção ácido-gástrica (CARLINI & FROCHTENGARTEN, 1998), dada por uma ação redutora de pH gástrico similar

à indometacina. Estes compostos também foram avaliados quanto à sua toxicidade e a avaliação do extrato das folhas não mostrou toxicidade (ANVISA, 2016).

Estudos em modelo animal, com extrato metanólico de *C.epithymum* L. e extratos etanólico e aquosos nanoparticulados de sementes de *C.chinensis* Lam. mostraram efeito hepatoprotetor (AL-AL-SNAFI.2016; JAFARIAN, GANAPATY et al., 2013b) em potencial com redução de estresse oxidativo causado por tetracloreto de carbono bem como ação hepatoregeneradora (YEN et al, 2008; DONNAPEE et al., 2014).

Em 2014, Wang e colaboradores avaliaram os extratos aquosos e etanólicos das sementes *C.chinesis* em comparação com o arbutina, para avaliar sua ação inibidora da melanogênese, para uma possível aplicação tópica e cosmética clareadora e concluiu-se que ambos os extratos influenciam na melanogênese ao regular a atividade da enzima tirosinase, por um possível efeito anestésico, porém, nenhuma das frações avaliadas, foram determinantes para a inibição da atividade desta enzima.

A ação da quercetina, uma das estruturas flavonoídicas mais conhecidas, presente no extrato das sementes *C. campestris* Yuki, foi avaliada via oral quanto a sua atividade antiproliferativa e redutora de prurido em pacientes com dermatite atópica, resultando em uma significativa ação de controle da pigmentação destes (MEHRBANI et al., 2004).

A espécie *C. campestris* Yunck também foi avaliada em 2014 por sua atividade anti-inflamatória e antiproliferativa, ação atribuída pelos autores a presença de flavonóides como quercetina, canferol e rutina (MEHRBANI et al., 2004), compostos químicos também presentes no extrato de *C. racemosa* e identificados em estudos anteriores (FERRAZ et al., 2011; SOUSA et al., 2012).

As diversas espécies do gênero *Cuscuta* foram estudadas por suas atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e antiproliferativa dada a presença de flavonoides e alcaloides (PAN et al., 2016; FERRAZ, et al.; 2011; LI et al., 2015) em sua composição.

Em 2011, com o objetivo de avaliar a ação anti-inflamatória da *C.reflexa* Roxb., Suresh e colaboradores estudaram o extrato aquoso “*in vitro*” em modelo de inflamação induzida por lipopolissacarídeo (LPA) em cultura de macrófagos murinos para avaliar a ação dos genes envolvidos na liberação da COX-2 e TNF-

α durante o processo inflamatório. Efeitos anti-inflamatórios e citotóxicos do extrato metanólico (EM) da *C. reflexa* e sua fração acetato de etila (EAE) também foram avaliados por ensaios de estabilização da membrana de HRBC e no ensaio de citotoxicidade do camarão salino, que resultou nos valores DL₅₀ de 384,08 g/mL (EM) e 184,86 g/mL da (EAE) (UDAVANT, SATYANARAYANA & UPASANI, 2012) e confirmou a potencial ação anti-inflamatória das amostras, também avaliadas em outras espécies de *Cuscuta.*, tais como *C. chinensis*, por sua ação reguladora de citoquinas (RAJU et al., 2015) e *C. racemosa* por seus efeitos conforme descritos anteriormente (SOUSA et al., 2012).

Relacionado a ação citotóxica *C. racemosa* já foi avaliada anteriormente no modelo experimental de *Artemia franciscana*, para determinar a letalidade do extrato bruto e frações derivadas (FERRAZ et al, 2011).

Ensaio de toxicidade para determinação da DL₅₀ foram realizados *in vivo* e ação não genotóxica, comprovada por estudos *in vitro*, por meio do teste de micronúcleo (ANVISA, 2016).

Além de flavonoides com conhecida ação antioxidante há evidências descritas na literatura de que algumas espécies do gênero *Cuscuta* apresentam frações de alcaloides de núcleo indólico (PÉREZ-AMADOR et al.,1996) e esta característica levanta considerações sobre uma possível atividade antitumoral a ser investigada (FERRAZ et al., 2011a).

Os alcalóides representam um dos grupos mais importantes do metabolismo secundário vegetal, com grande número de substâncias descritas e identificadas, encontrados em cerca de 40% das famílias com diversidade estrutural e atividade farmacológica, são compostos predominantes nas angiospermas. (ECHEVERRÍA & NIEMEYER, 2012). A origem do termo remete ao árabe “*al kaly*” ou “*al-quali*” similar à soda e ao grego “*eidos*” relativo ao aspecto e são assim chamados pois a maior parte dos compostos apresentam caráter alcalino em solução, à exceção de colchicina, piperina, oximas (BRUNETON,1997,SIMOES et. al., 2001). Em sua origem, formados a partir de aminoácidos, são produzidos como um mecanismo de proteção contra predadores, especula-se sua função como substâncias reguladoras de crescimento ou de reserva nas plantas (ECHEVERRÍA & NIEMEYER, 2012). São compostos nitrogenados de estrutura química heterogênea muito diversificada, que podem conter um ou mais átomos de nitrogênio, estes podem

apresentar-se ligados a estruturas simples não heterocíclica, como a efedrina ou complexas, ligados a um sistema heterocíclico, (OLIVEIRA et al., 2010; HARBORNE,1973).

Os alcalóides indólicos apresentam núcleo aromático, como parte de sua estrutura química, e são conhecidos tanto pela ação alucinógena presentes na espécie *Ipomoea violácea* e identificados em *C. monogyna* e *C. chinensis* (GARCIA et al, 1995 como pela ação colinérgica da ioimbina obtida da casca da *Pausinystalia yhimbine* e antitumoral da vimblastina presentes na *Vinca rosea*, (ALONSO,2008).

Espécies do gênero *Cuscuta*, como *C.reflexa* Roxb foram estudadas para avaliação de sua atividade antitumoral em papiloma dérmico (NISA et al.,1986), em células Hep3B, para avaliar ação antitumoral, verificando capacidade do extrato na inibição da atividade inflamatória induzida por LPA e na indução da apoptose celular (SURESH et al., 2011) e em células MCF-7, apresentando redução do crescimento tumoral em modelo “*in vivo*” (BHAGAT et al., 2013). Ações antitumorais foram também estudadas em espécies *C. chinensis* e ação citotóxica foi atribuída a presença de glicosídeos (MAVLONOV et al., 2008).

Em um levantamento bibliográfico sobre a composição da *C. chinensis*, Donnapee e colaboradores (2014) relatam a presença de cerca 83 de compostos químicos diferentes identificados nesta espécie, em diferentes partes da planta, abrangendo partes aéreas, sementes e caule. São relacionados 19 flavonoides; 13 ácidos fenólicos, 2 esteróides, 1 hidroquinona, 10 óleos voláteis, 23 ligninas, 5 alcalóides, 9 polissacarídeos, 2 glicosídeos resinosos e 16 ácidos graxos.

O interesse pelo estudo das atividades acima relatadas está relacionado a característica “imortal” atribuída à *Cuscuta*, uma vez que a planta, floresce após o período de chuvas, após permanecer em estado de dormência no solo após os meses de seca. Estas espécies podem ser consideradas plantas adaptógenas e, sob condições de estresse pode apresentar aumento da concentração de antioxidantes, indicando uma potencial utilização em formulações cosméticas, com ação preventiva ao envelhecimento (UDAVANT, SATYANARAYANA & UPASANI 2012), ou ação medicamentosa, com diminuição de células tumorais. Se for confirmada a ação sobre linhagens celulares distintas, não tumorais e tumorais, este estudo pode contribuir com a busca de novos fármacos mais seletivos e menos citotóxicos, o que aumenta o interesse

científico em avaliar, por meio de métodos experimentais alternativos ao uso de animais, validados pela Organização para Cooperação e desenvolvimento Econômico (OECD), a segurança e eficácia da *C. racemosa* Mart.

QUADRO 4: Levantamento bibliográfico sobre Ensaios do Gênero *Cuscuta*

Espécie	Parte vegetal	Extrato ou Frações	Modelo Experimental/ Dose	Resultados	Referencias
<i>C. australis</i>	sementes			Ação imunológica	Gu et al., 2001
<i>C. campestris</i> Yuncker	planta seca	Extrato etanolico	Modelo animal ratos: Analgesia Extrato 50-100mg/kg x p-benzoquinona; Ação anti-inflamatória: 100mg/Kg x carragenina.; Ação antipirética: 50-100mg/kG x solução de levedura; Modelo de Condicionamento comportamental (Evitar e escapar) 50-100mg/kg x chorpromazina.	Ação analgésica, anti-inflamatória, hipotérmica e tranquilizante do SNC.	Aga, Saltar & Galal, 1996
<i>C. campestris.</i> X <i>Ocimum basilicum,</i> <i>Alhagi maurorum,</i> <i>Calendula officinalis</i>	partes aéreas	extrato metanolico	Ensaio de citotoxicidade em MTT em linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231, e linhagem normal de mama MCF 10A; Apoptose: PCR	Citotoxicidade: DI ₅₀ 36,31µ g/mL.	Behbahani, 2014
<i>C. campestris</i> Yuncker	Semente	extrato aquoso + Soro de Leite	Duplo cego randomizado x placebo 52 pacientes x500mg/ dia por 30 dias para dermatite atopica severa.	32 pacientes: aumento de hidratação e elasticidade da pele , redução de prurido, melhora da qualidade de sono, sem alteração significativa na pigmentação, pH cutâneo ou produção sebácea.	Mehrbani et al., 2015
<i>C chinensis</i> Lam. X <i>C. campestris</i> Yunck.	sementes processadas por aquecimento		MTT em macrófagos	Ação anti-inflamatória (<i>C. campestris</i>) e ação antiproliferativa; ação antioxidante (polissacarídeos) aumento de anticorpos e a de linfócitos, aumento em 23 x de quercetina sementes processadas com aquecimento	Lee et al., 2011.
<i>C. chinensis</i> Lam.	planta toda	Extrato aquoso	Camundongo 1g/Kg 3x /semana	Antitumoral pele inibição do papiloma na pele e redução da transformação do carcinoma	Nisa et al., 1986;
			CCRF-CEM e JM células 1-25µg/mL	Ação citotóxica em células de leucemia em linfócitos humanos	Zeraati et al, 2010;
			MES Ratos 1g/kg vo	ação anticonvulsivante	Suresh, et al., 2012., Gupta, et al., 2003
		Extrato metanolico	Modelo bactéria: 0,1mg	Ação antimutagenica. Positiva TRp-1	Nakahara, et al. 2002;

	semente	extrato aquoso	Ensaio do Cometa : genoproteção em linfocitos humanos	Não mostrou ação protetora do DNA 2g: 200mL H ₂ O	Szeto et al, 2011.
			LPS estimulado por BV-2 Microglia, RT-PCR (iNOS) e western- bot (COX-2mRNA)	Ação redutora da inflamação: Redução de NO e PGE ₂ , redução de TNF- α , IL-1 β , IL-6.	Kang et al, 2014
		extrato aquoso e extrato etanolico	Ensaio de inibição da tirosinase em cogumelos;	Anti-melasma e anti-efélides: inibidor não competitivo de tirosinase (extrato aquoso) comparado com arbutim e mequinol); IC ₅₀ 12mg/mL	Wang et al, 2014
		extrato aquoso e extrato etanolico 500 μ g - 2mg/mL	Ensaio in vivo de inibição da tirosinase em larva de zebra fish;	Anti-melasma e anti-efélides: não apresentou resultado em Extrato etanolico; apresentou redução da ação de tirosinase e redução de pontos com melanina no Extrato aquoso.	Wang et al, 2015
		extrato etanolico		Promotora da melanogenese	Yan & Di, 2006
		extrato aquoso		Ação inibidora da melanogenese	Yang et al, 2012.
		extrato etanolico e frações	Ensaio ALP em Osteoblastos-like (células UMR-106); ERE (ação estrogenica) eAtivação proteina Ap-1(ação antiestrogenica) em células Hela	Aumento da diferenciação do osteoblasto e da mineralização óssea ALP-(Canferol e hiperísideo); Aumento de proliferação (Astragalin): ação estrogênica todas as frações - quercetina, canferol e isorhamnetina com ação agonista de receptor ER- β .	Jian-Hui et al, 2003; Yanget, 2009.; Lijuan et al, 2011
		extrato aquoso, extrato etanolico e nanoparticulas de extrato etanolico	ratos 125- 250 mg/Kg extratos aquoso e etanolico, 25-50mg/kg nanoparticulas	Ação hepatoprotetora e hepatoregeneradora.	Yen at al, 2008;
		fração organica e flavonoides	células Hela 1,5,10,50,100 μ g/mL Fração organica e 1,5,10,50 μ M flavonoides isolados	Estimulo ao crescimento das células Hela via receptor estrogenico ER α e ER β , pelo extrato etanolico.	Yang et al., 2011;

		fração organica e flavonoides	células MC7-T47D 1,5,10,50,100µg/mL Fração organica e 1,5,10,50µM flavonoides isolados	Estimulo ao crescimento das células de cancer de mama 10 µM flavonoides isolados	Umerhara et al., 2004;
		extrato etanolico	Ratos: tratados com OVA 100 µg. Células do baço: 100, 200 and 400 µg/kg	Aumento da proliferação celular, aumento de anticorpo específico.	Pan, Sun & Pan, 2005
		Extrato metanolico	HPLC, MTT 8,72-59,53µg/mL.	Ação citotóxica em linhagens celulares: MG-63, MCF-7, SMMC-7721	Donnapee et al., 2014
		Extratos aquoso e etanólico e frações n-hexano, ethyl acetato, n-butano, aquosa orgânica.	DPHC	ação antioxidante e maior concentração de flavonol: Fração etyl acetate ; Ausencia de ação e baixo teor de flavonol: extrato aquoso	Yen at al, 2008b
		Extrato	Rato: IP 10mg/kg x CTX	ação imunoprotetora x quimioterapia, ação uroprotetora.	Raju, et al., 2015.
		extrato etanolico	Ratos: tratados com OVA 100 µg. Células do baço: 100, 200 and 400 µg/kg	Aumento da proliferação celular, aumento de anticorpo específico.	Pan, Sun & Pan, 2005
		polissacarideos isolados	modelo animal ratos velhos vo 400mg/Kg, 100mL e 200MM por 42 dias	redução de apoptose em celulas do miocardio, ação anti-envelhecimento.	Sun, et al., 2014.;
		extrato metanolico	modelo animal rato vo 20-500mg/kg	Anti-inflamatoria redução de edema induzido por γ- carragenina em 04 horas.	Liao, et al., 2014;
	semente 2%		Bioensaio Luciferase	Atividade antiprogestogenica	Ahmed et al, 2014
<i>C. chinensis Lam.</i>			MTT citotoxicidade- PAE cell	40-100µg/ mL não citotóxico	Ahmed et al, 2014
<i>C. chinensis Lam;</i> <i>C. epithymum;</i>	partes aéreas	Extratos cloroformico e Hidroalcolico.	Ensaio de citotoxicidade em MTT em Linhagens de células tumorais: Hela, HT29 e MDA-MB-468 . Extratos a: 1, 10, 50, 100 and 500 µg/ml.	Extratos de clorofórmio de <i>C. chinensis</i> e <i>C. epithymum</i> reduziram significativamente a viabilidade das células Hela, HT-29 e MDA-MB-468.	Jafarian, Ghannadi, e Mohebi, 2014.
		extratos hidroalcolico e cloroformico	Linhagens celulares tumorais: MDA-DB-468; HT29, Hela.	MDA-DB: Extrato hidroalcolico reduziu viabilidade celular IC ₅₀ 340µ g/mL	Al-Snafi.2016; Jafarian, Ghannadi e Mohebi, 2014.

<i>C. epithymum</i>	caule	extrato metanolico	Difusão em ágar: atividade antimicrobiana 500µg/ disco : <i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>P.aeruginosas</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E.coli</i> , <i>S.sonnei</i> , <i>S. dysenteriae</i> , <i>V. cholerae</i> , <i>S. typhi</i> - Diluição e letalidade brine shrimp.	Moderada atividade antimicrobiana <i>B. megaterium</i> (CIM 4,96mg/mL), <i>P.aeruginosas</i> (CIM 3,03mg/mL), <i>E.coli</i> (CIM 3,47mg/mL), <i>S. typhi</i> (CIM 4,07mg/mL).	Biwas et al, 2012.; Al-Snafi, 2016.
<i>C.epithymum</i> L.		extrato metanolico	DPPH, radicais: superoxido e hidroxila	Ação antioxidante 360µg	Al-Snafi.2016; Jafarian, Ganapaty et al., 2013a
<i>C.epithymum</i> L.	planta toda	extrato metanolico	In vivo: rato x CCl ₄	hepatoproteção: redução de estresse oxidativo.	Al-Snafi.2016; Jafarian, Ganapaty et al., 2013b
<i>C.epithymum</i> Murr.		Extrato hidroalcoólico	Rato vo 50mg/kg x pentylenetetrazol.	Atividade anticonvulsivante	Al-Snafi.2016; Mehrabani et al., 2007
<i>C. japonica</i> Choisy	sementes	Extrato aquoso	Rato: D.O. 50-100mg/kg por 21 dias/ neurogenese- cognição	Estimulo neuronal: proliferação, diferenciação e maturação celular; Melhora cognitiva e aprendizado.	Moon, et al. 2016
		extratto etanolico e frações	Plasma de rato - ECA 460-596µgM	Redução em 50% ECA, ação anti-hipertensiva	Oh, et al., 2002
<i>C. paniflora</i> Tem.			Triplo cego 500mg/ 08 semanas	atividade antidepressiva	Al-Snafi.2016; Firoozabadi et al., 2015
<i>C. pedicellata</i> lledeb.		extrato etanólico e frações n-hexano, etilacetato, metanol/etilacetato.	In vivo: ratos perfil Lipidico sérico Dieta de engorda 2 meses: Extrato e frações 400mg/kg x Orlistat.	Ação redutora de peso. naringenina-7-Oβ-D-glucosideo: ação redutora de colesterol.	Zekry, et al.,2015
<i>C.racemosa</i> Mart.	planta toda	Ecologia	Presença de insetos e aracnideos em hospedeira na presença de <i>C. racemosa</i>	Redução de insetos herbívoros(mastigadores e sugadores) possivel ação competitiva pelo açúcar e nutrientes fotoassimilados do floema da hospedeira. Aracnideos, não parece influenciar a população- possivel busca de abridgo.	Andrade, Araújo e Neves, 2007.

		Extrato bruto e frações: cloroformio, etil acetato, etanolica, etanolica/água, direcionada para alcalóides	<i>Ensaio de citotoxicidade Extrato bruto DL50: 231µg/mL;</i>	<i>Ensaio de citotoxicidade in vivo Artemia franciscana (Brine shrimp) 1mg/mL;</i>	Ferraz et al (b), 2011
		extrato bruto em alcool 70%	Ensaio antimicrobiano Extrato Bruto 0,5,1,0,1,5,2,0mg/mL Diluição em meio líquido X Staphylococcus aureus ATCC 6538, Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027 e Escherichia coli ATCC 10536, Candida albicans ATCC 10231 e Aspergillus niger ATCC 16404.	Atividade antimicrobiana S. aureus CIM 2mg/mL	Ferraz et al (b), 2011
		Extrato bruto em alcool 70%, extrato bruto 400mg/Kg e frações cloroformio 3,04mg, etyl acetato13,6mg, etanolica 145mg	Modelo animal ratos Wistar machos e femeas Dose aguda e cronica	Ação antiulcera Extrato Bruto em alcool 41,27% inibição (frações tb)	Ferraz et al., 2011a
		extrato bruto em alcool 70%	MDA: cerebro homogeneizado de ratos Extrato bruto em etanol 70% 0,125-1,25µg/mL; fração etanolica 0,06-1µg/mL	Ação antioxidante extrato bruto 9,31µg/mL Fração etanolica: 4,36µg/mL	Ferraz et al., 2011a
		extrato bruto em alcool 70%	camundongos Dose única Extrato Bruto 5 g/Kg	Toxicidade aguda: alterações em peso de coração e pulmoes de camundongos machos.	Ferraz et al (a), 2011
		Fração diclorometano 0,33g em 2mL solvente	DCCC - Separação de compostos por cromatografia	Lignanas associada a ação antimicrobiana, antifungica, antiviral, anti-pragas, inseticida, com ação biológica antitumoral, antiinflamatória, imunossupressora, antioxidante e tonica cardiovascular.	Sousa et al, 2012

<i>C. reflexa</i> Roxb. x <i>Carthamus oxyacantha</i>	planta toda	extrato bruto etanolico, frações n-hexano, acetato de etila e cloroformica.	método DPPH (antioxidante); Difusão em ágar Bacillus sp AQ-1, AQ-2, AZ-1, AZ-2	anti-inflamatória: todos os extratos redução de DPPH citotoxicidade 09-62 µg/mL e antimicrobiana demonstrada em todos os extratos e frações.	Raza et al., 2015.
<i>C.reflexa</i> x <i>Aesclynomene indica</i>		Etyl acetato	300µg Difusão em ágar x Bacillus subtilis IFO 3026, Sarcina lutea IFO 3232, Xanthomonas campestris IAM 1671, Escherichia coli IFO 3007, Klebsiella pneumoniae ATTC 10031, Proteus vulgaris MTCC 321 and Pseudomonas denitrificans KACC 32026	Demosntrou sucetibilidade ao extrato combinado: E. coli, P. vulgaris, K. pneumoniae, P. denitrificans. Individualmente os extraos mostraram uma ação pequena.	Islam et al, 2015.
<i>C. reflexa</i> Roxb.	partes aéreas	extrato metanólico e aquoso	Ratos: tratados com 200 and 400 mg/kg	Não apresentou ação hipoglicemiante no grupo controle normal, apresentou redução de taxa da glicose no sangue dos grupos tratados ação: antidiabética	Rath et al., 2016
		extrato etanolico	ratos anestesiados com pentothal.	Redução da pressão arterial e frequência cardíaca, efeitos hipotensivos e bradicárdicos independentes da estimulação do receptor colinérgico ou bloqueio do receptor adrenérgico.	Gilani & Aftab, 1992
	planta toda	extrato metanolico	ensaio de inibição da tirosinase em cogumelos;	Inibição da tirosinase 28,9%	Adhkali et al, 2008;
			Atividade DPPH	IC50 359,48µg/mL	Vijikumar, 2011;
	caule	pasta com a planta	uso popular: eczema e caspa e lepra		Gaur, 1999; Jyothi et al, 2010; Sinha et al, 2013, Upadhyay et al., 2010;
	extrato alcoolico e extrato aquoso	HPE 100,200 e 400mg/kg x ibuprofen 40mg/kg	Antiinflamatória 16-20g camundongos albinos F e M; Toxicidade em em ratos albinos (não toxico 200mg/kg);	Katiyar et al, 2012;	

		extrato alcoolico	Gram +: <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> Gram : <i>E. coli</i> , <i>P.aeruginosa</i> , Fungi: <i>A. niger</i>	Antimicrobiana: Gram - e Fungos	Inamdae et al, 2011;
		éter de propilenoglicol e extrato etanólico	extratos 250 mg / kg em ratos machos albinos suíços em alopecia induzida por ciclofosfamida	alopécia: crescimento capilar e proliferação capilar ativa	Patel et al., 2014
		frações	Ensaio SRB 25-50µM amostras em Células HCT 116	ação antiproliferativa moderada das frações: escoparone, ácido p-coumarina, stigmasta-3,5 diene.	Riaz, et al., 2017
		extratos metanolico, eter petroleo e cloroformico.	Ensaio em <i>Pheritima posthuma</i> (helminto) 20-50	todos os extratos: Inibição na motilidade; ação dose dependente	Udavant, et al., 2012.b
		Extrato de ester de petroleo, fração esterol	In vivo: rato (testosterona) Topico Sol. Extrato 2% + veiculo por 20 dias; In vitro: enzima 5-aredutase Extrato, Fração e finasterida 0,1-0,5mL; Avaliação histologica.	Ação anti-alopécia: Aumento das fases anagena e telogena de crescimento capilar; ação anti-androgênica: inibição de enzima 5-aredutase com IC ₅₀ Extrato, Fração e finasterida: 1,78mg, 0,19µg e 0,77µg.	Pandit et al., 2008
		Extrato metanólico e fração Etyl acetato.	HBRC; Ensaio de Letalidade Brine Shrimp.	ação anti-inflamatória e ação citotóxica IC ₅₀ 277,83µg/mL (Extrato metanolico) eIC ₅₀ 219,94µg/mL (Fração etyl acetato); citotoxicidade DL50 257,73µg/mL (Extrato metanolico) eDL50184,86µg/mL (Fração etyl acetato) .	Udavant, et al., 2012.
		Extrato metanolico	Ratos STR, Estimulo Bioquimico de catecolaminas	Age no receptor GABA	Suresh, et al.,2012.; Akbar, Nisa e Tariq,1985.
Fonte: Adaptado de Ferraz, 2002 p.30-4 e Donnapee et al., 2014 p.8-10; Malik et al, 2015; Pandit et al., 2008; Sharma et al, 20114.					

1.3. Estudos de Citotoxicidade e Fototoxicidade.

Para se avaliar a segurança da amostra de uma substância que apresenta potencial terapêutico a ser incorporado em cosméticos e, ou medicamentos faz-se necessário avaliar o potencial de toxicidade em ensaios de citotoxicidade, fototoxicidade e genotoxicidade, desenvolvidos “*in vitro*” por meio dos chamados métodos alternativos.

“ Métodos alternativos: procedimentos validados e internacionalmente aceitos que garantam resultados semelhantes e com reprodutibilidade para atingir, sempre que possível, a mesma meta dos procedimentos substituídos por metodologias que: não utilizem animais; usem espécies de ordens inferiores; empreguem menor número de animais; utilizem sistemas orgânicos *ex vivos*; ou diminuam ou eliminem o desconforto (BRASIL, Artigo 2 do Decreto nº 6.899/2009)”.

De acordo com o Guia para Avaliação de Segurança de produtos Cosméticos (ANVISA, 2012), os ensaios que compõem os métodos alternativos, propõem a redução e o refinamento do uso de modelos animais e, a substituição destes, para realização de testes aceitos internacionalmente, com validação científica, que possuam resultados reprodutíveis e que possam ser aplicados com segurança nos modelos “*in vivo*”. Este Guia define métodos aceitos para avaliação de segurança e testes de permeação de matérias-primas de interesse cosméticos, baseados nas normas da OECD, conhecidos como métodos alternativos.

Os métodos alternativos são, portanto, o conjunto validado de ensaios “*in vitro*”, atualmente aceitos para avaliação de segurança em cosméticos. (Brasil, LEI Nº 15.316, DE 23 DE JANEIRO DE 2014). Estes métodos são embasados em princípios éticos que propõem protocolos alternativos para se estudar as interações de irritabilidade, toxicidade e permeação de uma substância, bem como alguns efeitos terapêuticos como hidratação, potencial antioxidante, cicatrização, entre outros com as células alvo, que favoreçam a substituição ou quando esta não for possível, a redução no número de animais em testes não clínicos (ANVISA, 2012).

No estado de São Paulo, a Lei no. 15.316 de 23 de janeiro de 2014 proíbe o uso de animais para realização de experimentos e testes em cosméticos, produtos de higiene pessoal, perfumes ou seus componentes. A aprovação desta norma está em concordância com o princípio dos 3 Rs, que preconiza, quando possível a substituição dos animais a serem usados na pesquisa científica, realizando ensaios por métodos alternativos, como por exemplo os ensaios em cultura celular (CAZARIN, CORRÊA & ZAMBRONE, 2014).

Os métodos alternativos são embasados em três pilares que sustentam o princípio dos 3 Rs, Reduction (redução), Refinement (refinamento) e Replacement (Substituição), propostos inicialmente William Russel e Rex Burch na publicação "The Principles of Humane Experimental Technique" 1959, estes princípios são aceitos mundialmente e tornaram-se pilares dos Comitês de Ética constituídos que visam a redução no número de animais a serem utilizados em experimentações científicas quando ainda necessários, bem como regulamenta condições que envolvem o uso de animais nos experimentos .

Os estudos de toxicidade têm como objetivo principal prever em ensaios "*in vitro*" possíveis efeitos adversos, manifestados pelo organismo em contato com determinadas substâncias químicas, sejam elas de origem natural ou sintéticas, presentes em um medicamento, cosmético, saneante, alimento ou qualquer agente químico para diversas utilizações (CAZARIN, CORRÊA & ZAMBRONE, 2004). Estes estudos são realizados por métodos alternativos "*in vitro*" ou "*ex-vivo*", e os métodos são validados por instituições internacionais OECD, COLIPA, ECVAM, CTEA, ICCVAM, que disponibilizam em seus websites, diretrizes e protocolos que são documentos referências usados para o desenvolvimento das pesquisas científicas. Dentre os diversos métodos alternativos validados e realizados em linhagens celulares eucariontes, estão: fototoxicidade; teste do micronúcleo *in vitro*; e citotoxicidade (ANVISA, 2012).

O teste de citotoxicidade é realizado através do contato da amostra (substância teste) em contato com células de mamíferos cultivadas com o objetivo em se verificar se ocorrem alterações ou morte celular. Segundo Freshney (2010), pode-se avaliar por meio deste teste a viabilidade celular, medida através da proporção de células que permanecem viáveis após estas serem expostas a um procedimento traumático. A viabilidade celular é, portanto; um dos parâmetros mais utilizados, que pode ser evidenciado pela avaliação da

integridade da membrana celular, com o auxílio da exposição a um Corante vital ou não vital. Tal parâmetro pode ser medido pela captação de um corante impermeável às células viáveis, a exemplo do Triplan Blue (TP), ou de um corante absorvido pelas células viáveis, a exemplo do Vermelho Neutro (NR) (NIH, 2001; ICCVAM, 2006). Para o desenvolvimento deste trabalho, com o objetivo de avaliar o potencial citotóxico do extrato bruto de *C. racemosa* e de sua fração direcionada obtenção de alcalóides, os testes validados usados para este fim foram realizados pela utilização das células Balb/ C 3T3 clone A31 (fibroblastos murino) no teste de citotoxicidade com utilização do corante vital vermelho neutro (NR), que por sua característica hidrossolúvel consegue atravessar à membrana celular e fixa-se ao lisossoma das células (ROGERO, et al., 2003). Uma substância com potencial citotóxico, rompe a membrana celular, reduzindo a capacidade da célula em captar o corante vermelho neutro, portanto, pode-se avaliar a viabilidade celular pela intensidade da cor na cultura celular, esta será mais intensa nas células que foram expostas à uma amostra de baixa citotoxicidade.

Este ensaio é realizado na forma dose-resposta, para determinar a IC_{50} , ou seja, a concentração da amostra que reduz em 50% a viabilidade celular em comparação ao controle celular, mensurada pela incorporação do corante vital na célula. Através do valor calculado de IC_{50} pode-se estimar o valor da DL_{50} (dosagem da amostra letal a 50% dos animais), através da equação de regressão linear. O Valor encontrado é usado para determinar a dosagem inicial da amostra para ensaios de toxicidade sistêmica oral aguda e para se determina a Dosagem letal mínima (DL_{10}) (OECD 129, 2010)

“A fototoxicidade é definida como uma resposta tóxica aguda induzida por uma determinada substância aplicada ao corpo (aparentemente em doses baixas) após a exposição solar” (OECD 432, 2004).

O teste de fototoxicidade 3T3 NRU, tem por objetivo determinar se a substância amostrada apresentará potencial citotoxicidade quando exposta à uma dose de radiação solar não citotóxica em comparação à não exposição à radiação. O ensaio de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU, determina a viabilidade dos fibroblastos murino Balb 3T3 clone A31, expostos às amostras estudadas (C.

racemosa EB e EA e seus solventes) na presença e na ausência de luz UVA (315 nm – 400 nm).

O teste de fototoxicidade, proposto pela metodologia (3T3 NRU), é realizado pela exposição da célula de mamíferos em cultura primeiramente à amostra testada e sua posterior exposição em uma Câmara escura que simula a exposição da amostra a ser testada à radiação solar, no comprimento de onda da radiação UVA, por meio de irradiação por uma Lâmpada UVA. As amostras fototóxicas podem causar dano celular pela ativação de radicais livres, causando injúrias e lise na membrana das células. As substâncias potencialmente foto reativas são aquelas capazes de absorver a radiação UVA. A citotoxicidade é medida a partir da viabilidade celular, expressa em porcentagem e observável por meio da coloração das células viáveis com o corante vital Vermelho Neutro, após 24 horas da foto exposição (OECD 432, 2004).

Este teste alternativo ao uso de animais, permite prever com efetividade se as substâncias identificadas como potencialmente citotóxicas seriam também susceptíveis à ação fototóxica “*in vivo*”, após aplicação tópica, em medicamentos e cosméticos (OECD 432, 2004), porém este método não é sensível para prever se a substância amostrada possa causar alterações de origem de fotogenotoxicidade, fotoalergia ou fotocarcinogenicidade. Ainda que não sensível , avaliar o potencial fototóxico de uma substância de interesse cosmético ou dermatológico por meio de um teste validado é essencial para o desenvolvimento de um novo produto na indústria (KEJLOVÁ et al., 2010).

1.4. Avaliação antiproliferativa

A presença de células tumorais ocorre em decorrência de alterações genéticas que podem ser causadas por vários fatores externos e produzidas por vários mecanismos celulares, caracterizando uma célula que perdeu sua função uma vez que passa a se apresentar como uma célula desdiferenciada, que se prolifera livremente sem controle e pode migrar para tecidos adjacentes podendo realizar metástases (CARVALHO, 2006).

Os compostos glicosídicos da espécie de *C. chinensis* foram avaliados por seu potencial antitumoral (MAVLONOV et al, 2008). A presença de compostos

flavonoides e alcaloides previamente identificados na *C. racemosa* também podem contribuir inibindo a proliferação celular descontrolada, um dos mecanismos característicos das células tumorais, por meio de sua ação anti-inflamatória e antioxidante.

As principais características das células neoplásicas que as distinguem das células normais são a proliferação descontrolada, diferenciação e perda da função, poder de invasão e de gerar metástases. Uma das principais dificuldades no uso da quimioterapia no câncer é que o tumor geralmente se encontra bem avançado por ocasião do diagnóstico (RANG & DALE, 2001).

Os fármacos utilizados nos tratamentos antineoplásicos atuais apresentam um alto grau de citotoxicidade por não apresentarem seletividade à célula tumoral em seus mecanismos de ação (BERNARDI, JACQUES-SILVA & LENZ, 2006).

Tais pesquisas tornam favorável uma investigação sobre a probabilidade da espécie *C. racemosa* Mart. também apresentar atividade antiproliferativa, podendo apresenta-se como uma alternativa da biodiversidade nacional a ser utilizada em medicamentos.

2. OBJETIVOS:

Avaliar a segurança e eficácia do extrato e fração de *Cuscuta racemosa* Martius por meio de métodos “*in vitro*” recomendados por órgãos reguladores de métodos alternativos.

2.1. Objetivos Específicos:

- Avaliação exploratória dos constituintes fitoquímicos majoritários na *C. racemosa* Mart. parasitando *Lagerstroemia indica* L.
- Avaliação do potencial citotóxico e fototóxico do extrato de *C. racemosa* Mart. e sua fração.
- Avaliação do potencial antitumoral e antimicrobiano do extrato da *C. racemosa* Mart. e sua fração.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi submetido à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP em novembro de 2015, recebendo a aprovação do mesmo em 07 de julho de 2016, inscrito no CEP n. 5387211215 (ANEXO I).

Muito embora a *C. racemosa* Mart. não seja uma espécie nativa no país, ela se encontra adaptada e pode ser apresentar de forma endêmica, e, como tal, é utilizado como recurso de uso de conhecimento tradicional popular e, portanto, o cadastro de acesso ao patrimônio genético será realizado através do site do SISGen, com previsão de abertura a partir de 2017, atendendo a uma recomendação da Lei da Biodiversidade Brasileira Lei13.123/2015.

3.1. Coleta do Material.

Amostras de material vegetal pertencentes à espécie *C. racemosa* Mart. foram coletadas entre os meses de março e setembro de 2015, parasitando a árvore ornamental espécie *Lagerstroemia indica*, popularmente conhecido como "Resedá" ou "Quaresmeira" (Figura 1E) situadas às margens da avenida Abraão de Moraes, no Bairro do Ipiranga, em São Paulo – Brasil.

A exsicata para identificação da espécie foi submetida à especialista em Convolvulaceae do Jardim Botânico da cidade São Paulo, Dra. Rosângela Simão-Bianchini, e será depositada no herbário posteriormente. A coleta, preparo e identificação do material a ser herborizado foi realizada de acordo com Manual de Procedimentos Herbários, da Universidade de Pernambuco (NETO et al., 2013).

3.2. Preparação do extrato

O extrato foi preparado de acordo com a Farmacopeia Brasileira 5ª. Edição (2010), de acordo com fluxograma proposto na figura 4. Partes da planta foram limpas e selecionadas e posteriormente dispostas em bandejas de alumínio e secas em estufa (marca Marconi, modelo MA032/1) a temperatura de $45^{\circ} \pm C$ durante 3 dias. Para determinar o ponto da secagem foi realizado um teste visual de friabilidade do material seco. Em sequência, procedeu-se a

moagem do material vegetal no moinho de pás (marca Ika Works Modelo para laboratório A11basic, Millis).

O material vegetal foi pesado em balança semi-analítica (marca Digimeo, modelo KN8000C 220v) e seu peso foi de 65,5 g, seguiu-se com o preparo do extrato fluido extraído por etanol 70% (p/p) por percolação. O extrato foi mantido em contato com o solvente em um funil de separação protegido da luz (Figura 3) por 7 dias. Ao final do processo, o macerado foi drenado, o líquido obtido foi filtrado para se obter o extrato de fluido (EF). A quantidade obtida de extrato fluído foi de 650 mL.

O solvente usado no processo de extração, etanol 70% foi removido com a ajuda de equipamento rotaevaporador (marca Heidolph) acoplado a banho maria (marca Heidolph) a 48° C, em 65 rpm com vácuo de 150mbar. O resíduo aquoso foi liofilizado (marca Liotop) por 04 dias. O extrato liofilizado foi peneirado em malha 25 e acondicionado em frasco âmbar, mantida em dessecador a vácuo (marca Solab, modelo: SL-175) com porta de vidro.

Após a liofilização o rendimento médio obtido para o Extrato foi de 8% (p/v) pesando 5,24 g.

A fração alcaloídica (FA) foi obtida em meio ácido baseado no método descrito por Wagner e colaboradores (1984). Pesou-se 2 g de extrato bruto (EB) liofilizado e, solubilizou-se em 5 mL de H₂SO₄ 0,1 mol/L, por 5 vezes. A solução de 25 mL foi transferida para um funil de separação e lavada com diclorometano 2 vezes. Após eliminação do diclorometano, no funil de separação, foi introduzido quantidade suficiente de NH₄OH 1% para obter um pH próximo de 9, testado com papel indicador. Alcalinizado o meio, foi feita extração com Diclorometano (2X 5 mL), obtendo-se como resultado a fração direcionada para obtenção de alcalóide (EA), após eliminação do solvente.

As amostras ensaiadas foram ressuspendidas em solvente etanol 70% (EB) e solução fisiológica 0,9% (p/v) (EA).

Figura 3- Fluxograma ilustrativo das Etapas que envolvem o processo de Percolação.



1. Coleta do material vegetal fresco



2. Secagem em estufa 45°C por 72hs
Moagem material vegetal seco pulverizado



3. Intumescimento 7 dias e Percolação (Método adaptado)



4. Escoamento – Obtenção do Extrato Líquido



5. Rotaevaporação do solvente e Liofilização do extrato aquoso.



6. Obtenção de Extrato Bruto Liofilizado e Fracionamento

Fonte fotos da Autora, 2015.

Para se verificar o final do processo de percolação foi adicionado a uma alíquota do percolado algumas gotas de cloreto férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) a 2% (p/v), para monitorar a presença de compostos fenólicos, obtendo-se leve turvação, indicando a finalização do processo (GROCHANKE *et al.*, 2016).

3.2.1. Perfil do extrato bruto por CLAE-DAD

3.2.1.1. Preparo da amostra

Para a realização deste ensaio, pesou-se 20mg do extrato bruto da *C. racemosa* M. e dilui-se em metanol a 80% totalizando 1mL. Em seguida, realizou-se extração em fase sólida (EFS) em cartucho de sílica modificada C-18 pré ativada com metanol 100% e condicionada com metanol 80% (em água). Eluiu-se este sistema até que se completasse 5ml coletados em balão volumétrico.

Filtrou-se 1mL desta amostra em filtro de seringa 0,45µm (marca simple pure), e 1mL de metanol 80% (diluição 1:1). Analisou-se por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), métodos relatados nos itens 3.2.1.2. e 3.2.1.3.

3.2.1.2. Desenvolvimento dos métodos CLAE

Realizando-se uma análise exploratória do extrato, desenvolveu-se um sistema de eluição cromatográfica variando-se a concentração de metanol de 10 a 70% em 30 minutos (detalhado pela Tabela 1).

Tabela 1- Sistema de gradiente exploratório *Eluente A: Água com ácido acético a 1%(v/v); Eluente B: Metanol.*

Tempo (min)	Ácido Acético 1% (%)	Metanol (%)	Fluxo mL.min ⁻¹
0	90	10	0,8
5	90	10	0,8
35	30	70	0,8
40	0	100	0,8
45	0	100	0,8
46	90	10	0,8
50	90	10	0,8

Fonte: Equipamento Agilent Technologies, modelo 1260 infinity, com detector UV tipo DAD..

Após a obtenção do perfil cromatográfico foi realizada uma análise comparativa com biblioteca de dados, verificando-se com padrões de flavonoides conhecidos, a exemplo da quercetina e com a literatura de referência (Quadro 3).

Para a realização da análise por CLAE-DAD (detector de arranjo de fotodiodo) foi usado o equipamento Infinity Quant Pump VL modelo 1260,

O equipamento foi preparado para receber a amostra com preenchimento no canal A com solução de ácido acético 1%, para eluição de compostos fenólicos, por ser levemente ácido e manter o grupo hidroxila OH levemente protonado e no canal B com solvente Metanol 100% grau HPLC.

A amostra foi adicionada em um volume de 10µL de injeção a 25°C. O Gradiente inicial da amostra foi de 8,8 mL/min em metanol e ácido acético.

O Cromatograma obtido foi através do software online LC open Lab.

Foi realizada a corrida teste 1 gradiente a partir de 10% MeOH a 70%-100%

3.2.1.3. Ensaio preliminar: Caracterização de Alcaloides

Para a execução deste ensaio realizou-se uma Cromatografia em Camada Delgada (CCD) empregando-se para fase estacionária placa de sílica gel (GF₂₅₄ 20x20; 0,2mm de espessura), para fase móvel 5mL do eluente: clorofórmio/metanol/água (65:30:5), conforme descrito por CHAVES (1997.)

Os eluentes de fase móvel foram adicionados à uma cuba com tampa e, acrescentou-se papel de filtro aguardando-se a saturação da fase móvel, evitando sua evaporação (OLIVEIRA, et al., 2010). As amostras EB, FA de *C. racemosa* Mart. foram aplicadas na placa, respeitando-se uma margem inferior de 1 cm identificado como pontos delimitados de partida e em sequência a placa foi submetida à corrida na Cuba, evitando contato direto da amostra com o solvente. A placa foi retirada, quando a distância total de 10 cm foi atingida. Posteriormente, após secagem, a placa foi nebulizada com revelador Dragendorff, diluído em ácido acético 1% e água destilada (OLIVEIRA et al., 2010).

3.3 Ensaios de Citotoxicidade e Fototoxicidade

3.3. 1 Preparo das suspensões celulares

Foram usadas para estes ensaios as células de murino Balb/ 3T3 Clone A31, originárias da American Type Culture Collection (ATCC[®], CCL 163[™]).

O cultivo da linhagem celular foi realizado em frascos de 75 cm² e 150 cm², (Nest® e TPP®) em meio *Dulbecco Eagle's Medium*-(DMEM), Alta Glicose 4.500 mg/L (Vitrocell®), suplementado com 10% (v/v) de Soro Fetal Bovino (SFB-Gibco®), 2 g/L de bicarbonato de sódio (Synth®) 1% (v/v), L-glutamina 1% (v/v) da solução de antibióticos contendo 10.000 UI/mL de penicilina e 10 mg/mL de estreptomicina) (Vitrocell®). Este meio será indicado como D10.

As células foram incubadas em estufa a 37° C em atmosfera úmida e 5% de CO₂, ocorrendo a substituição do meio de cultura a cada 48 horas até as células atingirem 80% de confluência no frasco de cultura celular. O processo de descolamento celular foi realizado pela ação da solução de tripsina 0,05% (p/v) EDTA (*Ethylene Diamine Tetracetic Acid*) 0,02% (p/v) em tampão fosfato de pH 7,4 (ICCVAM, 2006).

3.3.2 Testes de citotoxicidade e pré-determinação da DL50.

A avaliação da citotoxicidade foi realizada de acordo com o teste validado pela OECD 129 (2010), em células BALB 3T3 / Clones A31 (ATCC®, CCL163™). Inicialmente foram preparadas 03 placas de 96 poços com as células (2 x 10⁴ células / poço).

Inicialmente preparou-se uma concentração inicial para cada amostra de extrato bruto liofilizado (EB), fração direcionada obtenção de alcalóides (EA) e solvente Alcool 70% e, estas foram filtradas. As amostras foram filtradas e filtro para seringa 0,45 µm e diluídas em meio D10 utilizando fator de diluição 1,47 preconizado no Guia da OECD em oito concentrações seriadas (50 a 3,37 mg.mL⁻¹ - EB; 40 a 2,69 mg.mL⁻¹- EA) (OECD 129, 2010). Após 24 horas de contato com as amostras, as células foram expostas ao corante vital vermelho neutro 0,4% (NR) usado para avaliar a viabilidade celular, na concentração de 0,004g/mL por poço. Após 3 horas de incubação, os poços foram aspirados e foram adicionados 150 µL de solução “dessorb” (49% (v/v) de água destilada, 1% (v/v) de ácido acético glacial e 50% (v/v) de álcool etílico) e após 10 minutos de agitação em agitador de placas, a leitura das absorbâncias foi realizada em 540 nm em Leitor de Placas Multi - Detection microplate reader Synergy – BIOTEK.

Os cálculos dos valores das IC10, IC50 e IC90 concentração que inibem respectivamente 10%, 50% e 90% das células desafiadas, foi realizado pelo programa *Phototox*® (2008). Para este ensaio foi verificada a possível interferência do solvente etanol 70% em diluições seriadas a partir de 1mL, uma vez que este solvente foi usado para solubilização do extrato bruto da *C. racemosa* Mart.

Os ensaios foram realizados de acordo com o *Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests* (OECD 129, 2010) em condições assépticas de acordo com as recomendações do OECD *Principles on Good Laboratory Practice* (OECD, 1998).

3.3.3 Teste de Fototoxicidade.

A avaliação da fototoxicidade foi realizada de acordo com o teste validado pela OECD 432: *In vitro* e 3T3 NRU phototoxicity test, em células clones BALB 3T3/A31 (ATCC® 163™). Para a realização deste ensaio foram preparadas microplacas de 96 poços em duplicatas, contendo as células na concentração de $2,0 \times 10^4$ células / poço. As mesmas foram incubadas por 24 horas para promover a aderência celular. As amostras foram filtradas e solubilizadas em PBS enriquecido com 1% Ca^{2+} (p/v) e 0,13% Mg^{2+} (p/v) preparadas antes da sua utilização protegidas da luz. As amostras foram adicionadas às placas em diluições seriadas, resultando em oito concentrações, calculadas pelo EAtor de diluição 1:47. As concentrações testadas foram 50 a $3,37 \text{ mg.mL}^{-1}$ - EB; 40 a $2,69 \text{ mg.mL}^{-1}$ - EA. As placas foram realizadas em duplicatas, sendo uma placa UVA+ expostas à radiação, e outra UVA- protegida da foto exposição, ambas foram submetidas as mesmas condições experimentais (concentrações das amostras, temperatura de incubação, tempo de permanência na Câmara UVA). Após período de 1h de incubação, as placas foram expostas conforme a disposição UVA+ e UVA- em uma câmara de radiação UVA por 1h30, perfazendo uma dose de 5 J/ cm^2 . O experimento foi realizado em uma Câmara de fototoxicidade, construída de acordo com as normas da OECD (OECD 432, 2014; SUFI, 2013).

A viabilidade celular foi avaliada com a adição do corante vital vermelho neutro (NR) 4,0% e adicionada a uma concentração de 0,004g/mL por poço. Este procedimento foi realizado protegendo as placas tratadas da ação direta da luz. Passados três horas, os poços foram aspirados e foram adicionados 150 µL de solução “dessorb” (49% (v/v) de água destilada, 1% (v/v) de ácido acético glacial e 50% (v/v) de álcool etílico) e após 10 minutos de agitação em agitador de placas, a leitura das absorbâncias foi realizada em 540 nm em leitor de placas (Biotek Synergy HT) a 540 nm.

Para este ensaio foi verificada a possível interferência do solvente etanol 70% em diluições seriadas a partir de 1mL, uma vez que este solvente foi usado para solubilização do extrato bruto da *C. racemosa*.

Os ensaios foram realizados de acordo com o *Guidance document on using in vitro* e 3T3 NRU phototoxicity test (OECD 432, 2010) em condições assépticas de acordo com as recomendações do OECD *Principles on Good Laboratory Practice* (OECD, 1998).

3.4 Ensaios Microbiológicos

3.4.1. Preparo das Amostras

As Cepas microbianas ATCC[®] utilizadas foram descongeladas conforme procedimento padronizado. Foram usados para estes ensaios: *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

As suspensões previamente congeladas dos microrganismos foram ressuspendidas, em condições assépticas em meios de cultura recém-preparados previamente esterilizados. Foram utilizados meios Meio SDB[®]: Sabouraud Dextrose Broth (Sigma[®]) e TSB[®] Casyn Broth[®] (Sigma[®]). Os microrganismos foram incubados para crescimento das colônias em estufas específicas por 24 horas para bactérias a 30-35° C e 48 horas para a levedura a 20-25° C.

Após o período de incubação, procedeu-se à padronização para determinação da concentração de UFC (Unidades Formadoras de Colônia) por ml de solução salina.

3.4.2. Difusão em Ágar

Este teste foi realizado com a finalidade de avaliar a atividade antimicrobiana das amostras testadas nas concentrações de 100 mg de EB; 50 mg de EA e 10 mL de EtOH 70% por meio da formação de um halo de inibição mensurável. Para realizar um ensaio preliminar, as placas foram preparadas em duplicata com bicamada caseína peptona Soy Agar® (TSA) e meio antibiótico número 11 Neomycin – Erythromycin Assay Agar- Erythromycin Seed Agar (Hymedia®). As amostras foram inoculadas utilizando discos de 15 mm de papel de filtro. As placas foram incubadas "overnight" a 37° C, e avaliadas macroscopicamente com relação a formação de halos de inibição. A partir dos resultados preliminares deste teste, foi realizada o ensaio de microdiluição seriada.

Os extratos foram obtidos a partir de material vegetal de *C. racemosa* Mart. coletados nos meses de maio e setembro de 2015 e usados para avaliar a eficácia do extrato bruto (EB) e a fração direcionada para obtenção de alcalóide (EA) para possíveis aplicações cosméticas. As amostras foram diluídas na proporção 1:2 e adicionou-se as placas contendo os microorganismos. Cada amostra foi diluída em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9 % (p/v).

3.4.3 Micro diluição seriada

Estes testes foram realizados com a finalidade de avaliar a atividade antimicrobiana das amostras testadas, determinando a CIM (Concentração Inibitória Mínima) e avaliar o uso dos compostos naturais obtidos do Extrato Bruto (EB) de *C. racemosa* M e sua fração alcaloídica (EA). As análises microbiológicas foram realizadas em sextuplicatas em meio líquido em placas de 96 poços contendo 10^6 UFC/mL de cada microrganismo testado.

Nas microplacas de 96 poços foram adicionadas um controle negativo (meio de cultura), controle positivo (meio de cultura com inóculo) e as diferentes concentrações (0,156 mg/mL a 20 mg/mL). As microplacas foram incubadas "overnight" a 25 ou 35° C (fungos ou bactérias, respectivamente). Após o período de incubação, foi acrescentado 10 µl do corante 3,5-trifenil tetrazólio (TTC) a 0,01% diluído em Solução NaCl 0,9 (p/v) em cada poço. As placas foram

novamente incubadas durante 1 hora e as placas avaliadas utilizando um leitor de placas (Biotek Synergy HT) a 620 nm.

3.5. Teste de Fotoproteção

A avaliação da atividade fotoreparadora do Extrato de *C. racemosa* M e sua fração direcionada obtenção de alcalóides foi realizada a partir da adaptação do teste validado pela OECD 432: *In vitro* e 3T3 NRU phototoxicity test, em células clones BALB 3T3/A31 (ATCC® 163™). Para a realização deste ensaio foram preparadas microplacas de 96 poços em duplicatas, contendo as células na concentração de 2×10^4 células / poço. As mesmas foram incubadas por 24 horas para promover a aderência celular. Antes da exposição das células as amostras analisadas, as placas foram aspiradas e lavadas e foram incubadas por uma hora após tratamento com PBS enriquecido com 1% Ca^{2+} (p/v) e 0,13% Mg^{2+} (p/v). As amostras foram filtradas e solubilizadas em PBS enriquecido com 1% Ca^{2+} (p/v) e 0,13% Mg^{2+} (p/v). Após este período, as placas foram aspiradas e as amostras foram adicionadas às placas em diluições seriadas, resultando em oito concentrações, calculadas pelo fator de diluição 1:47. As concentrações testadas foram 50 a $3,37 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ - EB; 40 a $2,69 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ - EA, ambas diluídas em meio D10. Após período de 1h incubação, as placas foram expostas conforme a disposição UVA+ e UVA- em uma câmara de radiação UVA por 1h30, perfazendo uma dose de $5 \text{ J} / \text{cm}^2$. As placas foram realizadas em duplicatas, para que pudessem ser submetidas simultaneamente às condições experimentais da placa identificada como UVA+ (expostas à radiação), e outra, identificada como UVA- (protegida da foto exposição), ambas foram submetidas as mesmas condições experimentais (concentrações das amostras, temperatura de incubação, tempo de permanência na Câmara UVA). O experimento foi realizado em uma Câmara de fototoxicidade, construída de acordo com as normas da OECD (OECD 432, 2014; SUFI, 2013).

A viabilidade celular foi avaliada com a adição do corante vital vermelho neutro (NR) 4,0% e adicionada a uma concentração de 0,004g/mL por poço. Este procedimento foi realizado protegendo as placas tratadas da ação direta da luz. As placas foram novamente incubadas por 3 horas. Passadas três horas, os

poços foram aspirados e foram adicionados 150 µL de solução “dessorb” (49% (v/v) de água destilada, 1% (v/v) de ácido acético glacial e 50% (v/v) de álcool etílico) e após 10 minutos de agitação em agitador de placas, a leitura das absorbâncias foi realizada utilizando um leitor de placas (marca Biotek Synergy HT) a 540 nm.

Para este ensaio foi verificada a possível interferência do solvente etanol 70% e do controle óleo essencial de Bergamota em diluições seriadas a partir de 1mL, uma vez que este solvente foi usado para solubilização do extrato bruto da *C. racemosa* e a Bergamota é relatada na literatura como fototóxica.

3.6. Teste de avaliação do potencial antitumoral

A avaliação da atividade antitumoral foi realizada de acordo com o protocolo adaptado descrito por Monks e colaboradores (1991), com a finalidade de avaliar a ação antiproliferativa do Extrato liofilizado da *C. racemosa* M. e sua fração alcaloídica frente a linhagens de células tumorais HeLa ATCC® CCL-2), SK-MEL-28 (ATCC® HTB-72) e MDA-MB-468 (ATCC® HTB-132).

As linhagens celulares foram cultivadas em frascos de 75 cm² e 150 cm², (Nest® e TPP®) em meio *Dulbecco Eagle's Medium*-(DMEM), Alta Glicose 4.500 mg/L (Vitrocell®), suplementado com 10% (v/v) de Soro Fetal Bovino (SFB-Gibco®), 2 g/L de bicarbonato de sódio (Synth®) 1% (v/v), L-glutamina 1% (v/v) da solução de antibióticos contendo 10.000 UI/mL de penicilina e 10 mg/mL de estreptomicina) (Vitrocell®). Este meio indicado como D10.

As células foram incubadas em estufa a 37°C em atmosfera úmida e 5% de CO₂, ocorrendo a substituição do meio de cultura a cada 48 horas até as células atingirem 80% de confluência no frasco de cultura celular. O processo de descolamento celular foi realizado pela ação da solução de tripsina 0,05% (p/v)/ EDTA (*Ethylene Diamine Tetracetic Acid*) 0,02% (p/v) em tampão fosfato de pH 7,4 (ICCVAM, 2006).

Inicialmente foram preparadas 1 placa de 96 poços com as células (2,0 x 10⁴ células / poço) para cada linhagem celular testada. As amostras foram testadas em Triplicatas. A placa foi dividida para o ensaio, realizando-se o plaqueamento das duas amostras em uma mesma placa para cada linhagem

celular. Uma placa foi preparada com as 03 linhagens distintas para o Controle do Solvente.

As placas foram incubadas por 24 horas para promover a aderência celular. As amostras foram filtradas e solubilizadas em D10 preparadas antes da sua utilização. As amostras foram adicionadas às placas em diluições seriadas, resultando em oito concentrações, calculadas pelo fator de diluição 1:47. As concentrações testadas foram 50 a 3,37 mg.mL⁻¹ para o EB; 40 a 2,69 mg.mL⁻¹ para o EA.

A viabilidade celular foi avaliada com a adição do corante vital vermelho neutro (NR) 4,0% e adicionada a uma concentração de 0,004g/mL por poço. Este procedimento foi realizado protegendo as placas tratadas da ação direta da luz. As placas foram novamente incubadas por 3 horas. Passados três horas, os poços foram aspirados e foram adicionados 150 µL de solução “dessorb” (49% (v/v) de água destilada, 1% (v/v) de ácido acético glacial e 50% (v/v) de álcool etílico) e após 10 minutos de agitação em agitador de placas, a leitura das absorbâncias foi realizada utilizando um leitor de placas (Biotek Synergy HT) a 540 nm.

Quadro 4 - Linhagens de Células ATCC para ensaio de avaliação antitumoral.

Nome	ATCC®	Origem das Linhagens	Meio de Cultivo
MDA-MB- 468	HTB-132	Tecido epitelial da glândula Mamária derivado de área de metástase	D10
HeLa	CCL2	Tecido epitelial Humano extraído de Cérvix com papiloma vírus	D10
SK-MEL-28	HTB-72	Pele Melanoma Humano	D10

Fonte: banco de dados ATCC disponível online via: [https://www.atcc.org/en/Products/Cells and.../Cell_Lines.aspx](https://www.atcc.org/en/Products/Cells_and.../Cell_Lines.aspx)

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A *C. racemosa* Mart. apresenta-se como uma alternativa da biodiversidade a ser utilizada em cosméticos e medicamentos. Os resultados preliminares dos ensaios microbiológicos e de Citotoxicidade foram divulgados no 29th IFSCC Congress em Orlando – Flórida em Novembro de 2016, na modalidade apresentação em poster. Esta espécie caracteriza-se pela presença de um caule extenso que se enovela nos ramos e folhagens da planta hospedeira, quase sem ramos e por sua coloração amarelada, que lhe remete o aspecto ao nome popular “fio de ovos” (CORREA, 1984).

4.1. Obtenção do extrato:

Os “fios” longos secos foram pulverizados e apresentou coloração amarelada acastanhada e com odor característico similar à terra molhada. O Extrato fluído foi obtido por percolação onde 65,5 g do material vegetal pulverizado (Figura 4) foi embebido em álcool 70% e permaneceu em contato líquido extrator por 07 dias. O extrato bruto obtido apresentou coloração amarelada, com odor característico levemente adocicado (percepção organoléptica).

FIGURA 4 - Processamento e obtenção do extrato de *C. racemosa* Martius.



Fonte: fotos da autora. Material vegetal seco (A), Material seco em processo sendo pulverizado (B), macerado com líquido extrator etanol 70% (p/p) (C). Material em extração (D).

4.2. Análise exploratória para confirmar-Compostos fenólicos na amostra.

No final do processo de percolação, separou-se 1mL da amostra e foi adicionado ao extrato algumas gotas de cloreto férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) a 2% (p/v), para verificar a presença de compostos fenólicos (baseados nos dados da literatura, quadro 2) na amostra, foi obtida como resultado uma cor amarela bem clara, quase incolor, sem precipitado, indicando a finalização da extração (GROCHANKE, 2016).

4.3. Rendimento do extrato

O Extrato Bruto (EB) da *C. racemosa* foi obtido após a extração do solvente por rotaevaporação e liofilização, e o rendimento médio obtido foi cerca de 8%, conforme apresentado na tabela 3, resultando em um pó de textura fina, coloração amarelada, com aroma característico, insolúvel em água e, solúvel em etanol 70% (v/v), característica altamente higroscópica.

TABELA 3- Cálculo do rendimento EB *C. racemosa*

Peso Inicial	Peso do extrato Fluido	Peso EB	Rendimento médio
65,5g	650 mL	5,24g	8% (p/v)
Material vegetal seco pulverizado	Maceração e Percolação	Extrato Bruto Liofilizado	

A fração direcionada para a obtenção de alcalóides foi obtida conforme método descrito por WAGNER e BLADTD (1997) resultando em um produto final (FA), com coloração âmbar, castanho escuro, aspecto resinoso. Foi realizado um teste com o reagente Dragendorff, como indicador da presença de alcalóides na fração.,

4.4. Perfil do extrato bruto por CLAE-DAD

O Cromatograma (Figura 6) se mostrou consistente ao apresentar compostos fenólicos na amostra estudada, conforme literatura, com bases no tempo de retenção entre 20 e 40 minutos e de acordo com o perfil de absorção

de UV (254- 360nm) nos picos A, B, C e D indicam ser compatível com perfil de flavonoides. Comparou-se o perfil obtido com o padrão de quercetina, com perfil de absorção de UV em 370 nm.

Löffler e colaboradores (1997) descreveu a presença de compostos fenólicos em caules de 09 diferentes espécies do gênero *Cuscuta*, *C. reflexa* Roxb, *C. platyloba* Progel, *C. campestris* Yunck., *C. odorata*, R&P, *C. chinensis* L., *C. pedicellata* Illedeb) e selvagens (*C.europeae* L, *C. gronovii* Wild., *C. lupuliformis* Krock) e relatou que não houve diferenças quanto aos tipos de compostos encontrados, quando comparados entre espécies cultivadas e selvagens. A presença de quercetina também foi demonstrada em sementes de *C. campestris* Yunck. (LEE *et al.*, 2011), sementes e frutos de *C. chinensis* Lan. (YAHARA *et al.*,1994; JIAN-HUI *et al.*, 2003; YANGET, 2009.; LIJUAN *et al.* 2011), *C.pedicellata* Illedeb. (ZEKRY, *et al.*,2015), sementes de *C.reflexa* Roxb (PRASSAD *et al.*,2016) e na *C.racemosa* Martius (SOUSA *et al.*,2012; FERRAZ *et al.*, 2011b.).

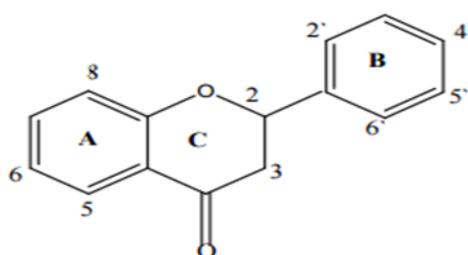
Os resultados descritos na literatura e encontrados neste ensaio, corroboram com dados apresentados por Löffler e colaboradores (1997), que sugeriram que a presença de ácido clorogênico, ácido 3,5-dicafeoil-quinico, derivados de ácido hidroxicinâmico, quercetina-3-O-galactosideo, quercetina-3-O-glucosídeo, podem ser usados como marcadores taxonômicos para identificação das plantas deste gênero, considerando ainda a presença de compostos alcalóides indólicos, derivados de ergolina, também descritos anteriormente em Convolvulaceae (CRONQUIST, 1981; FERRAZ, 2002) Embora, seja necessário destacar que esses últimos podem variar sazonalmente, sendo mais frequentes em períodos de chuvas e ou conforme a hospedeira a ser parasitada (PÉREZ-AMADOR, 1996).

Dentre os compostos fenólicos os flavonóis encontram-se amplamente distribuídos nas plantas, como pigmentos presentes em folhas e pétalas (HARBORNE,1973). Em sua estrutura básica apresenta-se como um composto tricíclico, com 15 átomos de carbono distribuídos em dois anéis aromáticos A (benzoil) e B (Cinamol), ligados a uma estrutura heterocíclica central (DI CARLO *et al.*, 1999). As estruturas químicas específicas dos compostos deste grupo ocorrem devido a diferentes níveis de oxidação do anel central (C) BRUNETON *et al.* 2001) e do padrão de substituição do anel C (PIETTÁ, 1999). Dentre as

substâncias mais comuns pertencentes a este grupo destacam-se, o canferol, a quercetina (Figuras 5 e 6) e a miricetina, compostos comumente associados à atividade antioxidante e protetora para as plantas contra agressões externas (DORNAS et al, 2007). A estrutura básica da quercetina, é apresentada por um núcleo composto por três anéis fenólicos A, B e C, cuja relação estrutura-atividade está associada a presença de um grupo OH- na posição C3 do anel heterocíclico e de um catecol no anel B, associado às possíveis ações anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana (DORNAS, et al.,2008; FEMENA, 1996). A presença do grupo hidroxila na posição 3, está relacionada ao perfil de absorção de UV-vis nos espectros entre 240 a 380nm. Dentre os compostos fenólicos, as flavonas e os flavonóides exibem duas bandas de maior absorção à radiação UV-vis, representadas pela estrutura dos anéis A e B. A posição da banda I, permite conhecer o tipo de flavonóide e seu grau de oxidação (Nos flavonoides a absorção na banca I (Anel B) ocorre na faixa entre 320- 385 nm e a absorção na banda II (Anel A) ocorre na faixa entre 250-285nm. Substância do grupo dos flavonóis, a exemplo da quercetina, apresentam espectro de absorção a banda I entre os comprimentos de onda 352-385 enas flavonas a absorção ocorre nas faixas entre 304-350nm (MABRY et al., 1970), conforme demonstrado na figura 5.

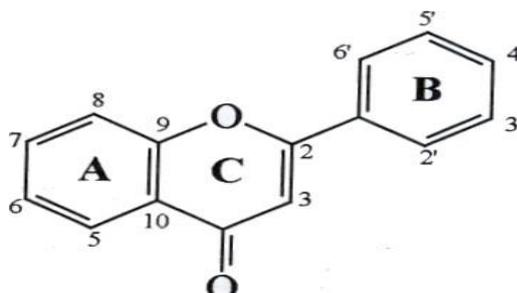
FIGURA 5- Representação esquemática da estrutura básica de flavonas e flavonóis e seus respectivos espectros de absorção UV-vis.

Banda II
250-285nm



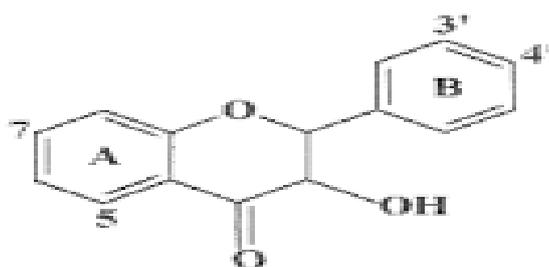
Estrutura das Flavonas

Banda I
320- 385 nm



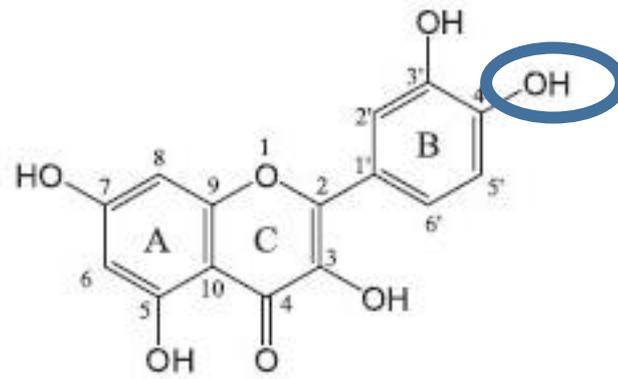
Estrutura dos Flavonóis

Banda I
304- 350 nm



Estrutura da Quercetina (Flavonól)

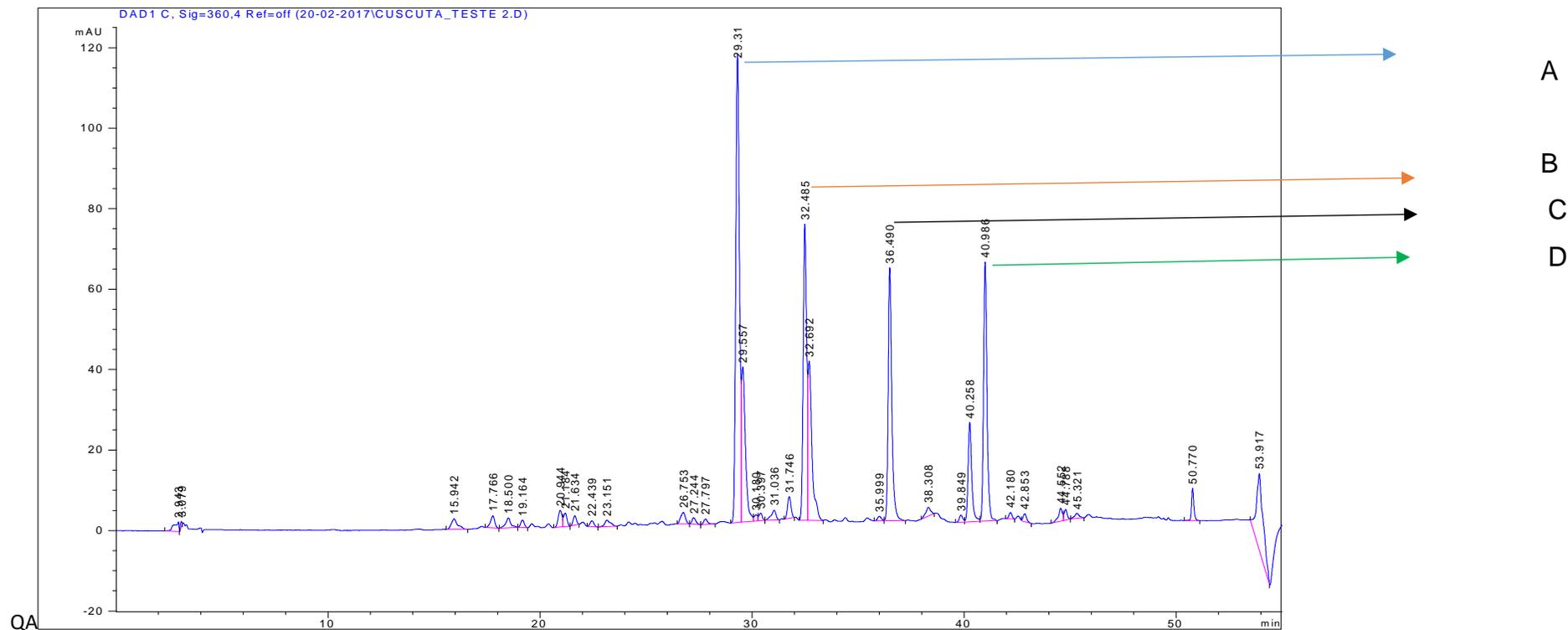
Banda I
352- 385 nm



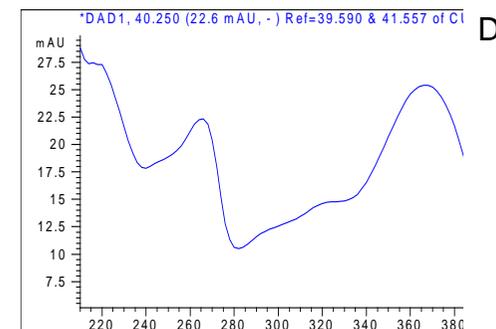
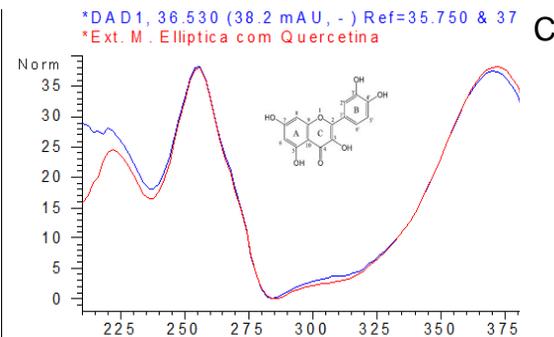
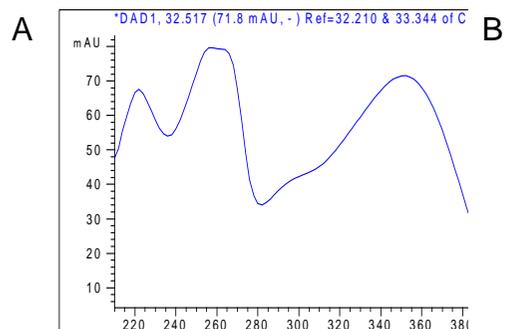
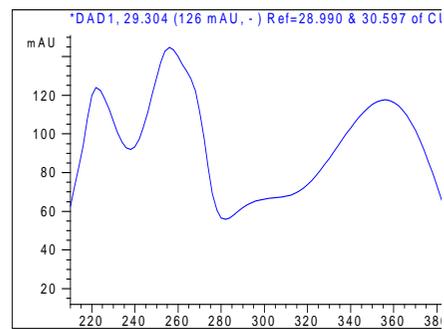
Banda I
370 nm

Fonte: Adaptado de Harborne, 1973; Dornas, 2008 e Bruneton, 2001; Piettà, 1999.

FIGURA 6- Cromatograma obtido por CLAE-DAD do EB de *C. racemosa* Martius



360nm - Teste 2 : Gradiente a partir de 10% MeOH a 70%- 100%



4.5. Citotoxicidade

Na avaliação da atividade citotóxica do EB de *Cuscuta racemosa* Mart. e sua fração EA sobre linhagens celulares BALB 3T3/A31 (ATCC® 163™), através do protocolo padronizado pela OECD129 (2010), foi realizada a partir da medida de absorbância de células que permaneceram viáveis, após contato por 24 horas com as amostras. Neste ensaio, obteve-se IC₅₀ para EB determinada em 25,44 ± 1,407 mg / mL e a IC₁₀ em 16,684 ± 1,744 mg/mL. Para a EA e EtOH 70% não foi encontrado o valor de IC₅₀ nas concentrações testadas (Figura 8). Observou-se através do gráfico comparativo entre as amostras ensaiadas (Figura 9), que a Fração EA não apresentou redução na viabilidade celular e que o solvente, não apresentou interferência neste ensaio.

A estimativa da DL₅₀ foi pré - calculada utilizando a equação que extrapola os valores de IC₅₀ para DL₅₀, utilizada para as misturas e substâncias com peso molecular desconhecido, de acordo com a OECD129, 2010:

$$\log DL_{50} (\text{mg /kg}) = 0,372 \log IC_{50} (\text{mg / mL}) + 2,024$$

O valor DL₅₀ é 352,25mg/Kg

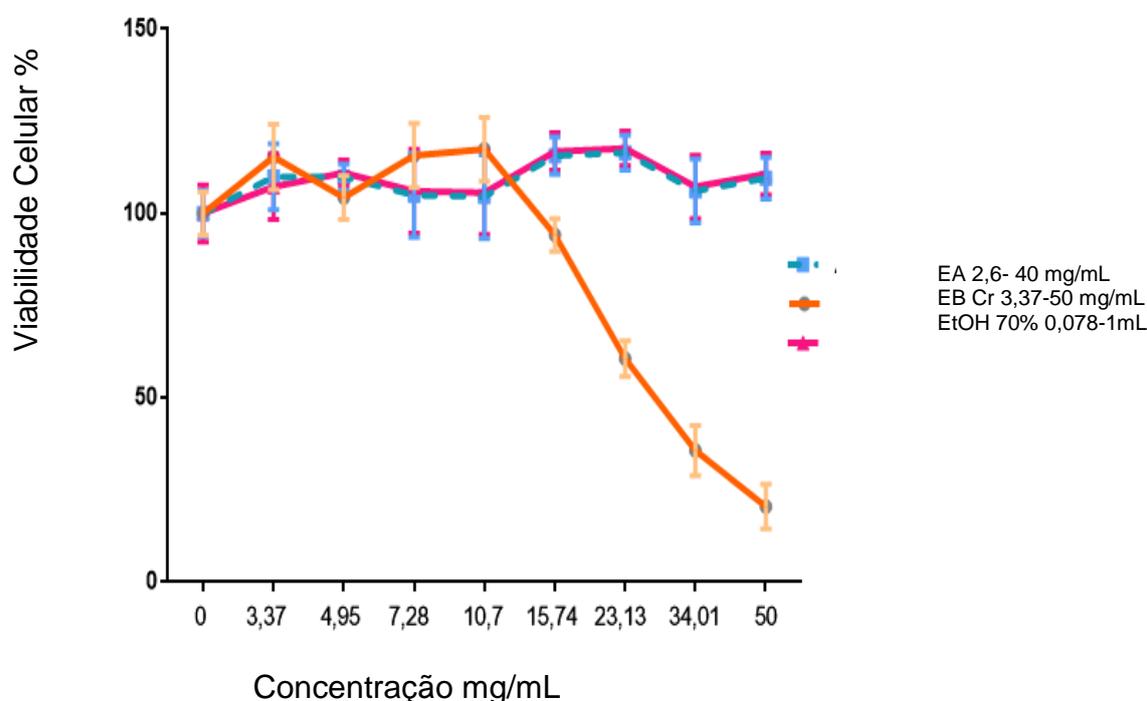
Anteriormente avaliação da citotoxicidade da *C. racemosa* e outras espécies foram realizadas no modelo experimental “in vivo” em ensaio de letalidade em “*Artemia franciscana*” (brine shrimp). Naquele modelo experimental foram obtidos os valores de DL₅₀ 0,231 mg/mL do extrato bruto e DL₅₀ 1mg/mL da fração direcionada para alcalóide (FERRAZ et al., 2011b); DL₅₀ 257,73µg/mL do Extrato metanólico e DL₅₀ 184,86µg/mL da Fração etil-acetato obtidos do caule da *C. reflexa* Roxb. (UDAVANT, et al., 2012).

O valor de DL₅₀, encontrado neste estudo, está em acordo com a Norma OECD 423 (2001) sobre o teste de toxicidade oral aguda, que estipula que esta seria uma substância Categoria 4 >300-2000mg/Kg. De acordo com a OECD 129 (2010), a União Européia, declara que cerca de 87% das substâncias químicas testadas para ter seu uso industrial regulamentado apresentam DL₅₀>

2000mg/Kg. Considerando o resultado de DL₅₀ obtido, o extrato bruto de *C. racemosa* está dentro da margem de segurança preconizada pelas normas internacionais.

Os testes de citotoxicidade “*in vitro*” em culturas de células são usados como métodos alternativos aos testes farmacológicos e cosméticos, e são importantes para avaliação preliminar de ação tóxica de um conjunto de princípios ativos de origem vegetal, além de reduzir o número de animais usados em ensaios “*in vivo*” (BOGO, 2012).

FIGURA 7- Gráficos comparativos dos resultados da avaliação da citotoxicidade entre EB e FA de *C. racemosa* Mart.



Fonte: Software Graph Pad Prism, v. 7.

4.5. Fototoxicidade

Os resultados foram obtidos a partir da análise do programa Phototox®. As amostras testadas em diferentes concentrações seriadas não demonstraram ação fototóxica para este experimento, conforme mostrado na Figura 9 e na Tabela 4. Os resultados obtidos para avaliação do fator de Irritação Fototóxico (PIF) e Efeito Fototóxico Médio (MPE) foram comparados com a norma de referência OECD 432 (2004).

TABELA 4 - Resultados de fototoxicidade

Amostra	MPE	PIF	Probabilidade toxicidade
EB	0,078	1,000	0,203
EA	- 0,152	1,000	0,000
ETOH 70%	-0,071	1,00	0,000

Fonte: programa Phototox®

A OECD determina em conformidade com estudos validados que quando uma substância testada apresenta $PIF < 2$ e/ou $MPE < 0,1$ a substância não é fototóxica; quando $PIF > 2$ e < 5 e/ou $MPE > 0,1$ e $< 0,15$ existe uma provável fototoxicidade e quando o $PIF > 5$ e/ou $MPE > 0,15$ a substância é fototóxica (OECD 432, 2004).

No ensaio de fototoxicidade, ambas as amostras testadas não apresentaram fototoxicidade. Os resultados obtidos foram PIF (1,00) < 2 e MEP (0,078) $< 0,1$ para EB, e PIF (1,00) < 2 e MEP (-0,071) $< 0,1$ para Extrato direcionado para a extração de alcalóides (Tabela 4).

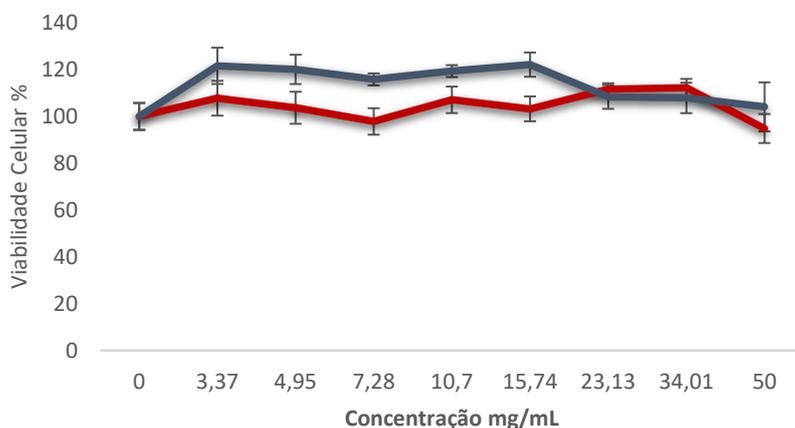
O resultado apresentado nas Figuras 9 e 10, demonstraram que não houve queda na viabilidade celular nas placas tratadas com ambas as amostras expostas a radiação UVA após o tratamento com EB e EA quando foram comparados com as placas com amostras que não foram expostas à radiação. Foi realizado ensaio com o solvente, e este não demonstrou ser fotosensível à exposição à radiação UVA, este resultado mostra que o solvente também não interfere no comportamento das amostras frente à radiação UVA. .

Os resultados obtidos de não fototoxicidade podem ser associados à presença de compostos fenólicos nas amostras, além da presença de quercetinas e derivados em várias das espécies do gênero *Cuscuta* (CAZARIN, CORRÊA & DUQUE, 2014; SHARMA et al., 2014) conhecidos por sua atividade antioxidante, que está em conformidade com a literatura, estes compostos podem estar envolvidos em atividades citoprotetoras, antioxidantes e reparadoras, bem como na ação reguladora de melanogênese (WANG, 2014).

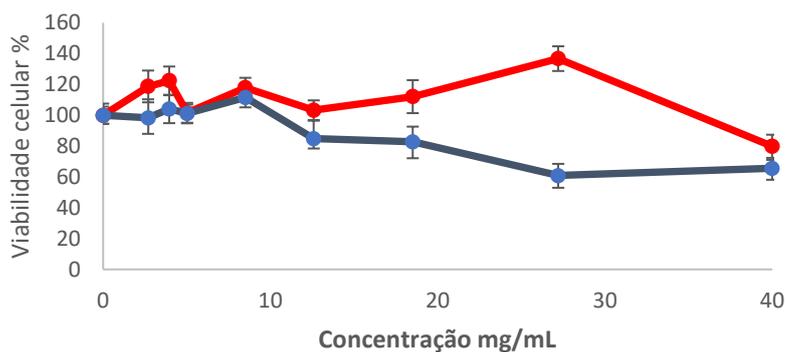
Estudos recentes mostram ação protetora antioxidante do extrato de semente da *Cuscuta* em cultura de linfócitos hepáticos e ação redutora de dano

ao DNA mitocondrial causado pelo envelhecimento em modelos de experimentação animal com ratos (SZETO et al., 2011).

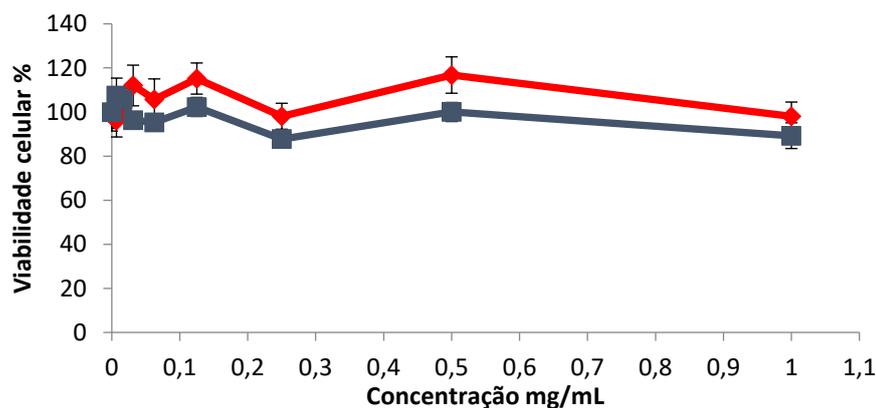
FIGURA 8– Gráfico comparativo da avaliação fototóxica das amostras expostas e não expostas à radiação UV.



A



B



C

Curva de viabilidade celular pela concentração mg/mL do extrato bruto de *C. racemosa*, Mart. (A), Fração alcalóidica (B) e Etanol 70%(p/p). Amostras foram expostas à UVA+ (■) e protegidas UVA- (■). C solvente

4.6. Atividade Antimicrobiana

No Brasil a espécie *C. racemosa* é popularmente usada por sua ação cicatrizante, para fechar feridas abertas, bem como por outras propriedades a ela atribuídas, tais como: atividades antimicrobiana e antiviral, ação adstringente, anti-inflamatória, diurética, aliviadora de distúrbios hepáticos e estomacais e por suas propriedades cicatrizantes (CORREA, 1984).

Considerando-se a crescente resistência de muitas bactérias e fungos frente à exposição de antibióticos, pesquisadores vem estudando as espécies vegetais a fim de investigar o potencial antimicrobiano dos produtos naturais (WALKER et al., 2009).

Às diferentes espécies de *Cuscuta* são atribuídas ações antibacterianas, a exemplo da *C.reflexa* que, inibiu cepas de microrganismos *E.coli* (ATCC-25922), *S.aureus* (ATCC-25923), *P.aeruginosa* (ATCC-27853), *P.vulgaris* (ATCC 6380), *S.paratyphi* (ATCC-9150), *S. sonnei* (ATCC-25931), *S.typhimurium* (ATCC-25241) e *K.pneumonia* (ATCC-27736), em ensaio de difusão em ágar, na concentração de 55mg/mL dos extratos metenólicos e clorofórmicos (MATEEN, SURESH & AHMED, 2011), ação possivelmente associada a presença de compostos fenólicos e do óleo essencial composto por hidrocarbonetos mono e sesquiterpenicos, tais como piperitona, cariofilena, cânfora, entre outros, identificados através da cromatografia gasosa (SHARMA et al., 2014).

Através do ensaio preliminar de difusão em ágar o extrato bruto (EB) e fração alcaloídica (FA) *C. racemosa* Martius mostraram zonas de inibição em meio de cultura sólido de 50 mg/ mL de EB e 25mg / ml para EA contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* sendo mais visível para *Candida albicans*, resultado atribuído a presença de compostos fenólicos identificados anteriormente e, pela possível ação de alcaloides, conforme figura abaixo. Os halos de inibição foram observados na presença do revelador Cloreto de Trifenil tetrazólico (TTC), usado como indicador de atividade enzimática de bactérias (PEDROSA, 2012). Pode-se observar na placa que as

áreas com crescimento de microrganismos, apresentou coloração vermelho intensa, enquanto que ao redor da área exposta às amostras formou-se um discreto halo de inibição (Figura12).

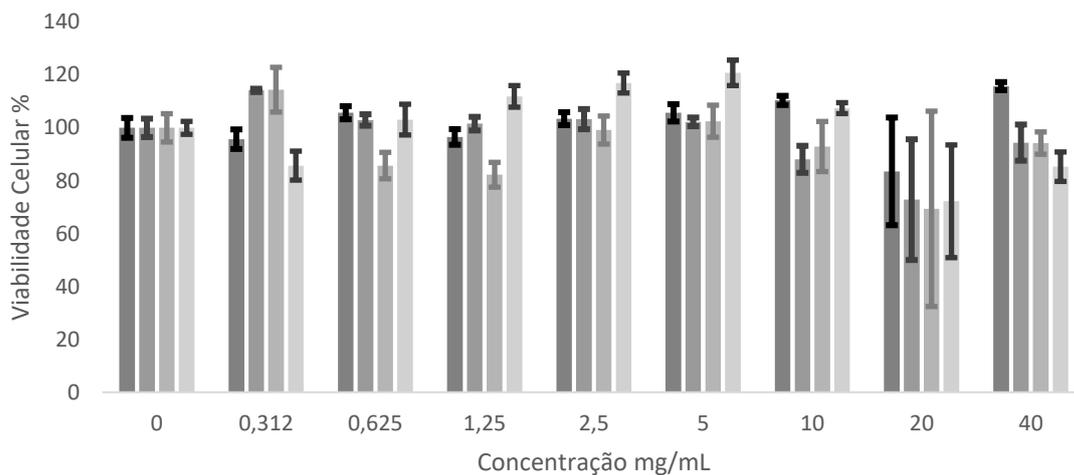
Substâncias como saponinas e terpenos foram relatadas anteriormente por sua ação antimicrobiana frente a bactérias *S.aureus* e *P.aeruginosas*, confirmando a ação inibitória discreta do extrato de *C. epithimum* em difusão em ágar frente à *B.megaterium*, *E.coli*, *S.typhi* e *P.aeruginosas* (BIWAS et al.,2012; AL-SNAFI, 2016.), tal ação foi atribuída à presença de flavonoides, glicosídeos, saponinas e esteróis identificados no extrato. Estudos citam que os terpenos apresentam pouca ou nenhuma ação contra *C. albicans* (BUSTAMANTE, 2010).

FIGURA10: **Ensaio preliminar pelo método Difusão em ágar**



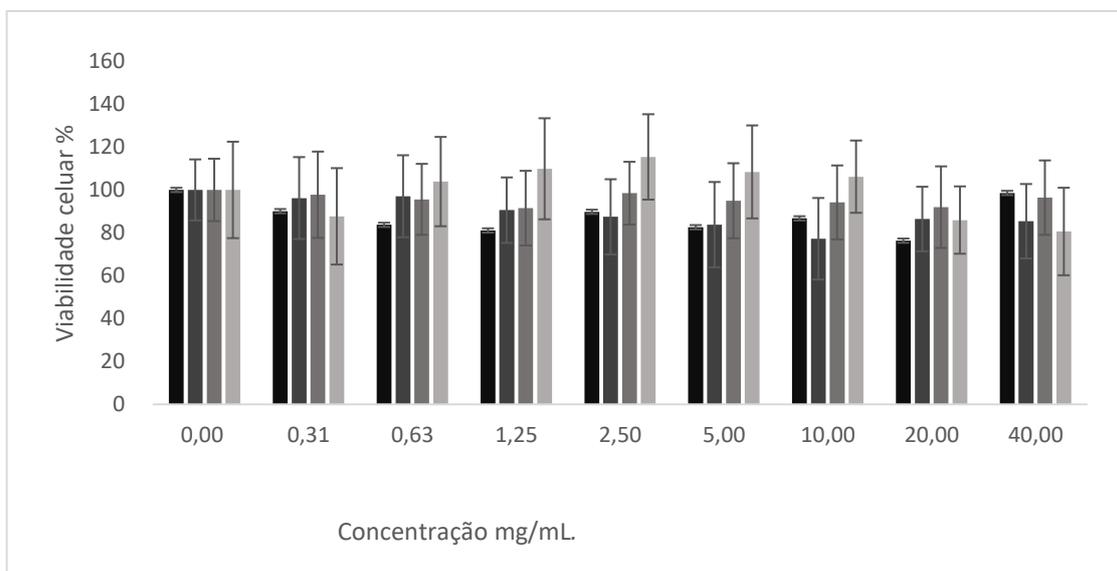
Fonte: fotos da autora, demonstrando o destaque da formação dos halos de inibição, na presença do revelador TTC 1%.

FIGURA11 - Ensaio de micro diluição seriada com EB *C. racemosa* Mart.



Legenda: Extrato Bruto (EB) 40mg a 0.31 mg/mL x *C.albicans*, *E.coli*, *S.aureus* e *P.aeruginosa*.

FIGURA14- Ensaio de micro diluição seriada com EA da *C. racemosa* Mart.



Legenda: Fração alcaloidica (FA) 40mg a 0.31 mg/mL x *C.albicans*, *E.coli*, *S.aureus* e *P.aeruginosa*.

Neste estudo o extrato de *C. racemosa* Martius e a fração direcionada para obtenção de alcalóides não demonstrou atividade antimicrobiana

significativa no ensaio de micro diluição seriada 2,69-40mg/mL frente as cepas estudadas *C.albicans*, *E. coli*, *P. aeruginosas* e *S. aureus*. (Figuras 13 e 14).

Não houve diferença estatística significativa entre o extrato e a fração comparando-se as diferentes concentrações com o grupo controle apresentando valor de $p > 0,05$ no teste ANOVA ONE-WAY.

O valor da Concentração Inibitória mínima (MIC) foi calculado por meio do ensaio de microdiluição seriada apresentando-se nos valores EB e EA frente as Cepas ATCC desafiadas conforme resultados descritos na Tabela 5 e observados nas Figuras 13 e 14.

TABELA 5- Valor da Concentração Inibitória Mínima (MIC) *C. racemosa*

Amostra	CA	EC	PA	SA
EB	20mg/mL	20mg/mL	20mg/mL	20mg/mL
EA	----	-----	-----	-----

São consideradas substâncias com forte ação antimicrobiana aquelas que apresentam $MIC \leq 500 \mu\text{g/mL}$, sendo $\geq 600 \leq 1000 \mu\text{g/mL}$ de ação moderada e $\geq 1000 \mu\text{g/mL}$ de ação fraca (DUARTE, 2005; ALIGIANT et. Al., 2001), portanto as amostras ensaiadas apresentaram fraca ação antimicrobiana.

O resultado da ação antimicrobiana do extrato etanólico de *C. racemosa* Mart. apresentados por Ferraz e colaboradores (2011b), pode estar associada à presença de flavonoides disponíveis em maiores concentrações na hospedeira *Hibiscus rosa sinensis* L no período da coleta. Bais e colaboradores (2014) apontam que os diferentes resultados obtidos sobre a atividade antibacteriana dos extratos obtidos da *C. reflexa* Roxb. poderiam estar associados às diferentes hospedeiras, uma vez que a parasita absorve da seiva da planta hospedeira fitocompostos relacionados à sua atividade biológica. Estudos demonstram que a *Lagerstroemia indica* apresenta compostos como alcalóides bifenilquinolizidinas, associadas à ação anti-inflamatórias (KIN et al., 2008; YANG et al, 2010). A presença de flavonas no extrato metanólico das folhas *Lagerstroemia indica*, demonstrou ação antimicrobiana frente à algumas cepas bacterianas patoénicas e *C. albicans* (DIAB, ATALLA& ELBANNA, 2012). Esta diferença em relação ao potencial inibidor de crescimento microbiológico talvez possa ser explicada pelos diferentes compostos químicos presentes nos extratos

apresentados em cada estudo, uma vez que a *C. racemosa* poderá expressar atividades distintas, de acordo com sua característica adaptógena considerando-se o tempo da coleta, local de coleta e a planta hospedeira.

De acordo com os resultados obtidos neste estudo as amostras de *C. racemosa* EB e FA por ter apresentado baixa ação antimicrobiana, podem ser aplicados com segurança à cosméticos faciais naturais para assepsia, e controle pigmentar pós-inflamatório, devido ao potencial antioxidante e anti-inflamatória (WANG, 2014), sem promover alteração da microbiota natural da pele, conforme valores demonstrados na Tabela 5.

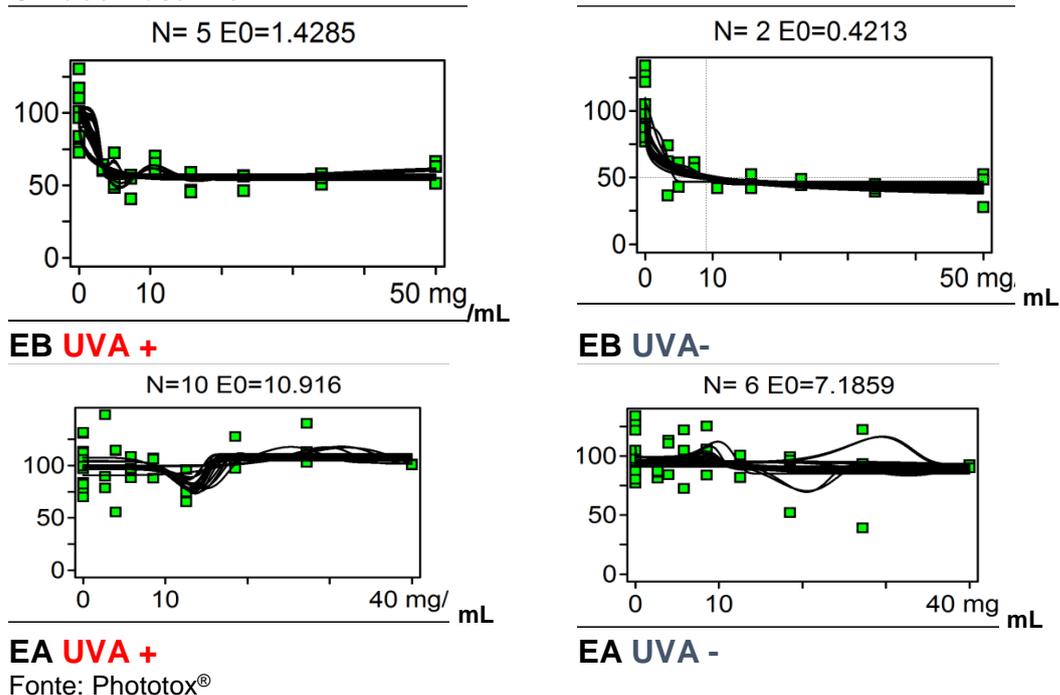
4.7 Atividade Fotoprotetora

A avaliação fotoprotetora do Extrato de *C. racemosa* foi proposta como uma alternativa para avaliar o resultado gráfico obtido no ensaio de fototoxicidade que mostrou possível atividade de aumento na viabilidade celular em grupo tratado com o EA após exposição à câmara de UV. Este ensaio foi realizado adaptando-se o teste de fototoxicidade validado pela OECD 432. A presença de substâncias naturais, obtidas de plantas podem apresentar ações benéficas, ao organismo humano por sua sua ação antioxidante, reduzindo a presença de espécies reativas nas células, retardando o processo de senescência, protegendo a membrana (MEHABANI, et al, 2015) e retardando o aparecimento de muitas doenças degenerativas (WALKER, et al.,2013), Consideramos também que uma possível ação fotoprotetora poderia ser relacionada à outros compostos descritos na literatura, além do canferol e da quercetina, presentes em alguma espécie de *Cuscuta*; tais como taninos, saponinas e polissacarídeos (CARLINE & FRONCHTENGARTEN, 1998), com ação cicatrizante, anti-edema (Liao, 2014; Niazi, et al., 2017) e antienvhecimento (SUN, et al., 2014.; CAI et al., 2005).

Em estudo anterior foi reportada para *C. reflexa* a IC₅₀ 359,48µg/mL em ensaio antioxidante DPPH (VIJIKUMAR,2001; SHARMA et al, 2011), demonstrando um valor moderado antioxidante deste extrato quando comparado a outras substâncias.

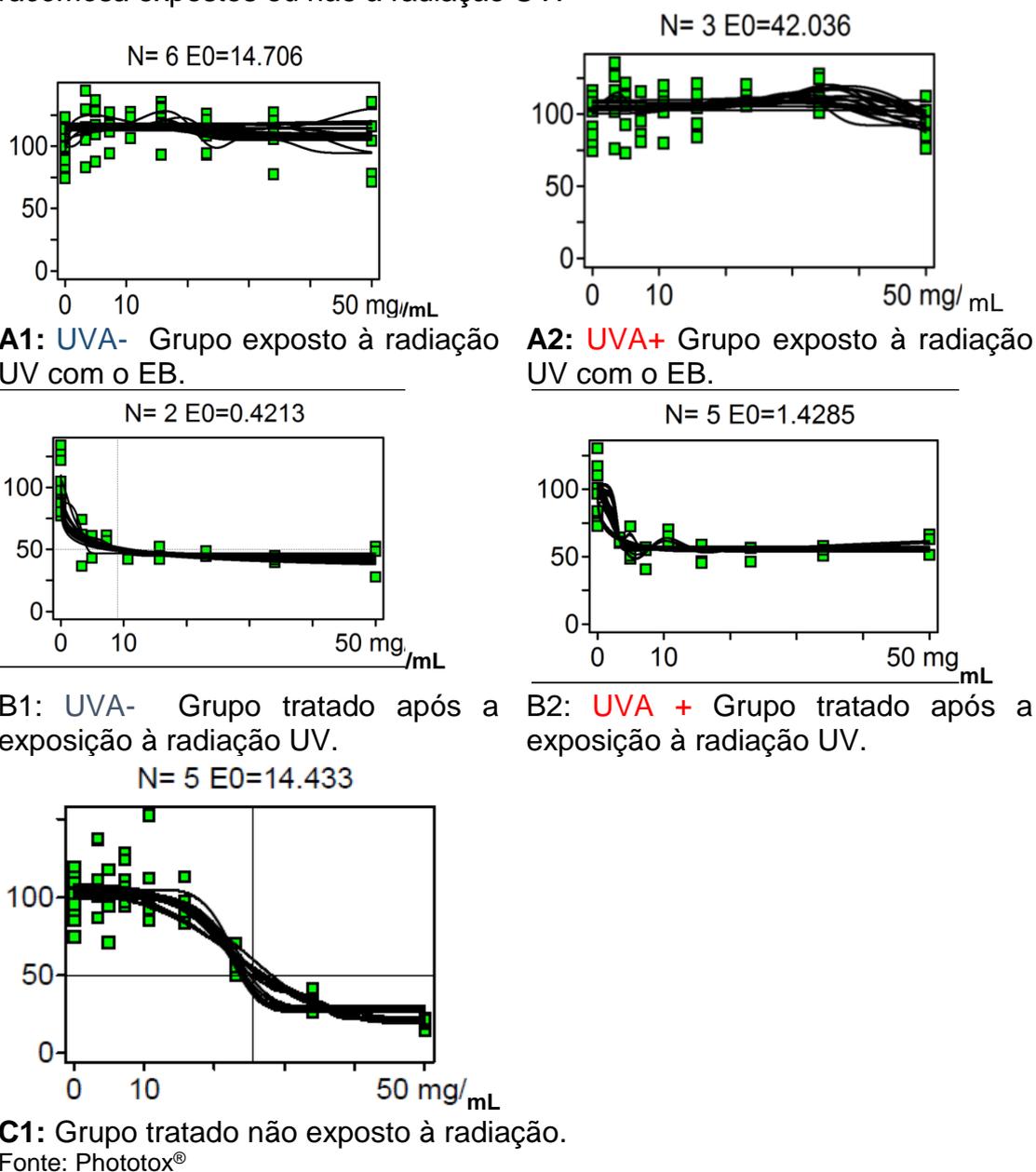
Neste ensaio a *C.racemosa* Mart, apresentou valor de IC_{50} $9,045 \pm 1,487$ mg/mL no grupo não exposto à radiação. Analisando-se a concentração da viabilidade celular do EB nas células tratadas com as amostras expostas e não expostas à radiação ultravioleta, não se notou diferença significativa entre os grupos, conforme demonstrado na figura 13.

FIGURA 12 – Gráficos do ensaio para avaliação da atividade Fotoprotetora da *C. racemosa* Mart.



Porém, quando comparamos a viabilidade celular entre os grupos A (tratados com EB e expostos à radiação), grupo B (tratado com EB após exposição à radiação) e grupo C (tratado com EB e não expostos à radiação); conforme figura 16, notamos diferenças no potencial de ação do extrato. Considerando que os grupos B e C ficaram 24 horas em contato com as amostras, notamos que embora não se tenha demonstrado diferença entre os grupos e seus respectivos controles UVA -, e o EB não tenha apresentado ação fototóxica, observou-se uma diferença entre os grupos B e C nas concentrações 34,01-50mg/mL, uma vez que o grupo exposto à radiação não apresentou diminuição na viabilidade celular, mantendo-se estável. Esta ação fotoprotetora, merece ser investigada em ensaios futuros e pode estar relacionada à presença do compostos com ação anti-inflamatória e antioxidante, que poderiam citados anteriormente (Lee et al, 2011).

FIGURA 13- Gráficos comparativos entre grupos tratados com EB de *C. racemosa* expostos ou não à radiação UV.



4.9. Atividade antitumoral

Observou-se ação citotóxica do EB, da *Cuscuta racemosa* Mart. em todas as concentrações testadas 3,37-50mg/mL, os valores calculados de IC_{50} estão demonstrados na Tabela 6. A ação das amostras foi avaliada a partir da redução da viabilidade celular, porém não houve correlação entre os efeitos citotóxicos e o aumento das concentrações conforme demonstrado na figura17. O EA,

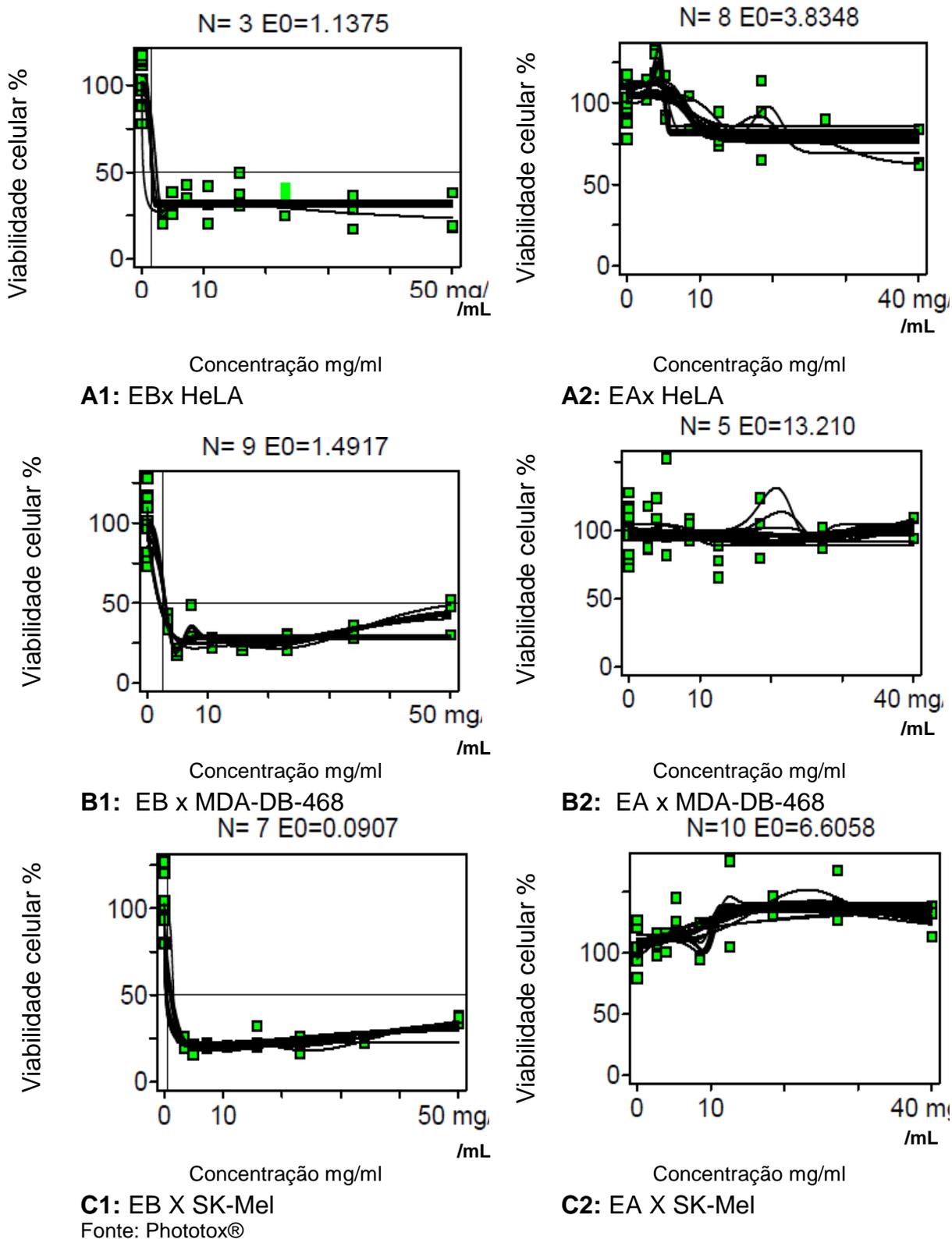
testado nas concentrações 2,69–40mg/mL não apresentou neste ensaio ação citotóxica frente as linhagens celulares tumorais HeLa e MDA-DB-468 e, parece ter favorecido o aumento da viabilidade celular frente a linhagem Sk- Mel.

TABELA 6 - Valores IC₁₀ e IC₅₀ do Extrato de *C racemosa* Mart. em linhagens tumorais

	EB	EA
HeLa IC ₁₀	0,952+/- 0,283	0,160+/- 0,311
Hela IC ₅₀	1,645 +/-0,405	-----
MDA-DB-468 IC ₁₀	0,705+/- 0,545	0,114 +/- 0,195
MDA-DB-468 IC ₅₀	2,604 +/- 0,496	-----
SK-Mel. IC ₁₀	0,0062 +/- 0,212	-----
SK-Mel. C ₅₀	0,505 +/- 0,420	-----

Fonte: Phototox®

FIGURA14- Gráficos da avaliação de viabilidade celular de linhagens tumorais x *C. racemosa* Martius.



A ação nas células tumorais das plantas do gênero *Cuscuta* vêm sendo avaliada em diferentes modelos experimentais, com distintas linhagens celulares, Nisa e colegas (1986), avaliaram a atividade inibitória e antiproliferativa da *C. chinensis* Lam. em modelo animal frente à papiloma de

pele, e Riaz e colaboradores (2017) reportaram ação antiproliferativa moderada das frações: escoparone, ácido p-coumarina, stigmasta-3,5 diene obtidas da *C. reflexa* Roxb. A presença de compostos como quercetina, canferol e hiperosídeos em sementes de *C. campestris* foi avaliada e quantificada por Lee e colaboradores em 2011, e ficou demonstrado a obtenção destes compostos está relacionada ao processamento da semente. Quercetina e canferol foram obtidos em maior quantidade e apresentaram melhor resposta biológica na redução de proliferação frente as linhagens tumorais MCF-7 e MDA-DB, nas sementes que passaram por processo de aquecimento, em comparação ao extrato das sementes não processadas. Os hiperosídeos não foram degradados, a ação antiproliferativa ocorreu na linhagem MCF-7, quando exposta à 40 mg do extrato etanólico (BHAGAT et al., 2013).

A indução de apoptose em células tumorais, associada à ação antiinflamatória através do aumento de fator TNF- α e redução de COX2 foi avaliada em *C. reflexa* Roxb. (SURESH, et al., 2011). Estudos correlacionaram o mecanismo de apoptose e inibição na proliferação celular em linhagens tumorais com a presença de flavonóides como quercetina (RUSSO et al., 2010), embora alguns estudos tenham mostrado efeito de estímulo à proliferação celular em linhagens tumorais, o extrato de *C. chinensis* Lam em células com atividade estrogênica, como HeLa, MDA-DB e MCF-7, associada à ação agonista no receptor ER- β , ação esta que parece estar relacionada aos compostos isolados presente em alguns extratos (UMERHARA et al., 2004). A ação proliferativa estudada em osteoblastos pode estar relacionada à presença do hiperosídeo (JIAN-HUI et al, 2003; YANGET, 2009.; LIJUAN et al, 2011).

Os efeitos estrogênicos também foram verificados em células HeLa, ação que os autores associam à possível presença de compostos esteróis presentes no extrato etanólico, que possivelmente agiriam estimulando os receptores estrogênico ER α e ER β (YANG et al., 2011). Em outro estudo, com estas células para avaliação de citotoxicidade em ensaio de MTT para as espécies *C. chinensis* e *C. epithyum*, apresentando redução significativa da viabilidade das células HeLa, HT-29 e MDA-MB-468 (JAFARIAN, GHANNADI, e MOHEBI, 2014), esta diferença parece estar associada à diferentes processos extrativos, a parte da planta usada e a obtenção de compostos pró-estrogenos ou anti-inflamatórios.

Embora algumas espécies do gênero *Cuscuta* tenham sido descritas na literatura como promissoras para uma possível atividade antitumoral, pela presença de alcalóides, neste estudo o EA, não apresentou resultados, ação citotóxica ou redução de viabilidade celular nas linhagens estudadas. O mecanismo de proteção celular, e atividade antiproliferativa das espécies pertencentes a este gênero estudados em linhagens tumorais parece estar associada à ação anti-inflamatória, antioxidante e imunoestimulantes de compostos como quercetina e canferol (Al-Snafi.2016; Jafarian, Ghannadi e Mohebi, 2014; Zeraati 1 et al, 2010 Ahmed et al, 2014; Prasad et al, 2016), que em hipótese poderiam estar envolvidos na ação antiproliferativa do EB da *C. racemosa* Martius, tornando-a como uma substância de interesse para estudos em células tumorais.

Em estudos anteriores foram identificadas atividades antioxidante e antimicrobiana do extrato bruto provavelmente associadas à presença de compostos fenólicos, com a quercetina (FERRAZ, et al., 2011; MAVLONOV et al, 2008).

Os resultados deste estudo indicam que, embora os extratos não apresentem elevada atividade antimicrobiológica, por sua baixa toxicidade em concentrações menores, há um uso potencial para produtos cosméticos. No contexto do ensaio de citotoxicidade, fototoxicidade e ação fotoprotetora os resultados apontam uma margem de segurança para uma potencial utilização dos extratos como substância anti - envelhecimento, reguladoras de oleosidade e cicatrizantes em concentrações reduzidas, poderiam ser incorporadas a formulações de nanoemulsões ou lipossomas, com apelo sustentável e natural. Os compostos fenólicos presentes na planta e a possível presença de alcaloides, podem apresentar-se como uma alternativa aos tratamentos induzindo apoptose em células tumorais, preservando as células saudáveis de danos oxidativos e o organismo de contaminações oportunistas , esta ação que pode estar relacionada diretamente à capacidade adaptativa da parasita, que poderia estimular sua hospedeira a expressar em maior ou menor quantidade substâncias metabólicas de interesse para sua sobrevivência, conforme à exposição a fatores externos, hipótese essa a ser investigada, em ensaios futuros.

5. CONSTATAÇÕES

1. A triagem fitoquímica exploratória da *C. racemosa* Mart. parasitando *Lagerstroemia indica* L., indicou presença de compostos fenólicos, mais especificamente a quercetina.
2. No ensaio de avaliação de citotoxicidade validado pela OECD 129 (2010) do extrato bruto liofilizado da *C. racemosa* Mart foi estipulado o valor aproximado da DL₅₀ 352,25mg/Kg, e a sua fração alcaloídica não apresentou toxicidade nas concentrações ensaiadas de 2,6-40mg/mL.
3. No ensaio de avaliação de fototoxicidade validado pela OECD 432 (2004) do extrato bruto liofilizado da *C. racemosa* Mart e a sua fração alcaloídica se mostraram não fototóxicos nas concentrações de 3,37-50 mg/mL e 2,6-40 mg/mL respectivamente. Os valores do fator de Irritação Fototóxico (PIF) em 1,00 para ambas as amostras e Efeito Fototóxico Médio (MPE) de 0,078 para o extrato bruto liofilizado e -0,152 para a fração alcaloídica.
4. Na avaliação do potencial antimicrobiano do extrato bruto liofilizado da *C. racemosa* Mart. e fração alcaloídica não apresentaram halos de inibição no ensaio de difusão em ágar frente as cepas microbianas de *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosas* e *Staphylococcus aureus* nas concentrações de 50 e 25 mg/mL. No ensaio de microdiluição seriada não foi possível determinar a concentração inibitória mínima do extrato e fração de *C. racemosa* nas concentrações ensaiadas.
5. No ensaio “*in vitro*” de fotoproteção, adaptado do ensaio de fototoxicidade do extrato bruto liofilizado da *Cuscuta racemosa* Mart. mostrou ação regeneradora em cerca de 50% nas concentrações 34,01-50mg/mL, nas células expostas à radiação UVA+
6. No ensaio para avaliação do potencial antitumoral o extrato bruto liofilizado da *Cuscuta racemosa* Mart. não apresentou atividade citotóxica significativa nas concentrações testadas 3,37-50mg/mL, nas linhagens tumorais HeLa, MDA-DB e Sk-Mel. O valor de IC₅₀ calculado foi de 1,645 ± 0,405, 2,604 ± 0,496, 0,505 ± 0,420 mg/mL, respectivamente. O fração alcaloídica mostrou atividade citotóxica nas linhagens HeLa, MDA-DB, e favoreceu o crescimento das células Sk-Mel.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos o extrato de *Cuscuta racemosa* Martius e sua fração alcaloídica não apresentaram ações citotóxica e fototóxica nas concentrações testadas 3,37-50mg/mL e 2,6-40mg/mL, respectivamente, demonstrando ser um ingrediente potencialmente seguro para aplicação tópica em cosméticos com ações cicatrizante, anti-inflamatória e antioxidante. Quanto aos resultados obtidos nos ensaios de eficácia nenhuma das amostras apresentou atividades antimicrobiana e antitumoral nas concentrações testadas, porém o extrato apresentou potencial atividade fotoprotetora frente à exposição á radiação UVA,. Conclui-se que o extrato e a fração apresentam potencial para uso em cosméticos, e para confirmar os resultados obtidos nestes ensaios, novos estudos podem ser realizados, pois uma vez que se possa confirmar ação antioxidante e fotoprotetora do extrato, este pode ser utilizado uma formulação cosmética.

7.REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

AHMED, H. M., YEH, J. Y., TANG, Y. C., CHENG, W. T. K., & OU, B. R. Molecular screening of Chinese medicinal plants for progestogenic and anti-progestogenic activity. *J. Biosci.*, 39(3), 453–461, 2014.

<https://doi.org/10.1007/s12038-014-9434-z>

ANDRADE, R. A. S., ARAUJO, L. S., NEVES, F. S. Ocorrência de *C. racemosa* (Convolvulaceae) no Parque Estadual do Rio Preto, Minas Gerais, 2009. *Rev Unimontes Científica*, Montes Claros, v.9, n.1 – jan./jun. 2007.p 131-5. Disponível via internet em <<http://www.ruc.unimontes.br/index.php/unicientifica/article/viewFile/303/281>>. Acesso em: 28/04/2015.

ANVISA, Programa nacional de plantas medicinais e fitoterápicos, Ministério da Saúde. Brasília-DF, 2009.

ANVISA. Guia para avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos. 2ed. Brasília, DF, 2012. 74p.

ANVISA, RDC 26, de 13 de maio de 2014. Esta resolução dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos..Brasília, DF, 2014. 34p.

ALONSO, J. Fitomedicina: curso para profissionais da área da saúde. Pharmabooks, São Paulo, 2008 195p.

ASHIG, J., MARQUEZ, E. Dodder (*C. spp.*) Biology and Management Guide A-615. NM State University Cooperative Extension Service. College of agricultural, Consumer and Environmental Science, p1-4, 2010.

AUSTIN, D. F.. Parallel and convergent evolution in the Convolvulaceae. Pp. 201–234, 1982.

BARBOSA, L. M. M. A.; DANTAS, I., e S. L. C.; FELISMINO, D. C.; COSTA. “Levantamento taxonômico da EAmília Convolvulaceae no sítio Imbaúba, Lagoa Seca, Paraíba”. *BioEAR - Revista de Biologia e EArmacia*: 111–24 ,2012.

BHAGAT, M. H ARORA, J. S., SAXENA, A. K. 2013. “In vitro and in vivo antiproliferative potential of *C. reflexa* Roxb.” *Journal of Pharmacy Research* 6(7): 90–695, 2013.

BERNARDI, A., JACQUES-SILVA, M.C., LENZ, G. Abordagem molecular no desenvolvimento de fármacos anti-tumorais. *Rev. InEArma*, Vol.15, nº 9-10, (Set/Out), pp.61-63, 2003

BISWAS, S.K., CHOWDHURY, J.D., KARMAKAR, U. K., RATHAN, S.Z., DAS, A.C., HANNAN, M.A., MONSUR-DINAR, M.A., HASSAN, M. J., HOSSAIN, M.I., EARHAD, M.R. Phytochemical investigation na chromatography evaluation with antimicrobial and cytotoxic potentials of *C. epethymum*. *Int J.Pharmacology*, p. 1-9, 2012.

BOGO, D. Avaliação da atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* de compostos de líquens. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul para obtenção de título de Doutor. Campo Grande, 2012.

CARLINI, E. A.; FROCHTENGARTEN, M. L. Toxicologia clínica (EAsE I) da Espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*). In: (CEME) CdM, editor. Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras (*Maytenus ilicifolia* “Espinheira-santa” e outras). Brasília. DF: CEME/MS, p. 67-73, 1988.

CARNEIRO, F. M., SILVA, M. J. P., BORGES, L.L., LORENA, C.A., COSTA, J, D, P.Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. *Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais – UEG/Câmpus de Iporá*, v.3, n. 2, p.44-75 – jul/dez 2014. .

CARVALHO, J. E. “Atividade antiulcerogênica e anticâncer de produtos naturais e de síntese”. *Revista Multiciência2*, 2006. p. 1–18. http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_03_7.pdf.

CAZARIN, K. C., CERONI, C L CORRÊA, F. A. D. Z.. . “Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual”. *Revista Brasileira de Ciências EArmacêuticas* 40(3): 289–99, 2004.

CORREA, P. Dicionário das plantas úteis do Brasil, vol. III. Ministério da Agricultura. Brasil, 1984.

COSTEA, M., GARCÍA, M. A., STEFANOVIC, S. . A Phylogenetically Based Infrageneric Classification of the Parasitic Plant Genus *Cuscuta* (Dodders, Convolvulaceae). *Systematic Botany*, 40(1), 269–285, 2015. <http://doi.org/10.1600/036364415X686567>

CRAGG, G. M. GROTHAUS, P.G., NEWMAN, D. J. Impact of Natural Products on developing new anti-cancer agents. *Natural Products Branch, Developmental Therapeutics Program, Division of Cancer Treatment and Diagnosis, NCI- January 16, 2009* <http://doi.org/10.1021/cr900019j>

DONNAPEE, S., LI, J., YANG, X., GE, A. H., DONKOR, P. O., GAO, X. M., & CHANG, Y. X. *Cuscuta chinensis* Lam.: A systematic review on ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important

traditional herbal medicine. *J. Ethnopharmacol.*, 157, 292–308, 2014.
<http://doi.org/10.1016/j.jep.2014.09.032>

EMBRAPA. 2011. “Biologia e Ecologia de Plantas Daninhas”. : 33.
http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/Plantas_daninhas_defini_caoID-OKBSzkoJUb.pdf. Acesso em 31/10/2016.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, Memento Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira - 5ª edição, 2016.

FARMACOPEIA BRASILEIRA, vol 1 5ª.ed, 2010

FERRAZ, H.O., SILVA, M. G., CARVALHO, R., SUFFREDINI, I.B., KATO, E. T.M., ARAKAKI, F., BACCHI, E.M. Phytochemical study and evaluation of the antimicrobial activity and cytotoxicity of *C. racemosa*. *Revista Brasileira de Earmacognosia*, Vol. 21, No.1 (Jan/Feb), pp: 41-46, 2011.

FERRAZ, H O., SILVA, M.G. ,KATO, E. T. M., BARROS, S. B.M., BACCHI, E. M. “Antiulcer and antioxidant activities and acute toxicity of extracts of *C. Racemosa* Mart. (Convolvulaceae)”. *Latin American Journal of Pharmacy* 30(6): 1090–97, 2011.

FERREIRA, P. P. A., DETTKE, G. A.; WAECHTER, J. L., MIOTTO, T. S.S . 2014. “*C. taimensis* (Convolvulaceae, Cuscutae), a new species from South America”. *Brittonia* 66(3): 269–73, 2014.

FELTROW, C. W., AVILA, J. R. Manual de medicina alternativa para profissional. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1999 743p.

FLECKNELL, P. Replacement, Reduction and Refinement. Presentation at a symposium "Use of animals in research: a science-society controversy?" held by the Doerenkamp-Zbinden-Foundation on March 12 in D-Mainz.

FLOGIO, M.A., QUEIROGA, C. L., SOUSA, I.M.O., RODRIGUES, R.A.F. Plantas Mediciniais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar, *Construindo a História dos Produtos Naturais*, No 7, 2006.

FRESHNEY, R. I. Cytotoxicity. In: Culture of animal cells: a manual of basic technique. New Jersey: Wiley-Liss, 2010. ed. 6ª, p. 359-374.

FERREIRA, P. P. A., DETTKE, G. A., WAECHTER, J. L., & MIOTTO, S. T. S. *Cuscuta taimensis* (Convolvulaceae, Cuscutae), a new species from South America. *Brittonia*, 66(3), 269–273, 2014.
<https://doi.org/10.1007/s12228-014-9329-1>

FORZZA, R. C. *Catálogo de plantas e fungos do Brasil* (Vol. 2), 2010.

GARCIA R., ERAZO M.S., PENA R.C. Flavonoids and alkaloids from *Cuscuta* (Cuscutaceae). *Biochem syst ecol* 23: 571-572, 1995.

ICCVAM. Peer review panel report: The use of in vitro basal cytotoxicity test methods for estimating starting doses for acute oral systemic toxicity testing. Research Triangle Park: National Toxicology Program, n. 07-4519, nov. 2006.

ISLAM, R., RAHMAN, M. S., & RAHMAN, S. M. GC-MS analysis and antibacterial activity of *Cuscuta reflexa* against bacterial pathogens. *Asian Pacific J. Trop. Dis.*, 5(5), 399–403, 2015a.
[http://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60804-5](http://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60804-5)

ISLAM, R., RAHMAN, M. S., HOSSAIN, R., NAHAR, N., HOSSIN, B., AHAD, A., & RAHMAN, S. M. Antibacterial activity of combined medicinal plants extract against multiple drug resistant strains. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5(S1), S151–S154, 2015.
[http://doi.org/10.1016/S2222-1808\(15\)60878-7](http://doi.org/10.1016/S2222-1808(15)60878-7)

GUNJUNE, K.; WESTWOOD, J. H. Macromolecule exchange in C.–host plant interactions

HARRIS, M. I. *Pele: do envelhecimento à Maturidade*. Senac, São Paulo, 2016. 302p.

KAISER B, VOGG G, FÜRST UB, ALBERT M. Parasitic plants of the genus *C.* and their interaction with susceptible and resistant host plants. *Frontiers in Plant Science*. 2015;6:45. doi:10.3389/fpls.2015.00045.

KEJLOVÁ, K., JÍROVÁ, D., BENDO VÁ, H., GAJDOŠ, P., KOLÁŘOVÁ, H.. “Phototoxicity of essential oils intended for cosmetic use”. *Toxicology in Vitro* 24(8): 2084–89, 2010.

KIM, G., WESTWOOD, J. H.. “Macromolecule exchange in C.-host plant interactions”. *Current Opinion in Plant Biology* 26(Table 1): 20–25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2015.05.012>, 2015.

LI, J., HETTENHAUSEN, C. SUN, G. ZHUANG, H., LI, J. H., WU, J. Li, J.,. “The parasitic plant *C. australis* is highly insensitive to abscisic acid-induced suppression of hypocotyl elongation and seed germination”. *PLoS ONE* 10(8): 1–12, 2015.

LI, J., HETTENHAUSEN, C., SUN, G., ZHUANG, H., LI, J., & WU, J. The Parasitic Plant *Cuscuta australis* Is Highly Insensitive to Abscisic ..., 1–8, 2017.

LÖFFLER, C., CZYGAN, F. C., & PROKSCH, P. Phenolic constituents as taxonomic markers in the genus *Cuscuta* (Cuscutaceae). *Biochemical*

Systematics and Ecology, 25(4), 297–303, 1997.
[https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(97\)00015-X](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(97)00015-X)

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. The Systematic identification of flavonoids. Ed. Springer. Berlin, 1970, p.41-169.

MATEEN, A, P. V K SURESH, e PARWEZ. “Evaluation of antibacterial activity of *C. reflexa* and *abutilon indicum*.” *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 2(4),2011: 355–61.

MAVLONOV, G. T., KH A. UBAIDULLAEVA, G. V. KADRYAEVA, E N. N. KUZNETSOVA.. “Cytotoxic components of *C.*”. *Chemistry of Natural Compounds* 44(3), 2008 p.409–10.

MEHRBANI, M., CHOOPANI, R., FEKRI, A., MEHRABANI, M., MOSADDEGH, M. “The efficacy of whey associated with dodder seed extract on moderate-to-severe atopic dermatitis in adults: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial”. *Journal of Ethnopharmacology* 172: 325–32., 2015
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.07.003>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. 31 *Plantas Medicinais e Fitoterapia na Atenção Básica*, 2012

MONKS, A., SCUDIERO, D., SKEHAN, P., SHOEMAKER, R., PAULL, K., VISTICA, D., HOSE, C., LANGLEY, J., CRONISE, P., VAIGRO-WOLFF, A., GRAY-GOODRICH, M., CAMPBELL, H., MAYO, J., BOYD, M. Feasibility of a high-flux anticâncer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the Nacional Cancer Institute*. Vol.83, No. 11, Jun, pp. 757-766, 1991.

MOON, M., JEONG, H. U., CHOI, J. G., JEON, S. G., SONG, E. J., HONG, S. P., & OH, M. S. Memory-enhancing effects of *Cuscuta japonica* Choisy via enhancement of adult hippocampal neurogenesis in mice. *Behavioural Brain Research*, 311, 173–182, 2016.
<http://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.05.031>

NIH Publication. Guidance document on using *in vitro* data to estimate in vivo starting doses for acute toxicity, n. 01-4500, ago. 2001.

NETO, P. C.G.; LIMA, J.R.; BARBOSA, M.R.V.; BARBOSA, M.A.; MENEZES, M.; PORTO, K. C.; WARTCHOW, F.; GIBERTONI, T.B. Manual de Procedimentos para Herbários. Ed. Universitária UFPE; Recife,2013.

OECD, Organization for Economic Co-operation and Development. Guideline for Testing of Chemicals 432: *In vitro* e 3T3 NRU phototoxicity test, abr. 2004.

OECD, Organization for Economic Co-operation and Development. Guideline for Testing of Chemicals 487: *In Vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test (MNvit), sep. 2014.

OECD, Organization for Economic Co-operation and Development. OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance monitoring, n.1, jan. 1998.

PAN, S., WANG, X., DUAN, W., YU, Z., ZHANG, L., LIU, W. Preparative isolation and purification of flavonoids from *C. chinensis* Lam. By high-speed countercurrent Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 37:15, 2162-2171, 2016.

PATEL, S., SHARMA, V., CHAUHAN, N. S., & DIXIT, V. K. A study on the extracts of *Cuscuta reflexa* Roxb. in treatment of cyclophosphamide induced alopecia. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22(1), 7, 2014. <http://doi.org/10.1186/2008-2231-22-7>

PEREIRA, C.B., MARIN, A., DALMORA, S.L., NECCHI, R.M.M., ROSSATO, L., ALVES, S.H., MANFRON, M.P. Atividade Antimicrobiana e Citotoxicidade do extrato bruto obtido de *Morus Alba* L. (Moraceae). *Rev Ciênc EArm Básica Apl.*, Vol.33, No. 1, pp 133-137, 2012.

PITELLI, R.A. Interferência das plantas daninhas em culturas agrícolas. Informe Agropecuário 11(129): 16-27, 1985. In EMBRAPA Biologia e Ecologia de Plantas Daninhas, disponível via <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/Plantas_daninhas_definicaoID-OKBSzkoJUj.pdf> Acesso em 15/10/2016.

PHOTOTOX®: Statistical Software Phototox Version 2.0 for OECD Test Guideline 432. Disponível em: <<http://www.oecd-ilibrary.org/content/book/9789264071162-en>>. Acesso em: 06 jun. 2015.

RAJU, NIDHI et al. 2015. "C. chinensis Ameliorates Immunosuppression and Urotoxic Effect of Cyclophosphamide by Regulating Cytokines - GM-CSF and TNF-Alpha". *Applied Biochemistry and Biotechnology* 176(3): 742–57.

RANG, H. P. e DALE, M. M., 2001. *Earmacologia*, Guanabara Koogan, 4ed.

RENAMA – REDE NACIONAL DE MÉTODOS ALTERNATIVOS. Disponível em: <<http://renama.org.br/>>. Acesso em 26 abr. 2015.

RIBEIRO, C., 2010. *Cosmetologia aplicada a dermoestética*. Pharmabooks, São Paulo, 2ª. ed. pp. 218-222.

RVIERE, S., CLAYSON, C., DOCS, K. "To attract or to repel? Diversity, evolution and role of the 'most peculiar organ' in the C. flower (dodder,

Convolvulaceae)-the infrastaminal scales". *Plant Systematics and Evolution* 299(3): 529–52, 2013.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A. S. "Teste *in vitro* de Citotoxicidade: estudo comparativo de duas metodologias". *Materials research*, v.6, n.3, 317-320, 2003.

RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L. *The Principles of Humane Experimental Technique*, 2 ed, Special edition, 1990. Disponível via internet:<http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/foreword,> Acessado em 10/11/2016.

SHARMA, J., GAIROLA, S, L SHARMA, Y. P., GAUR.,R. D. "Ethnomedicinal plants used to treat skin diseases by Tharu community of district Udham Singh Nagar, Uttarakhand, India". *Journal of Ethnopharmacology* 158(PART A): 140–206. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.10.004>, 2014.

SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., PETROVICK, P.R., 2001. Produtos de origem vegetal na produção de medicamentos. In SIMÕES, M.O., et al., *Earmacgnosia: da Planta ao medicamento*. 3ed. Ed. da UFSC, Rio Grande do Sul, pp. 301-332.

SCHIPSEMA, J., DAGNINO, D., GOSMANN, G., 2001. Alcalóides indólicos. In SIMÕES, M.O., et al., *Earmacgnosia: da Planta ao medicamento*. 3ed. Ed. da UFSC, Rio Grande do Sul, pp. 689-715.

SIMÃO-BIANCHINI, R. & FERREIRA P. P. A. C.. In Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013 <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB6978>>. Acessado em 06/10/2016.

SOUSA, A. L., SALES, Q. S., BRAZ-FILHO, R., OLIVEIRA, R. R.. "Lignans and flavonoids isolated from *C. racemosa* mart. & humb (Convolvulaceae) by droplet counter-current chromatography". : 2294–2303, 2012.

SPEISKY, H; CASSELS, B.K, Boldo and boldine: na emerging case of natural drug development. *Pharmacol res* 29, 1994 p. 1-12.

SPIELMANN, H., BALLS, M., DUPUIS, J., PAPE, W.J.W., PECHOVITCH, G., DE SILVA, O., HOLZHÜTTER, H.G., CLOTHIER, R., DESOLLE, P., GERBERICK, F., LIEBSCH, M., LOVELL, W.W., MAURER, T., PEANNENBECKER, U., POTTHAST, J. M., CSATO, M., SLADOWSKI, D., STEILING, W., AND BRANTOM, P. The international EU/COLIPA phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. *Toxicology In Vitro*, Vol.12, pp. 305-327, 1998.

SUFI, B. Utilização de cocultura de melanócitos e queratinócitos para avaliação da ação do líquido da castanha de caju (LCC) na pigmentação

epidérmica / Use of melanocytes and keratinocytes in co-culture for evaluation of the action of cashew nut shell liquid (CNSL) in epidermal pigmentation. 2013. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energeticas e Nucleares - IPEN-CNEN/SP, São Paulo. 118 p.

SURESH, V., V. SRUTHI, B. PADMAJA, E V. V. ASHA. 2. "In vitro anti-inflammatory and anti-cancer activities of *C. reflexa* Roxb." *Journal of Ethnopharmacology* 134(3), 2011: 872–77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2011.01.043>.

SZETO, Y. T., WONG, S. C.Y., WONG, J. W.M., KALLE, W. PAK, S. C. "In vitro antioxidation activity and genoprotective effect of selected Chinese medicinal herbs." *The American journal of Chinese medicine* 39(4): 827–38. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21721160>, 2011.

TANNENBAUM, J., R BENNETT, B. T. Russell and Burch's 3Rs Then and Now: The Need for Clarity in Definition and Purpose. Vol 54, No 2, Journal of the American Association for Laboratory Animal Science, march 2015.

TORRE, A.D., 2013. Óleo essencial de *Baccharis trimera* (less.) Dc.: estudo fitoquímico e avaliação in vitro das atividades antiproliferativa e mutagênica. Dissertação de mestrado, UNICAMP, Campinas.

UDAVANT, Pavan Bhausahab, Suggala Venkata Satyanarayana, e Chandrashekhar Devidas Upasani. 2012b. "Preliminary screening of *C. reflexa* stems for Anti inflammatory and cytotoxic activity". *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2(3 SUPPL.): S1303–7. [http://dx.doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60405-5](http://dx.doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60405-5).

———. 2012a. "Preliminary screening of *C. reflexa* stems for Anti inflammatory and cytotoxic activity". *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2(3 SUPPL.).

UMEHARA, K., NEMOTO, K., OHKUBO, T., MIYASE, T., DEGAWA, M., & NOGUCHI, H. Isolation of a New 15-Membered Macrocyclic Glycolipid Lactone, Cuscutic Resinoside A from the Seeds of *Cuscuta chinensis*: A Stimulator of Breast Cancer Cell Proliferation, 2004. <http://doi.org/10.1055/s-2004-818939>

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGC NSKI, E.M. Plants drug analysis: a thin layer chromatography atlas; Plant Springer-Werlog, Berlim, 1984.

WANG, T. J.; AN, J.; HUI-CHEN, X.; DIDENG, Q.; YANG, L. Assessment of *C. chinensis* seeds' effect on melanogenesis: Comparison of water and ethanol fractions in vitro and in vivo. *Journal of Ethnopharmacology* 154(2014)240–248.

XIU, L.-J., SUN, D.-Z., JIAO, J.-P., YAN, B., QIN, Z.-F., LIU, X., YUE, X.-Q. Anticancer effects of traditional Chinese herbs with phlegm-eliminating

properties - An overview. *Journal of Ethnopharmacology*, 172(415), 1–7, 2015. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2015.05.032>

YANG, H. M., SHIN, H.-K., KANG, Y.-H., & KIM, J.-K. Cuscuta chinensis extract promotes osteoblast differentiation and mineralization in human osteoblast-like MG-63 cells. *J. Med. Food*, 12(1), 85–92, 2009. <http://doi.org/10.1089/jmf.2007.0665>

YANG, L., CHEN, Q., WANG, F., & ZHANG, G. Antiosteoporotic compounds from seeds of Cuscuta chinensis. *J. Ethnopharmacol.*, 135(2), 553–560, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.03.056>

YEN, F. L., WU, T. H., LIN, L. T., CHAM, T. M., & LIN, C. C. Nanoparticles formulation of Cuscuta chinensis prevents acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Food Chem. Toxicol.*, 46(5), 1771–1777, 2008. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2008.01.021>

YUNCKER, T. G. 1932. The genus Cuscuta *Memoirs of the Torrey Botanical Club* 18: 113–331.

ANEXO I

Cópia do Parecer de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa assinada


COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA


São Paulo, 07 de julho de 2016
CEP N 5387211215

Ilmo(a). Sr(a).
 Pesquisador(a): Raquel Siveira Bertoluci
 Depto/Disc: Ciências Exatas E Da Terra
 Dra. Patrícia Santos Lopes (orientador)

Título do projeto: "Avaliação da Segurança e Eficácia in vitro da *Cuscuta racemosa* Mart."

Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa UNIFESP/HSP

A *Cuscuta racemosa* Mart. é uma holoparasita pertencente à família Convolvulaceae, conhecida no Brasil como Cipó chumbo. Embora seja originária do Chile é presente em vários estados do sul e sudeste brasileiros. O presente projeto tem como objetivo a avaliação in vitro da segurança e eficácia do extrato de *Cuscuta racemosa* para possíveis aplicações cosméticas. Serão empregados testes como a citotoxicidade, fototoxicidade e genotoxicidade para avaliar diferentes extratos da planta de acordo com as boas práticas de cultivo celular e em acordo com os guias da OECD, visando acrescentar informações com relação à ação fototóxica e genotóxica. Os testes serão realizados em culturas celulares de linhagens de células tumorais e não tumorais obtidas da ATCC. Serão utilizados fibroblastos (BaB 3T3/C), ovário de hamster (CHO), mama (MCF-7), mama agressivo (MDA), útero (HELA), leucemia (THP-1) e melanoma humano (Sk). As amostras do material vegetal, serão coletadas no Ipiranga, bairro da cidade de São Paulo. Após coletadas, serão submetidas à avaliação de uma especialista no Instituto de Botânica de São Paulo, local em que será depositada sua espécie. A obtenção do extrato bruto (EB) padronizado e liofilizado e de suas sucessivas extrações com solventes orgânicos de polaridades crescentes, serão realizadas conforme método descrito por Ferraz e colegas. A avaliação da atividade antitumoral das amostras será realizada de acordo com o protocolo adaptado descrito por Monks e colaboradores. Espera-se comprovar a ausência de citotoxicidade, fototoxicidade e genotoxicidade no extrato avaliado garantindo a segurança para possíveis aplicações cosméticas e medicinais e também comprovar sua atividade antioxidante e antitumoral.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo, na reunião de 19/01/2016, **ANALISOU e APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo;
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo;
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes;
4. Relatórios parciais de andamento deverão ser enviados anualmente ao CEP até a conclusão do protocolo.

Atenciosamente,


 Prof. Dr. Miguel Roberto Jorge
 Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
 Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Rua Herington, 672 - Vila Mariana - CEP 08123-001 - São Paulo - SP - Tel: 55 (11) 5071-1002 / Fax: 55 (11) 5026-7182
 Rua do Estado, 1000 - Santana - Teresopolis - RJ - CEP: 13120-000 - Tel: 55 (11) 5071-1002 / Fax: 55 (11) 5026-7182
 CEP: 53872115