



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

ANA PAULA SANT'ANNA DA SILVA

**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA, ANTIPIRÉTICA, ANTI-INFLAMATÓRIA,
ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS
ISOLADAS DE *Cleome spinosa* Jacq.**

Recife, 2016

ANA PAULA SANT'ANNA DA SILVA

**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA, ANTIPIRÉTICA, ANTI-INFLAMATÓRIA,
ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS
ISOLADAS DE *Cleome spinosa* Jacq.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos à obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Vera Lúcia de Menezes Lima

Co-orientador: Prof^o Dr^o César Augusto da Silva

Recife, 2016

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Silva, Ana Paula Sant'Anna da

Atividade antinociceptiva, antipirética, anti-inflamatória, antimicrobiana e antioxidante de extratos e substâncias isoladas de *Cleome spinosa* Jacq. / Recife: O Autor, 2016.

181 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Vera Lúcia de Menezes Lima|

Coorientador: César Augusto da Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biotecnologia, 2016.

Inclui referências

- 1. Plantas medicinais 2. Inflamação 3. Febre I. Lima, Vera Lúcia de Menezes (orient.) II. Silva, Augusto César da (coorient.) III. Título**

615.321

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017- 498

ANA PAULA SANT'ANNA DA SILVA

ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA, ANTIPIRÉTICA, ANTIINFLAMATÓRIA,
ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS
ISOLADAS DE *Cleome Spinosa* Jacq.

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas, Área de concentração em
Biotecnologia, da Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito parcial para a
obtenção do título de doutor em Ciências
Biológicas.

Aprovada em: 30/06/2016

COMISSÃO EXAMINADORA:

Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima
Departamento de Bioquímica – UFPE

Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia
Departamento de Bioquímica – UFPE

Profa. Dra. Márcia Vanusa da Silva
Departamento de Bioquímica – UFPE

Prof. Dr. Antônio Fernando Moraes de Oliveira
Departamento de Botânica – UFPE

Prof. Dr. Caíque Silveira Martins da Fonseca
Departamento de Bioquímica – UFPE

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo sol que me ilumina, pelo ar que respiro... Por me mostrar a cada dia o quão forte sou, fazendo-me sempre perseverar.

A professora e orientadora Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima por ter me recebido, pela aprendizagem e puxões de orelha, que me fizeram ver um outro mundo.

Aos professores Dr. Nicácio Henrique, Dra. Márcia Vanusa e Dra. Maria Tereza Correia quão importantes vocês são para mim, sem vcs a jornada seria impossível.

A minha eterna amada e amiga mãe, Edna Sant'Anna da Silva, pelo amor dedicado e por ver em mim uma força que nunca pensei ter. Eu sempre soube da grande mulher que tinha ao meu lado, o que essa criatura divina me proporcionou nada, nem ninguém tira de mim e hoje isso me faz ainda mais forte. Ao meu pai Antônio Pereira da Silva pelo amor, mesmo que de uma forma tosca e pela confiança que sempre depositou em mim.

Aos meus irmãos George Henrique Sant'Anna da Silva e Ana Carolina Sant'Anna da Silva pelo cuidado, carinho e compreensão. Só não pelos apereios.

Aos meus sobrinhos Pedro Henrique, Paulo Henrique, Gustavo Henrique, Ana Clara, Ana Beatriz, Artur Henrique e Davi Henrique por me proporcionar tantas e todas as alegrias nos últimos anos.

A Carlos Alberto de Melo pelo amor e compreensão, um amigo incondicional.

Aos técnicos João Virgínio e Albérico Real que sempre se mostraram dispostos a me ensinar e ajudar no manuseio das técnicas e manipulação dos equipamentos, e nas horas difíceis sempre tinham uma palavra amiga, um abraço e algumas lágrimas, não é sr. João?!!!

A amiga e companheira de jornada diária e de vida Mônica Martins, que abriu as portas de seu coração e de sua casa para mim. Pois se hoje tenho essa tese escrita ela esteve comigo. A Caíque Fonseca que sempre se mostrou atencioso e empenhado em contribuir, ajudou-me para hoje esse trabalho estar pronto.

Aos amigos Irailton Prazeres, Thaise Brito, Juciara Tenório, Cibele Maria, Paula Fernanda, Tiago Fonseca, valeu a pena, amigo é aquele que está com você para sorrir e chorar, no meu caso mais chorar.

Aos amigos de jornada diária e não menos importantes Alexsandra Carvalho, Amanda Uchôa, Ingridd Ayslane, Weber Melo, Janaína Campos, Joelma Pessoa, Tatiana Siqueira, José Guedes, Alexandre Gomes e tantos outros.

E a todos que de forma direta ou indireta fizeram parte desta realização.

Dedico a minha mãe uma verdadeira lição de vida.

(in memoriam)

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.”

Charles Chaplin

RESUMO

As plantas utilizadas na medicina tradicional são promissores recursos no tratamento de diversas doenças, cabe a pesquisa científica confirmar estas propriedades terapêuticas. Devido ao uso de *Cleome spinosa* Jacq. na medicina popular contra processos inflamatórios, febre e infecções microbiológicas, este estudo tem como objetivo avaliar a atividade antinociceptiva, antipirética, anti-inflamatória, antimicrobiana e antioxidante de extrato e substâncias isoladas de *C. spinosa* Jacq. A partir de folhas (L) e raízes (R) de *C. spinosa* diferentes extratos foram obtidos (ciclo-hexano: ChL e ChR; clorofórmio: CL e CR; acetato de etila: EAL e EAR, metanol: ML e MR). A atividade antibacteriana foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo de forma a obter as concentrações inibitória mínima (MIC) e microbicida (MMC). A atividade anti-inflamatória foi avaliada através do teste de peritonite em camundongos. Atividade antioxidante através dos métodos de 2,2-Azino-Bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfônico (ABTS), ensaio de sequestro radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) e a capacidade antioxidante total por fosfomolibdênio. A atividade antipirética dos flavonoides isolados de *C. spinosa* Jacq foi investigada pela pirexia induzida por levedura em camundongos albinos e atividade analgésica em camundongos utilizando a contorção induzida por ácido acético. O exame de toxicidade aguda realizado com os extratos de plantas não revelou qualquer sinal de toxicidade. Na atividade antimicrobiana, os extratos CHL e CL foram os mais ativos, com MIC inferior a 1 mg/mL contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Micrococcus luteus* e. É importante notar que estas concentrações são muito mais baixas do que a sua concentração de 50% de hemólise (HC50). Foram encontradas fortes correlações entre o teor de compostos fenólico ($p = -0,89$) e teor de flavonoides ($p = -0,87$), reforçando o possível papel destas classes de metabólitos sobre a atividade antimicrobiana de *C. spinosa* derivado extratos. Além disso, CL e CR mostrou a melhor atividade inibitória contra isolados clínicos de *S. aureus*, eles também mostraram ação sinérgica com oxacilina contra todas as cepas. Na atividade anti-inflamatórias dos extratos ML e MR, todas as concentrações testadas causaram uma redução significativa no número de leucócitos em camundongos com peritonite. Os extratos ML e MR mostrou atividade antioxidante Pará nos três métodos testados, ABTS, DPPH e fosfomolibdênio. Os compostos quercetina 3-glicose, rhamnose e 5-Hidróxi-7,4'-dimethoxyflavone isolado em doses de 10 e 20 mg / kg, mostraram uma redução significativa da febre e apresentaram atividade analgésica. O estudo mostrou-se promissor para o desenvolvimento com *C. spinosa*.

Palavras-chave: Micro-organismos. Inflamação. Febre.

ABSTRACT

The plants used in folk medicine are promising resources in the treatment of several pathologies, combined with research confirming these therapeutic properties. Due to the use of *Cleome spinosa* Jacq. in folk medicine against inflammatory processes, fever and microbiological infections, this study aims to evaluate the antinociceptive activity, antipyretic, anti-inflammatory, antimicrobial and antioxidant extract and isolated substances of *Cleome spinosa* Jacq. From leaves (L) and roots (R) of *C. spinosa* different extracts were obtained (cyclohexane: ChL and ChR; chloroform: CL and CR; ethyl acetate: EAL and EAR, methanol: ML and MR). Antibacterial activity was evaluated by the broth microdilution method to obtain the minimum inhibitory (MIC) and microbicidal (MMC). Anti-inflammatory activity was evaluated through peritonitis test in mice. Antioxidant Activity through the methods of 2,2-Azino-Bis-(3 Ethylbenzothiazoline)-6-Sulfonic Acid (ABTS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Radical Scavenging Assay and Capacity Total Antioxidant by Phosphomolybdenum Assay. The antipyretic activity of flavonoids isolated from *Cleome spinosa* Jacq. was investigated for its, on normal body temperature and yeast-induced pyrexia in albino rats and analgesic activity in mice using the acetic acid induced writhing. According The acute toxicity performed the plant extracts did not reveal any toxic signs. In the antimicrobial activity the ChL and CL extracts were the most actives, with MIC less than 1 mg/mL against *S. aureus*, *Bacillus subtilis* and *Micrococcus luteus*. It is important to note that these concentrations are much lower than their 50% hemolysis concentration (HC50) values. Strong correlations were found between the average MIC against *S. aureus* and their phenolic ($\rho = -0.89$) and flavonoid content ($\rho = -0.87$), reinforcing the possible role of these metabolite classes on the antimicrobial activity of *C. spinosa* derived extracts. Moreover, CL and CR showed the best inhibitory activity against *S. aureus* clinical isolates, they also showed synergistic action with oxacilin against all strains (at least at one combined proportion). In the activity antiinflammatory methanolic extracts of leaf and root at all concentrations tested caused a significant reduction in the number of leukocytes in mice with peritonitis. The ML and MR extracts showed antioxidant activity para the three methods tested, ABTS, DPPH and Fosfomolibidenium. The compounds Quercetin 3-glucose, rhamnose and 5-hidroxi-7,4 '-dimethoxyflavone isolated at doses of 10 and 20mg/kg, showed significant reduction in normal body temperature no dose-dependent manner and showed analgesic activity. The study showed promising. The study of the *C. spinosa* showed promising

Palavras-chave: Microorganisms. Inflammation. Fever.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 -	“ <i>Tabuinha Sumeriana</i> ”, compêndio de textos médicos em placas de argila	19
Figura 2 -	“ <i>Papyrus Ebers</i> ”, obra egípcia de 1500 a. C.	20
Figura 3 -	“ <i>O corpo dos Simples</i> ”, obra de Ibn Al-Baitâr.....	23
Figura 4 -	Folhas da sarapintada (<i>Pulmonaria officinalis</i>)	24
Figura 5 -	Capa do livro “ <i>Historia Naturalis Brasiliae</i> ”	29
Figura 6 -	Estrutura química da Morfina	31
Figura 7 -	Estrutura química da Emetina	31
Figura 8 -	Estrutura química da Estricnina	31
Figura 9 -	Estrutura química da Quinina	31
Figura 10 -	Estrutura química da Quinidina	31
Figura 11 -	Cascata inflamatória a partir do ácido aracdônico	36
Figura 12 -	Mecanismo da febre e ação dos antipiréticos	38
Figura 13 -	Monitoramento dos transdutores nociceptores da dor e influência das condições teciduais	39
Figura 14 -	Ciclo biosintético dos metabólitos secundários	42
Figura 15 -	Estrutura química do isopentenilpirofosfato.....	43
Figura 16 -	Estrutura química da giberlina	45
Figura 17 -	Estrutura química de fitoesteróis	46
Figura 18 -	Estrutura química dos cardenolídeos	47
Figura 19 -	Estrutura química da 1,2-benzopirona	49
Figura 20 -	Estrutura química de um alcaloide	50
Figura 21 -	Classificação química dos compostos fenólicos a sua divisão nos grandes grupos	55
Figura 22 -	Taninos hidrolisáveis: galotanino e elagitanino	56
Figura 23 -	Taninos condensados	56

Figura 24 -	Ácido hidroxibenzoico (A) e Ácido hidroxicinâmico (B)	58
Figura 25 -	Via do chiquimato	60
Figura 26 -	Rota do acetato/mevalonato	60
Figura 27 -	Estrutura geral dos flavonoides	61
Figura 28 -	Estrutura das principais classes dos flavonoides	62
Figura 29 -	Semelhança das estruturas químicas do Estrogênio e da Isoflavona	65
Figura 30 -	Estrutura geral das Antocianidinas	66
Figura 31 -	Espécie do presente estudo, <i>Cleome spinosa</i> Jacq	74

CAPITULO 1

Figure 1 -	Hemolytic Activity of organic extracts from leaves (A) and roots (B) of <i>C. spinosa</i>	128
Figure 2 -	Combinatory effect of Oxacillin and organic extracts from leaves and roots of <i>C. spinosa</i> against clinical isolates of <i>Staphylococcus aureus</i> . Legend: Non – non-interactive effect; Add - additive effect; Syn - synergistic effect; Ant – antagonistic effect	128

CAPITULO 2

Figure 1 -	Quercetin 3-glucose, rhamnose flavonoid isolated from <i>Cleome spinosa</i>	136
Figure 2 -	5-hydroxy-7,4'-dimethoxyflavone flavonoid isolated from <i>Cleome spinosa</i>	136
Figure 3 -	Effect of Quercetin 3-glucose, rhamnose (10 and 20 mg/kg), Ibuprofen (100 mg/kg) and on acetic-acid-induced writhing test. Values are mean $\pm$ standard error of the mean. * $p < 0.001$, significantly different from control; analysis of variance followed by Student's "t" test (n= 6, per group)	138
Figure 4 -	Effect of 5-hidroxi-7,4'-dimethoxyflavone (10 and 20 mg/kg), Ibuprofen (100 mg/kg) and on acetic-acid-induced writhing test. Values are mean $\pm$ standard error of the mean. * $p < 0.001$, significantly different from control; analysis of variance followed by Student's "t" test (N = 6, per group).	138

CAPITULO 3

Figure 1 Effects of extracts of leaves and roots metanolics *C. spinosa* and Acetyl salicylic (500mg/ Kg) on the leukocytes migration. The results are expressed as Mean $\pm$ SD (n=6). * Indicates significant difference from the control group (p <0.005), One-way ANOVA

.....

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 -	Principais classes de alcaloides sintetizados pelas planta	51
Tabela 2 -	Propriedades cientificamente comprovadas dos flavonoides	69
Tabela 3 -	Propriedade medicinal de espécies do gênero <i>Cleome</i>	73

CAPITULO 1

Table 1 -	Microorganisms	121
Table 2 -	Susceptibility of <i>Staphylococcus aureus</i> strains to antibiotics	122
Table 3 -	Phytochemical analyse of organic extracts from leaves and roots of <i>C. spinosa</i>	123
Table 4 -	Antimicrobial Activity of organic extracts from leaves of <i>C. spinosa</i> against bacteria.	124
Table 5 -	Antimicrobial Activity of organic extracts from roots of <i>C. spinosa</i> against bacteria.	125
Table 6 -	Antimicrobial Activity of organic extracts from leaves and roots of <i>C. spinosa</i> against <i>Candida</i> spp.	126
Table 7 -	Antimicrobial Activity of organic extracts from leaves and roots of <i>C. spinosa</i> against <i>Staphylococcus aureus</i>	127

CAPITULO 2

Table 1 -	Effect of Quercetin and 3-glucose, rhamnose (10 and 20 mg/kg) on body temperature in yeast-induced pyrexia	137
Table 2 -	Effect of 5-hydroxy-7,4 '-dimethoxyflavone (10 and 20 mg/kg) on b re in temperature yeast-induced pyrexia	137

CAPITULO 3

Table 1 -	Antioxidant activity (ABTS ⁺) of <i>Cleome spinosa</i>	157
Table 2 -	Antioxidant activity of methanolic extract of <i>C. spinosa</i> leaves and roots in different concentrations. Gallic acid was used as standard. Mean $\pm$ SD (n = 3)	158

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 OBJETIVOS	18
1.1.1 Objetivo geral	18
1.2.2 Objetivos específicos	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 USO DOS VEGETAIS PELO HOMEM AO LONGO DO TEMPO	19
2.2 APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS DOS METABÓLITOS DE PLANTAS	34
2.2.1 Antimicrobianos	34
2.2.2 Processo inflamatório	35
2.2.3 Febre	37
2.2.4 Processo de dor	38
2.2.5 Antioxidantes	40
2.3. CLASSE DOS METABÓLITOS DE PLANTAS	41
2.4 BRASSICACEAE	72
2.4.1 <i>Cleome spinosa</i>	73
3. CONCLUSÃO	74
4. REFERÊNCIAS	75
CAPÍTULO 1	102
ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND PHYTOCHEMICAL ANALYSIS OF ORGANIC EXTRACTS FROM <i>Cleome spinosa</i> JACQ.	104
Abstract	105
Introduction	106
Material and methods	106
Results	110
Discussion	112
Conclusions	116
References	117
CAPÍTULO 2	129
ISOLATION, STRUCTURE ELUCIDATION AND ANTINOCICEPTIVA AND ANTIPYRETIC ACTIVITY OF THE FLAVONOID COMPOUNDS FROM <i>Cleome spinosa</i> JACQ.....	131
Abstract	132
Introduction	133
Material and methods	133
Results	135
Discussion	138
Conclusions	140
References	140
CAPÍTULO 3	143
ANTIOXIDANT ACTIVITY AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES <i>IN VIVO</i> OF METHANOLIC EXTRACTS OF LEAVES AND ROOTS OF <i>Cleome</i> <i>spinosa</i> JACQ.	145
Abstract	145
Introduction	146
Methods	146
Results	149
Discussion	151

Conclusions	153
References	153
APENDICE A – ARTIGOS A SEREM PUBLICADOS.....	159
ANTIOXIDANT AND ANTI- <i>Staphylococcus aureus</i> ACTIVITIES OF EXTRACT FROM <i>Crataeva tapia</i> L.	159
POTASSIUM USNATE TOXICITY AGAINST EMBRYONIC STAGES OF THE SNAIL <i>Biomphalaria glabrata</i>	162
APENDICE B – COLABORAÇÕES EM ARTIGOS PUBLICADOS	166
Antimicrobial activity of seaweeds of Pernambuco, northeastern coast of brazil	166
<i>Syagrus coronata</i> seed oils have antimicrobial action against multidrug-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	167
Antimicrobial activity of several brazilian medicinal plants against phytopathogenic bacteria	168
ANEXO A - INSTRUCTIONS FOR AUTHORS BMC COMPLEMENTARY AND ALTERNATIVE MEDICINE	169

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais pela população é milenar, despertando o interesse de muitos pesquisadores com o objetivo de conhecer sobre novas moléculas que possam ser usadas na terapêutica. O Brasil apresenta a maior biodiversidade do planeta, e ainda muitas plantas a serem exploradas quanto ao seu potencial farmacêutico, o que torna o país o cenário ideal para o desenvolvimento de estudos voltados à comprovação de uso de plantas (SANTOS, 2015).

A escolha de uma espécie vegetal para a pesquisa científica é baseada nas alegações do efeito terapêutico em humanos, constituindo um valioso atalho para a descoberta de novos fármacos. O conhecimento tradicional do uso das plantas pode ser uma pré-triagem quanto à utilidade terapêutica (ELISABETSKY, 2003).

A utilização de plantas no tratamento de doenças infecciosas, inflamatórias, como analgésicos, antipiréticos e antioxidantes a partir da medicina tradicional é muito comum e essas práticas vêm sendo estudadas pela comunidade científica, visando não apenas a cura ou tratamento dessas patologias, mas restituir o homem à vida natural, sem as consequências tão danosas dos efeitos adversos (MOTTA et al., 2013; CARNEVALLI; DE ARAÚJO, A. P. S., 2015). Devido ao aumento alarmante na incidência de novas doenças infecciosas e resistência aos fármacos atuais, existe uma grande necessidade em descobrir novos compostos químicos com atividade antimicrobiana e, possivelmente, com novos mecanismos de ação (ADWAN et al., 2010).

O processo inflamatório consiste na resposta orgânica mais precoce diante de lesão tissular ou infecção. Este processo fisiológico envolve uma ação coordenada entre o sistema imunológico e o tecido na qual ocorreu a lesão. Diante de um trauma tissular, o acúmulo local de prostaglandinas, tromboxanos e outros mediadores químicos ocasionam a sensibilização periférica da dor, que se caracteriza por uma alteração no limiar de nociceptores, provocando dor, eritema, aumento da temperatura local e edema, como uma resposta aguda ao processo inflamatório estabelecido (SAKATA E ISSY, 2008; SMITH et al., 1998).

Segundo a “*Internacional Association for the Study of Pain*” (IASP), a dor é definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a um dano tissular real ou potencial ou descrita em termos de tal dano (MERSKEY, 1994). A dor patológica é persistente e em geral está associada a processos inflamatórios, por sofrer ações de mediadores químicos comuns na inflamação (MENDELL;

SAHENK, 2003). Por esses fatores, as substâncias com funções de diminuir a condição inflamatória são capazes de serem empregadas no alívio da dor.

Vários são os fatores determinante e geradores da febre, o mais comum é a infecção. Os antipiréticos atuam na inibição das prostaglandinas, ajustando o centro termorregulador, uma vez que a regulação da temperatura do corpo ocorre principalmente por mecanismos de *feedback* neurais, através de centros regulatórios da temperatura localizados no hipotálamo (GUYTON; HALL, 2001).

Outra atividade atualmente muito estudada em plantas é o potencial antioxidante em extratos e/ou substâncias que estejam isoladas. Os antioxidantes naturais, presentes em vegetais, atuam inibindo a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), as quais estão implicadas em várias fisiopatologias. Dentre os vários tipos de antioxidantes podem ser citados os polifenóis, constituídos de ácidos fenólicos e flavonoides, substâncias bioativas de grande ocorrência em vegetais (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; SOUSA et al., 2007).

Assim, nos últimos anos tem-se verificado um grande avanço científico no entendimento do mecanismo de ação de várias classes de compostos fitoquímicos, tais como os compostos fenólicos, que tem sido demonstrado possuir um amplo espectro de atividades biológicas, tais como, antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, antidiabética, anti-hipertensiva, antipirética, entre outras. Diante do exposto e do uso populares da *Cleome spinosa* Jacq., este estudo buscou comprovar as propriedades terapêuticas da referida espécie contra micro-organismos patógenos e processos inflamatórios, dor e febre, inferindo uma alternativa terapêutica eficiente e de baixo custo a população.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Investigar a atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, antinociceptiva, antipirética e antioxidante do composto isolado dos extratos de *C. spinosa*.

1.1.2 Objetivos Específicos

- ✓ Isolar, purificar e caracterizar um composto isolado de extratos de *C. spinosa*;
- ✓ Avaliar o efeito dos extratos e compostos purificados de *C. spinosa* em modelos experimentais de inflamação aguda e crônica, analgesia e febre induzida por lipossacarídeo em camundongos;
- ✓ Avaliar o efeito antioxidante *in vitro* dos extratos e componente purificado de *C. spinosa*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 USO DOS VEGETAIS PELO HOMEM AO LONGO DO TEMPO

O uso de plantas medicinais é tão antigo que existe registro na Bíblia, tanto no Antigo como no Novo Testamento, como por exemplo, o aloés (*Aloe vera*), o benjoim (*Styrax benzoin*) e a mirra (*Commiphora myrrha*) (GADELHA et al., 2013). Na Antiguidade, registros cuneiformes sumérios e babilônicos, escritos por ordem do Rei Assurbanipal, descrevem detalhadamente os usos e aplicações de espécies vegetais ou produtos derivados, como ópio (*Papaver somniferum* L.), galbano (*Ferula galbaniflua* Boiss & Buhse), assafetida (*Ferula assafoetida* L.), meimendro (*Hyoscyamus niger* L.), mandrágora (*Mandragora officinalis* L.) e beladona (*Atropa belladonna* L.) administrada contra espasmos, tosse e asma (CUNHA, 2005; GARCIA et al., 1995). Os babilônios e sumerianos (2.600 a.C.) usavam em seus remédios frutos, folhas, flores, cascas e raízes como a oliveira e o alho. A “*Tabuinha Sumeriana*” (Figura 1), compêndio de textos médicos em placas de argila, apresenta registros dos primeiros sintomas de doenças e a prescrição para cada enfermidade, sendo considerada o mais antigo tratado de medicina (MIGUEL; MIGUEL, 1999; PARKY, 1966; TEIXEIRA, 1994).

Figura 1: “*Tabuinha Sumeriana*”, compêndio de textos médicos em placa de argila



Fonte: <https://carmelourso.wordpress.com/category/cursos/>. Acesso em: 06/12/2015.

Na china (2.500 ~ 2.000 a.C.), o imperador Shen-Nung, considerado fundador e patrono da farmácia chinesa, descreve 365 drogas no *Pen Tsao*, onde cita plantas como ginseng (*Pfaffia glomerata*), cinamomo (*Melia azedarach*), ruibarbo (*Rheum rhabarbarum*), podofilo (*Podophyllum peltatum*) e efedra (*Ephedra sinica*) (PARKY, 1966). Sabe-se que desde 2300 a.C., egípcios, assírios e hebreus cultivavam diversas ervas e traziam tantas outras de suas expedições. Nesses tempos, as plantas eram muitas vezes escolhidas por seu cheiro, acreditavam que certos aromas afugentavam os espíritos das enfermidades. O primeiro médico egípcio conhecido foi Imhotep (2980~2900 a.C.), grande curandeiro, que utilizava ervas medicinais em seus preparados mágicos (JORGE, 2013). Em 1.500 a.C., no Egito, a obra “*Papyrus Ebers*” (Figura 2) com 811 prescrições, menciona 700 drogas vegetais, minerais e animais, incluindo salgueiro, acácia e sedativos extraídos de *Ephedra*. Estes utilizavam diversas outras plantas além das aromáticas, com efeitos diversos, bem como, para embalsamar seus cadáveres, experimentaram muitas plantas (PARKY, 1996; TAVARES, 1996; TEIXEIRA, 1994).

Figura 2: “*Papyrus Ebers*”, obra egípcia de 1500 a.C.



Fonte: <http://www.crystalinks.com/egyptmedicine.html>. Acesso em: 12/12/2015

Em toda história, registra-se que os medicamentos surgiram a partir da simples observação e experimentação e assim as propriedades terapêuticas foram sendo descobertas e propagadas de geração a geração. Os médicos gregos pouco sabiam dos efeitos e mecanismos de ação das plantas medicinais, mas acompanhavam atentamente as reações de seus pacientes e como o organismo

restabelecia-se. Os gregos citavam o uso de compressas com raízes no estancamento de hemorragias; uso de óleo de rícino (obtido a partir das sementes da planta *Ricinus communis*) e couve como purgativos; chás de várias ervas como sudoríferos suco de aipo (*Apium graveolens*), salsa (*Petroselinum crispum* (Mill.) Nym.) e aspargo (*Asparagus officinalis*) como diuréticos e beladona (*Atropa belladonna* L.), meimendro (*Hyoscyamus niger* L.) e ópio (*Papaver somniferum*) como narcóticos (TAVARES, 1996; TEIXEIRA, 1994).

Na Grécia e em Roma, a medicina sempre esteve estreitamente dependente da Botânica. Hipócrates (460~377 a.C.), médico grego considerado pai da medicina moderna, o qual na obra “*Corpus Hippocraticum*”, descreveu inúmeros medicamentos incluindo uso de vegetais, vinho e bolores (fungos), para tratamento e cura de doenças genitais. A morte de Sócrates, em 399 a.C., deveu-se à ingestão de uma solução contendo coniina (*Conium maculatum*) e Cleópatra usava extratos de *Hyoscyamus muticus*, contendo atropina, para dilatar as pupilas e, assim, parecer mais sedutora (KUTCHAN, 1995). Theophrastus (372~285 a.C.), discípulo de Aristóteles conhecido como pai da botânica e intitulado pai da farmacognosia, escreveu o livro “*História das Plantas*” onde descreveu espécies vegetais relacionando suas qualidades peculiares, além do seu “*Tratado dos Odores*”, que reúne informações sobre preparação e uso de plantas; Catão (234~149 a.C.) relacionou 120 plantas em sua obra “*De Re Rústica*” (TAVARES, 1996; PARKY, 1996).

No século XIII a.C., Asclépio, curandeiro grego, grande conhecedor das ervas, concebe um sistema de cura, (também chamado de Esculápio de Cos) fundando o primeiro SPA (*Salute Per Aquam*) que se tem conhecimento, em Epidauro. Era baseado em banhos, chás, jejum, uso da música como terapia, jogos e teatros. Tales de Mileto e Pitágoras compilaram essas receitas (OKA, 1998). O conhecimento grego sobre as ervas foi adquirido na Índia, Babilônia, Egito e até na China. Crateus (século I a.C.) publicou o livro *Rhizotomikon*, a primeira obra que se tem conhecimento sobre plantas medicinais ilustrada na Grécia.

No século I da Era cristã, o botânico grego Pedacio Dioscorides elaborou um dos maiores ervanários existentes: “*De Materia Medica*”, onde descreveu cerca de 600 plantas e a descrição de como conservar, utilizar e escolher ervas medicinais para os tratamentos, este tratado permaneceu como fonte de referência até a época

do Renascimento (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1996; TYLER, 1996) ; Plínio, o Velho, ainda neste século, catalogou sua obra, "*História Natural*", com 37 volumes, sendo oito deles com a descrição do uso das espécies vegetais úteis à medicina, pelos romanos. No mesmo século, na Índia, destacou-se o texto *Vrikshayurveda*, de Parasara, como uma das listagens de espécies medicinais mais importantes dos povos da Índia (PIRES, 1984).

No segundo século, sobressai o farmacêutico e médico grego Galeno, que escreveu 83 livros que apresentavam numerosas drogas de origem naturais, combinadas com diversas formulações e métodos de manipulação, originando a farmácia galênica. Entre esses medicamentos estão pimenta da Índia para tratamento de febre terçã e quartã, escanomea para icterícia, aipo e salsa para doenças renais e ruibarbo no tratamento das câibras; Mithridates IV, considerado o promotor da toxicologia, foi reconhecido como descobridor da arte dos venenos vegetais e as ações necessárias para neutralizá-los (PARKY, 1996; TEIXEIRA, 1994; YAMADA, 1998).

Com a queda do Império Romano e fortalecimento da Igreja Católica (que não via com bons olhos a aprendizagem científica e encarava a doença como um castigo). No período entre 450-1000d.C. período conhecido como a "Idade Tenebrosa", o estudo das plantas medicinais ficou estagnado. Somente a partir do século VII a ciência readquiriu importância, restringindo-se aos persas e árabes que mantiveram as ideias de Hipócrates e Galeno. A civilização árabe trouxe importantes contribuições à medicina natural, a ela deve-se o emprego dos purgativos vegetais e o conhecimento do sabor doce da urina dos diabéticos, além de introduzir o uso do âmbar (resina), cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*), sândalo (*Santalum album*), gengibre (*Zingiber officinale*), noz-moscada (*Myristica fragrans*) e canfôra (TEIXEIRA, 1994). Os legados árabes mais importantes foram: a primeira Farmacopeia árabe, intitulada "*O corpo dos Simples*", obra de Ibn Al-Baitâr (Figura 3) descrevendo 14.000 medicamentos, em sua maioria, de vegetais; no século X foi escrita por Abu Ali al Hussin ibn Abdallah ibn Sina, médico islâmico conhecido por Avicena nos países ocidentais o "*Canon Medicinæ*", um tratado sobre medicamentos cardíacos, repassado ao ocidente que se tornou base fundamental da medicina (SAAD; AZAIZEH; SAID, 2005).

Figura 3: “O corpo dos Simples”, obra de Ibn Al-Baitâr



Fonte: <http://aalquimiadacura.blogspot.com.br/2014/11/cure-si-mesmo-as-ervas-plantas-vegetais.html>. Acesso em: 03/01/2016

O pensamento científico dos séculos XII e XIII sofreu forte controle da igreja. No âmbito da química ocidental, talvez o acontecimento mais importante deste período esteja relacionado com a utilização do alambique para destilação de álcool. Por volta de 1280, o florentino Thaddeo Alderotti (1223- 1303) destilou vinho para propósitos medicamentosos (ANDERSON, 1983). Com as Escolas de Salerno e Montpellier (século XIII) surgem as universidades, abrindo para o leigo as portas do conhecimento até então reservado aos monges e religiosos. A universidade de Salerno tem sua obra mais importante o “*Regimen sanitatis salernitatum*”, sobre as virtudes medicinais das plantas. (BARQUERO, 2007).

Todo o empirismo mágico-feiticeiro da arte de curar ao longo da história da humanidade, das teriagas às mandrágoras, encontra em Paracelso (1493-1541), médico suíço, sua figura mais polêmica, este formulou a teoria da “*Assinatura dos corpos*”, baseada no provérbio latim *similia similibus curantur*, segundo o qual a “atividade farmacológica” de uma planta estaria relacionada com o seu aspecto morfológico, por exemplo, uma planta de cor amarela vivo seria adequado para a cura da icterícia, as com raízes vermiformes para o tratamento de helmintos intestinais e as que tinha folhas com forma semelhante a determinado órgão como as folhas de sarapintada (Figura 4) (*Pulmonaria officinalis*), pulmonária, têm aparência de pulmão doente, essa espécie era usada para tratar problemas pulmonares. Mas a opinião científica do fim do século XVII e início do XVIII tornou-se muito hostil à doutrina das assinaturas que, embora sustentada pelos herbanários de

meados do século XVII, foi refutada como sendo totalmente não-empírica e rapidamente desapareceu da botânica oficial, porém continua presente na tradição popular até os dias de hoje (MORS, 1982).

Figura 4: Folhas da sarapintada (*Pulmonaria officinalis*)



Fonte: <https://en.wikipedia.org/wiki/Pulmonaria>. Acesso em: 28/12/2015

Em 1484 foi impresso o primeiro livro sobre cultivo de ervas medicinais. Com o advento da imprensa, os livros começaram a aparecer em toda Europa e em quase todos eram descritas partes das obras de Dioscórides, Galeno, Hipócrates, Aristóteles, com ilustrações copiadas diretamente dos manuscritos da antiguidade (BARQUERO, 2007). As grandes navegações trouxeram a descoberta de novos continentes, legando ao mundo moderno um grande arsenal terapêutico de origem vegetal até hoje indispensável à medicina. O Primeiro herbário das Américas é o *Manuscrito Badanius*, o herbário asteca, do século XVI, em Nahuatl. As culturas americanas, especialmente a Inca, Asteca, Maya, Olmeca e Tolteca consignaram à civilização moderna a casca de quina (*Cinchona officinalis*), utilizada para baixar a temperatura nas febres palúdicas muito antes de se ter conhecimento de como dela se extrai a quinina, as folhas da coca (*Erythroxylum coca*) por suas virtudes anestésicas e estimulantes, e muitas outras drogas de valor terapêutico (MARINI-BETTÒLO, 1974).

Até o século XVI, os tratados de Botânica, então denominados “herbários”, consideram as plantas por suas virtudes medicinais. A primeira farmacopeia na Alemanha só foi elaborada em 1542, com uma lista de 300 espécies de plantas medicinais provenientes de todas as partes do mundo. No final do século XVI, já

havia sido organizados jardins botânicos em várias universidades. A ascensão do prestígio da fitoterapia pode ser traduzida pela difusão da publicação de herbários e pela criação da primeira cátedra de botânica na Escola de Medicina de Pádua, em 1533. Em 1551 foi escrito o primeiro texto em inglês "*Nieuwe Herball*", de William Turner, incansável viajante e grande coletor de plantas (HOFFMANN et al., 1992). Em 1563, Garcia da Orta, português que viveu na Índia, edita em Goa a obra *Colóquios dos Simples e das Drogas e Coisas Medicinais da Índia*. John Gerard, em 1597, incluiu em seu "Herbário" de 1600 páginas, plantas provenientes do Novo Mundo e preservou os conhecimentos botânicos dos monges medievais.

No século XVII, o tratado "*Herbário Completo*", do inglês Nicolas Culpeper, relaciona as virtudes das plantas com os planetas. John Parkinson escreve dois importantes livros sobre a botânica e seus usos medicinais: "*Theatrum Botanicum*" e "*Paradisi in Sole Paradisus Terrestris*". Durante o século XVIII, Sir John Hill escreve "*Virtudes de las Hierbas Británicas*", um trabalho inédito e bem ilustrado. Quase no final deste século, Samuel Hahnemann deu a conhecer sua teoria sobre a homeopatia, que aconselhava o tratamento das enfermidades com pequenas quantidades de substâncias derivadas das plantas, as quais eram ministradas aos pacientes como uma vacina (JORGE, 2003).

A história do Brasil está intimamente ligada ao comércio de produtos naturais - as especiarias - as quais determinaram as várias disputas de posse da nova terra e, por fim, a colonização portuguesa (VIEGAS JR; VANDERLAN, 2006). No Brasil, o conhecimento do uso das plantas como medicamento teve influência das culturas indígena, africana e europeia. Entre os índios, o pajé ou feiticeiro utilizava plantas entorpecentes para sonhar com o espírito que lhe revelaria a erva ou o modo de curar o enfermo e também pela observação de animais que procuravam certas plantas quando doentes. Um exemplo é o uso da raiz de ipecacuanha (*Psychotria ipecacuanha*), pelos animais, para alívio de cólicas e diarreias (SOUZA, 1995).

Os pajés associavam o uso de plantas a rituais de magia e seus tratamentos eram transmitidos oralmente de uma geração a outra. Os índios utilizavam a batata-de-purga (*Ipomoea purga*) para limpar o aparelho digestivo e a ipecacuanha curava tudo, era uma verdadeira panaceia. Os curandeiros (xamãs) entendem que a saúde depende do perfeito equilíbrio do corpo, dos sentidos, da mente e do espírito, para

que a energia possa fluir e obter resultados satisfatórios. Para os africanos, quando alguém adoecia é porque estava possuído pelo espírito mau e um curandeiro se encarregava de expulsá-lo por meio de exorcismo e uso de drogas. As plantas sempre estiveram ligadas ao homem e sempre serão utilizadas por ele, tanto na cura dos males como em outros múltiplos usos (JORGE, 2013).

A influência europeia teve início no Brasil com a vinda dos primeiros padres da Companhia de Jesus (1549), que além do suporte da educação colonial tomaram para si o papel de curadores, aproveitando muito da medicina indígena, pois a necessidade local obrigou os jesuítas a terem provisão de medicamentos e a procurar o que a terra podia dar, com suas plantas medicinais, e começaram a estudar e utilizar em receitas próprias. As primeiras notificações fitológicas brasileiras são atribuídas ao padre José de Anchieta e a outros jesuítas, que formulavam receitas chamadas “Boticas dos Colégios”. O padre Anchieta cita uma “erva boa” quando se referiu à hortelã-pimenta (*Mentha piperita*), utilizada pelos índios para combater indigestão, suavizar nevralgias, reumatismo e doenças nervosas (CORAZZA, 2002).

A Triaga Brasília, um medicamento composto de plantas nativas, ficou famosa chegando a ser uma fonte de renda para a ordem jesuítica na Bahia, se aplicava em várias doenças e sua fórmula era mantida em segredo pelos jesuítas. A estes devem-se a iniciativa pioneira entre esses universos da medicina, já que eles também absorviam o conhecimento dos físicos, cirurgiões e boticários, aplicando-os nos precários hospitais da Santa Casa de Misericórdia (EDLER, 2006).

Os primeiros médicos portugueses que vieram para o Brasil, diante da escassez, na colônia, de remédios empregados na Europa, viram uma flora exuberante e perceberam que os índios sabiam fazer uso da mesma, recolheram estas informações para o combate de doenças, levaram insumos da flora brasileira que podiam e trouxeram ervas, como a camomila (*Matricaria recutita*), calêndula (*Calendula officinalis*) e alfavema (*Lavandula* L.), que se aclimataram muito bem ao Brasil. Essas influências constituem a base da medicina popular. Os viajantes sempre se abasteciam destes remédios antes de excursionarem por regiões pouco conhecidas. Os primeiros cronistas da história brasileira foram Pero de Magalhães Gândavo que escreveu “História da Província de Santa Cruz” em 1576, e Gabriel Soares de Souza, o autor de “Tratado Descritivo do Brasil”, de 1587 (VEIGA JR,

2002). Este último autor denominava as plantas medicinais utilizadas pelos índios de “As árvores e ervas da virtude”, dentre as diversas plantas está a embaúba (*Cecropia hololeuca*, *C. palmata*, *C. adenopus*, *C. cinerea*), o mucuná (*Mucuna pruriens*), a figueira-do-inferno (*Datura stramonium*), o camará (*Chromolaena laevigata*, *Lantana camara*), a caapeba (*Cissampelos pareira*, *C. glaberrima*), a almécega (*Protium icicariba*, *P. heptaphyllum*), o ananás (*Ananas comosus*), o maracujá (*Passiflora sp.*), a piaçava (*Leopoldinia piassaba*), a ubiracica (*Protium icicariba*), o jaborandi (*Pilocarpus jaborandi*) e a copaíba (*Copaifera spp.*). Todas essas plantas eram usadas para curar feridas, chagas ou apostemas (ALVES, 2013).

No período das invasões francesas (1501-71), comandadas por Villegaignon, que fundou a França Antártica, uma tentativa de expulsar os portugueses do Brasil e estabelecer uma colônia francesa na Guanabara, os franceses conheceram e utilizaram as plantas medicinais indígenas. Jean de Léry esteve no Brasil entre 1557 e 1558, descreveu o tratamento e a gravidade do piã (doença semelhante a sífilis):

“O iurare tem a casca espessa de meio dedo e é muito agradável ao paladar, principalmente quando colhido fresco; os dois botânicos que vieram conosco afirmavam ser uma espécie de guaiaco. Os índios o empregavam contra o piã, doença tão grave entre eles como entre nós a bexiga” (EDLER, 2006).

A primeira obra natural brasileira, “*Historia Naturalis Brasiliae*”, foi elaborada por George Marcgrave e o médico de Maurício de Nassau, Wilhem Piso, e publicada originalmente por Johannes de Laet, que editou a contribuição de Marcgrave e acrescentou comentários próprios em 1648. A contribuição de Piso consiste de quatro extensas discussões. A primeira delas sobre o ar, a água e a topografia do Brasil. A segunda, sobre doenças endêmicas locais. A terceira, sobre venenos e seus antídotos. E a quarta, sobre plantas medicinais. Este livro representa a primeira história natural completa da América do Sul. Em seguida ao Tratado de Piso encontra-se o de Marcgrave, *Historiae Rerum Naturalium Brasiliae*, o primeiro livro

descreve as ervas; o segundo trata dos arbustos e plantas frutíferas; o terceiro é dedicado às árvores. Os livros 4, 5, 6 ocupam-se respectivamente dos peixes, das aves e dos quadrúpedes e répteis; o 7º trata dos insetos e o oitavo da geografia, meteorologia e etnografia (ALVES, 2013).

Além dos remédios naturais usados na terapêutica médica, não se pode deixar de mencionar o corante extraído da árvore do pau brasil (*Cesalpinia echinata*), o principal produto de exportação da colônia durante mais de dois séculos, utilizado para tingimento de roupas e como tinta de escrever, que já era conhecido e utilizado nas Índias Orientais desde a Idade Média, e um dos motivos para a colonização do Brasil pelos portugueses (PINTO, 1995). Quando Portugal começou a perder suas fontes de especiarias, na Índia e na Ásia, que foram passando para as mãos de ingleses e holandeses, iniciou-se no Brasil a corrida às especiarias do sertão – canela (*Cinnamomum verum*), baunilha (*Vanilla Plum. ex Mill.*), cravo (*Syzygium aromaticum*), anil (*Indigofera L.*), raízes aromáticas, urucum (*Bixa orellana*), salsa, sementes oleaginosas, madeiras etc. Em 1793, só de anil, foram exportadas 1400 arrobas para Portugal (CARNEIRO, 1956).

A vinda da Corte Real para o Brasil, em 1808, e o decreto de D. João VI que abriu os portos brasileiros às nações amigas pode ser considerado como um dos primeiros marcos históricos oficiais na ciência brasileira, porque foi a partir deste decreto que começaram a chegar ao País as primeiras expedições científicas, cujo principal objetivo era dar conhecimento aos europeus da exuberância de nossa fauna e de nossa flora. A maioria dos naturalistas destas expedições vieram com a incumbência de coletar espécimes de animais e de plantas para os museus europeus. Não se pode, entretanto, deixar de mencionar que a Europa já tinha conhecimento, há muito tempo, de plantas medicinais brasileiras, através da obra “*Historia Naturalis Brasiliae*” (Figura 5), mas foi a partir de então que a rica flora brasileira começou a ser estudada de forma sistemática e científica. (FREEDBERG, 1999).

Na comitiva que acompanhou a Arquiduquesa Leopoldina da Áustria, noiva de D. Pedro, veio o médico português Bernardino António Gomes (1768-1823), formado em Medicina pela Universidade de Coimbra, em 1793, qual prestou serviço vários anos no Brasil, na Armada Portuguesa. No Brasil fez valiosas observações botânico-médicas sobre plantas locais que lhe conferiram grande notoriedade. No Laboratório

Químico da Casa da Moeda, em Lisboa, isolou a cinchonina das cascas da quina, antes de Pelletier e Caventou terem isolado a quinina das cascas da mesma planta. A cinchonina foi o primeiro alcaloide natural sob a forma de base pura, na história da Química (COSTA, 1986).

Figura 5: Capa do livro “*Historia Naturalis Brasiliae*”



Fonte: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/02/Historia-Naturalis-Brasiliae.jpg>. Acesso em: 28/12/2015.

Nesta mesma expedição que veio a arquiduquesa, vieram o médico e botânico Carl Friederich von Martius e o zoólogo Johann Baptist Spix, dois dos iniciadores do estudo sistemático da flora e da fauna brasileiras que deixaram várias obras com destaque para a *Flora Brasiliensis*, onde estão descritas mais de 20.000 espécies botânicas. Martius teve influência direta no início das pesquisas fitoquímica no Brasil por sua sugestão o jovem farmacêutico alemão, Theodoro Peckolt, em 1847, veio para o Brasil para estudar a flora, sendo por seu trabalho fantástico pode ser considerado o pai da fitoquímica brasileira, além de ser o patriarca de uma família de cientistas notáveis que se entregaram de corpo e alma ao estudo químico de plantas brasileiras. O ano de 1874 pode ser considerado o ano do início dos estudos de química de produtos naturais no Brasil. Entre os muitos trabalhos de Peckolt pode-se destacar o isolamento do primeiro iridoide, chamado agoniadina, obtido de *Plumeria lancifolia*. (DOS SANTOS; PINTO; DE ALENCASTRO, 1998).

Este iridoide, muito comum na família Apocynaceae, é conhecido como plumerídeo (HALPEN; SCHMID; HELV, 1958).

Na época de Peckolt a atividade em química de produtos naturais estava voltada para a comercialização de remédios e se desenvolvia nos laboratórios das antigas boticas. Foi numa farmácia localizada no Rio de Janeiro que o farmacêutico Ezequiel Correia dos Santos, um dos responsáveis pela Sociedade Pharmacêutica, em 1833, isolou o alcaloide pereirina das cascas do pau-pereira (*Geissospermum velosii*) e em 1838, começou a comercializá-lo, tornando-se um pioneiro na obtenção de alcaloides. A casca desta árvore era empregada no combate à malária até o início do século XX (SANTOS, 1948; SANTOS, 1954).

O século XIX caracteriza-se pelos trabalhos de extração, principalmente de ácidos orgânicos e de alcaloides. Apartir de então, a humanidade depara-se com uma fonte terapêutica, muito diversa e inesgotável, presente nos vegetais. O isolamento da morfina (Figura 6) das folhas de papoula (*Papaver somniferum*) administrado como analgésico, em 1803-04, pelo farmacêutico Friedrich Wilhelm Adam Serturner, marcou o início do processo de extração de princípios ativos de plantas. A partir de então, outras substâncias foram isoladas. Joseph Pelletier em 1817 descreveu a emetina (Figura 7) isolada a partir da *Cephaelis ipecacuanha*, considerada um poderoso emético que, em doses menores pode ser utilizada como expectorante ou no tratamento das disenterias amebianas (MIGUEL; MIGUEL, 1999; SIMÕES, 1999). Em 1818, os farmacêuticos Pelletier e Caventou isolaram a estricnina (Figura 8) a partir da *Strychnos nux-vomica* e a quinina (Figura 9) e a quinidina (Figura 10) obtidas da *Cinchona* spp, em 1819, um dos primeiros antimicrobianos utilizado no tratamento da malária (MOTHES; LUCKNER, 1985; PARKY, 1966; TAVARES, 1966).

Figura 6: Estrutura química da Morfina

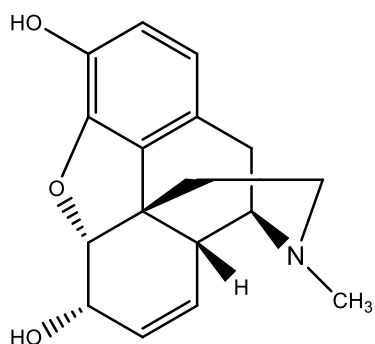


Figura7: Estrutura química da Emetina

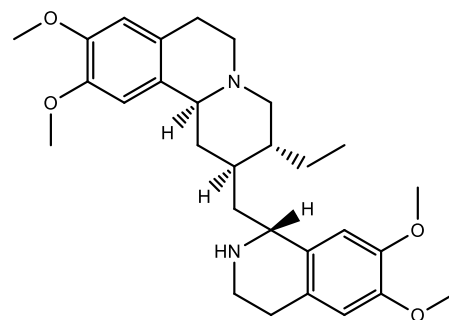


Figura 8: Estrutura química da Estricnina

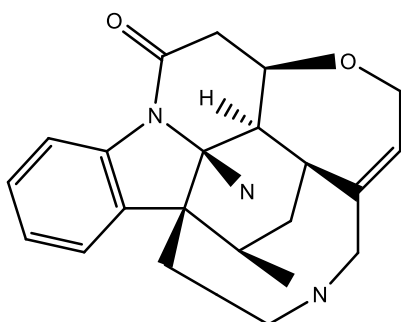


Figura 9: Estrutura química da Quinina

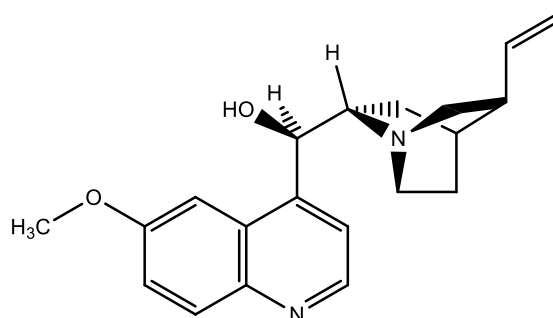
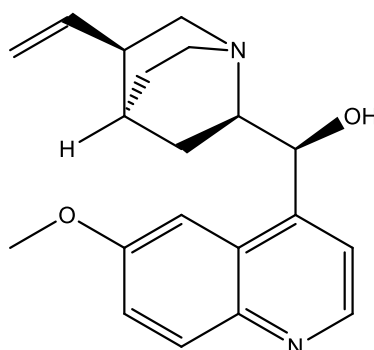


Figura 10: Estrutura química da Quinidina



Fonte: O autor (2016)

Na Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro, Domingos José Freire Júnior (1842-1899), catedrático da cadeira de Química Orgânica e Biológica (1874-1895), dedicou-se ao estudo das plantas e além de suas obras didáticas, deixou uma série

de publicações científicas, algumas dessas na área de fitoquímica, descrevendo, por exemplo, a grandiflorina isolada da fruta do lobo (*Solanum grandiflora*) (MORS, 1997). Esse alcaloide é hoje conhecido pelo nome de solasonina (MOTIDOME; LECKING; GOTTLIEB, 1970). Outro pesquisador solitário que tem seu nome ligado à química de produtos naturais é o farmacêutico Pedro Batista de Andrade (1848-1937), um dos fundadores da Faculdade de Farmácia da Universidade de São Paulo. Este pesquisador realizou, entre muitos outros, estudos sobre a composição química do café (VALLE, 1978).

Embora tenha sido comumente usada, desde a antiguidade, a origem e a biogênese dos compostos vegetais ainda não eram bem estabelecidos. Por muito tempo, imaginava-se que as substâncias presentes nos extratos vegetais não tinham uma função específica para a planta, por esta razão foram inicialmente caracterizadas como produto sem valor, resultado de um erro metabólico ou ainda produtos de desintoxicação do vegetal (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Após a Segunda Guerra Mundial a disponibilidade de carbono radioativo (^{14}C) para estudos de biossíntese de Produtos Naturais imprimiu um enorme avanço neste campo. Até então, as vias biogenéticas eram de natureza especulativa. No entanto, apesar de todo empirismo, as primeiras propostas feitas por Robinson, durante as primeiras décadas do século XX, sobre as rotas de biogênese de algumas classes de alcaloides, foram comprovadas experimentalmente muitos anos depois. Robinson, em 1929, sugeriu pela primeira vez uma provável origem biogenética da porção pirrolizidínica dos alcaloides de *Senecio* sp, propondo o aminoácido ornitina como o precursor de duas unidades C-4 que acoplariam para gerar as necinas (ROBINSON, 1975). Tal precursor foi comprovado por experiências que se seguiram com a incorporação do aminoácido marcado em *Senecio isatideus* e *Crotolaria spectabilis* (HUGHES; LETCHER; WARREN, 1974). Entre as várias contribuições advindas do emprego de ^{14}C em investigações de biossíntese podem-se destacar a elucidação das primeiras etapas químicas da fotossíntese, a ciclização de esqualeno a triterpenos, a degradação de lanosterol a esteróis e a biossíntese de colesterol (PINTO, 2002).

Seguindo na década de XX e nos dias de hoje, com o aumento do conhecimento e a descoberta de novos metabólitos, ficou clara a importância dessas substâncias para a vida das plantas. Este período foi prospero para o

desenvolvimento dos fármacos sintéticos, a partir deste metabólitos isolados, como os anti-histamínicos, antipsicóticos, antidepressivos e os ansiolíticos benzodiazepínicos. A indometacina um importante fármaco antiinflamatório não-esteróide de natureza indólica, surgiu nesta época (1962), dando início ao desenvolvimento dos fármacos antiinflamatórios não-esteroidais (NSAIDs). No entanto, nesta época, os produtos naturais observaram um período de declínio em termos de investimentos e interesse da indústria farmacêutica (Montanari, 2001).

A síntese de novas substâncias a serem bioensaiadas, na busca de novos fármacos, passou a ser cara demais, visto o pequeno número de novos compostos que venciam as etapas pré-clínicas e clínicas, chegando ao mercado como medicamentos. Neste novo cenário, a indústria farmacêutica passou a investir pesadamente em novos métodos de pesquisa de novas entidades químicas bioativas (bioNCEs), com efetiva potência terapêutica. As novas técnicas genéticas e a biologia molecular permitiram o isolamento e a purificação de muitas enzimas, receptores diretamente associados a processos patológicos, representando autênticos alvos-moleculares para novos fármacos (YUNES, 2001). Estes progressos permitiram a adoção de sistemas de testes em batelada, possibilitando que milhares de novas substâncias, obtidas, geralmente, por química combinatória, pudessem ser avaliados *in vitro* (SHU, 1998). Esta nova abordagem promoveu uma autêntica revolução na forma de concepção da síntese orgânica praticada até então na indústria farmacêutica (SHU, 1998; YUNES, 2001). A natureza, de um modo geral, é a responsável pela produção da maioria das substâncias orgânicas conhecidas, entretanto, o reino vegetal é responsável pela maior parcela da diversidade química conhecida e registrada na literatura. A variedade e a complexidade das micromoléculas que constituem os metabólitos secundários de plantas ainda é inalcançável por métodos laboratoriais. Isto seria a consequência direta de milhões de anos de evolução, atingindo um elevado refinamento, uma vez que as plantas por não poderem se deslocar buscando proteção, quando submetidas à situações desfavoráveis ou de estresse, produzem estratégias de defesa. Muitos autores ressaltam que, uma das maneiras desses organismos lidarem com essas situações de estresse é através de substâncias que possibilitem, de alguma maneira, adapta-se aos desafios. Dentre essas substâncias estão os metabólitos secundários (SANTOS, 2015).

Estes compostos não são considerados essenciais ao metabolismo basal da célula, por isso a designação de metabólitos secundários, mas desempenham papel na interação das plantas com o meio ambiente (PERES, 2004). A produção desses componentes tem como função proteger a planta contra herbívoros, ataque de patógenos, bem como beneficiá-la na competição com outros vegetais. Além disso, favorecem a atração de polinizadores, de animais dispersores de sementes, bem como microrganismos simbiontes. Acrescidos a estes fatores bióticos, a produção de metabólitos secundários também protege o vegetal de influências externas, como temperatura, umidade, proteção contra raios ultravioleta (UV) e deficiência de nutrientes minerais (PERES, 2004; SIMÕES et al., 2010). Apresentam um padrão de distribuição restrito a alguns grupos taxonômicos, no caso, cada família, gênero, e espécie produzem uma categoria química característica ou uma mistura delas, as quais, podem ser utilizadas como caracteres taxonômicos na classificação das plantas (BELL et al., 1980; WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA; KOWALSKA, 2008).

2.2 APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS DOS METABÓLITOS DE PLANTAS

2.2.1 Antimicrobianos

Os metabólitos secundários vegetais destacam-se na área da farmacologia devido a seus efeitos biológicos sobre a saúde da espécie humana, contribuíram para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, apresentando mecanismos de ação independentes para os diversos processos infecciosos, anti-inflamatórios, analgésicos e antipiréticos. Um agente antimicrobiano ideal exibe toxicidade seletiva e isto implica que uma substância deve ser eficiente contra a bactéria alvo, porém seguro quanto à toxicidade ao paciente, como podemos observar nos vegetais (BROOKS et al., 2008; SILVA, 2016; SOFIATI, 2009). O mecanismo de ação da maioria dos antimicrobianos não está totalmente esclarecido, mas, podem ser divididos em 4 categorias: (I) inibição da síntese da parede celular; (II) inibição da função da membrana celular; (III) inibição da síntese de proteínas; (IV) inibição da síntese de ácidos nucleicos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2003; BLACK, 2002; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; MADIGAN et al., 2010).

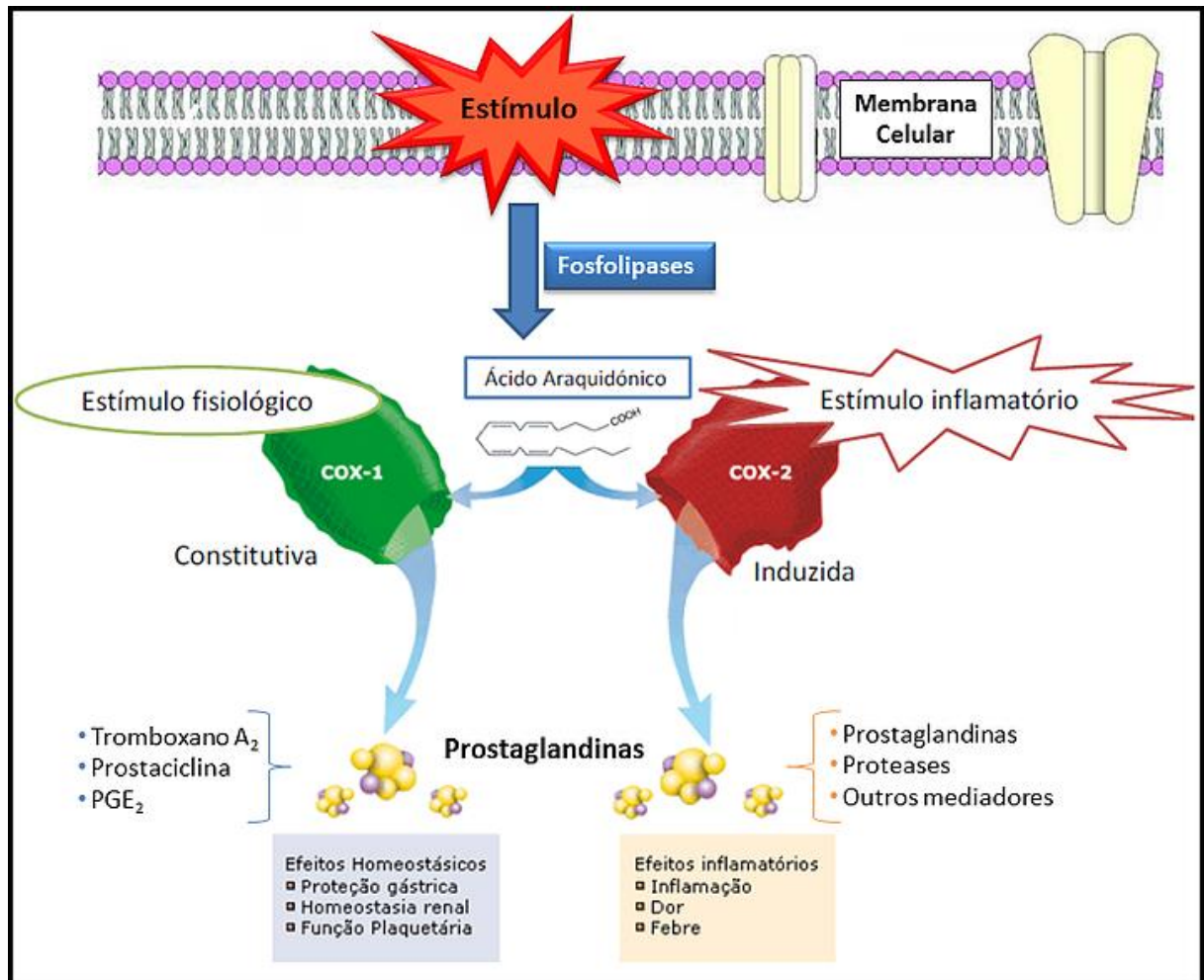
Os produtos do metabolismo secundário acumulado pelas plantas podem atuar de duas formas: como “potencializadores de atividade antibacteriana”, favorecendo a atividade de antibióticos cuja ação encontra-se limitada por mecanismos de multirresistência desenvolvidos pelos micro-organismos; ou como “atenuantes de virulência”, adequando a resposta do sistema imune do hospedeiro à infecção (GONZÁLEZ-LAMOTHE et al., 2009). A resistência aos antimicrobianos é um processo genético relacionado à existência de genes no micro-organismo que codificam diferentes mecanismos e evitam a ação dos medicamentos. Ela pode ter origem em mutações que ocorrem no micro-organismo durante seu processo reprodutivo ou através do intercâmbio de material genético (transferência horizontal gênica – THG) através da conjugação, transdução e transformação (UETANABARO; GÓES-NETO, 2006). As bactérias também podem desenvolver resistência aos antibióticos por meio de alguns mecanismos bioquímicos já bem difundidos na literatura (JACOBY, 2005; MIN et al., 2007). Os mecanismos incluem: modificação química do antibiótico, através de enzimas específicas; alteração do sítio de ligação do antibiótico; substituição do sítio de ligação do fármaco; diminuição da permeabilidade ao antibiótico; aumento da síntese de substrato com o qual o fármaco compete; síntese de proteínas protetoras dos ribossomos.

2.2.2 Processo inflamatório

Dentre as diversas aplicações terapêuticas dos metabólitos de plantas pode-se citar também suas indicações relacionadas à inibição da inflamação, a antipirese, a analgesia e a suas propriedades antioxidantes. A inflamação (Figura 11) consiste em uma resposta tissular frente à qualquer tipo de lesão, e se inicia com a formação de ácido araquidônico (AA) a partir de fosfolipídeos de membranas celulares, por uma enzima denominada de fosfolipase A₂ (PLA₂). Posteriormente, o AA dará origem aos mediadores inflamatórios por duas vias: I - Via das cicloxigenases (COX), produzindo prostaglandinas (PGs), prostaciclina (PI) e tromboxanos (TXs) e II - Via das lipoxigenases (LOX), derivando daí a formação de leucotrienos (LTs). PGs, PI, TXs e LTs são os principais mediadores responsáveis pela resposta inflamatória, sendo denominados de prostanoídes. Esses mediadores são responsáveis não só pela produção do processo inflamatório, como também são importantes em eventos fisiológicos como a modulação da secreção ácida gástrica, desempenhando fundamentais papéis na homeostase do organismo. Há duas

isoformas de COX: a COX I, relacionada aos processos fisiológicos e a COX II produzida pelos tecidos em resposta a uma lesão, iniciando o processo inflamatório. Sabe-se, porém, que ambas as isoformas, a COX I e a COX II, são expressas tanto pelos tecidos normais como nos tecidos inflamados (FERREIRA, 2009).

Figura 11: Cascata inflamatória a partir do ácido aracdônico



Fonte: <https://fenilbutazonacaval.wix.com>. Acesso em: 06/02/2015.

O processo inflamatório é composto de três fases, cada qual mediada por diferentes mecanismos: uma fase aguda, caracterizada principalmente por vasodilatação local e aumento da permeabilidade vascular; uma fase tardia, com a infiltração de leucócitos e células fagocitárias e a fase proliferativa crônica, na qual ocorre degeneração tecidual e fibrose. Na fase aguda a inflamação causada pelos prostanoides excede certos níveis, quantidades suficientes desses mediadores endógenos entram na circulação sistêmica e são disseminados pelo sangue a

diferentes órgãos. Isso resulta numa complexa variedade de reações sistêmicas, uma resposta multifatorial do organismo a infecções, lesões ou traumas. Estas respostas incluem o desenvolvimento da dor, febre, perda do apetite, aumento do ciclo de sono, diminuição da atividade motora e diminuição do comportamento de alerta (ROTH et al., 2009).

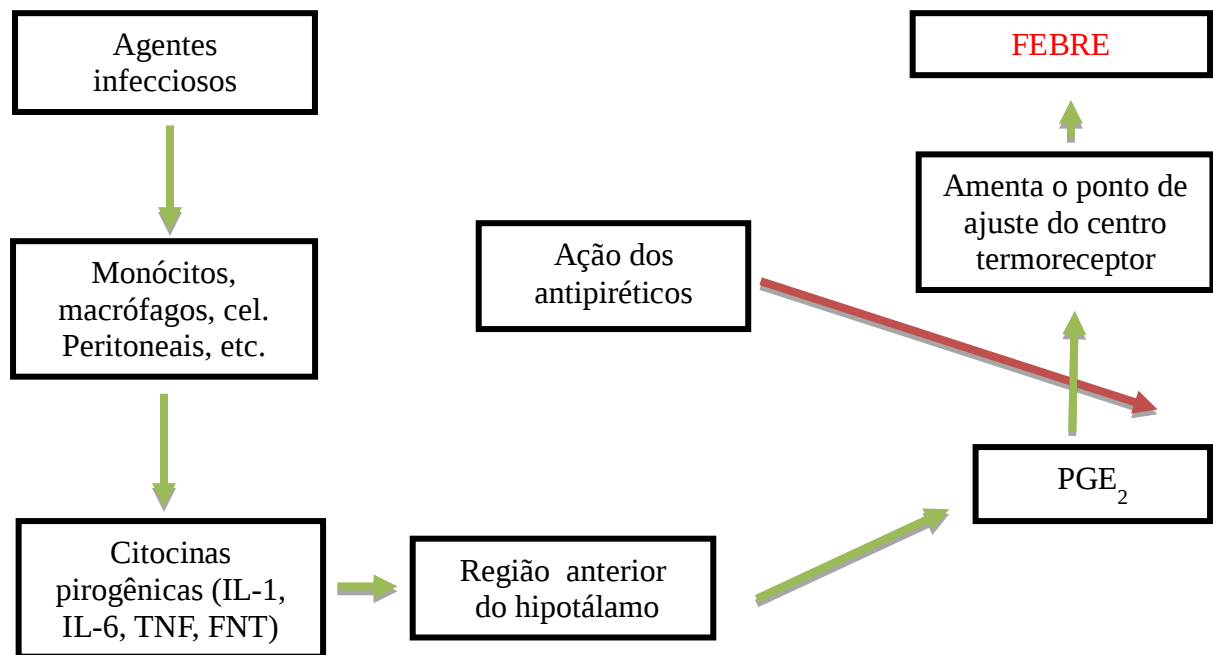
2.2.3 Febre

A febre pode ser definida como uma elevação controlada da temperatura corporal em resposta a uma lesão, trauma ou invasão de agente infeccioso. Essa elevação regulada da temperatura interna do organismo para níveis acima dos normais ocorre em decorrência da alteração do balanço térmico modulado pelo hipotálamo (DINARELLO et al., 1988). O aumento da temperatura corporal ocorre para se adequar ao elevado *set point*, ou seja, o corpo se organiza para manter a temperatura elevada (devido a elevação do ponto de ajuste da temperatura), através de mecanismos que garantam a produção e a conservação de calor (ROTH, et al., 2009).

Os pirógenos exógenos ao entrarem no hospedeiro, causam febre através da formação e liberação de citocinas pirogênicas pelos leucócitos (Figura 12). O sistema imune inato, predominantemente associado com neutrófilos, monócitos e macrófagos, representam a primeira linha de defesa contra uma variedade de patógenos. A presença no hospedeiro de patógenos que representem risco de infecção são reconhecidos por padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs). Membros da família de receptores Toll- like (TLR) são receptores chave para reconhecimento dos PAMPs (XI; RAMIREZ; DIMOPOULOS, 2008).

Os mecanismos de transdução de sinal do TLR e, possivelmente, de outras células levam a produção das citocinas inflamatórias no hospedeiro infectado (HÜBSCHLE et al., 2006; KANASHIRO, et al., 2008). Essas citocinas e outros mediadores inflamatórios, como as interleucinas IL-1, IL-6, TNF- α e interferons, estão implicadas na febre e são chamados pirógenos endógenos (ROTH et al., 2009). Estes afetam, direta ou indiretamente, a termogênese, através de sua ação no centro termorregulatório da área pré-óptica anterior do hipotálamo anterior (POA-HA). A produção da febre a partir desses mediadores vai depender da produção hipotalâmica de PGs (SOUZA et al., 2002; KANASHIRO, et al., 2008).

Figura12: Mecanismo da febre e ação dos antipiréticos



Fonte: Roth et al. (2009)

2.2.4 Processo de dor

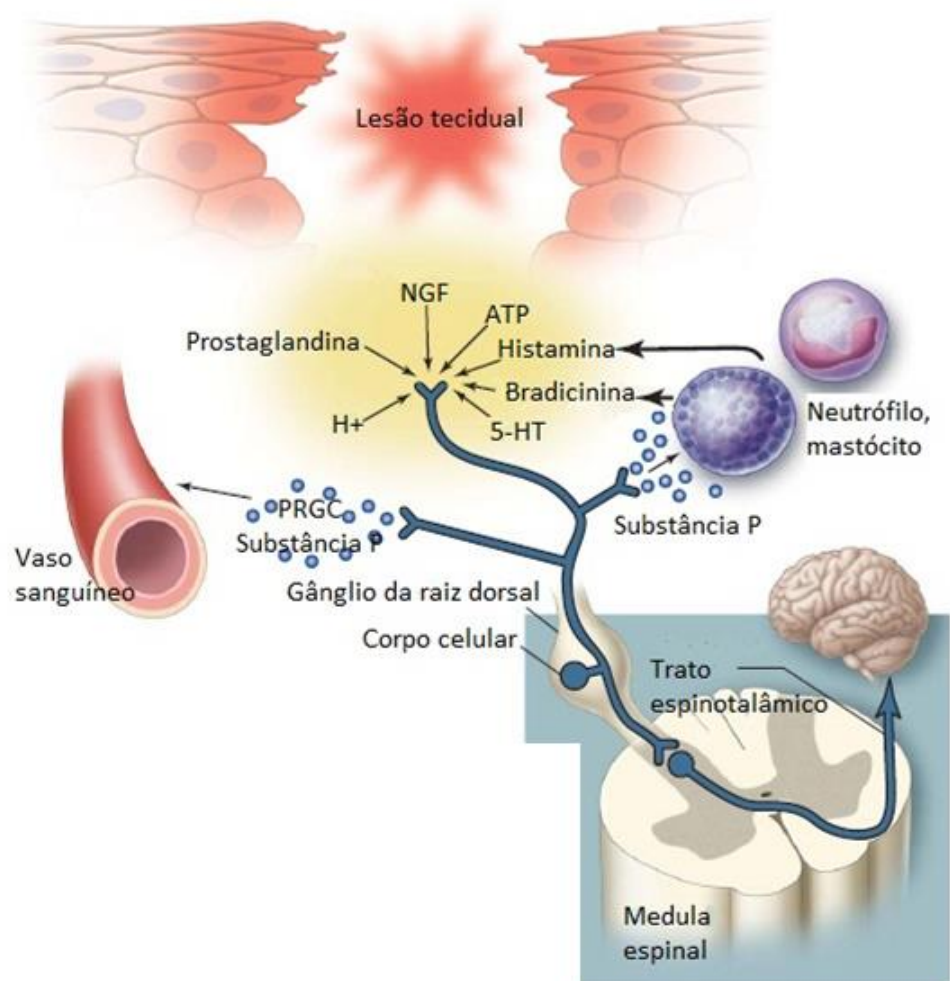
O estímulo inflamatório ou a lesão tecidual irão promover a liberação de citocinas, que disparam a liberação dos mediadores finais, que são prostanoídes e aminas simpatomiméticas responsáveis pela resposta de dor (VERRI et al., 2006). A dor é um dos sinais clássicos do processo inflamatório e decorre da sensibilização dos nociceptores. A percepção da dor é a integração funcional dos sinais da via da dor, modulado por condições psicológicas, motivacionais e emocionais, além da história individual. A nocicepção ou a sensação nociceptiva resulta da ativação de subpopulações de neurônios sensoriais primários específicos que transmitem a informação nociceptiva para o cordão espinhal, sendo retransmitido até o córtex (VERRI et al., 2006).

Nocicepção de forma simplificada, pode ser considerado como uma cadeia de três etapas, com o neurônio de primeira ordem originada na periferia (transdução) e projetando-se para a medula espinhal, o neurônio de segunda ordem ascende pela

medula espinhal (transmissão) e o neurônio de terceira ordem projeta-se para o córtex cerebral (modulação) (TRANQUILLI, 2004).

Dessa forma, a dor periférica é iniciada pela endotelina, substância P, histamina e pela bradicinina, sendo ampliada pela ação das PGs, principalmente a PGE2 e a PGI2, através da ligação a receptores nociceptivos (Figura 13). A PGI2 está relacionada com a hiperalgesia imediata e de curta duração, enquanto a PGE2 se relaciona com a hiperalgesia longa, que pode persistir por até 6 horas (SPINOSA et al., 2006).

Figura 13 - Monitoramento dos transdutores nociceptores da dor e influência das condições teciduais.



ATP = trifosfato de adenosina; NGF = fator de crescimento de nervo; NO = óxido nítrico; PRGC = peptídeo relacionado ao gene da calcitonina.

Fonte: Sann; Pierau, 1998.

2.2.5 Antioxidantes

Os antioxidantes naturais estão presentes em frutos, sementes, folhas e raízes de plantas, inibindo a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais estão implicadas em várias fisiopatologias. Os compostos antioxidantes podem ser definidos como substâncias que, quando presentes em pequenas concentrações em relação ao substrato oxidável, são capazes de retardar ou mesmo inibir substancialmente a oxidação do substrato. Naturalmente, alguns antioxidantes são produzidos pelo corpo humano e outros podem ser adquiridos pelo consumo de alimentos (NIKI, 2010).

Células vivas geram EROs como resultado das alterações fisiológicas e processos bioquímicos, a produção excessiva de EROs e reações que levam a produção de radicais livres pode levar ao estresse oxidativo celular, através da oxidação de PTNs, ácidos nucleicos e lipídios da membrana podendo causar doenças degenerativas ou patologias (DEEPA et al., 2012). Radicais livres mais estudados: radical hidroxila – OH^* , ânion superóxido – O_2^{*-} , radical peroxil – ROO^* , radical alcóxil – RO^* e óxido nítrico – NO^* . Entre esses radicais livres, o OH^* e O_2^{*-} são os que têm maior importância biológica, pois são formados durante o processo normal ou exacerbados da redução de oxigênio molecular (O_2) no interior das mitocôndrias. Embora o O_2 não seja um radical livre, pode favorecer a formação de espécies radicalares (FUSCO et al., 2007; JOMOVA; VALKO, 2011).

De acordo com seu modo de ação, os antioxidantes podem ser classificados em primários e secundários. Os primários atuam interrompendo a cadeia da reação através da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, convertendo-os em produtos termodinamicamente estáveis e/ ou reagindo com os radicais livres, formando o complexo lipídio-antioxidante que pode reagir com outro radical livre. Os antioxidantes secundários atuam retardando as etapas de iniciação da autooxidação, por diferentes mecanismos que incluem complexação de metais, sequestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos para formar espécie não radical, absorção da radiação ultravioleta ou desativação de oxigênio singletes (SOUSA et al., 2007)

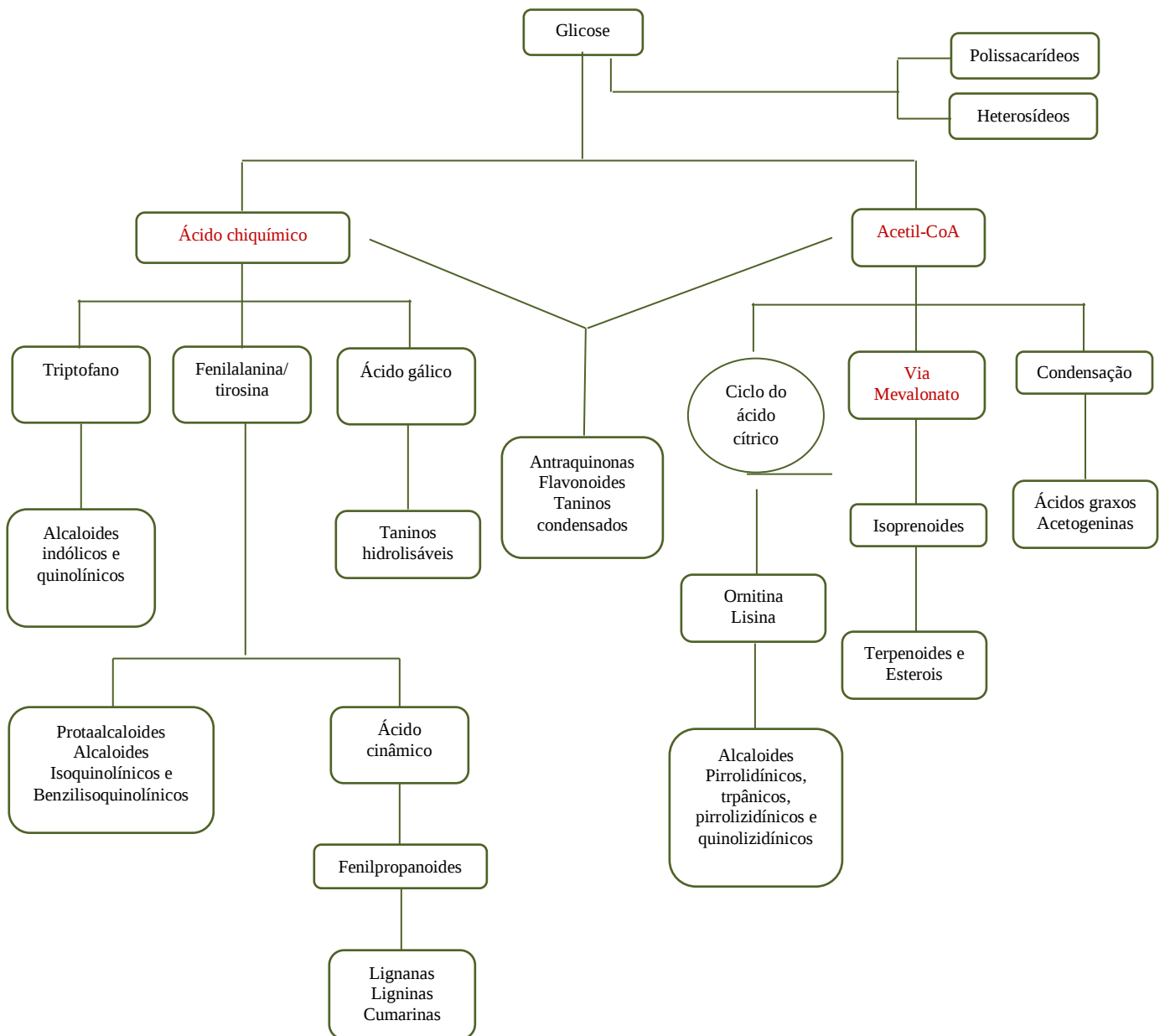
Em razão das diferentes formas de atuação nos organismos vivos, dificilmente existirá um método simples e universal pelo qual a atividade antioxidante possa ser medida precisa e quantitativamente. Os testes geralmente utilizados são

TRAP - *Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter*, ORAC - *Oxygen-Radical Absorbancy Capacity*, FRAP - *Ferric-Reducing Ability of Plasma* e TEAC - *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* e DPPH - *2,2-diphenil-1-picrilhidrazil* (VASCONCELOS et al., 2007).

2.3. CLASSE DOS METABÓLITOS DE PLANTAS

O estudo dos mecanismos de alguns processos biológicos que atingem a saúde da humanidade, pode-se entender as diversas propriedades farmacológicas dos extratos vegetais, o que esta relacionada ao seu metabolismo secundário, que é a capacidade biossintética dos vegetais tanto em relação a quantidade de substâncias, quanto em diversidade destas em um mesmo vegetal. Dentre os metabólitos secundários existem três grandes classes: os terpenos, os alcaloides e os compostos fenólicos. Apesar da diversidade, toda essa gama de substâncias produzidas é sintetizada a partir de quatro vias metabólicas principais (Figura14): via do acetato-malonato, via do acetato-mevalonato e a via do ácido chiquímico. E para todas essas vias, os seus precursores (blocos construtores) são provenientes do metabolismo primário, no caso o conjunto de reações ligado aos processos vitais de respiração, fotossíntese e formação de novos tecidos nas plantas, responsáveis pela síntese dos carboidratos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos (DEWICK, 2009). A origem de todos os metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, duas vias intermediárias principais: o ácido chiquímico e o Acetil-CoA (SANTOS, 2010).

Figura 14: Ciclo biosintético dos metabólitos secundários



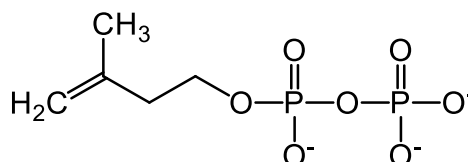
Fonte: O autor (2016)

O ácido chiquímico é precursor de taninos hidrolisáveis, cumarinas, alcaloides derivados dos aminoácidos aromáticos e fenilpropanoides, compostos que têm em comum a presença de um anel aromático na sua constituição; ao passo que os derivados do acetato são os aminoácidos alifáticos e os alcaloides derivados deles;

terpenoides, esteroides, ácidos graxos e triglicerídeos (LEITE, 2008). Geralmente, estas substâncias não se encontram na planta em estado puro, mas sob a forma de complexos, cujos diferentes componentes se completam e reforçam sua ação sobre o organismo. No entanto, mesmo quando a planta medicinal só contém uma substância ativa, esta tem sobre o organismo humano um efeito mais benéfico, devido sua falta ou baixa toxicidade, que o produzido pela mesma substância obtida por síntese química. Esta propriedade apresenta um grande interesse para a fitoterapia, tratamento através das plantas ou das substâncias de origem vegetal (ELISABETSKY; SOUZA, 2007).

O maior grupo de produtos naturais consiste nos isoprenoides, compreendendo mais de um terço de todos os compostos conhecidos, os metabólitos derivados do mevalonato (KLEINIG, 1989; MUHLBAUER et al, 1998). Todos os terpenos são formados pela fusão de unidades isoprênicas de cinco carbonos que, quando submetidos a altas temperaturas, podem se decompor em isoprenos (Figura 15) (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Figura 15: Estrutura química do isopentenilpirofosfato



Fonte: O autor (2016)

A classificação dos terpenos pode ser feita de acordo com o número de unidades de isopreno que vão se ligando entre si, orientadas em sentido inverso (cabeça-cauda) podendo ser: hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30) e carotenoides (C40) (PERES, 2008). A maioria dos óleos voláteis é constituída de derivados de terpenoides. Os hemiterpenoides são o menor grupo dos terpenos, o seu representante mais conhecido e estudado é o isopreno, um produto volátil liberado de tecidos fotossinteticamente ativos (CROTEAU et al., 2000).

Os monoterpenos são compostos por duas unidades de isopreno. Devido a seu baixo peso molecular, costumam ser voláteis, sendo, portanto, os constituintes dos óleos essenciais e das essências voláteis, atuando principalmente na atração de

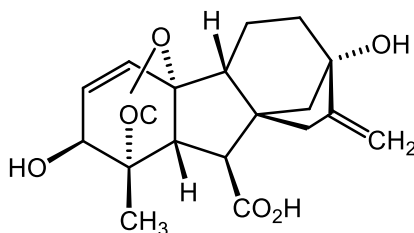
polinizadores. Podem ser isolados através de destilação ou extração e atualmente são conhecidos mais de 1.000 monoterpenoides naturais (OLIVEIRA et al., 2003). Os sesquiterpenos, em geral, podem atuar como compostos antimicrobianos contra fungos e bactérias (fitoalexinas) e anti-herbivoria (NIERO; MALHEIROS, 2007). Estes compostos são os mais frequentes nos óleos voláteis.

Comum por sua atividade antimicrobiana, o mecanismo pelo qual a maioria dos óleos essenciais exercem essa ação é através de sua atividade na estrutura do envoltório celular bacteriano, desnaturando e coagulando as proteínas. Mais especificamente, atuam alterando a permeabilidade da membrana citoplasmática por íons hidrogênio (H^+) e potássio (K^+). A alteração do gradiente iônico conduz a deterioração dos processos de geração de energia microbiana e consequentemente morte bacteriana (DORMAN; DEANS, 2000). Esse mecanismo pode ser observado em estudo realizado por Hyldgaard; Mygind; Meyer (2012) utilizando o carvacrol, um monoterpeno fenólico isolado do orégano, sua atividade antimicrobiana está relacionada ao aumento da fluidez da membrana plasmática, devido a alterações na composição dos ácidos graxos da membrana.

Trabalhos de Park et al. (2011) e Sain et al. (2014) mostraram que o β -cariofileno, um sesquiterpeno, em células de linfoma e neuroblastoma na concentração de 50 $\mu g.m/L$ foi capaz de inibir o crescimento e induzir apoptose celular, uma característica marcante da morte por apoptose é a fragmentação do DNA, por ativação de endonucleases. Murata et al. (2013) mostraram que o monoterpeno eucaliptol (50 mM), também presente no extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* L, foi capaz de ativar p38 e caspase-3, induzindo a apoptose e suprimindo a proliferação tumoral em células de câncer colorretal humano (HT-29).

Os diterpenoides compreendem um grande grupo de compostos não voláteis, possuindo uma vasta gama de atividades diferentes que incluem os hormônios, ácidos resínicos e agentes anticancerígenos (ROBBERS et al., 1997; CROTEAU et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2003). Peres (2004) descreve que talvez o principal papel desempenhado por um diterpeno seja o das giberelinas (Figura 16), um importante hormônio vegetal responsável pela germinação de sementes, alongamento caulinar e expansão dos frutos de muitas espécies vegetais.

Figura 16: Estrutura química da giberalina

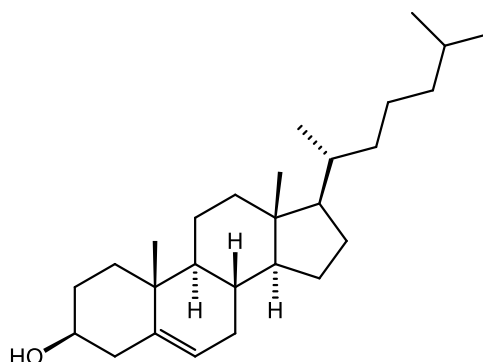


Fonte: O autor (2016)

O Esteviosídeo, um diterpeno glicosídico extraído da *Stevia rebaudiana* Bertoli, foi estudado quanto aos seus efeitos cardiovasculares em humanos em estudos duplo-cego controlado e concluiu-se que sua administração oral por 12 e 24 meses levou a redução dos níveis de pressão arterial sistólica, diastólica e média (CHAN et al., 2000; HSIEH et al., 2003). O mecanismo de ação do esteviosídeo consiste em bloqueio do influxo de cálcio extracelular (LEE et al., 2001) e liberação de prostaglandina vasodilatadora (TIRAPELLI et al., 2010).

Os triterpenoides formam os componentes das resinas, látex, ceras e cutícula das plantas. Entre os triterpenos está uma importante classe de substâncias, tanto para vegetais quanto para animais, trata-se dos esteroides (Figura 17), os quais são componentes dos lipídios de membrana e precursores de hormônios esteroides em mamíferos, plantas e insetos. Como exemplos de tetraterpenos, podem ser citados os carotenoides, e as xantofilas, pigmentos intimamente ligados aos processos fotossintéticos e especialmente, na pigmentação de flores e frutos. Existe ainda um grupo complexo de terpenos cujas moléculas são resultantes da síntese de mais de oito unidades de isoprenoides, ou seja, com mais de 40 carbonos na sua estrutura, estes são chamados de politerpenoides, que contêm compostos como ubiquinonas, poliprenoides e polímeros longos encontrados, por exemplo, no látex (ROBBERS et al., 1997; CROTEAU et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2003).

Figura 17: Estrutura química de fitoesteróis



Fonte: O autor (2016)

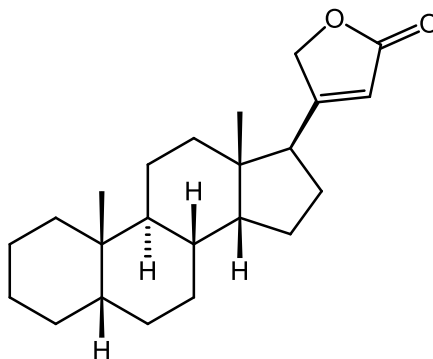
Os fitoesteróides são compostos com 28 ou 29 carbonos, diferindo do colesterol (27 carbonos) pela presença de uma ramificação metila ou etila adicional na cadeia carbônica. Os fitosteróis são semelhantes aos fitostanóis, dos quais diferem pela presença de insaturações. Sua grande similaridade com o colesterol parece ser responsável pela excreção fecal do colesterol dietético e consequente redução do colesterol sérico. Os efeitos dos esteroides vegetais na redução da colesterolemia têm sido amplamente estudados desde a década de 50 e são reconhecidas suas propriedades hipocolesterolêmicas (ARAÚJO, 2008).

Já foram identificados mais de 40 esteróis, sendo os mais abundantes em alimentos o β -sitosterol, o campesterol e o estigmasterol. Estão presentes em alimentos como soja, milho, trigo, frutos oleaginosos e óleos vegetais em geral, principalmente de canola, arroz e girassol. Dentre seus benefícios à saúde humana destaca-se a redução da absorção do colesterol da dieta, com consequente redução dos níveis sanguíneos; a redução do risco de doenças cardiovasculares; e inibição do crescimento de certos tipos de tumores malignos (SALGADO, 2009).

A estrutura química dos glicosídeos cardioativos é bastante peculiar, compreende três partes distintas: a) uma parte esteróide, denominada de aglicona ou genina; b) uma parte glicosídica ligada à genina pela hidroxila β do carbono-3; c) lactona (FRAGA; BARREIRO, 1996). A ação terapêutica dos glicosídeos cardioativos depende da estrutura da aglicona e do tipo e número de unidades de açúcares anexadas, aumentando a solubilidade em água e a ligação ao músculo cardíaco. Dois tipos de agliconas são conhecidos: os cardenolídeos (digitoxigenina) compostos de 23 carbonos e os bufadienolídeos (helebrigenina), com estruturas de

24 carbonos. Não há fontes alimentares para sua obtenção e são extraídos de plantas. Os efeitos dos glicosídeos cardioativos foram descobertos como resultado da sua aplicação no tratamento de edema, em que se observou, indiretamente, seu efeito sobre o coração, melhorando o suprimento sanguíneo aos rins, eliminando o excesso de fluido (SIMÕES et al., 2007).

Figura18: Estrutura química dos cardenolídeos



Fonte: O autor (2016)

Os carotenoides são uma família de pigmentos abundantemente encontrados na natureza, sendo os responsáveis pela cor da maioria das frutas e vegetais, que pode variar desde o amarelo até o vermelho vivo. Dos mais de 600 carotenoides existentes, aproximadamente 20 estão presentes no plasma e tecidos humanos, destacando-se: o alfa-caroteno, beta-caroteno, beta-criptoxantina, licopeno, luteína e zeaxantina (COZZOLINO, 2009). Esses compostos são importantes na dieta devido ao fato que muitos deles se convertem em vitamina A no organismo. Estudos têm demonstrado também que os carotenoides atuam como antioxidantes, protegendo as células dos danos oxidativos e, conseqüentemente, reduzindo o risco de desenvolvimento de algumas doenças crônicas (ARAÚJO, 2008).

Dos carotenoides já descobertos, cerca de 50 têm atividade biológica significativa como provitamina A, como o β -caroteno, que recebe maior atenção por possuir maior atividade de vitamina A. No entanto, muitos carotenoides com pouca ou nenhuma atividade de vitamina A (α -caroteno, licopeno), são estudados por seu potencial anticarcinogênico, devido a sua ação antioxidante. Estão presentes em frutas, ou em vegetais amarelos, alaranjados e vegetais folhosos verde escuros (ARAÚJO, 2008).

Os carotenos protegem os lipídios dos danos peroxidativos inativando o oxigênio singlete, sem sofrer degradação, através da reação com os radicais peroxila, hidroxila e superóxido. A atividade antioxidante dos carotenoides é decorrente da habilidade de deslocalizar elétrons desemparelhados através da estrutura de ligações duplas conjugadas (OMONI, 2005; SOUSA, 2007).

As saponinas são compostos que apresentam em sua estrutura uma parte com propriedades lipofílica (triterpeno ou esteroide) e outra parte hidrofílica, seu comportamento anfifílico e a capacidade de formar complexos com esteroides, proteínas e fosfolipídeos determinam um número variado de suas propriedades biológicas para essas substâncias, destacando-se a ação sobre membranas celulares, alterando a sua permeabilidade, ou causando sua destruição. Relacionadas com essa ação sobre a membranas, estão as atividades hemolíticas, ictiotóxica e moluscicida (SCHENKEL; GOSMANN; ATHAYDE, 2007).

A atividade mais comum das saponinas é a capacidade de produzir hemólise. Essa propriedade é resultado da interação das suas moléculas com o colesterol presente na membrana de eritrócitos, o que resulta na mudança conformacional da membrana e leva a uma penetração de íons e água na hemácia, com consequente rompimento celular e liberação de hemoglobina (GLAUBERT; DINGLE; LUCY, 1962; HARUNA et al., 1995). Segundo Jentsch et al. (1961) A atividade hemolítica foi apontada para um número significativo de saponinas, no entanto, a irritação causada nas mucosas tem impedido o desenvolvimento de aplicações. Dentre seus efeitos no organismo humano destacam-se os antioxidantes, em que se ligam a sais biliares e colesterol no tubo digestivo, impedindo sua absorção, além disso, possuem ação citotóxica atuando contra células tumorais (SCHENKEL; GOSMANN; ATHAYDE, 2007). Os principais alimentos em que são encontradas saponinas são soja e alimentos derivados desta, outras leguminosas, alfafa, espinafre, beterraba, aspargos, açafrão, amendoim, nozes e folhas de chás (SPARG; LIGHT; STANDEN, 2004).

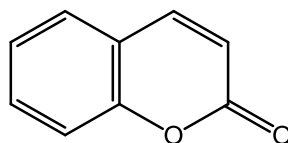
O papel biológico das lignanas nos vegetais ainda não é completamente conhecido, mas se acredita que esteja relacionado com a defesa do organismo e na regulação do seu crescimento. As diferentes estereoquímicas e padrões de substituição nos grupos arila contribuem na formação de diferentes estruturas que podem apresentar diversas atividades biológicas. Dentre as de maior interesse,

destacam-se as atividades antiviral, antifúngica, imunossupressora, antiasmática, antioxidante e citotóxica (KITAMURA; HIROKAWA; MAEZAKI, 2006).

Segundo Cardoso Carraro et al. (2012) a inserção de lignanas na dieta humana é muito importante. Um dos alimentos mais enriquecidos com essa classe de metabólitos é a semente de linhaça (*Linum usitatissimum*). Os efeitos benéficos de linhaça sobre o metabolismo do tecido adiposo e diminuição de gordura visceral são atribuídos à presença das lignanas nesta espécie. Outros alimentos, apesar de conterem uma quantidade menor de lignanas, também são importantes fontes destas substâncias, como a laranja e o café, e seu consumo diário está associado a inúmeros benefícios, principalmente na prevenção de alguns tumores.

As cumarinas são lactonas do ácido o-hidróxi-cinâmico, sendo que o principal representante é a 1,2-benzopirona (Figura 19), denominada simplesmente de cumarina. Estes constituintes vegetais são derivados do metabolismo da fenilalanina, tendo como precursores iniciais os ácidos cinâmico e p-hidróxi-cinâmico, a partir dos quais as cumarinas e seus derivados são biossintetizados (LOZHKIN; SAKANYAN, 2006).

Figura 19: Estrutura química da 1,2-benzopirona



Fonte: O autor (2016)

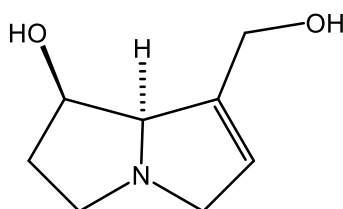
As cumarinas são de grande interesse para as indústrias farmacêuticas devido às suas diversas propriedades farmacológicas como: antioxidante, imunossupressora, antitumoral, anticoagulante, antiviral e anti-inflamatória (RIVIEIRO et al., 2010).

Estudos foram realizados por WITAICENIS et al. (2012) e demonstraram que a atividade anti-inflamatória intestinal do derivado cumarínico 4-metilesculetina está relacionada com a redução dos níveis de IL-1 β , inibição da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO), fosfatase alcalina e matrix metaloproteinase - 9 (MMP-9) e pela atividade antioxidante do composto, observada pela diminuição nos níveis de malondilaldeído (MDA) e por evitar a depleção do conteúdo de glutathiona total (GSH). Além disso, estudos *in vitro* demonstraram que a 4-metilesculetina promove

a inibição de IL-1 β , IL-8, IL-2 e IFN- γ em culturas de células RAW 264.7, Caco-2 e esplenócitos.

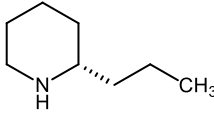
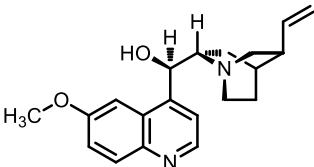
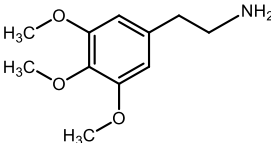
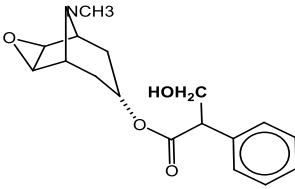
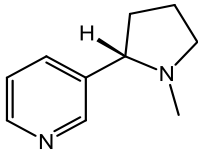
Os alcaloides, segundo maior grupo de metabólitos secundários, constituem-se num vasto grupo de compostos com grande diversidade estrutural, representando cerca de 20% das substâncias naturais descritas. Os alcaloides são compostos orgânicos cíclicos que possuem pelo menos um átomo de nitrogênio (N) em um estado de oxidação negativo e cuja distribuição é limitada entre os organismos vivos (Figura 20). São compostos encontrados predominantemente em angiospermas e farmacologicamente ativos (HENRIQUES et al., 2002). Estes produtos naturais de baixo peso molecular são derivados de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), os quais são derivados do ácido chiquímico, e também de aminoácidos alifáticos como a ornitina e a lisina (PERES, 2004), podendo ser classificados de acordo com o aminoácido precursor e sua forma estrutural (Tabela 2) (DEWICK, 2002).

Figura 20: Estrutura química de um alcaloide



Fonte: O Autor (2016)

Tabela 1: Principais classes de alcaloides sintetizados pelas plantas

Classe	Aminoácido precursor	Exemplos	Estrutura química
Piperidínicos	Lisina	Coniina, cassina, espectralina.	 Coniina
Indólicos	Triptofano	Quinina, vimblastina, vincristina.	 Quinina
Isoquinolínicos	Tirosina	Morfina, codeína, mescalina.	 Mescalina
Tropânicos	Ornitina	Atropina, hioscina, escopolamina.	 Escopolamina
Pirrolidínicos	Ornitina	Nicotina, higrina	 Nicotina

Fonte: Adaptado de FACCHINI; DE LUCA, 1998.

Esses metabólitos são de grande interesse para os pesquisadores, devido a heterogeneidade química do grupo, a distribuição restrita na natureza e ao grande potencial bioativo (ROBBERS et al., 1997). São encontrados em aproximadamente 14,2% dos gêneros de plantas superiores (CORDELL et al., 2001), principalmente em diversas partes de um vegetal como em tecidos com crescimento ativo, células epidérmicas e hipodérmicas, bainhas vasculares e vasos lactíferos (SIMÕES et al., 2010).

Apesar da existência de algumas características em comum, particularidades da bioquímica, biologia celular e biologia molecular comprovam as diferenças entre as subclasses de alcaloides. Enzimas envolvidas na catálise de reações em mamíferos compartilham de mecanismos de ação comuns onde cada uma pode agir sobre um amplo espectro de substrato ou sistema. Já as reações envolvidas na biossíntese dos alcaloides são catalisadas por enzimas estereoespecíficas (formação de somente um isômero, em detrimento de outro arranjo espacial), regiões específicas (formação de somente um de dois produtos possíveis), com ação determinada sobre substratos específicos. Os principais aminoácidos envolvidos nestes processos são lisina, ornitina, tirosina e triptofano. Sozinhos ou combinados com moléculas de secoiridoide, esteroide ou terpenoide, permitem a formação de diversas classes de alcaloides (FACCHINI; DE LUCA, 1998; YANG; STÖCKIGT, 2010).

Os alcaloides piperidínicos têm como aminoácido precursor a lisina, a partir da qual é formado um anel piperidínico, originado por perda de um grupo carboxílico e um átomo de nitrogênio (GUPTA; SPENCER, 1969). O triptofano é um aminoácido aromático derivado do corismato, sintetizado na via do chiquimato, e que por ação de descarboxilase, origina triptamina. A condensação de triptamina com secologanina produz strictosidina, molécula intermediária na síntese dos alcaloides indólicos. A quinina (*Cinchona officinalis*), camptotecina (*C. acuminata*), estricnina (*Nux vômica*), vincristina e vinblastina (*Catharanthus roseus*) são exemplos deste grupo (EL-SAYED; VERPOORTE, 2007).

Todos os alcaloides isoquinolínicos apresentam em sua composição núcleo tetrahydroisoquinolina, derivado da tirosina (FACCHINI; DE LUCA, 1995). Os alcaloides tropânicos e os alcaloides pirrolidínicos envolvem a participação de precursor comum na biossíntese, a putrescina, diamina derivada da descarboxilação do aminoácido ornitina (SATO et al., 2001).

Por sua variedade estrutural várias atividades biológicas são atribuídas aos alcaloides, como emetina (amebicida e emético), atropina, hiosciamina e escopolamina (anticolinérgico), reserpina e protoveratrina A (antipertensivo), quinina (antimalárico), camptotecina, vinblastina e vincristina (antitumorais), codeína e noscapina (antitussígenos), quinidina (depressor cardíaco), cafeína (estimulante do SNC), teobromina e teofilina (diuréticos), colchicina (tratamento da gota),

tubocurarina (miorrelaxante), efedrina (simpatomimético), castanospermina (antiviral) entre muitos outros (HENRIQUES et al., 1999).

Um dos mecanismos de ação desta classe de compostos pode estar correlacionado com a capacidade dos alcaloides de desestabilizar as membranas biológicas justificando sua atividade fúngica (SIMÕES, 2010). Alcaloides que apresentam atividade antitumoral inibem a síntese de DNA e RNA e proteínas, provavelmente, por intercalação na dupla hélice do DNA e por ligação com ácidos nucléicos. Os alcaloides diméricos de *Catharanthus* (vincristina e vinblastina) são usados na terapia de várias doenças neoplásicas, causando parada da divisão celular durante a metáfase devido a sua ligação específica com a tubulina, inibindo a polimerização (SIMÕES, 2010).

Estudo realizado por Hatae et al. (2015) com o alcaloide normalmente isolados de plantas das famílias Rutaceae, Papaveraceae e Fumariaceae apresentam atividade antiproliferativa potente contra células cancerígenas, células HCT-116 de tumor de cólon e HL-60 de leucemia promielocítica, por sua capacidade para inibir de topoisomerase, isto é, os alcaloides nitidina e fagaronina causam a morte de células tumorais por inibir as topoisomerases I e II (LARSEN et al., 1993; KHADKA; CHO, 2013) A queleritrina tem efeito tóxico nas células tumorais e atrasa seu crescimento através da inibição da proteína ciinase C, enzima que catalisa a fosforilação de proteínas (SOBRINHO, 2013).

A brucina, um alcaloide de *Strychnos nux-vomica* L. possui propriedades analgésica e anti-inflamatória, diante de um trauma tissular, o acúmulo local de prostaglandinas (PGs), tromboxanos (TXs) e outros mediadores químicos ocasionam a sensibilização periférica da dor, que se caracteriza por uma alteração no limiar de nociceptores, provocando dor, eritema, aumento da temperatura local e edema, como uma resposta aguda ao processo inflamatório estabelecido (SAKATA, ISSY, 2008; SMITH et al., 1998). A brucina pode inibir significativamente a liberação de PGE₂ em processo inflamatório e na dor induzida por ácido acético, reduz a permeabilidade vascular (YIN et al., 2003), o que pode explicar por sua propriedade analgésica e anti-inflamatória.

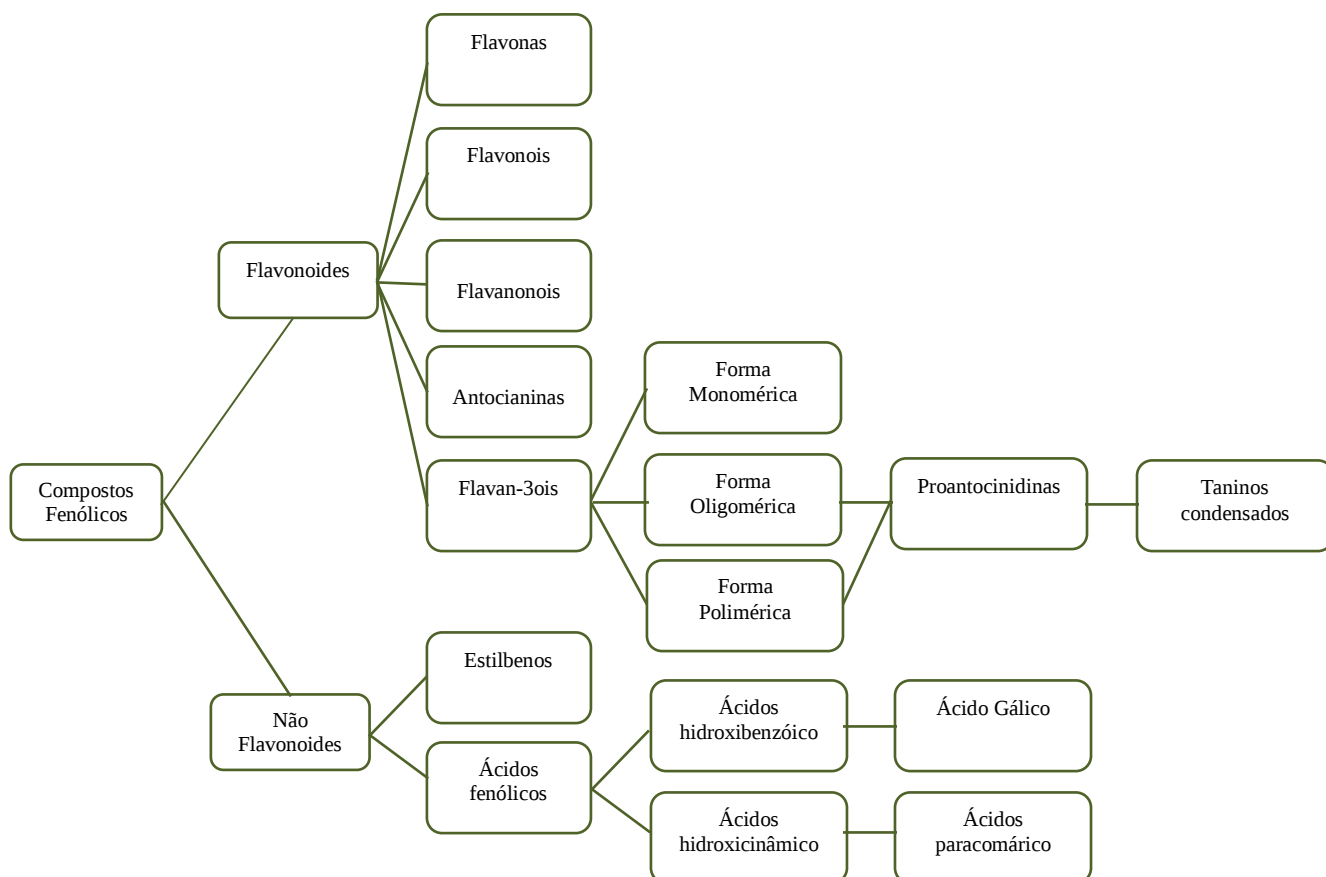
O organismo possui várias regiões e estruturas que são responsáveis em modular mecanismos intrínsecos da sensação dolorosa, após a sensibilização dos diversos núcleos do tálamo, os sinais são propagados para as diferentes áreas do

córtex, substância cinzenta pariaquedutal, hipotálamo, amígdala e cerebelo (MERSKEY, 1994). Princípio ativo da *Papaver somniferum*, a morfina age em nível de sistema nervoso central, por sua ação hipnoanalgésica, seu mecanismo de ação ocorre como consequência de sua interação com receptores específicos μ (mu), δ (delta), e κ (kapa), localizados em diversos pontos do sistema aferente e eferente, que participam da transmissão da sensibilidade dolorosa e modulam a informação nociceptiva (PICKER et al., 1992; WONG et al., 2000).

Os compostos fenólicos estão amplamente distribuídos no reino vegetal e desempenham funções essenciais no processo de polinização, no crescimento celular, na defesa contra pragas, contra infecções microbianas, na proteção contra radiações ultravioleta, e na modelação da distribuição de hormônios e como moléculas de sinalização para micro-organismos simbióticos (BRAND-WILLIAMS et al., 1995). A diversidade estrutural dos compostos fenólicos (Figura 21) deve-se a grande variedade de combinações que acontece na natureza, e estas combinações podem ser categorizadas em várias classes, dentre elas destacam-se os flavonoides, os ácidos fenólicos e os taninos, como os mais comuns antioxidantes fenólicos de fonte natural (ÂNGELO; JORGE, 2007).

Estudos *in vivo* e *in vitro* apontam os flavonoides como moléculas supressoras da carcinogênese, e alguns tm a capacidade de interagir sobre a gênese do câncer, bloqueando o estágio de promoção através da inibição da síntese da ornitina-descarboxilase. As classes que tem apresentado atividade antitumoral são: flavanonas, flavanóis, flavonas, flavonóis e isoflavonas (HUNG, 2010).

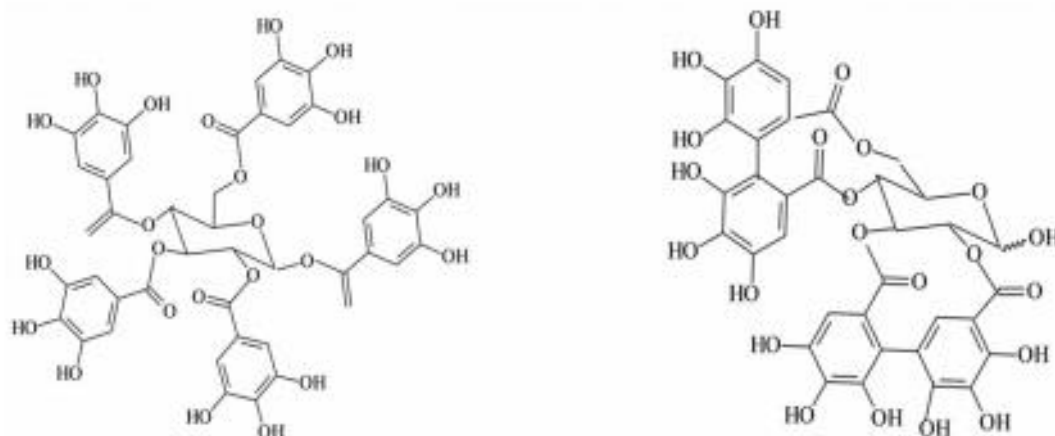
Figura 21: Classificação química dos compostos fenólicos a sua divisão nos grandes grupos



Fonte: O autor (2016)

Os taninos, uma classe de compostos fenólicos, originados diretamente do metabolismo do carbono. São importantes componentes gustativos, sendo responsáveis pela adstringência de muitos frutos e produtos vegetais. Estes são classificados em dois grupos principais, cujas estruturas são muito diferentes entre si, embora todos tenham em suas moléculas grupos poli-hidroxifenóis. Os pertencentes ao primeiro grupo são denominados taninos hidrolisáveis, que incluem os galotaninos e os elagitaninos (Figura 22), polímeros derivados dos ácidos gálico e elágico (DEGÁSPARI et al., 2004).

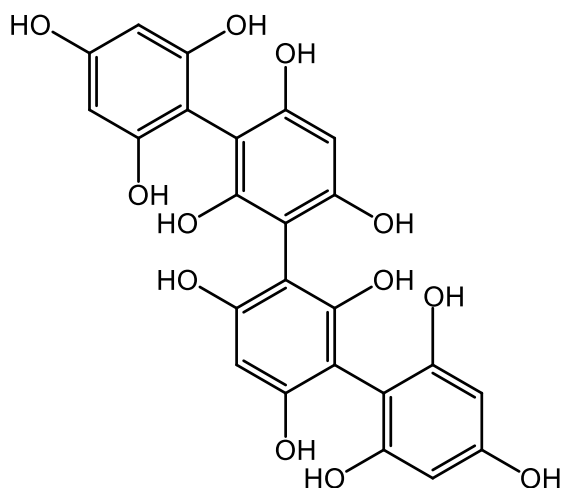
Figura 22: Taninos hidrolisáveis: galotanino e elagitanino



Fonte: essentiaeditora.iff.edu.br. Acesso em: 20/01/2016

Os constituintes do segundo grupo são denominados de taninos condensados (Figura 23) e são encontrados em maiores proporções e com maior importância nos alimentos. Exibem uma estrutura similar aos flavonoides, com coloração variando do vermelho ao marrom. Em baixas concentrações em frutos, os taninos conferem-lhes características sensoriais desejáveis. Todavia em concentrações mais elevadas, conferem aos frutos e outros alimentos características adstringentes (DEGÁSPARI et al., 2004).

Figura 23: Taninos condensados



Fonte: O autor (2016)

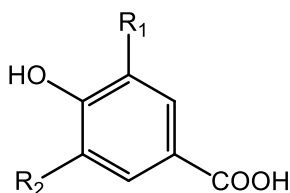
Niemetz; Gross (2005) e Simões et al. (2007) sugerem que os possíveis mecanismos de ação dos taninos no organismo estejam relacionados a três propriedades: a) complexação com íons metálicos (ferro, manganês, vanádio, cobre, alumínio, cálcio, entre outros); b) atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres e c) habilidade de complexar com macromoléculas, tais como proteínas e polissacarídeos. No organismo humano atuam como antidiarreico, anti-hipertensivo, anti-hemorrágico, cicatrizante, processos inflamatórios em geral e antimicrobiano (HOLNIK, 2015; RODRIGUES et al., 2014).

Segundo Loguercio et al. (2005) o mecanismo de ação antimicrobiana dos taninos explica-se por três hipóteses; a primeira pressupõe que os taninos inibem enzimas bacterianas e fúngicas e/ou se complexam com os substratos dessas enzimas; a segunda inclui a ação dos taninos sobre as membranas celulares dos microrganismos, modificando seu metabolismo e a terceira fundamenta-se na complexação dos taninos com íons metálicos (ferro, manganês, vanádio, cobre, alumínio, cálcio, entre outros), diminuindo a disponibilidade de íons essenciais para o metabolismo microbiano (SCALBERT, 1991).

Outra classe dentro dos compostos fenólicos é a dos não flavonoides. Esta não apresenta uma estrutura básica em comum e, portanto, é uma classe muito heterogênea (CHEYNIER, 2005). Os não flavonoides são classificados como: os derivados do ácido hidroxibenzoico e os derivados do ácido hidroxicinâmico (Figura 24) (ÂNGELO; JORGE, 2007), que são compostos fenólicos de ocorrência natural que apresentam uma cadeia lateral com três carbonos (C6–C3), como os ácidos caféico, ferúlico, p-cumárico e sinápico, sendo estes os mais comuns na natureza. Já os derivados dos ácidos hidroxibenzoicos incluem os ácidos gálico, p-hidroxibenzoico, protocatecuico, vanílico e siríngico, os quais apresentam a estrutura comum C6–C1 (MELO; GUERRA, 2002; BALASUNDRAM, 2006).

Figura 24: Ácido hidroxibenzoico (A) e Ácido hidroxicinâmico (B)

A)



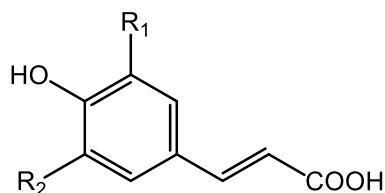
Ácido p-hidroxibenzoico: $R_1=R_2=H$

Ácido protocatecuico: $R_1=OH$, $R_2=H$

Ácido vanílico: $R_1=OCH_3$, $R_2=H$

Ácido sitingico: $R_1=R_2=OCH_3$

B)



Ácido p-cumárico: $R_1=R_2=H$

Ácido cafeico: $R_1=OH$, $R_2=H$

Ácido ferúlico: $R_1=OCH_3$, $R_2=H$

Fonte: O autor (2016)

Os derivados do ácido hidroxicinâmico são compostos fenólicos de ocorrência natural que apresentam uma cadeia lateral com três carbonos (C6–C3), como o ácido cafeico, ferúlico, p-cumárico e sinápico, sendo estes os mais comuns na natureza. Já os derivados dos ácidos hidroxibenzoicos incluem os ácidos gálico, p-hidroxibenzoico, protocatecuico, vanílico e siríngico, os quais apresentam a estrutura comum C6–C1 (MELO; GUERRA, 2002; BALASUNDRAM, 2006).

Em grãos de cevada, têm sido identificados derivados dos ácidos hidroxibenzoico e hidroxicinâmico, como o ácido trans-ferúlico, encontrado em maior quantidade no grão, seguido dos ácidos p-cumarínico e vanílico (MC MURROUGH et al., 1992; SHAHIDI; NACZK, 2003). Esses ácidos são conhecidos por atuarem como antioxidantes primários na recepção de radicais livres, interrompendo a reação em cadeia e encontram-se presentes na camada de aleurona e no endosperma do grão (GOUPY et al., 1999). Antioxidantes fenólicos naturais, incluindo o ácido cafeico e ácido ferúlico, ganharam atenção notável como promissores agentes fotoprotetores (YAMADA et al., 2006; MURRAY et al., 2008) e também têm estado presentes em produtos de cuidado para pele pela sua atividade antioxidante. O óxido nítrico (NO) parece ter grande participação na formação de eritema e inflamação da pele (HALLIWELL, 2012). Saija et al. (2000) provaram que tanto o ácido cafeico quanto o ferúlico agem sequestrando radicais NO.

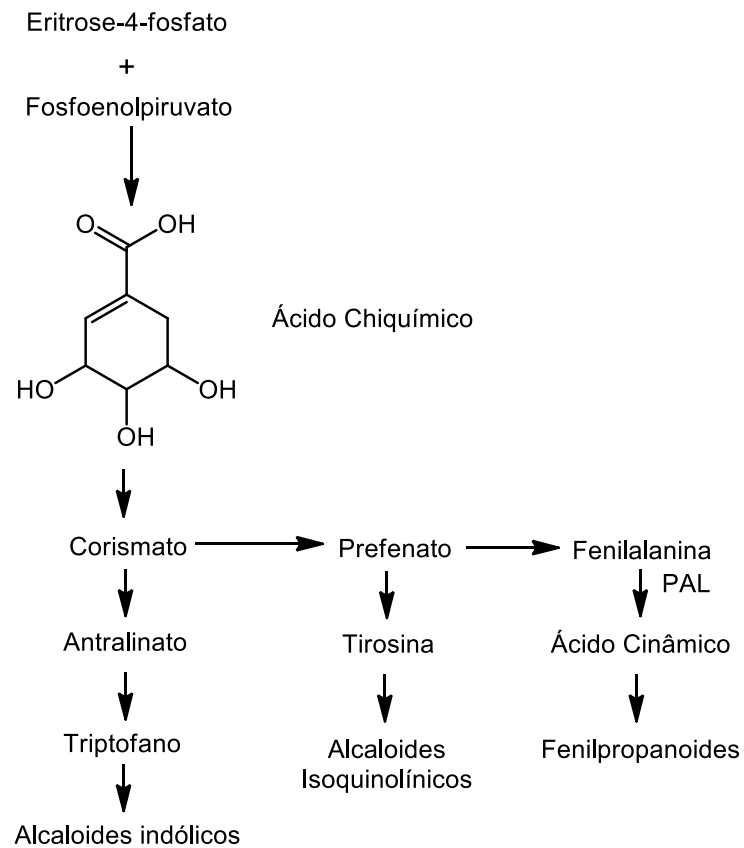
O ácido cafeico tem demonstrado ser um protetor de α -tocoferol em lipoproteína de baixa densidade (LDL) (LARANJINHA et al., 1996). Além disso, a sua conjugação com outros produtos, tais como com os ácidos clorogênicos e cafetárico demonstrou atividade antioxidante potente em diversos sistemas (MEYER et al., 1998; FUKUMOTO; MAZZA, 2000).

O ácido cafeico e seus derivados, como o fenil éster do ácido cafeico, têm ação contra câncer bucal e no cólon, bem como são inibidores da COX-2 (WEYANT et al., 2000; CESCHEL et al., 2002).

O principal grupo fenólico é dos flavanoides que podem ser originados basicamente por duas rotas bioquímicas diferentes, a do ácido mevalônico e a do ácido chiquímico, sendo esta última participante na biossíntese da maioria dos fenóis vegetais (QUIDEAU et al., 2011). A via do chiquimato é uma rota metabólica importante para as plantas e é iniciada com a condensação de fosfoenolpiruvato (PEP) e eritrose-4-fosfato, para a formação de ácido chiquímico (Figura 25). A partir deste composto forma-se corismato, molécula precursora dos aminoácidos fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) e triptofano (Trp), sendo que por ação da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) há conversão da fenilalanina em ácido trans-cinâmico. Nas reações enzimáticas subsequentes são originados esqueletos fenilpropanoides que servirão de substrato para a biossíntese de cumarinas, ligninas, flavonas, antocianinas, estilbenos além de outros compostos fenólicos (KOSUGE, 1969; HERRMANN, 1995).

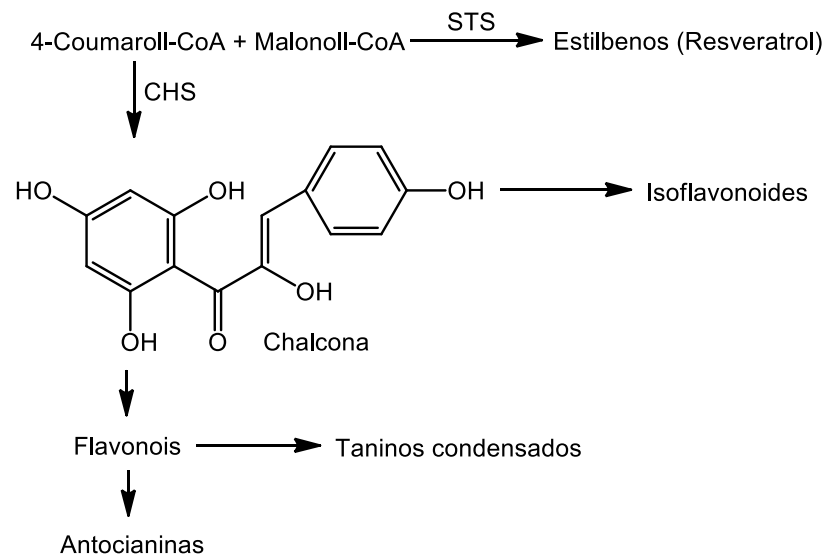
A rota do acetato/mevalonato (MVA) também contribui para o processo de síntese de fenóis, embora de forma menos significativa (Figura 26). A enzima chalcona-sintase (CHS) condensa uma molécula de cumaril-CoA com três moléculas de malonil-CoA (derivadas do acetato), formando tetrahidroxichalcona, substrato intermediário para a biossíntese de outros compostos fenólicos, como as antocianinas, flavonóis, isoflavonoides e taninos condensados (CLAUDOT, 1997).

Figura 25: Via do chiquimato



Fonte: O autor (2016)

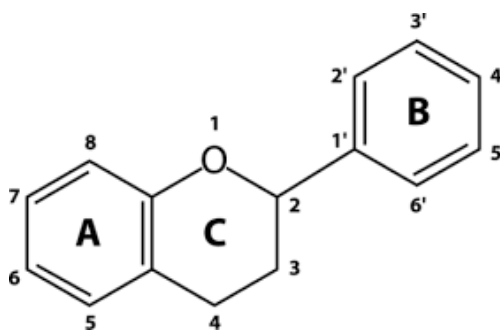
Figura 26: Rota do acetato/mevalonato



Fonte: O autor (2016)

Compostos largamente distribuídos no reino vegetal, os flavonoides encontram-se presentes em frutas, folhas, sementes e em outras partes da planta. São pigmentos naturais importantes e nas plantas tem como função principal proteger estes organismos contra agentes oxidantes (LOPES et al., 2010). Basicamente, os flavonoides (Figura 27) constituem substâncias aromáticas possuindo 15 átomos de carbono (C15) no seu esqueleto básico. Este grupo de compostos polifenólicos apresenta uma estrutura comum caracterizada por dois anéis aromáticos denominados anel A e B, unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico, denominado de anel C. O anel aromático A é derivado da via acetato/malonato, enquanto o anel B é derivado da fenilalanina e um heterocíclico oxigenado, o anel C, onde os seus carbonos podem sofrer variações químicas, como hidroxilação, hidrogenação metilação e sulfonação, proporcionando a formação de mais de quatro mil compostos flavonoides, agrupados em várias classes (GEORGIEV et al., 2014).

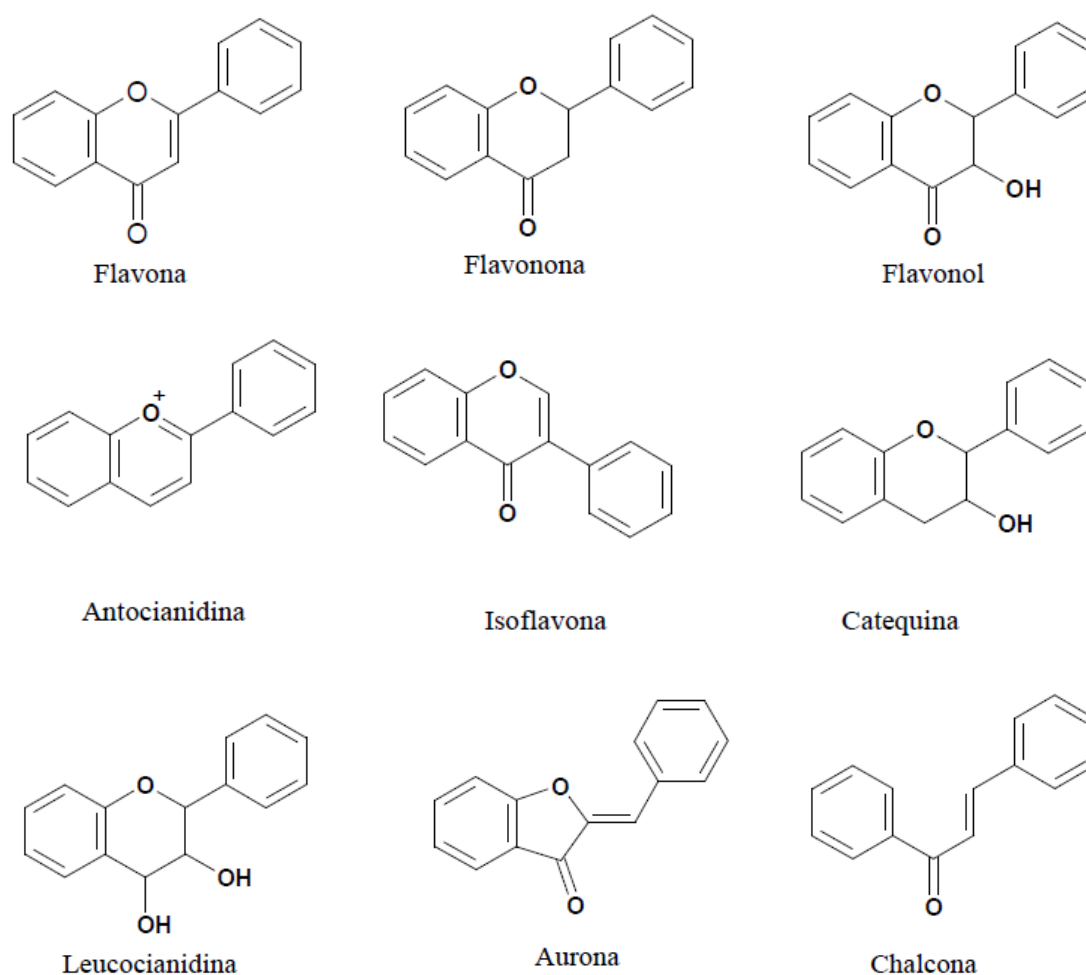
Figura 27: Estrutura geral dos flavonoides



Fonte: O autor, 2016

As principais classes de flavonoides (Figura 28) são as antocianinas, flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavononas e flavanas (LAZARY, 2010). Estas classes apresentam múltiplos efeitos biológicos, como atividade antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral, poder de redução a fragilidade e permeabilidade capilares; inibição da destruição do colágeno a agregação plaquetária; um elevado potencial redox que lhes permite atuar como agentes redutores e possuem ainda um potencial para quelar metais (MONAGAS; BARTOLOMÉÉ; GÓÓMEZ – CORDOVÉÉS, 2005; VALLS; 2009). Assim, a ingestão de flavonoides está associada à longevidade e à redução na incidência de doenças cardiovasculares (ARAÚJO, 2008; FILHO et al., 2001).

Figura 28: Estrutura das principais classes dos flavonoides



Fonte: SIMÕES et. al., 2010

Os flavonóis, subclasse mais numerosa de compostos pertencentes ao grupo dos flavonoides, presentes em frutas e folhas, são representados pelas quercetinas, rutinas, micertinas e os kaempferóis. Podem ser encontrados ainda as formas monoglicosiladas dos anteriores: quercetina-3-O-glucurósido, kaempferol-3-O-glucurósido e -3-O-galactosido e a miricetina-3-O-glucurosidio. Além destas, ainda ocorrem as formas diglicosiladas- 3-O-glucuarabinoide da quercetina e do kaempferol e a forma -3-O-glucosil xilosoide da quercetina.

Em estudos realizados por Queiroz et al. (2014) e Todorova; Trendafolova (2014), no tratamento da inflamação aguda, em ação conjunta, a quercetina e o

caempeferol demonstram ter grande potencial anti-inflamatório por modular a ação de componentes celulares envolvidos no mecanismo da inflamação, como por exemplo, a proliferação de linfócitos T, a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1, e a atividade das enzimas da via do ácido araquidônico, tais como fosfolipase A2, COX e LOX. Estas ações promovem a agregação de plaquetas.

Pirie et al. (2014) e Sheuder et al. (2014), estudando o tratamento da inflamação crônica observaram que a quercetina tem ação vasodilatadora, modifica a biossíntese de eicosanoides (resposta antiprostanoide) e tem a ação anti-inflamatória. Por conseguinte é capaz de proteger o colesterol-LDL da oxidação, impedindo a formação de placa aterosclerótica, e consequentemente prevenindo a agregação plaquetária. Efeito anti-hipertensivo e anti-isquêmico. Xu et al. (2013), em seu estudo, evidenciaram a ação dos flavonóis no aumento da expressão de genes que produzem proteínas sinápticas auxiliaadoras do impulso elétrico durante as sinapses, demonstrando potencial no tratamento de doenças como o mal de Parkinson e a depressão.

As flavonas são encontradas quase que exclusivamente em frutas cítricas. Mas também em alguns cereais, conferem também pigmento amarelo em flores. Os compostos mais comuns são a apigenina, luteolina, diosmestina, hesperidina e a naringerina. Os flavonoides cítricos naringina e hesperidina, predominantemente presentes no suco de laranja, são compostos glicosilados e sofrem reação de hidrólise no intestino para a formação de suas agliconas (naringenina e hesperitina, respectivamente) e posterior absorção. Enquanto nos flavonoides nobiletina e tangeretina que são polimetoxilados, a ausência do grupo glicosídeo facilita sua absorção (ASSINI et al., 2013).

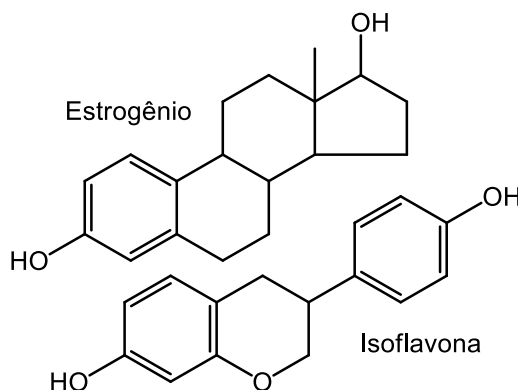
No estudo realizado por FUKUCHI et al. (2008) pode-se observar o efeito de flavonoides cítricos presentes em extrato da casca do limão (29,5% de eriocitrina, 0,9% de hesperidina, 0,5% de naringina e 0,3% de diosmina) sobre ratos alimentados com dieta rica em lipídios. A suplementação com 0,5% deste extrato por 12 semanas reduziu o ganho de peso e o acúmulo de gordura no grupo com dieta hiperlipídica, e suprimiu o aparecimento de hiperlipidemia, hiperglicemia e resistência à insulina. Os autores observaram um aumento dos níveis de RNAm do receptor de ativação para proliferação de peroxissomos α (PPAR α), que controla a

expressão de muitos genes envolvidos na oxidação de ácidos graxos, sugerindo que os flavonoides presentes no limão podem ser ligantes ou ativadores naturais do PPAR α . Ainda, verificou-se o aumento dos níveis de RNAm da enzima acil-CoA oxidase, responsável por aumentar a β -oxidação peroxissomal de lipídios.

Os isoflavonoides ou isoflavonas, uma outra classe de importância biológica, são encontradas quase que exclusivamente em legumes, particularmente na soja, tem como representantes a genisteína e a daidzeína, que apresentam efeito anticancerígeno. Em populações que consomem dietas ricas em soja e seus derivados, é possível observar uma menor incidência de determinados tipos de câncer (côlon, mama e próstata, principalmente) quando comparadas com populações que não consomem esses alimentos (LIU et al., 2007). Os mecanismos pelos quais as isoflavonas inibem a carcinogênese ainda não estão bem definidos, porém, estudos sugerem que seus efeitos protetores podem estar relacionados à inibição de enzimas participantes dos processos de proliferação celular, como a S6-cinase ribossomal, proteína cinase C e enzimas de reparo em geral e DNA topoisomerase II (ZAKIR; FREITAS, 2015).

Os isoflavonoides bioativos e não nutricionais apresentam estrutura química similar ao estradiol (Figura 29), o principal hormônio feminino, e se comportam como estrógenos verdadeiros, mas uma vez ligados aos receptores de estrógeno não são capazes de causar os mesmos efeitos colaterais. A ação das isoflavonas como repositores hormonais naturais está baseada na capacidade de ligação com os receptores de estrógeno, atuam na translocação para o núcleo da célula e induzem a transcrição do gene específico, que pode incluir a divisão celular. Uma das formas de ação das isoflavonas, particularmente da genisteína, é o bloqueio de fosforilações específicas como a do fator NF κ B que participa em processos inflamatórios e na osteoporose (ZAKIR; FREITAS, 2015).

Figura 29: Semelhança das estruturas químicas do Estrogênio e da Isoflavona



Fonte: O autor (2016)

Yang et al. (2013) e Yan et al. (2014) observaram que as isoflavonas são grandes doadores de elétrons por apresentarem estruturas químicas conjugadas em anel β , ricas em grupos hidroxilas, que têm grande ação antioxidante por reagirem e inativarem ânions superóxido, oxigênio singlete, radicais peróxido de lipídios e/ ou estabilizando radicais livres envolvidos no processo oxidativo. A ação desta classe de flavonoides potencializa a ação de polimerases de revisão, diminuindo danos ocasionados ao DNA e inibe a promoção de tumores em vários tipos de câncer iniciados a partir da ação de radicais livres.

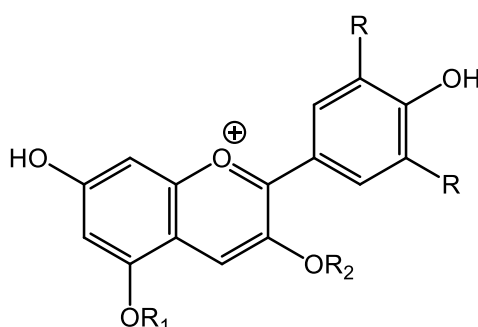
Brewer et al. (2014) e Ma (2014) puderam constatar que o isoflavonoide Daidzeína, em várias concentrações diferentes e em tratamento crônico, demonstra atuar como protetor e regenerador dos antioxidantes primários do organismo, como o ácido ascórbico (vitamina C), o tocoferol (vitamina E) e o caroteno (vitamina A), relatam também que esse isoflavonoide pode, efetivamente, inibir as reações oxidativas deletérias a tecidos e retardar os fenômenos fisiopatológicos da aterosclerose e da trombogênese. Babu et al. (2013) relatam que os flavonóis, as antocianidinas e as isoflavonas também exercem efeito benéficos no tratamento da diabetes por aumentar a secreção de insulina, diminuir a apoptose e promover a proliferação de células β -pancreáticas. Também regulam o metabolismo da glicose em hepatócitos, reduzem a resistência à insulina, a inflamação e o estresse oxidativo em tecidos musculares e adiposo.

As flavonas são compostos incolores, hidrossolúveis, que contribuem para o sabor amargo e a adstringência do vegetal. Dentre as principais representantes desse grupo estão: catequina, epicatequina, epigallocatequina,

epigallocatequina galato e a epicatequina galato (ARAÚJO, 2008). São encontradas em vegetais da alimentação humana tais como chá verde, cerejas, amoras, framboesas, mirtilo, uva roxa e vinho tinto. Dentre seus benefícios à saúde humana destacam-se a redução na incidência de certos tipos de câncer, redução do colesterol sérico e estimulação do sistema imunológico (COZZOLINO, 2009).

Dentre os flavonoides destacam-se também as antocianinas, um grupo de pigmentos naturais com estruturas fenólicas variadas, que são glicosídeos com um resíduo de açúcar no carbono 3 (Figura 30). Como produtos desta hidrólise, obtêm-se o componente glicídico e a aglicona é denominada antocianidina (DEWICK, 2008). As antocianinas encontradas em alimentos são todas derivadas das agliconas pertencentes a três pigmentos básicos: pelargonidina (vermelha), cianidina (vermelho) e delphinidina (violeta) (ARAÚJO, 2008). São os componentes de muitas frutas e hortaliças, como uva (*Vitis* L.), jabuticaba (*Plinia cauliflora*), romã (*Punica granatum*), açaí (*Euterpe oleracea*), maçã (*Malus domestica*), azeitona (*Syzygium jambolanum*), figo (*Ficus carica*), morango (*Fragaria* L.), repolho roxo (*Brassica* L.), rabanete (*Raphanus sativus*), berinjela (*Solanum melongena*), entre outras, apresentando grande concentração nas cascas de cor escuras (MALACRIDA; MOTTA, 2006; TEIXEIRA; STRINGHETA; DE OLIVEIRA, 2015).

Figura 30: Estrutura geral das Antocianidina



Fonte: O autor (2016)

As antocianinas têm significativo papel na prevenção ou retardo do aparecimento de várias doenças por suas propriedades antioxidantes, anticancerígena, alívio da inflamação crônica, diminuição da hipertensão arterial e regulação da síndrome metabólica (YI et al., 2010). Estudos *in vitro* e *in vivo* mostram que as antocianinas podem atenuar o estresse oxidativo envolvido no processo aterosclerótico. Vários mecanismos podem estar envolvidos nesse

processo, como a capacidade das antocianinas de inibir a oxidação do LDL e reduzir a injúria oxidativa das células endoteliais vasculares (CARDOSO; LEITE; PELUZIO, 2011).

Quin et al. (2009) em seu experimento com humanos, comprovaram que a ingestão de antocianinas, extraídas de *Vaccinium myrtillus* (mirtillo) e *Ribes Nigrum* (groselha preta), provocaram o aumento da lipoproteína de alta densidade (HDL) em 13,7%) e a LDL em 13,6%.

Hogan et al. (2010), em seu experimento com o extrato de açaí (*Euterpe oleracea*), rico em antocianinas (100 mg/g), tratou células de gliomas cerebrais de ratos por 24, 48 e 72h com as doses do extrato: 50, 100 e 200 µg/mL, ao final verificou a viabilidade celular (IC₅₀) e a atividade antioxidante do extrato foram realizadas de acordo com os métodos *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC) e 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) e teve como resultado a inibição, dose dependente, do crescimento das células cancerígenas. Alta capacidade antioxidante do extrato de açaí (ORAC e DPPH: 2589 µmoles e 1208 µmoles equivalentes de Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid), respectivamente, também foi observada.

Segundo Cardoso; Leite; Peluzio (2011), existem evidências que comprovam que as antocianinas também apresentam propriedades anti-inflamatórias. Alguns autores sugerem que os efeitos anti-inflamatórios das antocianinas podem ser explicados por diferentes mecanismos, tais como:

a) Inibição da ativação do fator nuclear (NF-κB) em humanos:

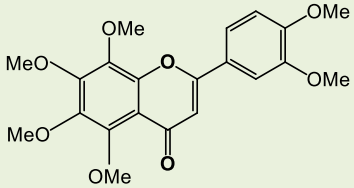
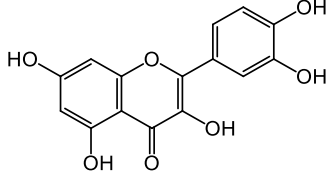
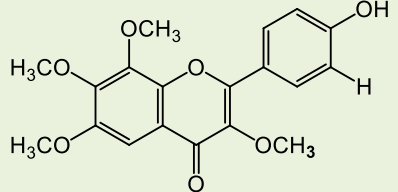
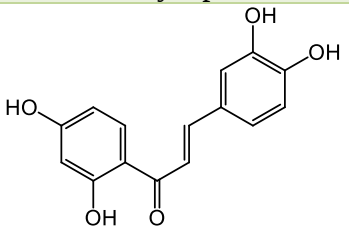
Dentre os mecanismos regulatórios da resposta inflamatória, a via do fator nuclear NF-κB representa uma via crucial no controle da transcrição de vários genes pró-inflamatórios, como citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, proteínas de fase aguda, reguladores da apoptose e da proliferação celular (WINTHER et al., 2005). Portanto, a inibição desta via pode contribuir para a redução do processo aterosclerótico.

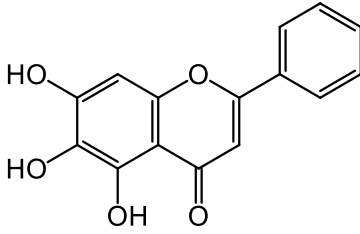
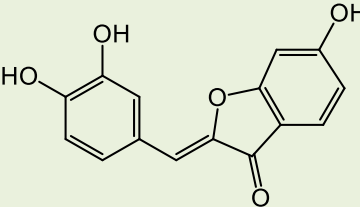
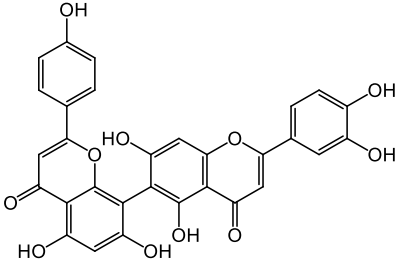
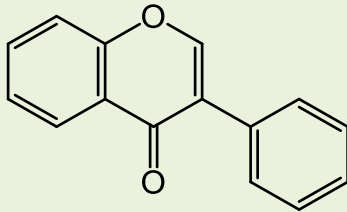
b) Redução da concentração plasmática da proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) em humanos, *in vitro* e *in vivo*:

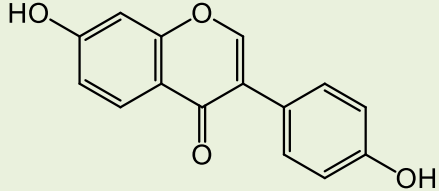
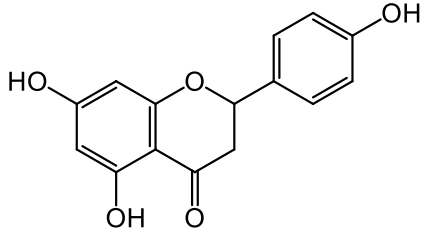
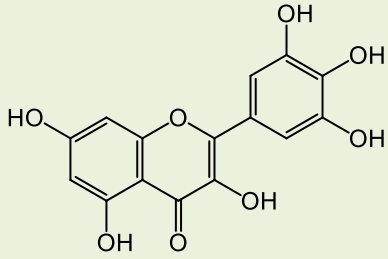
A MCP-1 é um biomarcador envolvido na evolução de doenças inflamatórias e é expressa, principalmente nas fases iniciais da aterosclerose (BELTRÁN-DEBÓN et al., 2010). Esta proteína está envolvida na aterogênese através de diferentes

mecanismos. Ela promove o recrutamento de monócitos e linfócitos T circulantes do sangue para o espaço subendotelial e contribui para a diferenciação dos macrófagos em células espumosas (Karlsen et al., 2007). A MCP-1 é uma quimiocina membro da subfamília de quimiocinas secretadas por vários tipos de células presentes na parede arterial, como as células endoteliais, as células musculares lisas, fibroblastos e macrófagos e sua expressão pode ser mediada por fatores de transcrição como o NF- κ B (GU; OKADA; CLINTON, 1998). A tabela 2 apresenta alguns detalhes sobre alguns flavonoides de importância biomédica.

Tabela 2: Propriedades cientificamente comprovadas dos flavonoides

Planta	Estrutura Química	Atividade Biológica	Referências
<i>Citrus nobilis</i>		Antitumoral	Kawabata et al., 2005; Murakami et al., 2002
<i>Caesalpinia pulcherrima</i>		Antiviral	Chiang et al., 2003
<i>Dracocephalum kotschy</i>	 Calycopterin	Antiproliferativa	Mohhaddam, et al., 2012
<i>Rhus verniciflua</i>	 Buteina	Cardioprotector	Jeon et al. (2006);

Planta	Estrutura Química	Atividade Biológica	Referências
<i>Scutellaria baicalensis</i>	 Baicaleína	Antifúngica	Serpa et al. (2012);
<i>Rhus verniciflua</i> Stokes	 Sulfuretin	Neuroprotector	Cho et al. (2012);
<i>Anacardium occidentale</i> L.	 Agathisflavone	Apoptose de células malignas leucêmicas	Konan et al. (2012);
<i>Glycine max</i> L.	 Isoflavona	Prevenção de demência e doença de Alzheimer	Ahmad et al. (2014)

Planta	Estrutura Química	Atividade Biológica	Referências
<i>Glycine max</i> L.	 Daidzeína	Alívio da radiotoxicidade (radioterapia)	Hillman et al. (2011)
<i>Citrus. x paradisi</i> (Toranja)	 Naringenina	Antidiabético	Chung et al. (2008)
<i>Rubus sp.</i>	 Miricetina	Recuperação e regeneração de nervos	Wang et al. (2011)

2.4 BRASSICACEAE

Do ponto de vista econômico, a família Brassicaceae destaca-se em função da grande diversidade de espécie hortícolas, como por exemplo: alcaparras, brócoles, couve de Bruxelas, repolhos e couve-flor (SARDI e TORDA, 2005; MATTHAUS e OZCAN, 2002). Os principais gêneros desta família que tiveram sua constituição química investigada são: *Maerua*, *Capparis* e *Cleome* (ABEL-MOGIG, 1999). Dentre as classes de substâncias predominantes destacam-se a ocorrência de flavonoides. No entanto, as seguintes classes de metabólitos especiais foram encontradas na família Brassicaceae: flavonoides (PELOTTO et al., 1998; SHARAF et al. 2000); alcalóides (DELAVEAU et al., 1973; AHMAD et al., 1992); glicosinolatos (MATTHÄUS e LUFTMANN, 2000; MATTHÄUS e OZCAN, 2002); glicosídeos indólicos (ÇALIS et al., 1999; 2002); sais de amônio quartenários (inclusive betaínas) (Mc LEAN et al., 1996; SARRAGIOTTO et al., 2004); oxindóis (DEKKER et al., 1987) e triterpenos do tipo lupano (ABDEL-MOGIB, 1999).

No Brasil, encontram-se aproximadamente cinquenta espécies que integram a família Brassicaceae, distribuídas nos seguintes gêneros: *Capparis*, *Comonopus*, *Crateva*, *Dactylaena*, *Lepidium* e *Morisonia* e *Cleome* (SOUSA, 2005). O gênero *Cleome* é formado de cento e cinquenta espécies, entre plantas herbáceas, arbustivas e arbóreas; sendo vinte e oito destas nativas do Brasil e amplamente distribuídas, preferencialmente em áreas abertas. São usadas como medicinais e ornamentais (PEREIRA et al., 2007). De acordo com o uso tradicional, espécies do gênero *Cleome* são utilizadas como estimulantes, antiescorbútico, anti-helmítico, rubefaciente e vesicante, dentre outros (BOSE et al., 2007). Como exemplos de espécies que são usadas na medicina tradicional destacam-se: *C. rutidosperma* DC, *C. droserifolia* Forssk, *C. viscosa* L., *C. ramosissima* Parl. e *C. spinosa* Jack.

Tabela 3: Propriedade medicinal de espécies do gênero *Cleome*

Espécies de <i>Cleome</i>	Atividades	Atores
<i>C. rutidosperma</i> D.C.	Antibacteriana, diurética, analgésica e motora (diminuição da atividade locomotora) e laxativa.	BOSE et al., 2006; 2007
<i>C. droserifolia</i> Forssk	Antimicrobiana, hepatoprotetora, antihistamínica, diurético, redução de índices glicêmicos, e na diminuição da pressão arterial.	ELNAGAR et al., 2005; MOTHANA et al., 2008
<i>C. viscosa</i> L.	Analgésica e citotóxica.	SING; WEST, 1991
<i>C. ramosissima</i> Parl.	Antihiperglicêmica, antihiperlipidêmica	EZZAT, S. M. et al. 2014

No gênero *Cleome* destacam-se as seguintes classes de metabólitos especiais: alcaloides (DELAVEREAU et al. 1973); flavonoides (SHARAF et al., 1997; NASSAR et al., 2003); fenoxicumarina (RAMACHANDRAN, 1979); diterpenos cembranos (COLLINS et al., 2004); cumarinas lignóides (ANIL et al. 1985); esteroides glicosilados; triterpenos damaranos e sais de amônio quaternário (MCLEAN et al., 1996; AHMED et al., 2001).

2.4.1 *Cleome spinosa*

C. spinosa é uma espécie herbácea, com folhas inteiras ou mais frequentemente compostas (digitadas), alternam em geral com estípulas durante todo o ano, possui flores pouco vistosas de coloração branca, hermafroditas, cíclicas, hipóginas, diclamídias, heteroclamídia. Os frutos são simples, seco, do tipo capsular, com deiscência longitudinal; com média de 12,5cm de comprimento, 0,26cm de largura e 0,24cm de espessura; cor verde quando jovem e bege quando maduro; sua superfície externa é rugosa com textura seca (PEREIRA et al., 2007).

Figura 31: Espécie do presente estudo, *Cleome spinosa* Jacq.



Fonte: O autor (2015)

No Brasil, as folhas, flores e raízes de *C. spinosa* são utilizadas na medicina tradicional. As folhas após maceração são aplicadas sobre a pele e agem como depurativos; as infusões de folhas e flores são eficazes no tratamento de bronquites, asma, febre, enquanto toda a planta mostra efeitos digestivos e cicatrizantes (CABRAL, AGRA, 1998; AGRA et al., 2007). Estudos químicos levaram ao isolamento de glucosinolatos (e glucocapparina glucocleomina) e “cembranes”. (COLLINS et al., 2004). O óleo essencial de partes aéreas de *C. spinosa* apresentou atividade antimicrobiana moderada contra sete das oito linhagens de bactérias utilizadas, com atividade inibitória significativa contra *Streptococcus pyogenes* grupo A, quando comparado com o padrão de antibióticos ampicilina e gentamicina. O fungo *Candida albicans* foi menos sensível ao óleo essencial. Os óleos apresentaram atividade inseticida contra *Cylas Formicarius elegantulus* e nenhuma atividade antioxidante (McNEIL et al., 2001).

3. CONCLUSÃO

As espécies de plantas continuam a representar fontes de inúmeras drogas e estudos relacionados à investigação de propriedades terapêuticas.

4. REFERÊNCIAS

ADWAN, G; ABU-SHANAB, B; ADWAN, K.; Antibacterial Activities of Some Plant Extracts Alone and in Combination with Different Antimicrobials Against Multidrug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p.266-269, 2010.

AGRA, M.F.; FRANÇA, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.

AHMAD, A. et al. V. Total isoflavones from soybean and tempeh reversed scopolamine-induced amnesia, improved cholinergic activities and reduced neuroinflammation in brain. **Food and Chemical Toxicology**, v. 65, p. 120-128, 2014.

AHMED, A. A. et al. Acetoxycyclobutanol. A from *Cleome amblyocarpa*. **Journal of Natural Products**, v. 64, n.1, p. 106-107, 2001.

AIDI WANNES, et al. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. **Food and Chemical Toxicology**, London, v. 48, n. 5, p. 1362-1370, 2010.

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

ALMEIDA, J. R. et al., 3, 6-Dimethoxy-6", 6"-Dimethyl-(7, 8, 2", 3")-Chromene-flavone, a flavonoid isolated from *Lonchocarpus araripensis* Benth.(Fabaceae), reduces nociceptive behaviour in mice. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 10, p.1622-1627, 2015.

ALMEIDA, M.Z. **Planta medicinais**. Salvador: Editora EDUFBA, 2.ed. 2003, p.31-39,147,181,

ALVAREZ, C.; LABARCA, J.; SALLES, M. Estratégias de prevenção de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) na América Latina. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 2, p.108-120, 2010.

ALVES, L. F. Produção de Fitoterápicos no Brasil: História, Problemas e Perspectivas. **Revista Virtual de Química**, v. 5 p. 450-513, 2013.

ALVES, R.R.N.; ROSA, I.M.L. Biodiversity, traditional medicine and public health: where do they meet? **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 3, n. 1, p. 1. 2007.

ANDERSON, R. G. W. **Early Islamic chemical glass**. Chemistry in Britain, v. 19, n. 10, p. 822, 1983.

- ANTUNES, R.M.P. et al. Atividade antimicrobiana “*in vitro*” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 517-524, 2006.
- ARAÚJO, J. M. **Química de alimentos: teoria e prática**. 4.ed. Viçosa: Editora UFV, 477p, 2008.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 3.ed. – Viçosa: UFV, 477p, 2004.
- BANSAL, S.S.; JOSHI, A.; BANSAL, A.K. New dosage formulations for targeted delivery of cyclo-oxygenase-2 inhibitors. **Drugs Aging**, v. 24, n. 6, p. 441-451. 2007.
- BARADARAN A, NASRI H, RAFIEIAN-KOPAEI M. Oxidative stress and hypertension: possibility of hypertension therapy with antioxidants. **J Res Med Sci** 2014; 19(4): 358-367.
- BARNETT, R. N. et al. Oxidative damage to DNA: counterion-assisted addition of water to ionized DNA. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 33, p. 10795-10800, 2006.
- BARQUERO, A.A. Plantas sanadoras: pasado, presente y futuro. **Revista Química Viva**, v. 6, n. 2, 2007.
- BELTRÁN-DEBÓN, R. et al. The aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* calices modulates the production of monocyte chemoattractant protein-1 in humans. **Phytomedicine**, v. 17, n. 3, p. 186-191, 2010.
- BENKEBLIA, N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). **LWT-Food Science and Technology**, London, v. 37, n. 2, p. 263-268, 2004.
- BERTUCCI, R.A. Initial antimicrobial activity studies of plants of the riverside forests of the southern Uruguay. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1, p. 20-25, 2009.
- BHATTACHARYA, S.; AHMED, K.K.M.; CHAKRABORTY, S. Free Radicals and Cardiovascular Diseases: An Update. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 1, n. 1, p. 17-22, 2011.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais Livres e os Principais Antioxidantes da Dieta, **Revista de Nutrição**, v. 12, p. 123-130, 1999.
- BIAVATTI, M.W. et al. Ethnopharmacognostic survey on botanical compendia for potential cosmeceutic species from Atlantic Forest. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 640-653, 2007.

BIGLARI, F.; ALKARKHI, A.F.M.; EASA, A.M. Antioxidant activity and phenolic content of various date palm (*Phoenix dactylifera*) fruits from Iran. **Food Chemistry**, v. 107, p. 1636–1641, 2008.

BLACK, J.G. **Microbiologia: fundamentos e perspectivas**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, p. 829.

BOLDI, A.M. Libraries from natural product-like scaffolds. **Chemical Biology**, v. 8, n. 3, p. 281-286, 2004.

BOSE, A. et al. Diuretic and antibacterial activity of aqueous extract of *Cleome rutidosperma*. **India Journal of Pharmaceutical Science**, v. 69, n. 2, p. 292-29, 2007.

BOSE, A. et al. Studies on diuretic and laxative activity of ethanolic extract and its fractions of *Cleome rutidosperma* aerial parts. **Pharmacognosy Magazine**, v. 2, n. 7, p. 178-182, 2006.

BRANDÃO, M.G.L.; GOMES, C.G.; NASCIMENTO, A.M. Plantas nativas da medicina tradicional brasileira: uso atual e necessidade de proteção. **Revista Fitos**, v. 2, n. 3, p. 24-29, 2006.

BRAND-WIL AMS, W.; CUVELI R, M.E ; B RSET, C. Use of a free radical method to evaluate antiioxidant activity. **Food Scien and Technolo gy**, v.28, p 25-30. 1995.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Brasília, DF, 2010. Disponível em:<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/c13443804478bef68eefcf7d1535461/resolucao+antibioticos.pdf?MOD=AJPERES>. Acessado em: 06.nov.2015.

BREWER, L.R. et al. Wheat bran particle size influence on phytochemical extractability and antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 52, p. 483-90, 2014.

BROOKS, G. F. **Microbiologia Médica**. 24 ed. São Paulo, p. 653, 2008.

CALIXTO, J.B. Medicamentos Fitoterápicos. In: **Plantas medicinais sob a ótica da química moderna**. Chapecó. Ed. Argos. 297-31, 2001.

CARDOSO L., LEITE J.P.V., PELUZIO M.C.G. Efeitos biológicos das antocianinas no processo aterosclerótico. **Revista Colombiana Ciencias Químico Farmacéuticas**, v. 40, n. 11, p. 116- 138, 2011.

CARDOSO-CARRARO, C. J.; DANTAS, M. I. S.; ESPESCHIT, A. C. R.; MARTINO, H. S. D.; RIBEIRO, S. M. R. Flaxseed and human health: reviewing benefits and adverse effects. **Food Reviews International**, v. 28, n. 2, p. 203-230, 2012.

CARNEIRO, E. **A Conquista da Amazônia**, Coleção Mauá, Ministério da Viação e Obras Públicas, Serviço de Documentação: Rio de Janeiro, 1956.

CARNEVALLI, D. B.; DE ARAÚJO, A.P. S. Atividade Biológica da Pimenta Preta (*Piper nigrum* L.): Revisão de Literatura. **UNICIÊNCIAS**, v. 17, n. 1, 2015.

CARRARA JR., E.; MEIRELLES, H. A Indústria Química e o Desenvolvimento do Brasil - 1560-1889, Metalivros: São Paulo, 1996

CARVALHO, A.C.B. et al. As plantas medicinais e suas interações com medicamentos. In: Diniz, M.F.F.M, Oliveira, R.A.G.; Medeiros, A.C.D.; Malta Júnior, A.; Moura, M.D. (org.) **Memento de plantas medicinais**. 1.ed. João Pessoa: Editora Universitária / UFPB, p. 121-125, 2006.

CARVALHO, A.C.B. et al. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Rev Bras Farmacogn**.18: 314-319, 2008.

CESCHEL, G.C., et al. *In vitro* permeation through porcine buccal mucosa of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) from a topical mucoadhesive gel containing propolis. **Fitoterapia**, v. 73, p. S44– S52, 2002.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica Ilustrada**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2008, 533p.

CHAN, P. et al. A double-blind placebo-controlled study of the effectiveness and tolerability of oral stevioside in human hypertension. **Brit J Clin Pharmacol** v. 50, n. 3, p. 215-220, 2000.

CHIANG, L. C. et al. *In vitro* antiviral activities of *Caesalpinia pulcherrima* and its related flavonoids. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 194-198, 2003.

CHIESA, F. A. F. MOYNA, P. Alcaloides esteroidales. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed, Editora: da UFRGS, 2010.

CHUNG, J. et al. HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 5, p. 1739-1744, 2008.

CLAUDOT A. C.; ERNST, D.; SANDERMANN, H.; DROUET, A. Chalcone synthase activity and polyphenolic compounds of shoot tissues from adult and rejuvenated walnut trees. **Planta**, v. 203, n. 3, p. 275-82, 1997.

COELHO, A. et al. Atividade antimicrobiana de *Bixa orellana* L. (Urucum). **Revista Lecta-USF**, Bragança Paulista, v. 21, n. ½, p. 47-54, 2003.

COHEN, M.L. Epidemiology of drug resistance: implications for a post antimicrobial era. **Science**, v.257, p.1050-1055, 1992.

COLLINS, D.O.; REYNOLDS, W.F.; REESE, P.B. New Cembranes from *Cleome spinosa*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 2, p. 179-183, 2004.

- CORAZZA, S.A. Aromacologia através dos tempos. In: CORAZZA, S. **Aromacologia: uma ciência de muitos cheiros**. São Paulo: Senac, 2002.
- CORRÊA JUNIOR, C.; LIN, C.M.; SCHEFFER, M.C. SOB, **Informa**, p. 9 (23), 1991.
- COSTA, A. M. M.; Boletim da Sociedade Portuguesa de Química. 1986, 23, 37.
- COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de Nutrientes**. 3. Ed. São Paulo: Manole, 2009, 1200p.
- CRISAN, I. Natural propolis extract Nivcrisol in the treatment of acute and chronic rhinopharyngitis in children. **Romanian Journal of Virology**, v. 46, n. 3-4, p. 115-33, 1995.
- CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). **Biochemistry and molecular biology of plants**, v. 24, p. 1250-1319, 2000.
- DAS, K.; TIWARI, R.K.S.; SHRIVASTAVA, D.K. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 2, p. 104-111, 2010.
- DEEPA, G. et al. *In vitro* antioxidant activity and phytochemical analysis in extracts of *Hibiscus rosa-sinensis* stem and leaves. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 2, Issue 3, 2012.
- DEGÁSPARI, C.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica, Curitiba**. v. 5, n. 2, p. 33-40, 2004
- DEGÁSPARI, C.H., WASZCZYNSKYJ, N., PRADO, M.R.M., Atividade antimicrobiana de *Schinus terebenthifolius* Raddi. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 3, p. 167-622, 2005.
- Dewick, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 2. Ed. West Sussex: John Wiley& Sons Ltd, 2002, 515p.
- DEWICK, Paul M. The shikimate pathway: aromatic amino acids and phenylpropanoids. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**, 3.ed, p. 137-186, 2009.
- DI ROSA, M., GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different n different sites by carrageenan and turpentine. **The American journal of pathology**, v. 104, n. 4, 1, p. 15-29, 1971.
- DOGRU, Z. et al. Effects of diabetes mellitus and postmenopausal period on the lungs of rats. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 6, p. 1989-2010, 2012.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. J. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**. v. 88, p. 308-316, 2000.

DOS SANTOS, N. P.; PINTO, A. C.; DE ALENCASTRO, R. B. Theodoro Peckolt: naturalista e farmacêutico do Brasil imperial. *Química Nova*, v. 21, n. 5, p. 666, 1998.

DOUGHARI, J. H.; EL-MAHMOOD, A. M.; TYOYINA, I. Antimicrobial activity of leaf extracts of *Senna obtusifolia* (L). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 2, n. 1, p. 7-13, 2008.

DUARTE M.C.T., et al. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14 (Supl.1), p. 6-8, 2004.

EDLER, F.C. **Boticas & farmacias: uma história ilustrada da farmácia no Brasil**. Casa da Palavra, 2006.

EICKHOFF, W.M.; ENGERS, D.A.; MUELLER, K.R. Nanoparticulate NSAID compositions. **Toxicology and Pharmacology**. 50, 283-289, 1995.

EL-SAYED, M; Verpooorte, R. Catharanthus terpenoid indole alkaloids: biosynthesis and regulation. **Phytochemistry reviews**, v.6, n.2-3, p. 277-305, 2007.

ELISABETSKY, E. Sociopolitical, economical and ethical issues in medicinal plant research. **Journal Ethnopharmacology**, v. 32, n. 1, p. 235-239, 1991.

ELISABETSKY, E.; SOUZA, GC de. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, v. 6, p. 107-122, 2004.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, p. 35-36, 2003.

EL-NAGAR, E.B. et al. Antidiabetic affect of *Cleome droserifolia* aerals parts: Lipid peroxidation-induced oxidative stress in diabetic rats. **Acta Veterinaria Brno**, v. 74, n. 33, p. 347-352, 2005.

ELVIN-LEWIS, M. Should we be concerned about herbal remedies. **Journal Ethnopharmacology**, v.75, p.141-164, 2001.

EZZAT, S.M.; FATHALLA, M.H.; SALAH, A.G. Antihyperglycemic and antihyperlipidemic effects of the methanol extracts of *Cleome ramosissima* Parl. *Barleria bispinosa* Vahl. and *Tribulus macropterus* Boiss. **Bulletin of Faculty of Pharmacy Cairo University**, v.52, n.1, p. 1-7, 2014.

FACCHINI, P. J.; DE LUCA, V. Opium poppy and Madagascar periwinkle: model non-model systems to investigate alkaloid biosynthesis in plants. **The Plant Journal**, v. 54, n. 4, p. 763-784, 2008.

FANSWORTH, N.R.; BINGEL, A.S. New natural products and plant drugs with pharmacological, biological or therapeutical activity. **Springer**, New York, 61-73, 1997.

FERNANDES, T.M. **Plantas medicinais: memória da ciência no Brasil**, Editora Fiocruz, Rio de Janeiro; FIOCRUZ. 260p. 2004.

FILHO, D. W.; SILVA, E. L.; BOVERIS, A. (2001), Flavonoides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas. In: Yunes, R. A. e Calixto, J. B. **Plantas Medicinais: sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Agros, 317-334.

FONTANAY, S. et al. Ursolic oleanolic and betulinic acids: Antibacterial spectra and selectivity indexes. **Journal of Ethnopharmacology**, p.272–276, 2008.

FORZZA, R.C. Introdução. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do RJ, 2013.

Freedberg, D.; Ciência, Comércio e Arte em o Brasil dos Holandeses 1630-1654, Herkenhoff, P., org.; GMT Editores Ltda.: Rio de Janeiro, 1999

FUKUCHI, Y., et al. Lemon polyphenols suppress Diet-induced Obesity by Up-Regulation of mRNA Levels of the Enzymes Involved in β -Oxidation in Mouse White Adipose Tissue. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.43, p. 201–209, 2008.

FUKUMOTO, L. R.; MAZZA, G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.3597–3604, 2000.

FUNKE I.; MELZIG M.F. Traditionally used plants in diabetes therapy - phytotherapeutics as inhibitors of α -amylase activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 16, p. 1-5. 2006.

FURTADO, G.H.C. et al. Impact of a Hospital-wide Antimicrobial Formulary Intervention on the Incidence of Multidrug-Resistant Gram negative Bacteria. **American Journal of Infection Control**, v.36l, p.661-4, 2008.

FUSCO D, et al. Effects of antioxidant supplementation on the aging process. **Journal of Clinical Interventions in Aging**, v. 2, n. 3, p. 377-87, 2007.

GADELHA, C. S., et al. Estudo bibliográfico sobre o uso das plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 8, n. 5, p. 208-212, 2013.

GEORGIEV V.; ANANGA A.; TSOLOVA V. Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. **Nutrients**.v .6, n. 1, p. 391-415, 2014.

GOMEZ-PINILLA, F.; NGUYEN, T. Natural mood foods: the actions of polyphenols against psychiatric and cognitive disorders. **Nutritional Neuroscience**, v. 15, p.127-33, 2012.

GONZÁLEZ-LAMOTHE, R. Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens. **International Journal of Molecular Sciences**, v.10, n.8, p. 3400-19, 2009.

GU, L., et al. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. **Molecular Cell**, v. 2, n. 2, p. 275-281, 1998.

GUIMARÃES D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância Terapêutica e Perspectivas Para a Descoberta e Desenvolvimento de Novos Agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

GUYTON A.C., HALL J.E. **Tratado de fisiologia médica**. 12^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011.

HAIDA, K.S. et al. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. **Arquivo de Ciências da Saúde Unipar**, v. 11, p. 185-192, 2007.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutrition Reviews**, v.70, n.5, p.257–265, 2012

HALPEN, O.; SCHMID, H.; Zur Kenntnis des Plumierids. 2. Mitteilung. **Helvetica Chimica Acta**, v. 41, n. 4, p. 123, 1958.

HAMDAN J.S., HAHN R.C. Antifungal drugs for systemic mycosis: an overview of mechanism of action and resistance. **Anti- infective Agents in Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 10, p. 403-412, 2006.

HARVEY, A. L.; EBEL, R. E.; QUINN, R. J. The reemergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 2, p. 111-129, 2015.

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

HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 98, n. (2-3), p. 67-202, 2002.

HELFAND, W.H.; COWEN D.L. **Pharmacy: An illustrated history**, New York: Harry N. Abrams. Inc. Publishers, 1990.

HENMAN, A. O guaraná: sua cultura, propriedades e formas de preparação e uso. São Paulo: Global/Ground; 1983

HENRIQUES, A. T. et al. Alcaloides: Generalidades e Aspectos Básicos. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Ed. UFRGS/ Ed. UFSC, Porto Alegre/ Florianópolis, cap 29, p 641, 1999.

HERRMANN, Klaus M. The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism. **Plant Physiology**, v. 107, n. 1, p. 7, 1995.

HILLMAN, G. G., et al. Soy isoflavones radiosensitize lung cancer while mitigating normal tissue injury. **Radiotherapy and Oncology**, v. 101, n. 2, p. 329-336, 2011.

HOEFEL, R. Ações que estimulam o uso racional de antimicrobianos. **Boletim Farmacoteca**. v. 11, p. 1-4, 2006.

HOFFMANN, A. et al. Plantas Medicinales de Uso Comum en Chile. Santiago do Chile. **Ed. Fundacion Claudio Gay**. 1992, 273 p.

HOGAN, S. et al. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açai. **Food Chemistry**, v.118, n. 2, p. 208, 2010.

HOLETZ, F.B. et al. Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7 p. 1027-1031. 2002.

HSIEH, M. H. et al. Efficacy and tolerability of oral stevioside in patients with mild essential hypertension: a two-year, randomized, placebo-controlled study. **Clinical Therapeutics**, v. 25, n. 11, p. 2797-808, 2003.

HUANG, Zheng et al. Anti-inflammatory Labdane Diterpenoids from *Leonurus macranthus*. **Journal of natural products**, v. 78, n. 9, p. 2276-2285, 2015.

HÜBSCHLE, Thomas et al. Pyrexia, anorexia, adipsia, and depressed motor activity in rats during systemic inflammation induced by the Toll-like receptors-2 and-6 agonists MALP-2 and FSL-1. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 290, n. 1, p. R180-R187, 2006.

HUGHES, C. A.; LETCHER, R.; WARREN, F. L. The Senecio Alkaloids. Part XVI. The Biosynthesis of the "Necine" Bases from Carbon-14 Precursors. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**. p. 4974-4978, 1964.

HUNG, J.-Y., et al. Didymin, a dietary flavonoid glycoside from citrus fruits, induces Fas-mediated apoptotic pathway in human non-small-cell lung cancer cells *in vitro* and *in vivo*. **Lung Cancer**, v. 68, n. 3, p. 366-374, 2010.

HYLDGAARD, M., MYGIND, T., MEYER, R.L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1-24. 2012.

- IDE, T. et al. Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. **Circulation Research**, v. 88, p. 529-535, 2001.
- ITOKAWA, H. et al. Plant- derived natural product research aimed at new drug discovery. **Nature Medicine**, v. 62, p. 263-280, 2008.
- JACOBY, G.A. Mechanisms of resistance to quinolones. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, p. 120-26, 2005.
- JEON, W. K., et al. Anti-platelet effects of bioactive compounds isolated from the bark of *Rhus verniciflua* Stokes. **Journal of ethnopharmacology**, v. 106, n. 1, p. 62-69, 2006.
- JOMOVA, K.; VALKO, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. **Toxicology**, v. 283, n. 2, p. 65-87, 2011.
- JORGE, S. S. A. **Plantas Medicinais: Coletânea de Saberes**. Pdf. Disponível em: http://www.fazendadocerrado.com.br/fotos_noticias/1280/Livro.pdf. Acesso em: 28 de dezembro 2015.
- KAFASH-FARKHAD, N.; ASADI-SAMANI, M.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. A review on phytochemistry and pharmacological effects of *Prangos ferulacea* (L.) Lindl. **Life Sciences Journal**, v. 10, n. 8s, p. 360-7, 2013.
- KAHVECI, N.; GULEC, G.; OZLUK, K. Effects of intracerebroventricularly-injected morphine on anxiety, memory retrieval and locomotor activity in rats: involvement of vasopressinergic system and nitric oxide pathway. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 85, n. 4, p. 859-867, 2006.
- KARAMAN, I. et al. A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **Journal Ethnopharmacology**, v. 85, n. 2, p. 231-235, 2003.
- KARLSEN, A., et al. Anthocyanins inhibit nuclear factor-kappaB activation in monocytes and reduce plasma concentrations of pro-inflammatory mediators in healthy adults. **Journal of Nutrition**, v. 137, n. 8, p. 1951, 2007.
- KARLSEN, A., et al. Anthocyanins inhibit nuclear factor-kB activation in monocytes and reduce plasma concentrations of pro-inflammatory mediators in healthy adults. **The Journal of nutrition**, v. 137, n. 8, p. 1951-1954, 2007.
- KHADKA, D.B.; CHO, W.J. Topoisomerase inhibitors as anticancer agents: a patent update. **Expert Opinion Therapeutic Patents**, v. 23, p. 1033-1056, 2013.
- KHAN, S. A. et al. Withanolides: Biologically Active Constituents in the Treatment of Alzheimer Disease. **Medicinal chemistry (Sharjah (United Arab Emirates))**, 2015.

KITAMURA, Maria; HIROKAWA, Yoshimi; MAEZAKI, Naoyoshi. Asymmetric [2, 3]-Wittig Rearrangement of Oxygenated Allyl Benzyl Ethers in the Presence of a Chiral di-tBu-bis (oxazoline) Ligand: A Novel Synthetic Approach to THF Lignans. **Chemistry—A European Journal**, v. 15, n. 38, p. 9911-9917, 2009.

KLAYMAN, D. L. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. **Science**, v. 228, n. 4703, p. 1049-1055, 1985.

KLEINIG, H. The role of plastids in isoprenoid biosynthesis. **Annual review of plant biology**, v. 40, n. 1, p. 39-59, 1989.

KOLEWE, M.E.; GAURAV, V.; ROBERTS, S.C. Pharmaceutically active natural product synthesis and supply via plant cell culture technology. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 2, p. 243-256. 2008.

KONAN, N. A., et al. Cytotoxicity of cashew flavonoids towards malignant cell lines. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 64, n. 5, p. 435-440, 2012.

KONTOGIORGIS, C.A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.J. Non steroidal anti-inflammatory and anti-allergy agents. **Current Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 1, p. 89-98, 2002.

KOSUGE, T. The role of phenolic in host response to infection. **Annual Review of Phytopathology**, v. 7, p. 195-222, 1969.

KUMAR, C. G. et al.. Antimicrobial activity from the extracts of fungal isolates of soil and dung samples from Kaziranga National Park, Assam India. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 20, p. 283-289, 2010

KUTCHAN, T. M. Alkaloid Biosynthesis -The Basis for Metabolic Engineering of Medicinal Plants. *The Plant Cell*, v. 7, p. 1059-1070, 1995.

LABARCA J.L. Nuevos conceptos en farmacodinâmica, debemos repensar como administramos antimicrobianos? **Revista Chilena de Infectologia**, v. 19, p. 33-37, 2002.

LARANJINHAS, J. et al. Inhibition of metmyoglobin/H₂O₂-dependent low density lipoprotein lipid peroxidation by naturally occurring phenolic acids. **Biochemical Pharmacology**, v. 51, p. 395-402, 1996.

LARSEN, A. K. et al. The antileukemic alkaloid fagaronine is an inhibitor of DNA topoisomerases I and II. **Biochemical pharmacology**, v. 46, n. 8, p. 1403-1412, 1993.

Lazary, V.M.D. Efeitos do consumo do isoflavona na prevenção do câncer de mama. [Monografia]. Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde, Núcleo de Estudos em Educação e Promoção da Saúde, NESPROM, Brasília, 2010.

LEE J.H., et al. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil from Cones of *Pinus koraiensis*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 497 – 502, 2008.

LEE, C.N. et al. Inhibitory effect of stevioside on calcium influx to produce antihypertension. **Planta Med**, v. 67, n. 9, p. 796-799, 2001.

LEITE, J. P. V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. 1.Ed. São Paulo: Atheneu, 344p. 2008.

LEONTI, M. Selection of medicinal plants-Evolutionary considerations for Ethnopharmacology and drug discovery. **Indian Journal of Traditional Knowledge**, v. 14, n. 4, p. 605-608, 2015.

LI, Y.; WU, Y.- L. An over four millenni um story behind qinghaosu (artemisinin)-a fantastic antimalarial drug from a traditional Chinese herb.**Current medicinal chemistry**, v. 10, n. 21, p. 2197-2230, 2003.

LIMA, M.R., et al. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 300-306, 2006.

LIU, Rongrong et al. Production of soybean isoflavone genistein in non-legume plants via genetically modified secondary metabolism pathway.**Metabolic engineering**, v. 9, n. 1, p. 1-7, 2007.

LO, T. N., et al. Dextran and carrageenan evoke different inflammatory responses in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indomethacin. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 221, n. 1, p. 261-267, 1982.

LOGUERCIO, Andrea Pinto et al. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, v. 35, n. 2, p. 371-376, 2005.

Lopes R.M., Oliveira T.D., Nagem T.J., Pinto A.D.S. Flavonoides. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**.v. 3, n. 14, 2010.

LÓPEZ-PUEYO, M. J. et al. Multirresistencia antibiótica en unidades de críticos. **Medicina Intensiva**, v. 35, n. 1, p. 41-53, 2011.

Lozhkin, A.V.; Sakanyan, E.I. Structure of chemical compounds, methods of análisis and process control. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 40, n. 6, p. 337-346, 2006.

M.P.J. Winther, E. Kanters, G. Kraal, M.H. Hofker, Nuclear factor κ B signaling in atherogenesis. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 25, n. 5, p. 904-914, 2005.

MA, Q. et al. Flavonoids from the Pericarps of Litchi chinensis. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 5, p. 1073-1078, 2014.

MADIGAN, M.T. **Microbiologia de Brock**, 12^a ed. São Paulo: Artmed, p. 1128, 2010.

MALACRIDA, C.R.; MOTTAS, S. Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 24, n. 1, p. 59-82, 2006.

MARASCHIN, M.; VERPOORTE, R. Engenharia do metabolismo secundário, otimização da produção de metabólitos secundários em culturas de células vegetais. Biotecnologia. **Rev. Biotecnologia Cienc. Desenvolv**, v. 10, p. 24-28, 1999.

MARINI-BETTÒLO, G. B. Present aspects of the use of plants in traditional medicine. **Journal of ethnopharmacology**, v. 2, n. 1, p. 5-7, 1980.

MARINO, A. et al. Role of natural antioxidants and potential use of bergamot in treating rheumatoid arthritis. **Pharma Nutrition**, v. 3, n. 2, p. 53-59, 2015.

MARKESBERY, W. R.E LOVELL, M. A. DNA oxidation in Alzheimer disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 8, p. 2039-2045, 2006.

MARTINS, E.R., et al. Buscando a saúde por meio das plantas medicinais. **Plantas medicinais**. Ed. UFV, Viçosa, 17-55.2000.

MATTHAUS, B.; OZCAN, M. Glucosinolates composition of young shoots and flower buds of *capparis* (*Capparis species*) growing wild in Turkey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 7323-7325, 2002.

McLEAN, W.F.H.; BLUNDEN, G.; JEWERS, K. Quaternary Ammonium Compounds in the Capparaceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 24, p. 427-434.1996.

McNEIL M.J.; PORTER R.B.; WILLIAMS L.A.; RAINFORD L. **Natural Product Communications**. Departamento de Química da Universidade de West Indies, Mona, 7 de Kingston, Jamaica, Aug. v. 5, n. 8, p. 1301-6. 2010.

MELO, E. A.; GUERRA, N. B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim Sociedade Brasileira Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 36, n. 1, p. 1-11, 2002.

MEYER, A. S.; DONOVAN, J. L.; PEARSON, D. A.; WATERHOUSE, A. L.; FRANKEL, E. N. Fruit hydroxycinnamic acids inhibit low density lipoprotein oxidation *in vitro*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 5, p. 1783-1787, 1998.

MICHALUART, P. et al. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on the activity and expression of cyclooxygenase-2 in human oral epithelial cells and in a rat model of inflammation. **Journal Cancer Research**, v.59, p. 2347–2352, 1999.

MICHELIN, D.C. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 316-320. 2005.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. São Paulo: Probe, 1999. 116 p.

MIN, L.; LAI, Y.; VILLARUZ, A. E.; CHA, D. J.; STURDEVANT, D. E.; OTTO, M. . Gram positive three-component antimicrobial peptidesensing system. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, p. 9469-9474, 2007.

MIRANDA, G.S. et al. Atividade antibacteriana in vitro de quatro espécies vegetais em diferentes graduações alcoólicas. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 15, n. 1, 2013.

MIRHOSEINI M, BARADARAN A, RAFIEIAN-KOPAEI M. Medicinal plants, diabetes mellitus and urgent needs. *J HerbMed Pharmacol* 2013; 2(2): 53-54

MONAGAS, M.; BARTOLOMÉÉ, B.; GÓÓMEZ – CORDOVÉÉS, C. Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. **Critical Reviews in Food and Nutrition**, v. 45, n. 2, p. 85–118, 2005.

Montanari, C. A.; Bolzani, V. S.; **Quimica Nova**, 2001, n.24, p. 105.

MORAIS-BRAGA, M. F. B., et al. Atividade antibacteriana, antifúngica e moduladora da atividade antimicrobiana de frações obtidas de *Lygodium venustum* SW. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v.12, n.1, p.38 – 43, 2013.

MORS, W. B. Looking at the origins. **Ciência e Cultura**, v. 49, p. 310-314, 1997.

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A. **Medicinal Plants of Brazil**. Reference Publications, Michigan: Algonac, p.501, 2000.

MOTHANA, R.A.A., et al. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities and phytochemical screening of some yemeni medicinal plants. **Evidence-based Complementary and alternative medicine**, v. 7, n. 3, p. 323-330, 2010.

MOTHES K, LUCKNER M. 1985. Historical Introduction. In: **Biochemistry of Alkaloids**, ed. by Mothes K, Schütte HR and Luckner M, Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin.

MOTIDOME, M.; LECKING, M. E.; GOTTLIEB, O. R.; **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 42 (Supl), p. 375, 1970.

MOTTA, E. V. S. et al. Atividades antioxidante, antinociceptiva e anti-inflamatória das folhas de *Mucuna pruriens* (L.) DC. **Revista Brasileira Pl. Med**, v. 15, n. 2, p. 264-272, 2013.

MURATA, S. et al. Antitumor effect of 1, 8-cineole against colon cancer. **Oncology**, Rep. 30: 2647-2652. 2013.

MURGANANTHAN, G.; PABBITHI, S. A. Antimicrobial constituents from plants. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 3, n. 1, 2012.

MURRAY, J. C. et al. A topical antioxidant solution containing vitamins C and E stabilized by ferulic acid provides protection for human skin against damage caused by ultraviolet irradiation. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 59, n. 3, p. 418-425, 2008.

NASCIMENTO, G.G.F. et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 247–256, 2000.

NASRI, H.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. Oxidative stress and aging prevention. **International journal of preventive medicine**, v. 1, n. 1, p. 1101-1102, 2013.

NAUSEEF, W. M.; METCALF, J. A.; ROOT, R. K. Role of myeloperoxidase in the respiratory burst of human neutrophils. **Blood**. v. 61, n. 3, p. 483-492, 1983.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products of therapeutic importance. **Natural products**, v. 2, p. 623- 650. 2010.

NEWMAN, D.J.; GRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as source of new drugs over a period 1981-2002. **Journal Nature Products**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

NIEMETZ, R.; GROSS, G. G. Enzymology of gallotannin and ellagitannin biosynthesis. **Phytochemistry**, v. 66, n. 17, p. 2001-2011, 2005.

NIERO, R. et al. Principais aspectos químicos e biológicos de terpenos. In: YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. UNIVALE, 2007.

NIKI, E. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, p. 503-515, 2010.

NOVAIS, T.S., et al. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 5-8, 2003.

OKA, C.; Roberto, A. **Herbário Cris Oka**. Disponível: <http://www.cotianet.com.br/eco/Herb/hist.htm>. Acesso: 04 de janeiro de 2016.

- OLIVEIRA, R.A.G., et al. Interference of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng essential oil on the anti-*Candida* activity of some clinically used antifungals. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 186-190, 2007.
- PADILHA, I.Q.M. et al. Antimicrobial activity of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. from Northeast Brazil against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20 n. 1, p. 45-47, 2010.
- PARK, K.-R. et al. β -Caryophyllene oxide inhibits growth and induces apoptosis through the suppression of PI3K/AKT/mTOR/S6K1 pathways and ROS-mediated MAPKs activation. **Cancer Letters**, v. 312, n. 2, p. 178-188, 2011.
- PECKOLT, O. Necrológio do Dr. Gustavo Peckolt. **Revista da Flora Medicinal**, Ano XVI, n.4, p.128-139, 1949.
- PEREIRA, D.A.; BRITO, A.C.; AMARAL C.L.F. Biologia floral e mecanismo reprodutivos do Mussambê (*Cleome spinosa* Jacq.) com vistas ao melhoramento genético. **Biotemas**, v. 20, n. 4, p. 27-34, 2007.
- PERES, M. T. L. P., et al. Estudos químicos e biológicos de *Microgramma vacciniifolia* (Langsd. & Fisch.) Copel (Polypodiaceae). **Química Nova**, v. 32, p. 897 – 901, 2009.
- PESSINI, G.L., et al.. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 21-24. 2003.
- PHILLIPSON, J.D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 56, n. 3, p. 237-243. 2000.
- PINTO, Angelo C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química nova**, p. 45-61, 2002.
- PINTO, Angelo C. O Brasil dos viajantes e dos exploradores e a química de produtos naturais brasileira. **Química Nova**, v. 18, n. 6, p. 608-615, 1995.
- PIRES, M. J. P. Aspectos históricos dos recursos genéticos de plantas medicinais. **Rodriguésia**, v. 35, n. 59, p. 61-66, 1984.
- POLITI F.A.Z, PIETRO R.C.L, MOREIRA R.R.D. Estudos farmacognósticos e avaliação de atividades biológicas de extratos obtidos das cascas pulverizadas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. (Humiraceae). Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de fármacos e medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2009.
- PRAKASH, D. Total phenol, antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants. **International Journal of Food Science and Nutrition**, v.58, n.1, p.18-28, 2007.

QUEIROZ, A. C. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of flavonoids PMT1 and PMT2 isolated from *Piper montealegreanum* Yuncker (Piperaceae) in mice. **Natural product research**, v. 28, n. 6, p. 403-406, 2014.

QUIDEAU, S. et al. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, n. 3, p. 586-621, 2011.

QUIN, Y.; et al. Anthocyanin supplementation improves serum LDL- and HDL-cholesterol concentrations associated with the inhibition of cholesteryl-ester transfer protein in dyslipidemic subjects. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 90, n. 3, p. 485, 2009.

RAFIEIAN-KOPAEI, M.; BARADARAN, A.; RAFIEIAN, M. Plants antioxidants: From laboratory to clinic. **Journal of nephropathology**, v. 2, n. 2, p. 152-153, 2013.

RAFIEIAN-KOPAEI, M. Medicinal plants and the human needs. **Journal of HerbMed Pharmacy**, v. 1, n.1, p.1-2, 2012.

RAMACHANDRAN, N. A. G. Cleosandrin, a novel 7-phenoxy coumarin from the seeds of *Cleome isosandra*. **Indian Journal of Chemistry**, v. 17, p. 438-440, 1979.

RANG, H. P.; DALLE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. Tradução de Amaury José da Cruz Júnior. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1997.

RESCHKE, A.; MARQUES, L. M.; MAYWORM, M. A. S. Atividade antibacteriana de *Ficus benjamina* L. (Moraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 2, p. 67-70, 2007.

REZAYOF, A.; HOSSEINI, S. S.; ZARRINDAST, M. R. Effects of morphine on rat behaviour in the elevated plus maze: the role of central amygdala dopamine receptors. **Behavioural brain research**, v. 202, n.2, p.171-178, 2009.

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

RÍOS, J. L.; GINER, R. M.; PRIETO, J. M. New findings on the bioactivity of lignans. **Studies in natural products chemistry**, v. 26, p. 183-292, 2002.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Pharmacognosy and pharmacobiotechnology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996. p.1-14.

ROBBINS, S. L., et al. **Fundamentos de Robbins: patologia estrutural e funcional**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001.

Roberts MF, Wink M.. A short history of alkaloids. In **Alkaloids: biochemistry, ecology and medicinal applications**, ed. Roberts and Wink, Plenum Press, New York, 1998.

ROBINSON, Augustus. Robinson 1829-1834. **Hobart: Tasmanian Historical Research Association**, 1966.

ROBINSON, V. N. E. The elimination of charging artefacts in the scanning electron microscope. **Journal of Physics E: Scientific Instruments**, v. 8, n. 8, p. 638, 1975.

RODRIGUES, A. C. F., et al, Atividade antibacteriana, antioxidante e toxicidade do extrato etanólico de *Senna obtusifolia*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 10, p. 43 – 53, 2013.

ROSA, R.L.; BARCELOS, A.L.V.; BAMPI, G. Investigação do uso de plantas medicinais no tratamento de indivíduos com diabetes melito na cidade de Herval D' Oeste - SC. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, n. 2, p. 306-310, 2012.

ROTELLI, A. E. et al. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. **Pharmacological Research**, v. 48, n. 6, p. 601– 606, 2003.

SAAD, B; AZAIZEH, H.; SAID, O. Tradition and perspectives of Arab herbal medicine: a review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 4, p. 475-479, 2005.

SAIJA, A. et al. Influence of different penetration enhancers on *in vitro* skin permeation and in vivo photoprotective effect of flavonoids. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 175, n. 1, p. 85-94, 1998.

SAIN, Soumyadeep et al. Beta caryophyllene and caryophyllene oxide, isolated from *Aegle marmelos*, as the potent anti-inflammatory agents against lymphoma and neuroblastoma cells. **Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Agents)**, v. 13, n. 1, p. 45-55, 2014.

SAKALANI, A.; KUTTY, S.K. Plant-derived compounds in clinical trials. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 3, p. 161-171, 2008.

SAKATA, R.K.; ISSY, A.M. **Fármacos para tratamento da Dor**.1.ed. Barueri: Editora Manole, 2008.

SALGADO, J. M. **Guia dos Funcionais: Dieta Alimentar para Manter a Saúde e Evitar Doenças**. Rio de Janeiro: Ediouro Publicações, 2009, 192p.

SANN, H.; PIERAU, F.-K. Efferent functions of C-fiber nociceptors. **Zeitschrift für Rheumatologie**, v. 57, n. 2, p. S8-S13, 1998.

SANTOS, Karla KA et al. Atividade antifúngica de extratos vegetais e animais da região do cariri. **Cadernos de Cultura e Ciência**, v. 1, n. 1, p. 53-65, 2010.

SANTOS, E. C. Monografia do *Geissospermum vellosii* vulgo pão-pereira **Revista da Flora Medicinal**, v. XV, n.8, p.317-339, 1948.

SANTOS, E. C. Therapeutica. **Revista Pharmaceutica Brasileira**, v. IV, p.49, 1854.

SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. Inflammatory edema induced by 1, 8-cineole in the hindpaw of rats: a model for screening antiallergic and anti-inflammatory compounds. **Phytomedicine**, v.5, n.2, p.115-119, 1998.

SANTOS, M.R.A.; LIMA, M.R.; FERREIRA, M.G.R. Uso de plantas medicinais pela população de Ariquemes, em Rondônia. **Horticultura Brasileira**, v. 26, p. 244-250, 2008.

SARDI, E.; TORDI, E. Determination of fully N-methylated compound in different cabbage and bee trout varieties. **Acta Biologia Szegediensis**, 49, (1-2): 43-45, 2005.

SATO, F et al. Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.98, n.1, p. 367-72, 2001.

SCHENKEL, E. P.; Gosmann, G.; Athayde, M. L. Saponinas. In: Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosman, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. **Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento**.6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007, 1104p.

SCHULZ, V.; HÄNSEL, R.; TYLER, V.E. Medicinal plants, phytomedicines, and phytotherapy. In: _____. **Rational phytotherapy: a physician's guide to herbal medicine**. 4.ed. New York, Berlin: Springer, 2001. cap.1, p.1-39.

SEWELL, R. D. E.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. The history and ups and downs of herbal medicine usage. **J HerbMed Pharmacol**, v. 3, n. 1, p. 1-3, 2014.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. Food Phenolics: sources, chemistry, effects and applications. Technomic Publ. **Lancaster, PA**, 1995, 331 p.

SHARMA, P.; GBKS, P.; ARCHANA, S. A. Comprehensive Review: Medicinal Plants with Potential Antidiabetic Activity. **Research & Reviews: Journal of Herbal Science**, v. 4, n. 1, p. 29-57, 2015.

SHIRZAD H., SHAHRANI M., RAFIEIAN-KOPAEI M. Comparison of morphine and tramadol effects on phagocytic activity of mice peritoneal phagocytes *in vivo*. **International Immunopharmacol**, v.9, n.7-8, p.968-970, 2009.

SHIRZAD H., TAJI F., RAFIEIAN-KOPAEI M. Correlation between antioxidant activity of garlic extracts and WEHI-164 fibrosarcoma tumor growth in BALB/c mice. **Journal of Medicinal Food**, v.14, n.9, p.969-974, 2011.

Shu, Y-Z.. **Journal Natural Products**, 1998, n. 61, p. 1053.

SILVA JUNIOR, I.E., et al. Antimicrobial screening of some medicinal plants from Mato Grosso Cerrado. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 1B, p. 242-248, 2009.

SILVA, M. I. G., et al. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 455-462, 2006.

SILVA, R.B.L.E. A etnobotânica de plantas medicinais na comunidade quilombola de Curiaú, Macapá-AP, Brasil. Dissertação (Mestrado - Área de Concentração em Agronomia) – Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém. 2002. 172p.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 12, n. 1, p. 35-40, 2002.

SIMÕES, C. M. O., et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS; Florianópolis: Ed. UFSC, 2004.

SING, P.D.A.; WEST, M.E. Pharmacological investigations of sticky viscome extract (*Cleome viscosa* L.) in rats, mice and guinea-pigs. **Phytotherapy research**, v.5, n.2, p. 82-84, 1991.

SMITH, C.J. et al. Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. **Proceedings of the National Academy Sciences U.S.A.**, v.95, p.13313-13318, 1998.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOBRINO, C. et al. Efecto de la queleritrina y de la ciclosporina sobre la peroxidación lipídica y receptores de somatostatina en hipocampo de rata con encefalomiелitis autoinmune experimental. **Dianas** v.2, n.2: e20130906, 2013.

SOFIATI, F. Estudo fitoquímico e atividades biológicas preliminares de extratos de *Polygonum acre* (Polygonaceae) H.B.K. e *Synadenium carinatum* Boiss. (Euphorbiaceae). 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, 2009.

SOUSA, C.M. de M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUSA, V.C. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação de famílias de angiospermas da flora brasileira baseado no A.P.G. II. **Nova Odessa**, S.P.: Instituto Plantarum, p. 404, 2005.

SPARG, S. G.; LIGHT, M. E.; STANDEN, J. Biological activities and distribution of plant saponins. **Journal of Ethnopharmacology**, v.94, n.2, p.219-243, 2004.

SRIVASTAVA, S. D. Chemical Constituents of *Cleome Viscosa*. **Indian Journal of Chemistry**, Section B: Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry, 21, p. 165-167. 1982.

SUDO, Roberto T. et al. Antinociceptive effects of hydroalcoholic extract from *Euterpe oleracea* Mart.(Açaí) in a rodent model of acute and neuropathic pain. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, n. 1, p. 208, 2015.

Sukkar MY, Ardawi MSM, El Munshid HA. Concise human physiology. New Jersey: Wiley-Blackwell Science; 2000, p. 446- 464.

SUN, L. et al. Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. **Food and Chemical Toxicology**, v.49, n.10, p. 2689–2696, 2011.

SVOBODOVÁ, A.; PSOTOVÁ, J.; WALTEROVÁ, D. Natural phenolic in the prevention of UV-induced skin damage. **A review. Biomedical Papers**, v.147, n. 2, p. 137-45, 2003.

SWAMY, M. K.; SINNIHA, U. R. A Comprehensive Review on the Phytochemical Constituents and Pharmacological Activities of *Pogostemon cablin* Benth.: An Aromatic Medicinal Plant of Industrial Importance. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 8521-8547, 2015.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4ªed. Editora Artmed, Porto Alegre, 820p, 2008.

TAKAMURA, O. S. Editorial: Tendências no estudo de Plantas medicinais. **Arquivos de Ciências da Saúde Unipar**, v. 12, n. 3, p. 165-274, 2008.

TANG, X., et al. Antimicrobial resistances of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates from swine in China. **Microbial pathogenesis**, v. 50, n. 5, p. 207-212, 2011.

TASI, Y.-C. et al. Potential Natural Products for Alzheimer's Disease: Targeted Search Using the Internal Ribosome Entry Site of Tau and Amyloid- β Precursor Protein. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 4, p. 8789-8810, 2015.

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

TAVARES, W. Introdução ao estudo dos antimicrobianos. In: Tavares, W. **Manual de antibióticos e fitoterápicos anti-infecciosos** 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 1996. p.3-13

TEIXEIRA, L. N.; STRINGHETA, P. C.; DE OLIVEIRA, F. A. Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. **Ceres**, v. 55, n. 4, 2015.

TEIXEIRA, P. C. **Do herbalismo tribal aos remédios florais do Dr. Bach**. São José do Rio Preto: São José, 1994. 33 p.

TIRAPELLI, C. R. et al. Hypotensive action of naturally occurring diterpenes: a therapeutic promise for the treatment of hypertension. **Fitoterapia**, v.81, n.7, p. 690-702, 2010.

TODOROVA, M.; TRENDAFILOVA, A. *Sideritis scardica* Griseb., an endemic species of Balkan peninsula: Traditional uses, cultivation, chemical composition, biological activity. **Journal of ethnopharmacology**, v. 152, n. 2, p. 256-265, 2014.

TOLEDO, A. C. O., et al. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, v. 21, n. ½, p. 7-13, 2003.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. Ed. Porto Alegre: Artmed, p.827, 2003.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, p.386, 2008.

TRANQUILLI, W. J. Fisiologia da dor aguda. In: GREENE, S. A. **Segredos em anestesia veterinária e manejo da dor**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 399-402.

TRAVERSA, G., et al. Cohort study of hepatotoxicity associated with nimesulide and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **British Medical Journal**, v. 327, p. 901-909, 2004.

TRIAS, J.; GORDON, E.M. Innovative approaches to novel antibacterial drug discovery. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, p. 757-762, 1997.

TYLER, V.E. Natural products and medicine: an overview. In: BALICK, M.J.; ELISABETSKY, E.; LAIRD, S.A., eds. **Medicinal resources of the tropical forest, biodiversity and its importance to human health**. New York: Columbia University Press, 1996. p.3-10. (Biology and resource management series).

UETANABARO, A.P.T.; GÓES-NETO, A. Segurança alimentar: transferência horizontal de genes e alimentos transgênicos. **Sitientibus**, v. 35, p. 111-124, 2006.

UZEL, A. et al. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. **Microbiology Research**, v. 160, p. 189-195, 2005.

VALLE, J. R.; A Farmacologia no Brasil (Antecedentes e Perspectivas) Academia de Ciências do Estado de São Paulo: São Paulo, 1978. 230p.

VALLS, J. et al. Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavonas and flavonols. **Journal of Chromatography A**, v.1216, n.43, p.7143 – 7172, 2009.

VANE, L.R.; BAKHLE, Y.S. BOTTING, R.M. Ciclooxygenases 1 and 2. **Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology**, v. 38, p. 97-120, 1998.

VASCONCELOS S.M.L., et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**. São Paulo. v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C. The *Copaifera* L. genus. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 273-286, 2002.

VEIGA JUNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.2, p. 308, 2008.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p.510-528, 2005.

VERRI, W. A. et al. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development?. **Pharmacology & therapeutics**, v. 112, n. 1, p. 116-138, 2006.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VIGIL, A.L.; PALOU, E.; ALZAMORA, S.M. Naturally occurring compounds: plant sources. In: DAVIDSON, P.M.; SOFOS, J.N.; BRANEN, A.L. (Ed.). **Antimicrobials in food**. Boca Raton: CRC Press, 2005.

VILEGAS, W. Fitoquímica de plantas brasileiras. 1998. 109p. Tese (Livro-docência em Química Orgânica) – Instituto de Química, Universidade estadual Paulista, 1998, Araraquara.

VOKURKOVA, M.; XU, S.; TOUYZ, R. M. Reactive oxygen species, cell growth, cell cycle progression and vascular remodeling in hypertension. **Future Cardiology**. v. 3, p. 53- 63, 2007.

VONBERG, R.P., et al. Epidemiology of Multi-Drug-Resistant Gram-Negative Bacteria: Data from an University Hospital Over a 36-month period - Int. J. Hyg. **Environmental Health**, v. 211, p. 251–257, 2008.

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. 1 Overview of the Field of TLC in Phytochemistry and the Structure of the Book. **Thin Layer Chromatography in Phytochemistry**, p. 1, 2008.

WANG, W., et al. Growthpromoting effects of quercetin on peripheral nerves in rats. **The International journal of artificial organs**, v. 34, n. 11, p. 1095-1105, 2011.

WANG, Z.; HSU, C.; YIN, M. Antioxidative characteristics of aqueous and ethanol extracts of glossy privet fruit. **Food Chemistry**. v. 112, p. 914–918, 2009.

WEYANT, M. J. et al. Colon cancer chemopreventive drugs modulate integrin-mediated signaling pathways. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 3, p. 949-956, 2000.

WHITTLE, B.J.R. Gastrointestinal effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Fundamental and Pharmacology**, v. 17, n. 3, p. 301-313, 2003.

WILLFÖR, S. M.; SMEDS, A. I.; HOLMBOM, B. R. Chromatographic analysis of lignans. **Journal of Chromatography A**, v. 1112, n. 1, p. 64-77, 2006.

WILLIAMS, C.A. et al. A biologically active lipophilic flavonol from *Tanacetum parthenium*. **Phytochemistry**, v. 38, n. 1, p. 267-270. 1995.

WINTHER, M.P.J.; et al. Nuclear factor κ B signaling in atherogenesis, Arteriosclerosis. **Thrombosis and Vascular Biology**. v.25, n.5, p.904, 2005.

WITAICENIS, Aline et al. Suppression of TNBS-induced colitis in rats by 4-methylesculetin, a natural coumarin: comparison with prednisolone and sulphasalazine. **Chemico-biological interactions**, v.195, n.1, p.76-85, 2012.

World HealthOrganization. (2015). Antibiotic resistance. World HealthOrganization

WRIGHT, G. Antibiotics: An irresistible newcomer. **Nature**, v. 517, n. 7535, p. 442-444, 2015.

XI, Z.; RAMIREZ, J. L.; DIMOPOULOS, G. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. **PLoS Pathog**, v.4, n.7, p. e1000098, 2008.

Xu S.L. et al. Flavonoids, derived from traditional chinese medicines, show roles in the differentiation of neurons: possible targets in developing health food products. **Birth Defects Res C Embryo Today: Reviews**, v.99, n.4, p.292-9, 2013.

YAMADA, Y.; YASUI, H.; SAKURAI, H. Suppressive effect of caffeic acid and its derivatives on the generation of UVA-induced reactive oxygen species in the skin of hairless mice and pharmacokinetic analysis on organ distribution of caffeic acid in ddY mice. **Photochemistry and Photobiology**, v.82, n. 6, p.1668–1676, 2006.

YAMAMOTO, H; OGAWA, T. Antimicrobial activity of perilla seed polyphenols against oral pathogenic bacteria. **Bioscience Biotechnology, and Biochemistry**, v. 66, n. 4, p. 921-4, 2002.

YAN, X.-T. et al. Identification and biological evaluation of flavonoids from the fruits of *Prunus mume*. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 24, n. 5, p. 1397-1402, 2014.

YANG, G.-M. et al. Antitumor effects of two extracts from *Oxytropis falcata* on hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo*. **Chin J Nat Med**. 2013;11(5):519-24.

YANG, Yi Fu et al. Anti-Inflammatory Natural Products. **Mediators of inflammation**, 2015.

YI, L. et al. Structural requirements of anthocyanins in relation to inhibition of endothelial injury induced by oxidized low-density lipoprotein and correlation with radical scavenging activity. **FEBS Letters**, v. 584, n. 3, p. 583, 2010.

YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal. **Chapecó: Argos**, 500p. 2001.

Yunes, R. A.; Cechinel Filho, V.; Em Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna; Yunes, R. A.; Calixto, J. B., eds.; 1a ed.; Ed. Argos: Chapecó, 2001, cap. 1; Yunes, R. A.; Pedrosa, R. C.; Cechinel Filho, V.; Química Nova, n. 24, p. 147, 2001.

ZACCHINO, S.A., et al. The need for antifungal drugs: screening for antifungal compounds with a selective mode of action with emphasis on the inhibitors of the fungal cell wall. In: RAI, M.; MARES, D. **Plant derived antimycotics: current trends and future prospects**. CRC Press, p. 1-41, 2003.

ZAKIR, M.M.; FREITAS, I. R. Benefícios à saúde humana do consumo de isoflavonas presentes em produtos derivados da soja. **Journal of bioenergy and food science**, v.2, n.3, 2015.

VOKURKOVA, M.; XU, S.; TOUYZ, R. M. Reactive oxygen species, cell growth, cell cycle progression and vascular remodeling in hypertension. **Future Cardiology**, v. 3, p. 53- 63, 2007.

VONBERG, R.P., et al. Epidemiology of Multi-Drug-Resistant Gram-Negative Bacteria: Data from an University Hospital Over a 36-month period - Int. J. Hyg. **Environmental Health**, v. 211, p. 251–257, 2008.

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. 1 Overview of the Field of TLC in Phytochemistry and the Structure of the Book. **Thin Layer Chromatography in Phytochemistry**, p. 1, 2008.

WANG, W., et al. Growthpromoting effects of quercetin on peripheral nerves in rats. **The International journal of artificial organs**, v. 34, n. 11, p. 1095-1105, 2011.

WANG, Z.; HSU, C.; YIN, M. Antioxidative characteristics of aqueous and ethanol extracts of glossy privet fruit. **Food Chemistry**, v. 112, p. 914–918, 2009.

WEYANT, M. J. et al. Colon cancer chemopreventive drugs modulate integrin-mediated signaling pathways. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 3, p. 949-956, 2000.

WHITTLE, B.J.R. Gastrointestinal effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Fundamental and Pharmacology**, v. 17, n. 3, p. 301-313, 2003.

WILLFÖR, S. M.; SMEDS, A. I.; HOLMBOM, B. R. Chromatographic analysis of lignans. **Journal of Chromatography A**, v. 1112, n. 1, p. 64-77, 2006.

WILLIAMS, C.A. et al. A biologically active lipophilic flavonol from *Tanacetum parthenium*. **Phytochemistry**, v. 38, n. 1, p. 267-270. 1995.

WINTHER, M.P.J.; et al. Nuclear factor κB signaling in atherogenesis, Arteriosclerosis. **Thrombosis and Vascular Biology**, v.25, n.5, p.904, 2005.

WITAICENIS, Aline et al. Suppression of TNBS-induced colitis in rats by 4-methylesculetin, a natural coumarin: comparison with prednisolone and sulphasalazine. **Chemico-biological interactions**, v.195, n.1, p.76-85, 2012.

World HealthOrganization. (2015). Antibiotic resistance. World HealthOrganization

WRIGHT, G. Antibiotics: An irresistible newcomer. **Nature**, v. 517, n. 7535, p. 442-444, 2015.

XI, Z.; RAMIREZ, J. L.; DIMOPOULOS, G. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. **PLoS Pathog**, v.4, n.7, p. e1000098, 2008.

Xu S.L. et al. Flavonoids, derived from traditional chinese medicines, show roles in the differentiation of neurons: possible targets in developing health food products. **Birth Defects Res C Embryo Today: Reviews**, v.99, n.4, p.292-9, 2013.

YAMADA, Y.; YASUI, H.; SAKURAI, H. Suppressive effect of caffeic acid and its derivatives on the generation of UVA-induced reactive oxygen species in the skin of hairless mice and pharmacokinetic analysis on organ distribution of caffeic acid in ddY mice. **Photochemistry and Photobiology**, v.82, n. 6, p.1668–1676, 2006.

YAMAMOTO, H; OGAWA, T. Antimicrobial activity of perilla seed polyphenols against oral pathogenic bacteria. **Bioscience Biotechnology, and Biochemistry**, v. 66, n. 4, p. 921-4, 2002.

YAN, X.-T. et al. Identification and biological evaluation of flavonoids from the fruits of *Prunus mume*. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 24, n. 5, p. 1397-1402, 2014.

YANG, G.-M. et al. Antitumor effects of two extracts from *Oxytropis falcata* on hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo*. **Chin J Nat Med**. 2013;11(5):519-24.

YANG, Yi Fu et al. Anti-Inflammatory Natural Products. **Mediators of inflammation**, 2015.

YI, L. et al. Structural requirements of anthocyanins in relation to inhibition of endothelial injury induced by oxidized low-density lipoprotein and correlation with radical scavenging activity. **FEBS Letters**, v. 584, n. 3, p. 583, 2010.

YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal. **Chapecó: Argos**, 500p. 2001.

Yunes, R. A.; Cechinel Filho, V.; Em Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna; Yunes, R. A.; Calixto, J. B., eds.; 1a ed.; Ed. Argos: Chapecó, 2001, cap. 1; Yunes, R. A.; Pedrosa, R. C.; Cechinel Filho, V.; Química Nova, n. 24, p. 147, 2001.

ZACCHINO, S.A., et al. The need for antifungal drugs: screening for antifungal compounds with a selective mode of action with emphasis on the inhibitors of the fungal cell wall. In: RAI, M.; MARES, D. **Plant derived antimycotics: current trends and future prospects**. CRC Press, p. 1-41, 2003.

ZAKIR, M.M.; FREITAS, I. R. Benefícios à saúde humana do consumo de isoflavonas presentes em produtos derivados da soja. **Journal of bioenergy and food science**, v.2, n.3, 2015.

CAPÍTULO 1

Manuscrito a ser submetido no Periódico: *Frontiers in Microbiology*

Fator de impacto: 4

Qualis:A2

Antimicrobial activity and phytochemical analysis of organic extracts from *Cleome spinosa* Jacq.

Ana Paula N. Sant'Anna da Silva¹, Caique Silveira Martins da Fonseca¹, Luis Cláudio Nascimento Da Silva^{2*}, Janete Magali d. Araújo³, Maria Tereza dos Santos Correia⁴, Marilene da Silva Cavalcanti⁵, Vera Lucia de Menezes Lima¹

¹Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil, ²Faculty of Science / Department of Biology, University of Copenhagen, Denmark, ³Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil, ⁴Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil, ⁵Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil

Submitted to Journal:
Frontiers in Microbiology

Specialty Section:
Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy

Article type:
Original Research Article

Manuscript ID:
178975

Received on:
22 Nov 2015

Revised on:
18 Feb 2016

Frontiers website link:
www.frontiersin.org

ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND PHYTOCHEMICAL ANALYSIS OF ORGANIC
EXTRACTS FROM *Cleome spinosa* JAQC.

Ana Paula Sant'Anna da Silva¹; Luís Cláudio Nascimento da Silva²; Caíque Silveira Martins da Fonseca¹; Janete Magali de Araújo³, Maria Tereza dos Santos Correia⁴; Marilene da Silva Cavalcanti⁵; Vera Lucia de Menezes Lima^{1*}

¹Laboratório de Lipídeos e Aplicações de Biomoléculas em Doenças Prevalentes e Negligenciadas, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

²Faculty of Science, University of Copenhagen, Denmark.

³Laboratório de Genética de Microrganismos, Departamento de Antibióticos, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

⁴Laboratório de Bioquímica de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

⁵Laboratório de Fungos Aquáticos, Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

Running title: **Antimicrobial Activity of *Cleome spinosa* Jaqc.**

***Corresponding Author:**

Vera Lúcia de Menezes Lima

Avenida Professor Moraes Rêgo, S/N.

Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil.

CEP: 50670-420. Phone: (+5581) 21268540

E-mail: lima.vera.ufpe@gmail.com

Abstract

Due to the use of *Cleome spinosa* Jacq. (Cleomaceae) in traditional medicine against inflammatory and infectious processes, this study evaluated the *in vitro* antimicrobial potential and chemical composition of extracts from its roots and leaves. From leaves (L) and roots (R) of *C. spinosa* different extracts were obtained (cyclohexane: ChL and ChR; chloroform: CL and CR; ethyl acetate: EAL and EAR, methanol: ML and MR). Antibacterial activity was evaluated by the broth microdilution method to obtain the minimum inhibitory (MIC) and microbicidal (MMC) concentrations against 17 species, including bacteria and yeasts. Additionally, antimicrobial and combinatory effects with oxalicin were assessed against eight *Staphylococcus aureus* strains with different antibiotic-resistance profiles. All *C. spinosa* extracts showed a broad spectrum of antimicrobial activity, as they have inhibited all tested bacteria and yeasts. This activity seems to be related to the phytochemicals (flavonoid, terpenoids and saponins) detected into the extracts of *C. spinosa*. ChL and CL extracts were the most actives, with MIC less than 1 mg/mL against *S. aureus*, *Bacillus subtilis* and *Micrococcus luteus*. It is important to note that these concentrations are much lower than their 50% hemolysis concentration (HC₅₀) values. Strong correlations were found between the average MIC against *S. aureus* and their phenolic ($\rho = -0.89$) and flavonoid content ($\rho = -0.87$), reinforcing the possible role of these metabolite classes on the antimicrobial activity of *C. spinosa* derived extracts. Moreover, CL and CR showed the best inhibitory activity against *S. aureus* clinical isolates, they also showed synergistic action with oxacilin against all strains (at least at one combined proportion). These results encourage the identification of active substances with a high valuable perspective for the treatment of infections caused by drug resistant microorganisms.

Key Words: plant-derived products, drug discovery, antibacterial agents, synergistic action, *S. aureus*.

Introduction

Microbial resistance to antibiotics is one of the most serious public health problem, especially in developing countries where infectious diseases still represent a major cause of human mortality (WHO, 2014). Among the microorganisms that represent a significant health threat, *Staphylococcus aureus* is highlighted as this species is responsible for a number of human illness conditions, such as skin infections and septicemia (Adhikari et al., 2012). Among fungal pathogens, the genus *Candida* also has high clinical relevance and it is responsible for a wide variety of infections, from superficial mucocutaneous to more invasive diseases (Kim and Sudbery, 2011). Approximately 75% of women, at least once in their life, develop candidiasis caused by *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, and/or *C. krusei* (Simonetti, 2014). This issue encourages the search for novel antimicrobial agents.

One of the oldest forms of medical practice is the use of plants for therapeutic purposes; teas, syrups, tinctures, among others have been used as medicines and in many cases come to be the sole therapeutic resource of certain communities and ethnic groups (Amorozo 2002; Oliveira et al., 2012). Thus, knowledge about the therapeutic potential of plants is of great scientific and medical interest, as an effective alternative to the battle against resistant microorganisms (Murganathan and Pabbithi, 2012; dos Santos et al., 2015).

Some species of the genus *Cleome* (Cleomaceae) have been investigated for medical properties and some of them had their anti-inflammatory (Sharma et al., 2010; Abarello et al., 2012.), analgesic (Bose et al., 2007), and antimicrobial (Sudhakar et al., 2006; McNeil et al., 2010) activities evaluated. *C. spinosa* Jacq is a perennial herb that grows in the Central-West, Northeast, North and Southeast of Brazil and is known in Brazil as "Mussambê". Its leaves and flowers have been used in traditional medicine: leaves infusion is used in the treatment of asthma, cough, and bronchitis, while flowers infusion is used against fever (Agra et al., 2007). So far, some pharmacological actions have been proven such as antimicrobial, antinociceptive, anti-inflammatory, anthelmintic (McNeil et al., 2010; Albarello et al., 2013; Andrade et al., 2014). Regarding the antimicrobial activity, it is reported for essential oils from leaves, which significantly inhibit *Streptococcus pyogenes* Group A (McNeil et al., 2010). Based on the uses of *C. spinosa* in folk medicine, the aim of study was to evaluate the antimicrobial activity and phytochemical constituents of leaves and roots of this plant.

Material and Methods

Plant material

The leaves and roots of *C. spinosa* were collected at *Universidade Federal Rural de Pernambuco – Dois Irmãos* (Latitude 8° 01'22.3 "; Longitude: 34° 57'15.8"). The botanical material was identified by Dr. Marlene Carvalho de Alencar Barbosa and deposited in the Herbarium UFP - Geraldo Mariz, at the Department of Botany, *Universidade Federal de Pernambuco* (UFPE), under the voucher number 76,556.

Extract Preparation

Samples (100g) from each tissue of *C. spinosa* were dried and milled and separately subjected to Soxhlet extraction using an elutropic series of solvents (in the following order: cyclohexane, chloroform, ethyl acetate and methanol) at a temperature below of the boiling point of each solvent. All samples were subjected to saturation at reflux for 24 hours. After this time, the extracts were filtered through a Whatman filter paper No 1. All extracts from leaves (L) or roots (R) (cyclohexane: ChL and ChR; chloroform: CL and CR; ethyl acetate: EAL and EAR; methanol: ML and MR) were concentrated until complete removal of the solvent on a rotating evaporator at 45° under reduced pressure and stored for later antimicrobial and phytochemical analyses.

Phytochemical Analysis

An aliquot (10 µL) of each extract obtained from leaves and roots of *C. spinosa* was subjected to qualitative phytochemical analysis to ascertain the presence of secondary metabolites such as: alkaloids, coumarins, anthracene and cinnamic acid derivatives, flavonoids, monoterpenoids, sesquiterpenoids, diterpenoids were according to Wagner and Bladt (1996); tests for tannins, triterpenoids and steroids were as reported by Harbone (1998); proanthocyanidins and leucoanthocyanidins were according to Robertson et al. (1957); reducing sugars and the presence of saponins were performed according to Russell (1982) and Costa (2002), respectively. The compounds classes were visualized as aid thin layer chromatography (TLC) on silica gel 60 F254 (Merck, Germany), different systems of development and adequate visualization techniques were used: Dragendorff, NEU-PEG, KOH-Ethanol, Liebermann-Burchard, vanillin-sulfuric acid and others reagents, according to the respective method.

Determination of Total Phenolic Content

The total phenol content in each extract was determined as reported by Li et al. (2008). Briefly, 200 µL of diluted sample (1mg) were added to 1 mL of 1:10 diluted Folin-Ciocalteu

reagent. After 4 min, 800 mL of saturated sodium carbonate solution (75 g/L) was added. After 2 h of incubation at room temperature, protected from light, the absorbance at 765 nm was measured in triplicate. Gallic acid (0 - 500 mg/L) was used as the calibration curve. The results were expressed as mg of gallic acid equivalents (GAE)/g dry weight of plant extract.

Determination of Flavonoids

The quantification of total flavonoid content in each extract followed the methodology proposed by Woisky and Salatino (1998), to 0.5 mL of diluted samples (1 mg) was added 0.5 mL of 2% AlCl_3 (w/v) solution prepared in methanol. After 30 minutes of incubation at room temperature, protected from light, the absorbance was measured at 420 nm. All measurements were done in triplicate. The results were expressed as mg of quercetin equivalent (QE)/g dry weight of plant extract.

Antimicrobial assays

Microorganisms

Twelve bacterial strains provided by the Culture Collection UFPEDA (Department of Antibiotics, UFPE) and five different strains of *Candida* species obtained from the Culture Collection URM (Department of Mycology, UFPE) were used for the antimicrobial tests, according to Tables 1 and 2.

Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimal microbicidal concentration (MMC)

The minimum inhibitory (MIC) and minimal microbicidal (MMC) concentrations were determined by the broth microdilution method in accordance with the guidelines established by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2011). Sabouraud broth was used for yeasts and Mueller Hinton broth for bacterial strains, except for *Streptococcus mutans*, which was cultivated in Brain-Heart infusion broth (BHI). Tested microorganisms were standardized by the Mcfarland turbidity scale equivalent to the tube 0.5, corresponding to a concentration of approximately 10^7 CFU/mL for yeasts and 10^8 CFU/mL for bacteria. The extracts were solubilized in a sterile 10% dimethylsulfoxide (DMSO) aqueous solution at the concentration of 100 mg/mL. Serial dilutions of all extracts were made in 96-well plates to obtain concentrations ranging from 50 to 0.09 mg/ml. Following that, each well received 10

μL of microorganism suspensions and the plates were incubated at 25 °C for 48 hours for yeasts and at 37 °C for 24 hours for bacteria. After each period, 15 μL of 0.01% resazurin was added, as a colorimetric indicator of cell viability. Then, the microplates were re-incubated for 4 hours and the lowest concentration of extract that inhibited microbial growth was recorded as the MIC. Then 50 μL of the solution from each inhibited well was collected and transferred to agar plates and re-incubated as described above for the yeasts and bacteria. The complete absence of growth on the agar surface with the lowest concentration of the sample was defined as the MMC. Commercially available antibiotics, amphotericin B (1 mg/mL) and chloramphenicol (1 mg/mL) were used as positive control for yeast and bacteria, respectively. Sterile 10% dimethylsulfoxide (DMSO) aqueous solution was used as negative control.

Evaluation of combinatory effects of chloroform extracts and oxacillin

Combinatory effects between chloroform extracts of *C. spinosa* and oxacilin were assessed using the checkerboard method against the different *S. aureus* strains (UFPEDA 670, 672, 683, 700, 705, 709, 726 and 731; table 2). Briefly, samples with different proportions of plant extract and drug (1:1, 1:2 and 1:3; final volume: 200 μL) were prepared from stock solutions of each extract (6.25 mg/mL) and oxacilin (0.5 mg/mL) and antibacterial activity was performed as described for MIC determination (da Silva et al., 2013). The Fractional Inhibitory Concentration (Σ FIC) was calculated according to the equation:

Σ FIC = (MICE + D/MICE) + (MICD + E/MICD) MICE+D: minimal inhibitory concentration of extract in combination with oxacilin; MICD+E: minimal inhibitory concentration of oxacilin in combination with extract. Results were considered: synergistic (Σ FIC < 0.5); additive (0.5 < Σ FIC < 1); non-interactive (1 < Σ FIC < 4); or antagonist (Σ FIC > 4) (Vuuren and Viljoen, 2011).

Hemolytic assay

Blood (5–10 mL) was obtained from healthy nonsmoking volunteers by venipuncture, after a written informed consent was obtained. Human erythrocytes from citrated blood were immediately isolated by centrifugation at 1500 rpm for 10 min at 4°C. After removal of plasma and buffy coat, the erythrocytes were washed three times with phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4) and then resuspended using the same buffer and a 1% erythrocyte suspension was prepared. The hemolytic activity of the crude extract was tested under *in vitro* conditions. Each tube received 1.1 mL of erythrocyte suspension and 0.4 mL of extract of various concentrations (31.25–1000 μg/mL) were added. The negative control was only

solvent and the positive control received 0.4 mL of Triton X-100. After 60-min incubation at room temperature, cells were centrifuged and the supernatant was used to measure the absorbance of the liberated hemoglobin at 540 nm (Oliveira et al., 2012). The average value was calculated from triplicate assays. The relative hemolytic activity was expressed in relation to Triton X-100 and calculated by the following formula:

$$\text{Relative hemolytic activity (\%)} = [(As - Ab) \cdot 100] / (Ac - Ab)$$

Where Ab was the absorbance of the control (blank, without extract), As was the absorbance in the presence of the extract, and Ac was the absorbance in the presence of Triton X-100. Hemolysis concentration was calculated.

Statistical Analyses

Each experiment was performed in triplicate. Statistical analyses were performed by One-way analysis of variance (ANOVA). All analyses were carried out using software GraphPrism, version 4. Differences were considered significant at $p < 0.05$. The correlation indices were calculated using the Pearson coefficient (ρ). The concentration needed for 50% of hemolysis (HC_{50} values) was calculated graphically by linear regression analysis.

Results

Phytochemical analyses of the samples

Analysis of the yield of all the extractions showed that the *C. spinosa* leaves had a better result, in comparison with the roots. With regards to the solvents, methanol extracts showed the better yield, when compared to the hexane, chloroform and ethyl acetate extracts, as showed in Table 3.

An overview of the secondary compounds present in the extracts is shown in table 3. The qualitative phytochemical analysis detected the presence of reducing sugars, antracenic derivatives, flavonoids and terpenes into all extracts. Additionally, ChL, CL, CR and EAR also presented monoterpenes, sesquiterpenes, diterpenes, triterpenes, and steroids; the EAL showed saponins, triterpenes, and steroids; ML exhibited saponins, monoterpenes, and sesquiterpenes; ChR revealed coumarins, triterpenes, and steroids; and MR presented coumarins, cinnamic acid derivatives, saponins, monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes.

The estimation of total phenolic content revealed that EAR (256.94 ± 0.48 mg GAE/g), ML (255.69 ± 0.28 mg GAE/g) and CR (215.23 ± 0.64 mg GAE/g) exhibited the highest phenolic content ($p < 0.05$). The other extracts showed phenolic content values ranging from 72.73 mg GAE/g to 201.71 mg GAE/g (Table 3). On the hand, CL and ML showed the highest flavonoids content with values of 153.70 ± 0.58 mg QE/g and 71.83 ± 0.76 mg QE/g, respectively. The total phenolic and flavonoids contents showed a weak correlation ($\rho = 0.48$).

Antimicrobial activity screening

The antimicrobial activity of the organic extracts from leaves and roots of *C. spinosa* are presented in Tables 4, 5 and 6. Overall, all extracts from both leaves and roots of *C. spinosa* exhibited antimicrobial activity with broad spectrum, as they inhibited all tested bacteria and yeasts.

Furthermore, with regards to the antibacterial efficiency, the best results observed were provided by the extracts obtained using cyclohexane and chloroform, whose MIC ranged from 0.09 mg/mL to 12.5 mg/mL and MMC ranged from 0.19 mg/mL to 50 mg/mL. Among extracts from leaves, ChL presented the best antibacterial activity against Gram-positive bacteria, such as *B. subtilis*, *M. luteus* and *Staphylococcus aureus*. On the other hand, CL was effective against Gram-positive bacteria (*B. subtilis*, *M. luteus*, *S. aureus*) at higher concentrations, but also against the Gram-negative bacteria *P. aeruginosa* (Table 4). In the case of the root extracts, ChR and CR were particularly effective against *B. subtilis* and *M. luteus*. Additionally, CR demonstrated anti-*S. aureus* potential. EAR showed markedly activity against *M. luteus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, and *S. epidermidis*. The MR extract exhibited its best activity against *M. luteus* and *B. subtilis* (Table 5).

The antifungal activity of the *C. spinosa* extracts is presented in Table 6. The leaf extracts showed MIC values ranging from 3.12 to 12.5 mg/mL and MMC between 6.25 and 50 mg/mL. The extracts from leaves were less active, as they inhibited yeasts in concentrations between 6.25 and 12.5 mg/mL and killed them at dosage from 12.5 mg/mL. Among leaves extracts, the CL was the most active against all *Candida* species tested, except *C. krusei*, followed by ChL. The extracts from the root part showed a circumspect activity, with ChR effective against *C. glabrata*, *C. krusei* and *C. parapsilosis*; CR against *C. krusei* and *C. parapsilosis*; EAR against *C. parapsilosis*; and EMR against *C. tropicalis* and *C. parapsilosis* (Table 6).

Hemolytic assay

The hemolytic activity of each extract was performed using fresh human erythrocytes and they showed low cytotoxicity (Figure 1). Even at the highest tested concentration (1000 µg/mL), the extracts CR, CL and ChL induced low levels of hemolysis (1.18%, 4.54% and 11.13%, respectively). Regarding the HC₅₀, ChR was the most toxic extract (470.88 µg/mL), followed by EAL (648.97 µg/mL), ML (725.58 µg/mL), EAR (870.72 µg/mL), MR (808.51 µg/mL). The less toxic extracts had theoretical HC₅₀ values of 4773.602 µg/mL, 13409.35 µg/mL and 151.389.2 µg/mL for ChL, CL and MR, respectively.

Anti-S. aureus activity and combinatory effects with oxacillin

Given the high medical importance of the antibiotic resistant *S. aureus*, the action of the extracts was evaluated in association with oxacillin against clinical isolates with oxacillin resistance profile, including methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains (Table 7). The extracts were effective against all strains. However, the chloroform ones from both tissues showed the best efficiencies ($p < 0.05$), with MIC₅₀ values (concentration able to inhibit 50% of the strains) of 0.78 mg/mL for leaves and 3.12 mg/mL for roots; while the cyclohexane extracts exhibited MIC₅₀ values of 6.25 mg/mL. Then, the combinatorial effect of the chloroform extracts with oxacillin was evaluated. Almost all extracts had synergistic activities, the exception was the non-interactive and additive effects observed against the isolate 683 (Figure 2). In addition, these HC₅₀ values were not correlated with either flavonoid ($\rho = 0.23$) or phenolic content ($\rho = -0.10$).

Discussion

Considering that the World is facing a growing number of multidrug-resistant microorganisms, numerous studies have been conducted in order to select new compounds, such as those from natural resources which are of extremely importance (WHO, 2014; dos Santos et al., 2015). The plants are, admittedly, a valuable reservoir of bioactive compounds of substantial medical importance (Murganathan and Pabbiti, 2012). So, this study has evaluated the antimicrobial activity of *C. spinosa*, a species known for their use in traditional medicine to treat infections. Some studies have shown antimicrobial, insecticidal, and antioxidant activities in essential oils obtained from their aerial parts of *C. spinosa* (McNeil et al., 2010), others had evaluated the anti-inflammatory and antinociceptive effects of methanol extracts from different ways of cultivation (Albarelo et al., 2013).

Qualitative phytochemical analysis clearly demonstrated the presence of number important active constituents and revealed that both *C. spinosa* tissues have similar chemical constitution. Only the extracts from leaves (cyclohexane, chloroform, ethyl acetate) showed proanthocyanidins and leucoanthocyanidins. Indeed, all kind of metabolite classes detected into the samples (saponins, flavonoids, tannins, coumarins and terpenoids) are well known to have significant inhibitory action against bacteria and fungi (Hayek, 2013). This fact can justify why all extracts showed antimicrobial activity. On the other hand, quantitative assays revealed that the extracts have different phenolic and flavonoid contents which can be correlated with each biological activity. For example, for roots derived extracts a strong direct correlation were found between their average MIC values (for all tested bacteria) and phenolic ($\rho = -0.87$) and flavonoid contents ($\rho = -0.96$). For leaves extracts inverse strong and moderate correlations were found (ρ value of 0.56 and 0.88 for correlation with phenolic and flavonoid contents, respectively), suggesting that the antimicrobial activity might be an effect of other types of compounds. It is important to note that when the correlations between polyphenols/flavonoid content were determined using and average MIC or HC_{50} , a negative ρ value ($\rho = -1$) is considered as perfect direct correlation.

On the basis of the results shown in Tables 4 and 5, *C. spinosa* extracts demonstrated to be more active on Gram-positive than on Gram-negative bacteria. This was not a surprise since previous studies have reported that generally plant extracts are usually more active against Gram-positive bacteria than Gram-negative bacteria, and the susceptibility may be due to cell wall structural differences between these classes of bacteria. Cells of Gram-negative bacteria are surrounded by an additional cell wall outer membrane, which provide them with a hydrophilic surface that functions as a permeability barrier for many substances including natural compounds (Hemaiswarya et al., 2008; Briers and Lavigne, 2015). Although the mechanisms of action of natural products are distinct, the cytoplasmic membrane ranks as the most common site of action for secondary metabolites. They usually act through cell lysis, triggering the leakage of cellular contents and consequently cell death (da Silva et al., 2013). The interaction with genetic material and protein synthesis is also a possible factor regarded to the promotion of the therapeutic action. In this case, when there is a contact with the genetic material, the compound is able to promote changes in the coding of microbial DNA, whose result is ineffective transcription and disturbance of vital functions for the cell (Hayek et al., 2013; Gyawali and Ibrahim, 2014). The phenolic compounds (polyphenols, tannins, and flavonoid) can act at two different levels: the cell membrane and cell wall of the microorganisms (Taguri et al., 2006). They can also penetrate into bacterial cells and

coagulate cell content (Tian et al., 2009). The antimicrobial property of saponins is due to a lipophilic portion into its structure (aglycon or sapogenin) and a hydrophilic core comprising one or more sugars (Costa et al., 2010).

Among all extracts, ChL and CR were the most active and inhibited the growth of *B. subtilis*, *M. luteus*, *S. aureus*. They demonstrated an average MIC of 0.35 mg/mL and 0.42 mg/mL (these values were not significantly different at the $p > 0.05$ level), and a predominantly bactericidal behavior: MMC/MIC ratio < 4 (Pankey and Sabath, 2004). To those same pathogens, the average MIC for ChL was up to 13-fold lower than the other extracts, while for CR was up to 8-fold lower. These extracts, qualitatively, showed the same chemical composition than the others, except for the presence of proanthocyanidins and leucoanthocyanidins in ChL. CR showed a higher phenolic and flavonoid content and a lower hemolytic activity than ChL ($p < 0.05$). Interestingly, a negative correlation was found between their MIC values ($\rho = -0.21$), whereas the inhibition order was *S. aureus* $>$ *B. subtilis* $>$ *M. luteus* to ChL and it was *B. subtilis* $>$ *M. luteus* $>$ *S. aureus* to CR. In fact, all extracts from roots showed markedly inhibitory activity against *B. subtilis*. This species is a model organism present in the soil and widely known for its ability to promote plant growth, and thus has great importance in agriculture. However, little information is available about the ecological role and the mechanisms involved in the interaction with plants (Kobayashi et al., 2015).

On the other hand, *C. spinosa* extracts had not shown an efficacy against *Candida* spp. as good as that observed for the Gram-positive bacteria. Among all yeasts tested, *C. glabrata* and *C. tropicalis* were the most sensitive to the fungistatic action (ratio of MMC/MIC > 4). Infections caused by *Candida* spp. are especially found in immunosuppressed patients, as those with cancer, transplantation, postoperative, HIV, especially in developing countries (Pitman et al., 2011). Allied to this, the lack of new antifungals and the growing microbial resistance (Odom et al., 2014) also make these results relevant and important.

Therefore, due to the great potential shown by *C. spinosa* extracts against *S. aureus*, we decided to investigate the effect of cyclohexanic and chloroformic extracts against clinical isolates. The search for new anti-*S. aureus* agents is extremely important, since infections caused by multidrug resistant strains have been growing worldwide and are one of the most serious problems within health care facilities (Stryjewski and Corey, 2014). Such issues have been accounted to the excessive use of drugs (Kim et al., 2015), which results in development of new resistance mechanisms (Dordel et al., 2014). Our data shows that the chloroform extracts were able to inhibit and kill with good efficiency against different clinical strains, the

most active was CL, with MIC₅₀ values ranging from 4 to 8-fold lower than other extracts. It is important to note that these concentrations are much lower than their HC₅₀ values. Both chloroform extracts showed bactericidal action, whereas their MIC values and MMC showed weak positive ($\rho = 0.09$) and moderate negative ($\rho = -0.49$) correlations, respectively. Then, it is possible that different mechanisms are responsible for the results observed. Furthermore, strong correlations were found between the average MIC against *S. aureus* and their phenolic ($\rho = -0.89$) and flavonoid content ($\rho = -0.87$), reinforcing the possible role of these metabolite classes on the antimicrobial activity of *C. spinosa* derived extracts.

In addition, given the importance of the *S. aureus* pathogenicity and its ability to acquire resistance, new ways to combat this pathogen must be developed, among them is combination therapy using compounds that act or not on the same target. Therefore, to test the combining action became a key step in phytochemical studies (Wagner and Ulrich-Merzenich, 2009; Bessa et al., 2015; Santos et al., 2015). All clinical isolates used in this study are classified as oxacillin-resistant. However, CL and CR extracts were able to restore the effectiveness of this antibiotic, mainly through synergistic interaction. Some plant-derived products have demonstrated the ability to reverse resistance to oxacillin (Jenkins and Cooper, 2012; Bessa et al., 2015), and the perspective is that the use of therapies based on the combination of phytochemicals and antibiotics grow in conventional medicine, to reduce the likelihood of dose-dependent toxicity (based on the belief that natural products are less toxic) and mutagenicity of antimicrobials (Boucher and Tam, 2006; Wagner and Ulrich-Merzenich, 2009).

Conclusion

This research demonstrates the antimicrobial potential of leaves and roots from *C. spinosa*. These extracts were especially active against Gram-positive organisms, with the most active extract capable of inhibiting growth of *S. aureus* strains with different phenotypes of resistance. Similarly, the most active extracts restored the action of oxacillin in strains resistant to this antibiotic. The isolation and identification of phytochemicals present in such extracts can result in the development of new drugs significantly contributing to the reduction of antimicrobial resistance as well as reduced morbidity cases and/or mortality caused by bacterial and fungal infections.

Conflict of interest statement

The authors declare that this research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be qualified as a potential conflict of interest.

Acknowledgments

The authors are grateful to *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq), *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) and *Fundação de Amparo à Ciência do Estado de Pernambuco* (FACEPE) for the financial support to this study. We express our gratitude to Dr. Haroudo Satiro Xavier, Laboratory of Pharmacognosy, UFPE, for performing the phytochemical analysis.

Author contribution statement

APSS, MSC, VLML designed the study protocol, and participated in its design and coordination. APSS, JMA, MSC carried out the antimicrobial assays. APSS, LCNS, CSMF, MTSC, VLML contributed to drafting the manuscript and/ or critically revising the paper and intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

Reference

- Adhikari, R. P., Ajao, A. O., Aman, M. J., Karauzum, H., Sarwar, J., Lydecker, A. D., et al. (2012). Lower antibody levels to *Staphylococcus aureus* exotoxins are associated with sepsis in hospitalized adults with invasive *Staphylococcus aureus* infections. *J. Infect. Dis.* jis462. doi:10.1093/infdis/jis462
- Agra, M. F., França, P. F., and Barbosa-Filho, J. M. (2007). Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev. Bras. Farmacogn.* 17, 114-140. doi:10.1590/S0102-69X2007000100021
- Albarello, N., Simões-Gurgel, C., Castro, T. C., Gayer, C. R. M., Coelho, M. G. P., Moura, R. S., et al. (2013). Anti-inflammatory and antinociceptive activity of field-growth plants and tissue culture of *Cleome spinosa* (Jacq.) in mice. *J. Med. Plants. Res.* 7, 1043-1049. doi: 10.5897/JMPR12.153
- Amorozo, M. C. D. M. (2002). Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antônio do Leverger, MT, Brasil. *Acta Bot. Bras.* 16, 189-203.
- Andrade, F. D., Ribeiro, A. R. C., Medeiros, M. C., Fonseca, S. S., Athayde, A. C. R., Ferreira, A. F., et al. (2014). Anthelmintic action of the hydroalcoholic extract of the root of *Tarenaya spinosa* (Jacq.) Raf. for *Haemonchus contortus* control in sheep. *Pes. Vet. Bras.* 34, 942-946. doi:10.1590/S0100-736X2014001000003
- Bessa, L. J., Palmeira, A., Gomes, A. S., Vasconcelos, V., Sousa, E., Pinto, M., et al. (2015). Synergistic Effects between thioxanthenes and oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microb. Drug. Resist.* 21, 404-415 doi:10.1089/mdr.2014.0162.
- Bose, A., Gupta, J. K., Dash, G. K., Ghosh, T., SI, S., and Panda, D.S. (2007). Diuretic and antibacterial activity of aqueous extract of *Cleome rutidosperma*. *Indian J. Pharm. Sci.* 69, 292-294. doi: 10.4103/0250-474X.33162
- Boucher, A. N., and Tam, V. H. (2006). Mathematical formulation of additivity for antimicrobial agents. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 55, 319–325. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2006.01.024
- Bramley, A. J., Patel, A. H., O'Reilly, M., Foster, R., and Foster, T. J. (1989). Roles of alpha-toxin and beta-toxin in virulence of *Staphylococcus aureus* for the mouse mammary gland. *Infect. Immun.* 57, 2489-2494.
- Briers, Y., and Lavigne R. (2015). Breaking barriers: expansion of the use of endolysins as novel antibacterials against Gram-negative bacteria. *Future Microbiol.* 10, 377-390. doi: 10.2217/fmb.15.8
- Costa, A. F. (2002). *Farmacognosia*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.

- Costa, D. A., Chaves, M. H., Silva, W. C. S., and Costa, C. L. S. (2010). Constituintes químicos, fenóis totais e atividade antioxidante de *Sterculia striata* St. Hil. et Naudin. *Acta Ama.* 40, 207 – 212.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2011). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty First Informational Supplement, M100S21*. Wayne, PA.
- Da Silva, L. C. N., Sandes, J. M., de Paiva, M. M., de Araújo, J. M., Figueiredo, R. C. B. Q. D., da Silva, M. V., et al. (2013). Anti-*Staphylococcus aureus* action of three Caatinga fruits evaluated by electron microscopy. *Nat. Prod. Res.* 27, 1492–1496. doi: 10.1080/14786419.2012.722090.
- Dordel, J., Kim, C., Chung, M., de la Gándara, M. P., Holden, M. T., Parkhill, J., et al. (2014). Novel determinants of antibiotic resistance: identification of mutated loci in highly methicillin-resistant subpopulations of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *mBio* 5,e01000-13. doi: 10.1128/mBio.01000-13
- dos Santos, A. T. B., da Silva Araújo, T. F., Da Silva, L. C. N., da Silva, C. B., de Oliveira, A. F. M., Araújo, J. M., et al. (2015). Organic extracts from *Indigofera suffruticosa* leaves have antimicrobial and synergic actions with Erythromycin against *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology* 6, 13. doi: 10.3389/fmicb.2015.00013
- Gyawali, R., and Ibrahim, S. A. (2014). Natural products as antimicrobial agents. *Food Control* 46, 412-429. doi:10.1016/j.foodcont.2014.05.047
- Hayek, S. A., Gyawali, R., and Ibrahim, S. A. (2013). Antimicrobial natural products - Biocontrol. *Microbial pathogens and strategies for combating them: Science, technology and education* 2, 910-921.
- Harborne, J. B. (1998). *Phytochemical Methods*. London: Chapman & Hall.
- Jenkins, R. E., and Cooper, R. (2012). Synergy between oxacillin and manuka honey sensitizes methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to oxacillin. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 1405-1407. doi: 10.1093/jac/dks071
- Hemaiswarya, S., Kruthiventi, A. K. and Doble M. (2008). Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine* 15, 639–652. doi: 10.1016/j.phymed.2008.06.008
- Kim, J., and Sudbery, P. (2011) *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *J. Microbiol.*, 49, 171-177.
- Kim, N. H., Koo, H. L., Choe, P. G., Cheon, S., Kim, M. S., Lee, M. J., et al. (2015). Inappropriate continued empirical vancomycin use in a hospital with a high prevalence of

- methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 59, 811–817. doi:10.1128/AAC.04523-14
- Kobayashi, K. (2015). Plant methyl salicylate induces defense responses in the rhizobacterium *Bacillus subtilis*. *Environ. Microbiol.* 17, 1365-1376. doi:10.1111/1462-2920.12613
- Li, A.B., Wonga, C.C., Ka-Wing, C. and Chen, F. (2008) Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT-Food Sci. Technol.* 41, 385-390. doi:10.1016/j.lwt.2007.03.011.
- McNeil, M. J., Porter, R. B., Williams, L. A., and Rainford, L. (2010). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from *Cleome spinosa*. *Nat. Prod. Commun.* 5, 1301-1306.
- Murganathan, G., and Pabbithi, S. A. (2012). Antimicrobial constituents from plants. *Int. Res. J. Pharm.* 3, 5-9.
- Odom, A. R. (2014). The triphenylethylenes, a novel class of antifungals. *mBio*.5, e01126-14. doi:10.1128/mBio.01126-14
- Oliveira, Y. L. C.; Silva, L. C. N.; Silva, A. G.; Macedo, A. J.; Araújo, J. M.; Correia, M. T. S.; and Silva, M. V. Antimicrobial activity and phytochemical screening of *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) R. A. Howard (Combretaceae: Combretaceae). *Sci. World J.* 2012, 6, Article ID 849302. doi.org/10.1100/2012/849302
- Pankey, G. A., and Sabath, L. D. (2004). Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Clin. Infect. Dis.* 38, 864-870. doi: 10.1086/381972
- Pitman, S.K., Drew, R. H., and Perfect, J. R. (2011). Addressing current medical needs in invasive fungal infection prevention and treatment with new antifungal agents, strategies and formulations. *Expert. Opin. Emerg. Drugs.* 16, 559-586. doi:10.1517/14728214.2011.607811.
- Robertson, E. H., Cartwright, R. A., and Wood, D. J.M. (1957). The flavones of tea. *J. Sci. Food. Agr.* 7, 637-646.

- Russell, C. R., and Morris, D. A. (1982). Invertase activity, soluble carbohydrates and inflorescence development in the tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Ann. Bot.* 49, 89-98.
- Sharma, A., Bhatia, S., Kharya, M. D., V., Ganesh, N., Namdeo, A. G., and Mahadik, K. R. (2010). Anti-inflammatory and analgesic activity of different fractions of *Boswellia serrata* *Phytomedicine*. 2. doi:10.5138/ijpm.2010.0975.0185.02015
- Simonetti, G., Santamaria, A. R., D'Auria, F. D., Mulinacci, N., Innocenti, M., Cecchini, F., et al. (2014). Evaluation of Anti-*Candida* Activity of *Vitis vinifera* L. seed extracts obtained from wine and table cultivars. *BioMed. Res. Int.* 2014, 2314-6141. doi: 10.1155/2014/127021
- Stryjewski, M. E., and Corey, G. R. (2014). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolving pathogen. *Clin. Infect. Dis.* 58, S10-S19. doi: 10.1093/cid/cit613
- Sudhakar, M., Rao, C. V., Rao, P. M., and Raju, D. B. (2006). Evaluation of antimicrobial activity of *Cleome viscosa* and *Gmelina asiatica*. *Fitoterap.* 77, 47-49. doi:10.1016/j.fitote.2005.08.003
- Taguri, T., Tanaka, T., and Kouno, I. (2006). Antibacterial spectrum of plant polyphenols and extracts depending upon hydroxyphenyl structure. *Biol. Pharm. Bull.* 29, 2226–2235. doi:10.1248/bpb.29.2226
- Tian, F., Li, B., Ji, B., Zhang, G., and Luo, Y. (2009). Identification and structure–activity Relationship of gallotannins separated from *Galla chinensis*. *LWT-Food Sci. Technol.* 42, 1289–1295. doi:10.1016/j.lwt.2009.03.004
- Vuuren, S., and Viljoen, A. (2011). Plant-based antimicrobial studies – methods and approaches to study the interaction between natural products. *Plant Med.* 77, 1168-82. doi: 10.1055/s-0030-1250736.
- Wagner, H., and Bladt, S. (1996). *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. Springer Science & Business Media.
- Wagner H., and Ulrich-Merzenich G. (2009). Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*. 16, 97-110. doi: 10.1016/j.phymed.2008.12.018
- Woisky, R. G. and Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J. Apic. Res.* 37, 99-105. doi: 10.1080/00218839.1998.11100961
- World Health Organization. (2014). *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*. World Health Organization.

Table 1: Microorganisms

Microorganism	Record No.
Bacteria	
<i>Bacillus subtilis</i>	UFPDA - 086
<i>Enterococcus faecalis</i>	UFPDA - 138
<i>Micrococcus luteus</i>	UFPDA - 100
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	UFPDA - 071
<i>Staphylococcus aureus</i>	UFPDA - 002
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	UFPDA - 183
<i>Streptococcus mutans</i>	UFPDA - 766
<i>Escherichia coli</i>	UFPDA - 224
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UFPDA - 396
<i>Proteus mirabilis</i>	UFPDA - 737
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	UFPDA - 416
<i>Salmonella enteritidis</i>	UFPDA - 414
Yeasts	
<i>Candida albicans</i>	URM - 5852
<i>Candida krusei</i>	URM - 6391
<i>Candida glabrata</i>	URM - 6343
<i>Candida parapsilosis</i>	URM - 6557
<i>Candida tropicalis</i>	URM - 6711

Table 2. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains to antibiotics.

Record No. (UFPDA)	Source	Susceptibility to antibiotics				
		Oxacillin	Ampicillin	Imipenem	Meracilin a	Ciprofloxacin
670 ^a	Urine sample	R	R	S	S	S
683	Bone fragment	R	R	S	S	R
689	Ulcer secretion	R	R	S	S	S
700 ^a	Ulcer secretion	R	R	S	S	R
705	Surgical wound	R	R	S	S	S
709	Purulent exudate	R	R	S	S	R
726	Nasal secretion	R	R	S	S	R
731	Surgical wound secretion	R	R	S	S	R

^aMRSA; R: Resistant; S: Sensitive.

Table 3. Phytochemical analyse of organic extracts from leaves and roots of *C. spinosa*.

Extract	Yeld (%)	Quantitative analyses		Phytochemical screen	
		Total phenolic content (mg GAE/g)	Flavonoid content (mg QE/g)	Positive tests for	Negative test for
ChL	3.77	131.3 ± 0.7	11.9 ± 0.1	Reducing sugars, Anthracene derivatives, Flavonoids, Tannins, Monoterpenes, Sesquiterpenes, Diterpenes, Triterpenes, Steroids, Proanthocyanidins and Leucoanthocyanidins	Alkaloids, Coumarins, Cinnamic Acid Derivatives, Saponins,
CL	2.15	201.7 ± 0.8	153.7 ± 0.6	Reducing sugars, Anthracene derivatives, Flavonoids, Tannins, Monoterpenes, Sesquiterpenes, Diterpenes, Triterpenes, Steroids, Proanthocyanidins and Leucoanthocyanidins	Alkaloids, Coumarins, Cinnamic Acid Derivatives, Saponins,
EAL	2.81	173.6 ± 0.5	48.4 ± 0.2	Reducing sugars, Anthracene derivatives, Flavonoids, Tannins, Triterpenes, Steroids, Proanthocyanidins and Leucoanthocyanidins	Alkaloids, Coumarins, Cinnamic Acid Derivatives, Saponins, Monoterpenes, Sesquiterpenes, Diterpenes
ML	6.23	255.7 ± 0.3	71.8 ± 0.8	Reducing sugars, Anthracene derivatives, Flavonoids, Tannins, Cinnamic Acid Derivatives, Saponins, Monoterpenes, Sesquiterpenes, Diterpenes,	Alkaloids, Coumarins, Triterpenes, Steroids, Proanthocyanidins and Leucoanthocyanidins
ChR	0.38	72.73 ± 1.43	4.7 ± 0.1	Reducing sugars, Anthracene derivatives, Flavonoids, Tannins, Coumarins, Monoterpenes, Sesquiterpenes, Diterpenes, Triterpenes, Steroids	Alkaloids, Cinnamic Acid Derivatives, Saponins, Proanthocyanidins and leucoanthocyanidins
CR	0.27	215.2 ± 0.6	24 ± 0.0	Reducing Sugars, Anthracene derivatives, Flavonoids, Tannins, Monoterpenes, Sesquiterpenes, Diterpenes, Triterpenes, Steroids	Alkaloids, Coumarins, Cinnamic Acid Derivatives, Saponins, Proanthocyanidins and Leucoanthocyanidins
EAR	0.1	256.94 ± 0.5	36.0 ± 0.2	Reducing sugars, Anthracene derivatives, Flavonoids, Tannins, Saponins, Monoterpenes, Sesquiterpenes, Diterpenes, Triterpenes, Steroids	Alkaloids, Coumarins, Cinnamic Acid Derivatives, Proanthocyanidins and Leucoanthocyanidins
MR	3.36	125.9 ± 0.70	7.9 ± 0.1	Reducing sugars, Anthracene derivatives, Flavonoids, Tannins, Coumarins, Cinnamic acid Derivatives, Saponins, Monoterpenes, Sesquiterpenes, Diterpenes,	Alkaloids, Triterpenes, Steroids, Proanthocyanidins and Leucoanthocyanidins

Table 4. Antimicrobial Activity of organic extracts from leaves of *C. spinosa* against bacteria.

Bacteria	<i>C. spinosa</i> extracts											
	ChL			CL			EAL			ML		
	MIC	MMC	MMC/MIC	MIC	MMC	MMC/MIC	MIC	MMC	MMC/MIC	MIC	MMC	MMC/MIC
Gram-positive												
<i>Bacillus subtilis</i>	0.19	3.12	16	1.56	12.5	8	1.56	1.56	1	6.25	6.25	1
<i>Enterococcus faecalis</i>	25	25	1	25	25	1	12.5	12.5	1	25	25	1
<i>Micrococcus luteus</i>	0.78	1.56	2	1.56	3.12	2	0.78	3.12	4	1.56	3.12	2
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	6.25	12.5	2	12.5	12.5	1	6.25	12.5	2	12.5	25	2
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.09	0.19	2	0.78	1.56	2	6.25	50	8	6.25	>50	>8
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6.25	12.5	2	6.25	6.25	1	3.12	6.25	2	6.25	6.25	1
<i>Streptococcus mutans</i>	6.25	25	4	12.5	50	4	12.5	25	2	6.25	>50	>8
Gram-negative												
<i>Escherichia coli</i>	12.5	25	2	25	25	1	6.25	12.5	2	12.5	50	4
<i>Klebsiella pneumonia</i>	12.5	>50	>4	25	>50	>2	12.5	>50	>4	12.5	>50	>4
<i>Proteus mirabilis</i>	12.5	25	2	12.5	25	2	6.25	12.5	2	12.5	50	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6.25	6.25	1	3.12	6.25	2	3.12	12.5	4	3.12	3.12	1
<i>Salmonella enteritidis</i>	6.25	25	4	12.5	25	2	12.5	50	4	12.5	>50	>4

MIC: Minimal Inhibitory Concentration. MMC: Minimal Microbicidal Concentration. MIC and MMC values are expressed in mg/mL.

Table 5. Antimicrobial Activity of organic extracts from roots of *C. spinosa* against bacteria.

Bacteria	<i>C. spinosa</i> extracts											
	ChR			CR			EAR			MR		
	MIC	MMC	MMC/MIC	MIC	MMC	MMC/MIC	MIC	MMC	MMC/MIC	MIC	MMC	MMC/MIC
Gram-positive												
<i>Bacillus subtilis</i>	0.09	0.19	2	0.09	0.19	2	0.78	0.78	1	3.12	3.12	1
<i>Enterococcus faecalis</i>	25	25	1	25	25	1	6.25	6.25	1	25	25	1
<i>Micrococcus luteus</i>	0.39	0.78	2	0.39	0.78	2	0.39	1.56	4	0.78	1.56	2
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	12.5	25	2	6.25	12.5	2	6.25	12.5	2	12.5	25	2
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.12	12.5	4	0.78	3.12	4	1.56	12.5	8	6.25	25	4
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6.25	12.5	2	12.5	12.5	1	3.12	6.25	2	6.25	6.25	1
<i>Streptococcus mutans</i>	12.5	50	4	12.5	50	4	6.25	25	4	12.5	>50	>4
Gram-negative												
<i>Escherichia coli</i>	12.5	50	4	12.5	50	4	12.5	50	4	12.5	25	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	25	50	2	12.5	50	4	12.5	12.5	1	12.5	50	4
<i>Proteus mirabilis</i>	12.5	25	2	6.25	25	4	12.5	12.5	1	25	25	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6.25	12.5	2	6.25	50	8	12.5	50	4	12.5	50	4
<i>Salmonella enteritidis</i>	12.5	50	4	12.5	25	2	6.25	12.5	2	12.5	50	4

MIC: Minimal Inhibitory Concentration. MMC: Minimal Microbicidal Concentration. MIC and MMC values are expressed in mg/mL.

Table 6. Antimicrobial Activity of organic extracts from leaves and roots of *C. spinosa* against *Candida* spp.

Extract	Microorganism														
	<i>Candida albicans</i>			<i>Candida glabrata</i>			<i>Candida krusei</i>			<i>Candida parapsilosis</i>			<i>Candida tropicalis</i>		
	MIC	MFC	MFC/ MIC	MIC	MFC	MFC/ MIC	MIC	MFC	MFC/ MIC	MIC	MFC	MFC/ MIC	MIC	MFC	MFC/ MIC
ChL	12.5	12.5	1	3.12	25	8	12.5	25	2	6.25	25	4	6.25	50	16
CL	3.12	12.5	4	3.12	50	16	12.5	25	2	3.12	12.5	4	3.12	50	16
EAL	6.25	12.5	2	3.12	25	8	12.5	25	2	6.25	12.5	2	6.25	50	8
ML	6.25	12.5	2	6.25	25	4	12.5	25	2	6.25	6.25	1	3.12	50	8
ChR	12.5	25	2	6.25	25	4	6.25	25	4	6.25	25	4	12.5	12.5	1
CR	12.5	50	4	12.5	>50	>8	6.25	25	4	6.25	25	4	12.5	50	4
EAR	12.5	12.5	1	12.5	25	2	12.5	25	2	6.25	12.5	2	12.5	25	2
MR	12.5	12.5	1	12.5	50	4	6.25	25	4	6.25	25	4	6.25	25	4

MIC: Minimal Inhibitory Concentration. MFC: Minimal Fungicidal Concentration. MIC and MFC values are expressed in mg/mL.

Table 7. Antimicrobial Activity of organic extracts from leaves and roots of *C. spinosa* against *Staphylococcus aureus*

<i>S. aureus</i> (UFPEDA Record No.)	<i>C. spinosa</i> Extract											
	ChL			CL			ChR			CR		
	MIC	MMC	MMC/ MIC	MIC	MMC	MMC/ MIC	MIC	MMC	MMC/ MIC	MIC	MMC	MMC/ MIC
670	6.25	25	4	0.19	0.78	4	6.25	25	4	6.25	25	4
683	1.56	3.12	2	0.39	1.56	4	12.5	50	4	6.25	12.5	2
691	3.12	25	4	0.19	1.56	4	6.25	25	4	1.56	12.5	4
700	6.25	50	4	3.12	25	4	6.25	25	4	6.25	6.25	1
705	6.25	12.5	2	3.12	6.25	2	6.25	12.5	2	3.12	3.12	1
718	6.25	25	4	0.78	6.25	4	12.5	50	4	3.12	6.25	2
726	12.5	50	4	6.25	12.5	2	6.25	12.5	2	6.25	12.5	2
731	12.5	50	4	6.25	12.5	2	6.25	25	4	3.12	6.25	2

MIC: Minimal Inhibitory Concentration. MMC: Minimal Microbicidal Concentration. MIC and MMC values are expressed in mg/mL.

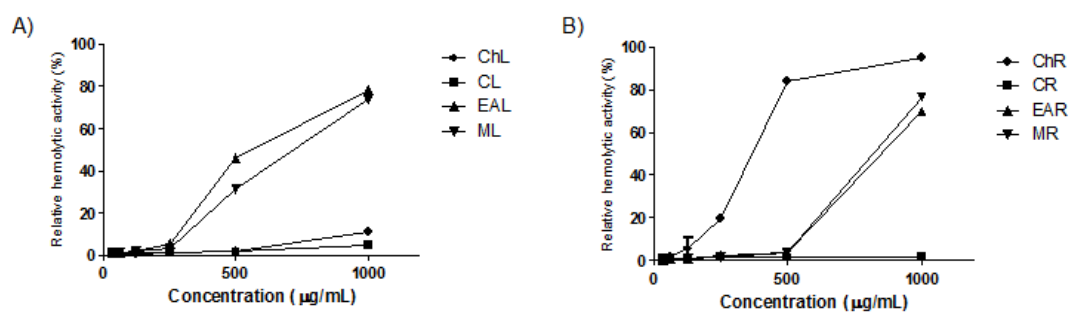


Figure 1: Hemolytic Activity of organic extracts from leaves (A) and roots (B) of *C. spinosa*.

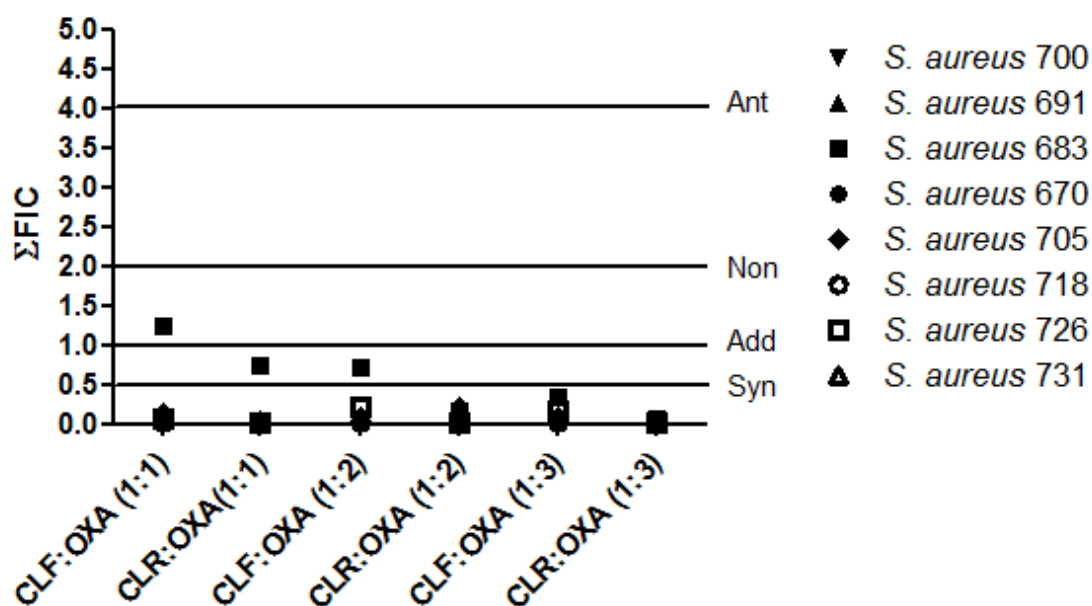


Figure 2. Combinatory effect of Oxacillin and organic extracts from leaves and roots of *C. spinosa* against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. Legend: Non – non-interactive effect; Add - additive effect; Syn - synergistic effect; Ant – antagonistic effect.

CAPÍTULO 2

Manuscrito a ser submetido no Periódico: Journal Ethnopharmacology

Fator de impacto: 2.466

Qualis: B1

ISOLATION, STRUCTURE ELUCIDATION AND ANTINOCICEPTIVA AND
ANTIPYRETIC ACTIVITY OF THE FLAVONOID COMPOUNDS FROM
Cleome spinosa JACQ.



ISOLATION, STRUCTURE ELUCIDATION AND ANTINOCICEPTIVA AND
ANTIPYRETIC ACTIVITY OF THE FLAVONOID COMPOUNDS FROM
Cleome spinosa JACQ.

Ana Paula Sant'Anna da Silva¹; Sara Alves Lucena Madeiro², Irailton Prazeres
dos Santos¹; Mônica Cristina Barroso Martins⁴; Josean Fachine Tavares², Nicácio
Henrique da Silva⁴; Cesar Augusto da Silva³, Vera Lúcia de Menezes Lima^{1*}

¹Laboratório de Lipídeos e Aplicações de Biomoléculas em Doenças Prevalentes
e Negligenciadas, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas,
Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

² Nucleus for Characterization and Analysis, Department of Pharmaceutical
Sciences, Health Science Center, Federal University of Paraíba, Joao Pessoa, Brazil

³Colegiado de Medicina, Universidade Federal do Vale do São Francisco,
Juazeiro, Brazil

⁴Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica, Centro de
Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

*Corresponding Author:

Vera Lúcia de Menezes Lima

Avenida Professor Moraes Rêgo, S/N.

Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil.

CEP: 50670-420. Phone: (+5581) 21268540

E-mail: lima.vera.ufpe@gmail.com

Abstract

The antipyretic activity of Quercetin 3-glucose, rhamnose and 5-hydroxy-7,4'-dimethoxyflavone flavonoids isolated from *Cleome spinosa* Jacq. was investigated for its, on normal body temperature and yeast-induced pyrexia in albino rats. The compounds, at doses of 10 and 20mg/kg, showed significant reduction in normal body temperature no dose-dependent manner. The effect also extended upto 5 h after the drug administration. The anti-pyretic effect of compounds was comparable to that of paracetamol (100 mg/kg p.o.), a standard anti-pyretic agente. The analgesic activity of compound 1 and 2 of *C. spinosa*, given orally at the doses of 10 and 20 mg/kg was evaluated for its analgesic activity in mice using the acetic acid induced writhing. The extract showed promising activity in all the tests.

Keywords: Algesia, Biological activity, Brassicaceae, Chroman, Pirexia, Quercetin.

Introduction

The flavonoids are one of the most diverse and widespread groups of natural products, with many interesting pharmacological activities. Have been reported to have multiple biological effects such as antioxidant (Cheng et al., 2015), antiinflammatory (Funakoshi-Tago et al. 2015), inhibition of platelet aggregation (10), antimicrobial (Gyawali and Ibrahim, 2014), and even "antiaging" (Khare et al., 2015) activities. Some species of the genus *Cleome* (Brassicaceae) Have been investigated for medical properties and some of them had anti-inflammatory, (Sharma et al, 2010; Abarello et al, 2012), (Bose et al, 2007), analgesic, and antimicrobial (Sudhakar et al, 2005; McNeil et al, 2010) Evaluated activities. *C. spinosa* is a perennial herb que grows in the Central-West, Northeast, North and Southeast of Brazil and is known in Brazil as "Mussambê". Its leaves and flowers have been used in traditional medicine. The infusion of the leaves had been used in the treatment of asthma, cough, and bronchitis, as the flowers is used against fever (Agra et al., 2007). Pharmacological actions of this kind, demonstrated the antimicrobial effects, anti nociceptive, anti-inflammatory, anthelmintic (McNeil et al 2010; Albarello et al, 2013; Andrade et al, 2014.). Based on the traditional use of the plant to an antipyretic and antinociceptive agent, the present study was carried out in na experimental animal model to corroborate the used of isolated compounds from *C. spinosa* in the traditional medicine.

Material and Methods

Plant

The leaves and roots of *C. spinosa* were collected at the Federal Rural University of Pernambuco - Two Brothers (Latitude 8 ° 01'22.3 "; Longitude: 34 ° 57'15.8") and deposited in the Herbarium UFPE - Geraldo Mariz, in the Department of Botany the Federal University of Pernambuco (UFPE) voucher n° 76556.

Obtaining isolation and purification of active substances from organics extracts

Macerated leaves (100 g) were subjected to extraction using an eluotropic series of solvents, in the order following: cyclohexane, chloroform, ethyl acetate and metanol extract were subjected to Soxhlet equipment at a temperature below the boiling point of each solvent. All samples were subjected at reflux for 24 h. The cyclohexane extract (1 g) was fractionated in a column silica gel G60 (70-300 mesh) and the methanol extract

(2 g) in a column Sephadex LH-20. The purity of the compounds was monitored by Thin Layer Chromatography (TLC) using the following mobile phase: hexane: ethyl acetate (90:10) to extract cyclohexane and ethyl acetate: formic acid: acetic acid: water (100: 11:11:26) for methanol extract. The bands were identified by fluorescence under UV light (254 and 365 nm). Fractions that exhibited a single band on chromatography were subjected to analysis by nuclear magnetic resonance of protons ^1H (NMR ^1H) and ^{13}C (NMR ^{13}C).

Structural elucidation of molecules

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectras were obtained on Brücker spectrometer, AC-200, operating at 500 MHz for ^1H NMR and 125 MHz for ^{13}C NMR with the solubilized samples in deuterated chloroform (CDCl_3) and deuterated dimethyl sulfoxide (DMSO-d_6) and using tetramethylsilane (TMS) as internal standard. Chemical shifts (δ) were obtained in parts per million (ppm) and coupling constants (J) were measured in Hertz (Hz). The identified flavonoids received the following designation: flavonoids 1= quercetin 3-glucose, rhamnose and flavonoid 2 = 5-hidroxi-7,4'-dimethoxyflavone (chroman).

Maintenance of Mice

Male Swiss Albino mice (25-30g) were purchased from Keizo Asami Immunopathology Laboratory (LIKA). The animals were kept under normal environmental conditions and fed with standard diet water *ad libitum*.

Bioassays

Pyrexia induction by yeast (brewer's yeast)

The mice were divided into five groups of six animals each ($n = 6$). Normal body temperature of each one was measured rectally with a thermometer probe inserted between 3-4 min into the rectum and fixed to the tail with adhesive tape where the basal temperature was recorded. To induce pyrexia, animals received a subcutaneous injection of a yeast (20% w/v) suspension (10 ml/kg) in 0.5% methyl cellulose (CMC). After 19 h of the yeast injection, the basal body temperature of the mice was monitored each hour during 5 h, according to Teotino (1963).

Administration of flavonoids

Quercetin 3-glucose, rhamnose and 5-hydroxy-7,4'-dimethoxyflavone flavonoids were dissolved in 2% Tween 80 right before oral application at were administered orally at doses of 10 and 20 mg / kg body weight (5 mL/kg), with $n = 6$ for each treatment. The experimental design consisted of the following groups: negative (2% Tween 80), positive control (Ibuprofen, 100 mg / kg orally) and treatments.

Algesia

Acetic acid-induced Writhing

For analgesia assays, groups of six mice were pretreated with Quercetin 3-glucose, rhamnose and 5-hydroxy-7,4'-dimethoxyflavone flavonoids as described for pyrexia. After the pretreatment, the contortions were observed, as described wave of contraction of the abdominal musculature followed by extension of the lower members, which were recorded during the period of 5 and 15 min after intraperitoneal administration of 0.6% acetic acid (v/v), according to Koster (1959).

Statistical analysis

The results of biological activities are presented as mean $\pm$ standard deviation (SD). Statistical significance was determined by analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher and Tukey tests, $P < 0.05$ considered significant.

Results

The organic extracts cyclohexane, chloroform, ethyl acetate and methanol were obtained from *C. spinosa*, but only the cyclohexane and methanol extracts showed analgesic and antipyretic significant activities. For this reason, they were selected to be fractionated, and active flavonoids were isolated and purified.

Structural elucidation of flavonoids

Flavonoid 1 and 2 were identified by analysis of the ^1H NMR and ^{13}C -dimensional compared to the data described in the literature (Markham, 1982; Agrawal, 1990).

The analysis of the ^1H NMR spectrum allowed Q flavonoid (^1H -NMR (DMSO- d_6) δ : 3.89 (3H, s), 6.40 (1H, d, $J = 2.3$ Hz), 6.79 (1H, d, $J = 2.3$ Hz), 6.85 (1H, s), 6.96 (2H, d, $J = 9.3$ Hz), 7.98 (2H, d, $J = 9, 3$ Hz), 12.95 (1H, s, 20 0 exchangeable). Yellow

amorphous powder (56 mg), mp 270 °C. The comparison of spectroscopic data obtained for the substance 1 with the literature data allowed the identification of quercetin 3-glucose, rhamnose (Figure 1).

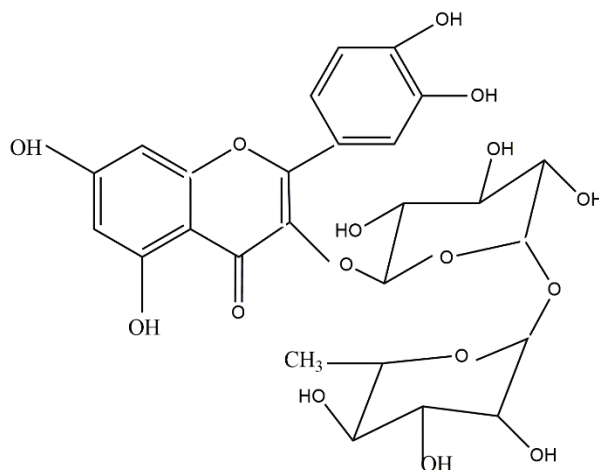


Figure 1: Quercetin 3-glucose, rhamnose flavonoid isolated from *Cleome spinosa*.

The analysis of the ^1H NMR spectrum allowed C flavonoid (^1H NMR (CDCl_3) fJ: 3.89, 3.90 (each 3H, s), 6.37 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 6, 49 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 6.58 (1H, s), 7.02 (2H, d, $J = 9.3$ Hz), 7.85 (2H, d, $J = 9.3$ Hz), 12.80 (1H, s). A comparison of spectroscopic data for C flavonoid with the literature data allowed the identification of the 5-hydroxy-7,4'-dimethoxyflavone (Flavone). Yellow crystals (2.17 mg), mp 173 °C (Figure 2).

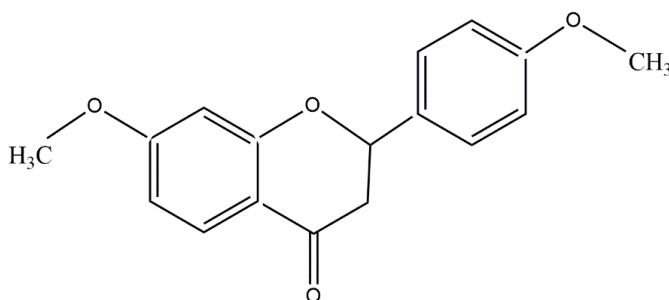


Figure 2: 5-hydroxy-7,4'-dimethoxyflavone flavonoid isolated from *Cleome spinosa*.

Pyrexia induction assay

The effect of flavonoids (Quercetin 3-glucose, rhamnose, 5-hydroxy-7,4'-dimethoxyflavone) yeast and paracetamol about normal body temperature in mice is shown in Table 1 and 2. It was found that the flavonoids both doses of 10 and 20 mg/kg of body weight caused a significant decrease in body temperature after one hour of his administration. The antipyretic effect of

quercetin 3-glucose, rhamnose flavonoid at 20 mg/kg was observed in 1 h and maintained for 4 h after administration. Paracetamol (100 mg/kg) reduced significantly the temperature yeast induced.

Table 1.

Effect of quercetin 3-glucose, rhamnose (10 and 20 mg/kg) on body temperature in yeast-induced pyrexia

Groups	Rectal temperature (C°) after 19hrs of Yeast injection					
	Baseline	0h	1h	2h	3h	4h
Control	36.6±1.3	37.9±0.2	38.4±0.4	38.3±0.3	38.0±0.4	37.7±0.4
Paracetamol	36.6±0.8	38.4±0.4	36.1±0.6*	36.0±0.3*	35.7±0.2*	35.6±0.3*
Q10	36.2±0.3	38.0±0.1	37.1±0.4*	36.9±0.3*	36.6±0.2*	36.6±0.3*
Q20	36.5±0.2	38.0±1.1	37.1±0.2*	36.9±0.3*	36.6±0.2*	36.7±0.3*

Values are expressed as Mean ± SD, n = 6 in each group, statistical analysis of data was performed using ANOVA followed by Fisher's Protected Least Significance Difference. *P < 0.05 vs Control of the same time.

Table 2.

Effect of 5-hidroxi-7,4 '-dimethoxyflavone (10 and 20 mg/kg) on body temperature in yeast-induced pyrexia

Groups	Rectal temperature C° after 19hrs of Yeast injection					
	Baseline	0h	1h	2h	3h	4h
Control	36.6±1.3	37.9±0.2	38.4±0.4	38.3±0.3	38.0±0.4	37.7±0.4
Paracetamol	36.6±0.8	38.4±0.4	36.1±0.6*	36.0±0.3*	35.7±0.2*	35.6±0.3*
C10	36.7±0.2	38.6±0.5	37.7±0.1*	37.5±0.2*	37.4±0.2*	37.3±0.3*
C20	36.3±0.2	38.7±0.4	37.0±0.1*	36.7±0.2*	36.6±0.2*	36.6±0.2*

Values are expressed as Mean ± DP, n = 6 in each group, s tatistical analysis of data was performed using ANOVA followed by Fisher's Protected Least Significance Difference. *p< 0.05 vs Control of the same time.

Acetic acid-induced abdominal constriction assay

The administration of flavonoids from *C. spinosa* significantly increases the pain tolerance compared with the control. The purified flavonoids quercetin 3-glucose, rhamnose and 5-hidroxi-7,4 '-dimethoxyflavone, administered orally, showed a significant analgesic activity (Figure 3-4). The flavonoid quercetin 3-glucose, rhamnose at 20 mg/kg was able to prevent nociception as well as ibuprofen 100mg/kg (standard drug).

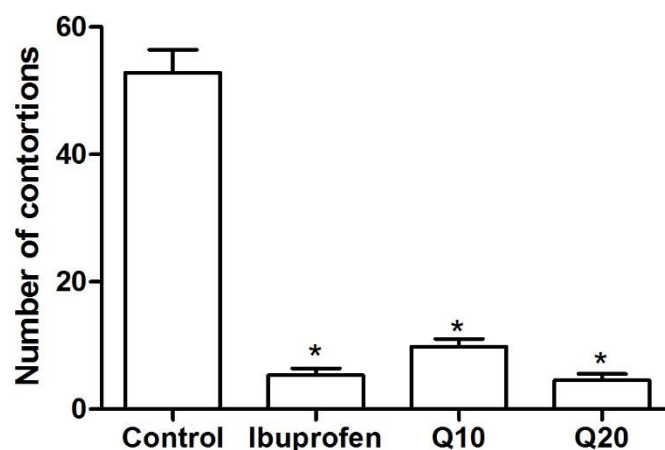


Figure 3: Effect of quercetin 3-glucose, rhamnose (10 and 20 mg/kg), Ibuprofen (100 mg/kg) and on acetic-acid-induced writhing test. Values are mean $\pm$ standard error of the mean. * $p < 0.001$, significantly different from control; analysis of variance followed by Student's "t" test ($n = 6$, per group).

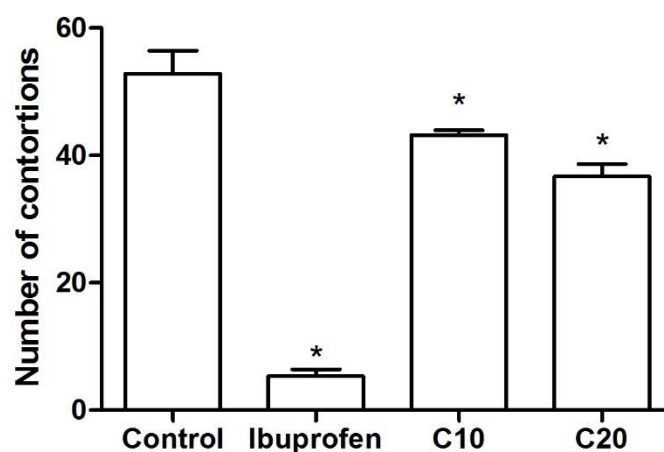


Figura 4: Effect of 5-hidroxi-7,4 '-dimethoxyflavone (10 and 20 mg/kg), Ibuprofen (100 mg/kg) and on acetic-acid-induced writhing test. Values are mean $\pm$ standard error of the mean. * $p < 0.001$, significantly different from control; analysis of variance followed by Student's "t" test ($N = 6$, per group).

Discussão

It is well-known that most of the analgesic and anti-inflammatory drugs will also act as antipyretics (Hajare, 2000) Several endogenous substances like interleukin-1 (IL-1) β , IL-6, IL-8, tumor necrosis factor α (TNF- α) and prostaglandins are evident to produce pyrexia.

The infection, tissue damage, graft rejection, inflammation or disease states may lead to pyrexia. Chemical compounds like flavonoids, steroids and tannins are predominant inhibitors of prostaglandin synthase-2 (PG) and cyclooxygenase or lipoxygenase, and act in inhibition pyrexia (Rajnarayana et al., 2001). Antipyretic are the agents, which cause the hypothalamus to supersede an interleukin induced fever to normal levels. Brewer's yeast induced fever is pathogenic fever, in which the production of PGs involves (Moltz, 1993). The present results show the Quercetin 3-glucose, rhamnose and 5-hydroxy-7,4'-dimethoxyflavone flavonoid isolated of *C. spinosa* has significant antipyretic activity in yeast induced pyrexia in rats, and this effect is comparable to standard drug paracetamol. Hence, there may be a possible mechanism of antipyretic action by inhibiting the synthesis of PGs like paracetamol (Chandrasekharan et al., 2002). Once the antipyretic effects of Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) will be produced through inhibition of prostaglandin synthetase in hypothalamus (Clark and Cumby,). Furthermore, there are several multiprocesses or mediators emphasizing the pathogenesis of fever. Inhibition of any of these mediators may bring about antipyresis [Srivastava et al., 2013]. The present results show that the Quercetin 3-glucose, rhamnose and 5-hydroxy-7,4'-dimethoxyflavone flavonoid have significant antipyretic action, corroborating with the use of leaves and flowers in traditional medicine in the form of infusion for the treatment of fever (Agra et al., 2007).

The writhing test induced by acetic acid is a screening tool for evaluating antinociceptive and anti-inflammatory agents (Martinez et al., 1999). The intraperitoneal injection of acetic acid increases mediators of pain, such as prostaglandins, lipoxygenase, cyclooxygenase, histamine, serotonin, bradykinin, substance P, IL-1 β , IL-8 and TNF- α (Martinez et al., 1999; Ikeda et al, 2003), to increase vascular permeability and reduce the nociceptive threshold, causing nociceptive stimulation terminals to induce writhing. Pretreatment with flavonoids isolated reduces the writhing response induced by acetic acid, suggesting the synthesis or release of reduced pain modulators. Involvement of the opioid receptor antinociceptive mechanism of action of flavone compounds was reported by many authors. Various dihydroxy derivatives of flavone (Girija et al, 2002; Umamaheswari et al, 2006; Vidyalakshmi et al, 2010) Quercetin (Naidu et al, 2003) were found to use the mechanism of opioid in the mediation its analgesic effect. Recently it was shown that the antinociceptive effect exhibited by hesperidin is mediated by opioids in rats and its aglycone hesperetin bind to μ -opioid receptors (Loscalzo et al., 2011). What can justify the analgesic action of Quercetin 3-glucose, rhamnose in higher than 20 mg/kg Ibuprofen 100 mg/kg (standard drug).

Conclusion

Plant species continue to represent sources of numerous drugs and studies related to the investigation of therapeutic properties exhibited by these constitute an important tool for scientific explanation. From these results it is clear that quercetin 3-glucose, rhamnose and 5-hydroxy-7,4'-dimethoxyflavone flavonoid has antipyretic and analgesic actions, which further supports the traditional use of *C. spinosa* to treat fever and pain.

Reference

- Asongalem EA, Foyet HS, Ngogand J, Folefoc GN, Dimo T, Kamtchoung P (2004). **Analgesic and anti-inflammatory activities of *Eriangeron floribundus*.** *J Ethnopharmacol.* **91(2–3)**:301-8.
- Ikeda Y, Ueno A, Naraba H, Oh-ishi S (2001). **Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice.** *Life Sci.* **69(24)**:2911-9.
- Khatun A, Imam MZ, Rana MS. **Antinociceptive effect of metanol extract of leaves of *Persicaria hydropiper* in mice (2015).** *BMC Complement Altern Med.* 2015; **15**:63.
- Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, et al. (2013) COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. (2002). *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:13926-31.
- Cheng, S. S.; Yen, P. L.; Chang, S. T (2015). Phytochemicals from wood extract of *Cunninghamia konishii* Hayata as antioxidant agents. *Industrial Crops and Products*, v. 64, p. 39-44.
- Clark, W.G., Cumby H.R. (1975) The antipyretic effect of indomethacin. *Journal of Physiology*, v.248, p. 625–38.
- Funakoshi-Tago, M.; Okamoto K.; Izumi R.; Tago K.; Yanagisawa K.; Narukawa Y.; Kiuchi F.; Kasahara T.; Tamura H., Anti-inflammatory activity of flavonoids in Nepalese propolis is attributed to inhibition of the IL-33 signaling pathway (2015). *International immunopharmacology*, v. 25, n. 1, p. 189-198.
- Goodman and Gilman, 1996. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th ed. McGraw-Hill, Professions Division, New York, pp. 959–975.

Gyawali, Rabin; Ibrahim, Salam A. (2014) Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*, v. 46, p. 412-429.

Hajare, S .W.; Chandra, S.; Tandan, S. K.; Sarma, J.; Lal, J.; Telang, A. G. (2000). Analgesic and antipyretic activities of *Dalbergia sissoo* leaves. *Indian Journal of Pharmacology*. v. 32, p. 357–60.

Khare, Noopur; Khare, Pragati; Yadav, Ghanshyam (2015). Recent Advances in Anti-Aging—A Review. *Global Journal of Pharmacology*, v. 9, n. 3, p. 267-271.

Loscalzo, L.M., Yow, Y.Y., Wasowski, C., Chebib, M., Marder, M., (2011). Hesperidin induces antinociceptive effect in mice and its aglycone, hesperetin, binds to μ -opioid receptor GIRK1/2 currents. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 99 (3), 333–341.

Markham, Kenneth R. et al. Techniques of flavonoid identification. London: Academic press, 1982.

Martinez V, Thakur S, Mogil JS, Taché Y, Mayer EA (1999). **Differential effects of chemical and mechanical colonic irritation on behavior pain response to intraperitoneal acetic acid in mice.** *Pain.* **81**(1–2):179-86.

Moltz H. Fever: Causes and consequences (1993). *Neurosci Biobehav Ver* 17(3):237-69.

Naidu, P.S., Singh, A., Kulkarni, S.K., 2003. D2-dopamine receptor and α 2-adrenoreceptor-mediated analgesic response of quercetin. *Indian J. Exp. Biol.* 41, 1400–1404.

Rajnarayana K, Reddy MS, Chaluvadi MR, Krishna DR. (2001). Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J Pharmacol* 33:2-16.

Srivastava S., Singh P., Jha K. K., Mishra G, Srivastava S, Khosa R. L. (2013). Antiinflammatory, analgesic and antipyretic activities of aerial parts of *costus speciosus* koen. *Indian J Pharm Sci* 75(1):83-8.

Trongsakul S, Panthong A, Kanjanapothi D, Taesotikul T (2003). **The analgesic, antipyretic and anti-inflammatory activity of Diospyros variegata Kruz.** *J Ethnopharmacol.* **85**(2–3):221- 5.

Umamaheswari, S., Viswanathan, S., Sathiyasekaran, B.W.C., Parvathavarthini, S., Ramaswamy, S., 2006. Antinociceptive activity of certain dihydroxy flavones. *Indian J. Pharm. Sci.* 68, 749–753.

Vidyalakshmi, K., Kamalakannan, P., Viswanathan, S., Ramaswamy, S., 2010. Antinociceptive effect of certain dihydroxy flavones in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 96, 1–6.

Ward, R. S. Carbon-13 NMR of flavonoids (studies in organic chemistry series, no. 39). PK Agrawal (Ed.). Elsevier, Amsterdam, 1990. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v. 28, n. 6, p. 562-563.

CAPÍTULO 3

Manuscrito a ser submetido no Periódico: *BMC Complementary and Alternative
Medicine*

Fator de impacto: 2.02

Qualis: B1

ANTIOXIDANT ACTIVITY AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES *IN VIVO*
OF METHANOLIC EXTRACTS OF LEAVES AND ROOTS OF *Cleome spinosa*
JACQ.

ANTIOXIDANT ACTIVITY AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES *IN VIVO* OF METHANOLIC EXTRACTS OF LEAVES AND ROOTS OF *Cleome spinosa* JACQ.

Ana Paula Sant'Anna da Silva^a, Janaina Karin de Lima Campos^a, Nicácio Henrique da Silva^a, Mácia Vanusa da Silva^a, Maria Tereza dos Santos Correia^a, Cesar Augusto da Silva^b, Vera Lúcia de Menezes Lima^{a*}

Abstract

Background: *Cleome spinosa* Jacq. or “Mussambê” is a medicinal plant used in traditional medicine in the treatment of infections, asma, bronquitis, among others.

Methods: The present study assessed the possible anti-inflammatory and acute toxicity action of the methanol extracts of leaves and roots of *Cleome spinosa* Jacq. in models animal and potential antioxidant *in vitro*.

Materials and methods: The acute toxicity was performed as per OECD Guidelines. Anti-inflammatory activity was evaluated through peritonitis test in mice. Antioxidant Activity through the methods of 2,2-Azino-Bis-(3 Ethylbenzothiazoline)-6-Sulfonic Acid (ABTS), DPPH Radical Scavenging Assay and Capacity Total Antioxidant by Phosphomolybdenum Assay.

Results: The plant extracts did not reveal any toxic signs even at 2000 mg/kg (p.o.) concentration. The methanolic extracts of leaf and root at all concentrations tested - 100mg / kg, 150mg / kg and 200mg / kg - caused a significant reduction in the number of leukocytes in mice with peritonitis. The ML and MR extracts showed antioxidant activity para the three methods tested, ABTS, DPPH and Fosfomolibidenium.

Conclusions: This findings suggest that the methanol extracts of leaves and roots of *C. spinosa* possesses antiinflammatory, antioxidant effects and low toxicity. These results may be contributing to scientific evidence of its medicinal uses related to the treatment of inflammation and degeneratives process.

Keywords: inflammation, acute toxicity, antioxidants, *Mussambê*

Background

Por they affect the quality of life and health, the process of pain and inflammation stands out for being considered one of the biggest problems in the population [1]. Anti-inflammatory and analgesic therapies are readily accessible but are associated with side effects when used long term [2]. So awakened enormous interest in the discovery of new drugs from natural sources with high efficiency and little adverse effect.

Plants are used as a healing source of disease for many people since prehistoric times. They synthesize chemicals essential for its development and protection, such as flavonoids, alkaloids, triterpenoids, tannins, saponins, amongst others, has pronounced effects on the human body and are used as medicinal agents in the treatment of diseases. Several of these bio-products, with high efficiency and little adverse effect, are extracted from plants for large scale marketing and many of them have been used as prototypes for synthetic or semi-synthetic drug with a pharmacokinetic profile [3,4]. It is well know that many this compounds derived of plants present several significant properties, such as anti-inflammatory.

Many species of the genus *Cleome* have been investigated for medicinal properties and some of them were evaluated for anti-inflammatory [5, 6, 7, 8, 9, 10] and analgesic [11, 12, 13] activities. The popular use of Leaf and flower of *C. spinosa* in form of infusions and syrups are usually prepared for treatment of fever, influenza, cough, bronchitis and asthma [14, 15]. The effect antiinflamatory of the extract methanolic leaves and roots was investigated using biologic models. Thus, this study aimed to establish in vivo the anti-inflammatory potential of this extract.

Methods

Animals

Experimental protocols and procedures used in this study were approved by the Ethics committee on animal experiments from the center of Biological Sciences, Federal University of Pernambuco (CEEa-UFPE) and in accordance with the guidelines suggested by the "Brazilian College for Animal Experimentation" and with international standards by the "National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory

Animals ". The healthy male mice (swiss albino), weighing 30-35g were used in the experiments. The mice were obtained from the the Keizo Asami Laboratory of immunopathology (LIKA), Pernambuco, Brasil. The animals were kept under laboratory conditions of 25 ± 2 ° C (constant temperature), 55-65% humidity with 12-hour cycles light/dark, with free access to food and water ad libitum.

Plant material

The botanic materials, *C. spinosa*, were collected at *Universidade Federal Rural de Pernambuco – Dois Irmãos* (Latitude 8° 01'22.3 "; Longitude: 34° 57'15.8"). The botanical material was identified and deposited in the Herbarium UFPE - Geraldo Mariz, at the Department of Botany, *Universidade Federal de Pernambuco* (UFPE), under the voucher number 76,556

Extraction

The material botanic (100g) was dried and milled and each tissue of *C. spinosa* was separately subjected to Soxhlet extraction using the solvent methanol, at a temperature below of the boiling point of solvent. The samples were subjected to saturation at reflux for 24 hours. After this time, the extracts were filtered through a Whatman filter paper N° 1. The extracts of leaves (L) and roots (R) (methanol: ML and MR) were concentrated until complete removal of the solvent on a rotating evaporator at 45° C under reduced pressure and stored for the application in bioassays.

Acute Toxicity studies

The toxicity of plant extract on experimental animal was tested according to the Organisation of Economic Co-operation and Development-423 guideline (OECD, 2004). Adult nulliparous and nonpregnant female albino rats were selected for the toxicity study, as female rats are more sensitive. Six animals were assigned to each group and fasted overnight prior to the administration of oral doses of test substances at a concentration of 2000 mg/kg body weight. The mice were observed continuously for the firsts 4 h for if any behavioral changes and then observed 14 day after the drug administration in the case of mortality.

Carrageenan - induced Peritonitis

According with Foster et al. [17]. The animals were pre-treated with water, Acetylsalicylic acid (Positive Control - ASA, 100 mg/kg, orally), ML e MR (20 and 40 mg/kg, orally), and 1h later, the animals received an injection of 1% carrageenan (i.p.). After 4 h, the animals were sacrificed. After, saline containing EDTA (1mM, i.p.) was injected, immediately a brief massage was done for further fluid collection and used for leukocyte (mainly neutrophils) counting in a Cell Counter (ABX MICROS 60). The results were expressed as the number of Leukocytes $\times 10^3/\text{mm}^3$. The percentage of the leukocyte inhibition = $(1 - T/C) \times 100$, where T represents the treated groups leukocyte counts and C represents the control group leukocyte counts.

Antioxidant Activity Using 2,2-Azino-Bis-(3 Ethylbenzothiazoline)-6-Sulfonic Acid (ABTS)

According to Silva et al. [18], the ABTS assay is based on the generation of chromophore cationic radical obtained from the oxidation of ABTS by potassium persulfate. The oxidation reaction was prepared with 7 mM ABTS stock solution plus 140 mM potassium persulfate (final concentration) and the mixture was left in the dark at room temperature ($23^\circ\text{C} - 25^\circ\text{C}$) for 12 - 16 h (time required for radical formation) before its use. The ABTS^+ solution was diluted in ethanol to an absorbance of 0.7 (± 0.02) units at 734 nm. The effects of extracts amount on the antioxidant activity was carried out using aliquots of 30 μL , and mixing with 3 mL diluted ABTS^+ solution. The absorbances at 734 nm were measured at different time intervals (6, 15, 30, 45, 60 and 120 min). Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) was used as a reference standard. The values of oxidative inhibition percentage were calculated and plotted as a function of the reference antioxidant concentration (Trolox) and expressed as Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC, μM). All determinations were carried out in triplicate.

DPPH Radical Scavenging Assay

The DPPH free radical scavenging activity of the extracts was performed according to Brand-Williams et al. [19] with some modifications. A methanolic DPPH stock solution (200 μM) was further diluted in methanol to obtain a UV-VIS absorbance between 0.6 - 0.7 at 517 nm, obtaining the DPPH working solution. 40 μL of the different

concentrations of the extracts ML and MR (1000, 500, 250, 125, 61,2, 31,25 μg) were mixed with DPPH solution (250 μL) and after 30 min incubation in darkness the absorbances were read at the same wavelength mentioned above. The measurements were triplicated and their scavenging activities were calculated based on the percentage of DPPH scavenged.

Total Antioxidant Capacity by Phosphomolybdenum Assay

According to Pietro et al. [20], the total antioxidant capacity (% TAC) was evaluated by phosphomolybdenum assay. An aliquot of 0.1 mL of the extracts ML and MR (100 $\mu\text{g/mL}$) was combined with 1 mL of reagent solution (600 mM sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate and 4 mM ammonium molybdate). The tubes were capped and incubated in a boiling water bath at 90°C for 90 min. Afterward, the absorbance was measured at 695 nm against a blank (1 mL of reagent and 0.1 mL of solvent). Total antioxidant activity was expressed in relation to ascorbic acid.

Statistical Analysis

The results of activities are presented as the mean $\pm$ standard deviation (S.D.). Statistical significance was determined by analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test and Tukey test, with $p < 0.05$ considered significant.

Results

Acute Toxicity studies

The acute toxicity studies conducted on plant extract did not reveal any toxic signs even at 2000 mg/kg (p.o.) concentration. The experimental animals did not exhibit any behavioral changes. Hence, the ML and MR extract of *C. spinosa* was found to be safe for internal administration.

Carrageenan-induced peritonitis

Cleome spinosa showed anti-inflammatory activity. The methanolic extracts, of leaves and roots at all concentrations tested - 100mg / kg, 150mg / kg and 200mg / kg - caused a significant reduction in the number of leukocytes in intraperitoneal fluid of

mice with peritonitis compared with animals with peritonitis treated with ASA, as shown in Figure 1 (A and B). It should also be mentioned that when compared the results obtained with the administration of *Cleome spinosa* extracts the reduction obtained by drug the commercial anti-inflammatory - acetylsalicylic acid (ASA) - in the total number of peritoneal fluid leukocytes, it was found that no there statistical difference between anti-inflammatory effect of concentration of 100mg / kg of the methanol extract of the leaves and decreasing the inflammatory response caused by ASA, and not statistically differ reduced average leukocyte number with the methanolic extract of the roots at a concentration of 150mg / Kg compared to the average obtained with the use of ASA.

With increasing concentration of the extract, it was found that there was an anti-inflammatory effect concentration-dependent because there was no statistical difference between total leucocytes values in intraperitoneal fluid, with the exception of those found in the animals who received the methanolic extract root at a concentration of 100mg / kg, for this group of animals showed the highest number of leukocytes, i.e., less reduction of the inflammatory response compared to the results obtained with other concentrations.

Antioxidant Activity Using 2,2-Azino-Bis-(3 Ethylbenzothiazoline)-6-Sulfonic Acid (ABTS)

The antioxidant activity of *C. spinosa* leaves and roots extracts in function of time is shown in Table 2, with oxidative inhibition of $96.28\% \pm 0.29$ to ML and $60.33\% \pm 0.29$ to MR, after 120 min, equivalent to TEAC of $2120 \pm 2.4 \mu\text{M}$ Trolox. *C. spinosa* significant antioxidant activity as a function of time, the activity was gradually increasing, remaining practically constant, after 120 minutes when the increase was of approximately 100% to ML extract.

DPPH Radical Scavenging Assay

The test of free radicals elimination expressed as a percentage reduction was shown in Table 3. The radical scavenging activity detected in the extract ML and MR were 85.54 ± 0.17 and 78.98 ± 0.53 respectively, at 1000 ug / mL.

Total Antioxidant Capacity by Phosphomolybdenum Assay

The total antioxidant activity (CAT) assay performed by phosphomolybdenum, which molybdenum ion reduction capability of *C. spinosa* extracts indicating that the extracts ML and MR were antioxidants. However, differences were observed in the antioxidant activity between these two types of extracts. The ML extract showed better activity ($51.06\% \pm 0.08$ TAC) than the MR extract ($42.67\% \pm 0.05\%$ TAC) using ascorbic acid as standard. Likewise the other methods, the ML extract was of best activity.

Discussion

The acute phase inflammatory response is a quick process that triggers the organism as a defense mechanism damage for the some agent, after recognition of the epitopes [21]. Acute peritonitis occurs recruitment of leukocytes into the intraperitoneal cavity and the quantifying the number of leukocytes in intraperitoneal fluid it works as an important index for evaluating the anti-inflammatory potential [22].

The present study after the establishment of an animal model of acute peritonitis by carrageenin showed a significant reduction in the number of leukocytes present in the intraperitoneal fluid after administration of methanolic extracts, as much as leaves of *C. spinosa* roots, demonstrating that the potential anti-inflammatory of this plant, which should be further explored, given the lack of studies related to this type of research on *C. spinosa*. anti-inflammatory properties [8], can be attributed to the phenolic compounds present in plants, especially flavonoids, and these compounds may also act in a manner cytoprotective [21]. These authors also showed that methanolic extracts may be better to detect the presence of anti-inflammatory activity by having a higher concentration of polar compounds than other organic solvents.

The three concentrations tested (100mg / kg, 150mg / kg and 200 mg / kg), for leaves and roots of *C. spinosa* had effects anti-inflammatory and excepting the concentration of 100 mg / kg roots and the 200 mg / kg sheets, can be evidenced that all other concentrations triggered anti-inflammatory response similar to that obtained with the administration of acetylsalicylic acid 500mg / kg. For extracts of the roots, the optimal concentration was 150 mg / kg, a higher concentration is not necessary, such as of 200 mg / kg, to have a better anti-inflammatory effect. How much for the extracts of

the leaves *C. spinosa* a concentration of 100 mg / kg already caused an anti-inflammatory process which does not differ in relation to groups of animals receiving higher concentrations of the extract. This shows that the anti-inflammatory potential of methanolic extracts of *C. spinosa* may already occur similarly to a concentration greater than 500 mg / kg acetylsalicylic acid, presenting themselves as possible effective therapeutic alternative for the development of inflammation, if this pass the act in exacerbated form.

Properties anti-inflammatory have also been reported for other species of the genus *Cleome* plant, which corroborates with the present investigation. observed anti-inflammatory activity for *Cleome arabica* after triggering of inflammation induced by carrageenan [23]. Extracts of leaves of *C. arabica* were administered at concentrations of 100, 200 and 300 mg / kg resulted in a reduction of edema and leukocyte migration in a dose-dependent manner, divergently of this study results using the *C. spinosa* extract which at a concentration of 100 mg / kg and 150 mg / kg have been sufficient enough to cause significant reductions in the inflammatory process. HARRAZ and AYAD (1994) *Cleome amblyocarpa* has shown the anti-inflammatory potential [25]. The ethanol extract of the aerial parts *Cleome rutidosperma* in the concentrations of 200 mg / kg and 400 mg / kg, administered orally, produced, besides the effect analgesic and antipyretic activity, one anti-inflammatory effect against inflammation induced also in carrageenan. Also confronted the results of the anti-inflammatory activity *C. rutidosperma* with those obtained by acetylsalicylic acid orally, the concentration of 200 mg / kg [13].

It is believed that these plants of genus *Cleome* can act as anti-inflammatory by inhibiting the release of mediators of acute inflammatory response, such as histamine, serotonin and bradykinin. It is also believed that extracts of this plant could submit some influence on the biosynthesis of prostaglandins, may intervene in the second stage of acute inflammatory response [13].

Antioxidants act in many of biological responses as inflammation and immunity, they function as signaling mechanisms for redox regulation. Even at minimal levels of oxidative stress, they are strongly detected and then the protective antioxidant mechanism is put into action, which is essential for maintaining the structural integrity of proteins. Also, the antioxidant potential may be a contributing factor to the extracts'

anti-inflammatory activity. ROS are released from activated neutrophils and macrophages during inflammatory injury and their overproduction leads to tissue injury or damage. ROS can also cause the release of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β and TNF- α which directly enhance inflammatory response [26, 27]. Hence, the extracts ability to counteract the effects of ROS and free radicals can contribute to their antiinflammatory activities.

Conclusion

The methanol extract of *C. spinosa* presents a anti-inflammatory potential, which contributed to scientific evidence of its medicinal uses related in the treatment of inflammation process, and the activity antioxidant of the extracts may be related to this effect beyond the phytochemicals present in each extract tested.

Competing interests

The authors this work declare does not have competing interests

Authors' contributions

Acknowledgments

The work was supported by FACEPE, CNPq and CAPES

Author details

^a Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brasil.

^b Colegiado de medicina, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Pernambuco, Brazil.

*Corresponding Author: Vera Lúcia de Menezes Lima. Avenida Professor Moraes Rêgo, S/N, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil. CEP: 50670-420. Telephone: +558121268540. E-mail: veramenezes_ufpe@gmail.com.br.

Reference

1. Boonyarikpunchai W, Sukrong S, Towiwat P. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid isolated from *Thunbergia laurifolia* Lindl." Pharmacology Biochemistry and Behavior. 2014; 124: 67-73.
2. Carvalho WA, Carvalho RDS, Rios-Santos, F. Analgésicos inibidores específicos da ciclooxigenase-2: avanços terapêuticos. Rev Bras Anesthesiol. 2004; 3: 448-464.

3. Carvalho ACB, Balbino EE, Maciel A, Perfeito JPS. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Rev Bras de Farmacog.* 2008; 18: 314-319.
4. Pupo MT, Guimarães DO, Furtado NAJC, Borges WS. Microbial natural products: a promising source of bioactive compounds. In: Taft, C. A. *Modern biotechnology in medicinal chemistry and industry.* Kerala: Research Signpost. 2006; 51- 78.
5. Selloum L, Arrar L, Medani B, Khenchouche A, Bisker H Effect of *Cleome arabica* leaves extract on inflammatory cell response in rat. *Biochem. Soc. Trans.* 1995; 23:609.
6. Nagaya H, Tobita Y, Nagae T, Itokawa H, Takeya K, Halim AF, Abd el- Halim O. Cytotoxic triterpenes from *Cleome africana*, *Phytochemistry.* 1997; 44:1115-1119.
7. Fushiya S, Kishi Y, Hattori K, Batkhuu J, Takano F, Singad ANB, Okuyama T. Flavonoids from *Cleome droserifolia* suppress NO production in activated macrophages *in vitro*. *Planta Med.* 1999; 65:404-407.
8. Bouriche H, Miles EA, Selloum L, Calder PC. Effect of *Cleome arabica* leaf extract, rutin and quercetin on soybean lipoxygenase activity and on generation of inflammatory eicosanoids by human neutrophils. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 2005; 72:195-201.
9. Simões C, Mattos JCP, Sabino KCC, Caldeira-de-Araújo A, Coelho MGP, Albarello N, Figueiredo SFL. Medicinal potential from *in vivo* and acclimatized plants of *Cleome rosea* Vahl ex DC. (Capparaceae). *Fitoterapia.* 2006; 77:94-99.
10. Sharma S, Chattopadhyay SK, Priyanka T, Bawankule DU. Synthesis and anti-inflammatory activity of derivatives of coumarinolignoid, cleomiscosin A and its methyl ether. *Eur. J. Med. Chem.* 2010^a; 45:5150-5156.
11. Singh PDA, West ME. Pharmacological investigations of sticky viscome extract (*Cleome viscosa* L.) in rats, mice and guinea-pigs. *Phytother. Res.* 1991; 5:82-84.
12. Parimaladevi B, Boominathan R, Mandal SC. Studies on analgesic activity of *Cleome viscosa* in mice. *Fitoterapia.* 2003; 74:262-266.
13. Bose A, Mondal S, Gupta JK, Ghosh T, Dash GK, Si S (2007). Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities of the ethanolic extract and its fractions of *Cleome rutidosperma*. *Fitoterapia.* 2007; 78:515-520.
14. Cabral, SCM, MF. Agra (1998) *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 79: 2-6
15. Agra, M F, França, PF, Barbosa-Filho, J M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2007; 17, 114-140.
17. Foster ME, Johnson CD, Bilings PJ, Davies PW, Leaper DJ. Intraoperative antegrade lavage and anastomotic healing in acute colonic obstruction. *Dis. Colon Rectum.* 1986; 29, 255-9.

18. Silva, R.A., Lima, M.S.F., Viana, J.B.M., Bezerra, V.S., Pimentel, M.C.B., Porto, A.L.F., Cavalcante, M.T.H. and Lima Filho, J.L. Can Artisanal “Coalho” Cheese from Northeastern Brazil Be Used as a Functional Food? *Food Chemistry*. 2012; 135, 1533-1538.
- 19 Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Food Science and Technology*. 1995; 28, 25-30.
20. Prieto, P., Pineda, M. and Aguilar, M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. *Analytical Biochemistry*. 1999; 269, 337-341.
21. DAL PRA, Valeria et al. Anti-inflammatory activity of fractionated extracts of *Salvia officinalis*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2011. 1, 7, 67.
22. Castelucci S., Rogerio A.P., Ambrosio S.R., Arakawa N.S., Lira S.P., Faccioli L.H., Costa F.B. Anti-inflammatory activity of *Dasyphyllum brasiliensis* (Asteraceae) on acute peritonitis induced by β -glucan from *Histoplasma capsulatum*. *J Ethnopharm.* 2007;112:192-198.
23. Mayer B., Baggio C.H., Freitas C.S., Santos A.C., Twardowschy A., Horst H., Pizzolatti G., Micke G. A., Heller M., Santos E.P., Otuki M.F., Marques A.C.A. Gastroprotective constituents of *Salvia officinalis* L. *Fitoterapia*. 2009; 80:421-426.
24. Albarello, N., Simões-Gurgel, C., Castro, T. C., Gayer, C. R. M., Coelho, M. G. P., Moura, R. S., et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of field-growth plants and tissue culture of *Cleome spinosa* (Jacq.) in mice. *J. Med. Plants. Res.* 2013; 7, 1043-1049.
25. Harraz, F. M., & Ayad, A. R.. Phytochemical and biological investigation of *Cleome amblyocarpa* Barr. et Murb. *Zagazig J. Pharm. Sci.* 1994;3, 64-71.
26. Dinarello, CA. Proinflammatory cytokines. *Chest* 2000;118(2):503-508.
27. Conforti F, Sosa S, Marrelli M, Menichini F, Statti GA, Uzunov D. In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. *J. Ethnopharmacol.* 2008; 116(1):144-151.

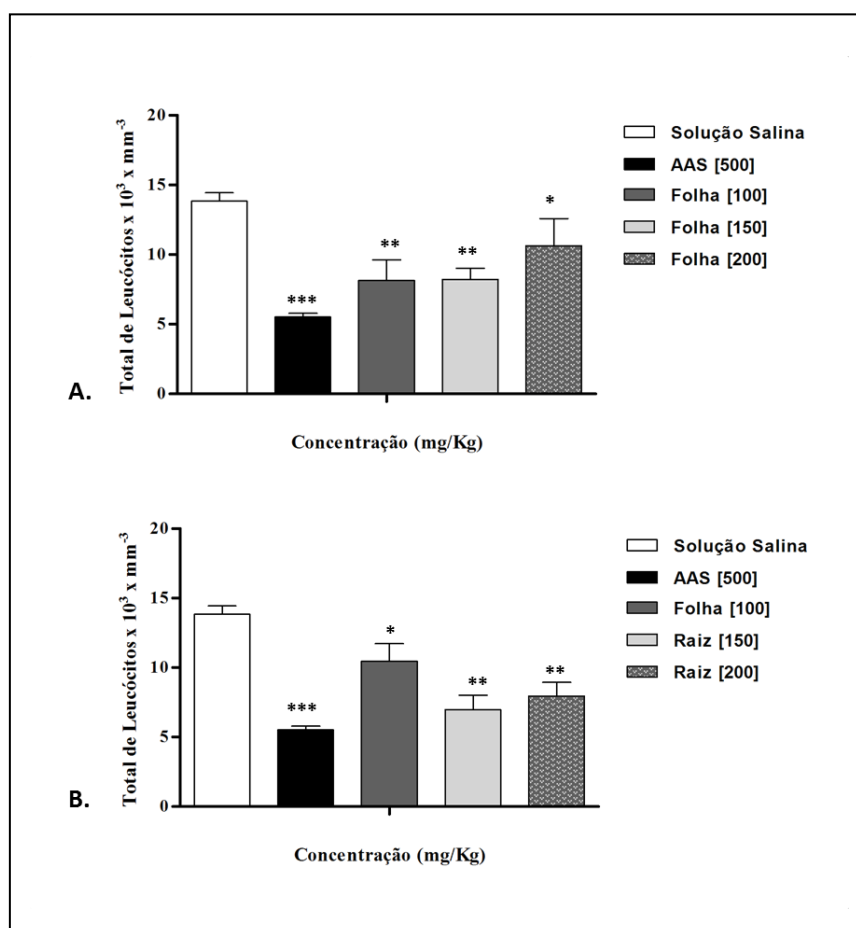


Figura 1. Effects of extracts of leaves and roots metanolics *C. spinosa* and Acetyl salicylic (500mg/ Kg) on the leukocytes migration. The results are expressed as Mean $\pm$ SD (n=6). * Indicates significant difference from the control group ($p < 0.005$), One-way ANOVA.

Table 1. Antioxidant activity (ABTS⁺) of *Cleome spinosa*

Extract	ML	MR	
Time	% Inhibition	% Inhibition	TEAC^a (μM Trolox)
6 min	71.62 ± 0.09	33.00 ± 0.08	1523.33 ± 1.23
15 min	77.40 ± 0.05	40.22 ± 0.12	1663.33 ± 0.99
30 min	81.68 ± 0.02	45.17 ± 0.09	1766.66 ± 1.16
45 min	82.92 ± 0.16	48.48 ± 0.18	1796.66 ± 2.45
60 min	88.29 ± 0.21	51.71 ± 0.23	1926.66 ± 2.16
120 min	96.28 ± 0.26	60.33 ± 0.29	2120.00 ± 2.40

Mean ± SD, n =3. ^aTEAC = antioxidante activity equivalente to Trolox

Table 2. Antioxidant activity of methanolic extract of *C. spinosa* leaves and roots in different concentrations. Gallic acid was used as standard. Mean $\pm$ SD (n = 3).

Extract	ML	MR
Extract concentration ($\mu\text{g/mL}$)	DPPH RSA %	DPPH RSA %
1000	85,54 $\pm$ 0.17	78.98 $\pm$ 0.53
500	80.08 $\pm$ 1.30	54.34 $\pm$ 0.62
250	74.16 $\pm$ 2.70	31.72 $\pm$ 1.60
125	67.13 $\pm$ 1.35	21.63 $\pm$ 1.83
62.5	53.29 $\pm$ 2.64	18.92 $\pm$ 1.53
31.2	35.37 $\pm$ 2.66	12.54 $\pm$ 1.25

RSA %: Percentage of DPPH radical reduction activity after 30 min.

APÊNDICE A - ARTIGOS A SEREM PUBLICADOS

ANTIOXIDANT AND ANTI-*Staphylococcus aureus* ACTIVITIES OF EXTRACT FROM *Crataeva tapia* L.

Ana Paula Sant'Anna da Silva¹; Amanda Dias de Araújo Uchôa ¹; Cibele Maria da Silva Bessa.¹; Paula Fernanda Figueiredo das Mercês; Tiago Fonseca Silva¹; Juciara Carneiro Gouveia Tenorio¹; Ingrid Ayslane Torres de Araújo Ribeiro¹; Rosimere da Silva¹; Cesar Augusto da Silva²; Vera Lucia de Menezes Lima¹

1- Departamento de Bioquímica, UFPE, Recife, Brazil

2- Colegiado de Medicina, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Juazeiro, Brazil

Background

Crataeva tapia, common in Semi-Arid northeastern, among herbal medicine practitioners for the treatment of diseases related to digestive processes and microbiological infections [1]. *S. aureus*, the most common bacterial pathogen isolated in humans is estimated at half a million cases of invasive infection, the emergence of multidrug-resistant strains, is grounds for research into new immunotherapies [2]. Oxidative stress induced by radicals is considered a primary factor in neurodegenerative disease [3, 4].

Methods

The sample of leaves were collected in the Universidade Federal de Pernambuco, Brazil, were fragmented and dried at 45°C for 48 h. The leaves *C. tapia* were extracted with ethanol for 3 days at room temperature, with agitation on a rotary shaker (90 rpm), after were filtered and evaporated. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) was realized according to the Instituto Clinical and Laboratory Standards (CLSI, 2011) [5]. The antimicrobial activity was tested against the following microorganisms provided by the Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, some isolated strains of *S. aureus* originally obtained from: blood sample (UFPEDA 672), vaginal secretion (UFPEDA 660); catheter tip (UFPEDA 663); urine sample (UFPEDA 670. For the antioxidant activity the following methods were used: 2, 2-azino-bis- (3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS) according [6] using trolox was reference standard. The results are expressed in trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) and phosphomolybdenum assay according [7] using ascorbic acid as standard.

Results and Conclusions

The MIC and MBC values ranged from 1.56 to 6.25 mg/mL and 3.12 to 12.5 mg/mL, respectively. This work showed that organic extract of *C. tapia* is a promising natural product for the development of new anti-*S. aureus*, therefore deserving further studies in order to understand their mechanism of action to develop formulations for

pharmaceutical use based on the your phytochemicals. The antioxidant activity against the radical ABTS showed: TEAC = $603,33 \pm 0.001 \mu\text{M}$ Trolox, with percentage inhibition: $33.6 \% \pm 0.002$. The assay performed by phosphomolybdenum showed: TAA: $23 \% \pm 2.7$. Ethanol, methanol are used favorably to extract polar compounds such as phenolic compounds and flavonoids which are believed to be effective antioxidants and antimicrobial [9].

Acknowledgments

Fundação de Amparo à Ciência do Estado de Pernambuco (FACEPE) for the financial support to this study.

References

1. Collins, D. O.; Reynolds W. F.; Reese. P. B. **New Cembranes from *Cleome spinosa***. *Journal of Natural Products*, 2004, 67 (2), pp 179–183
2. Daniel R Lu; Yann-Chong Tan; Sarah Kongpachith; Xiaoyong Cai¹; Emily A. Stein; Tamsin M Lindstrom; Jeremy Sokolove and William H Robinson. **Identification of Functional Anti-*Staphylococcus aureus* Antibodies by Sequencing Patient Plasmablast Antibody Repertoires**. *Clinical Immunology*. 2014 ; 152(0): 77–89.
3. Markesbery, W.R.E., Lovell, M. A. (2006). **DNA oxidation in Alzheimer disease**. *Antioxidants & Redox Signaling*. 8:2039-2045.
4. Gomez-Pinilla, F. E.; Nguyen, T. (2012). Natural mood foods: the actions of polyphenols against psychiatric and cognitive disorders. *Nutr Neurosci*. 15:127-33.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute (2011). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; Twenty First Informational Supplement, M100S21. Wayne, PA.
6. Silva RA, Lima MSF, Viana JBM, Bezerra VS, Pimentel MCB, Porto ALF. et al. 2012. **Can artisanal “Coalho” cheese from Northeastern Brazil be used as a functional food?** *Food Chemistry*. 2012,135:1533-1538.
7. Prieto P, Pineda M, Aguilar M. **Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum Complex: specific application to the determination of vitamin E**. *Analytical Biochemistry*. 1999,269:337-341.
9. Alam, Md. Nur; Bristi, Nusrat Jahan; Md. Rafiquzzaman. **Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity**. *Saudi Pharmaceutical Journal* (2013) 21, 143–152.

Corporation [US] <https://blu168.mail.live.com/?tid=cmhkHNewuE5KGB1WAhWtc1aAZ&tid=flinbox&paid=cmUP-rcd115KGD82W/5at65g2&pad=20>



Novo

Responder | ▾

Excluir

Arquivar

Lixo Eletrônico | ▾

Limpar

Mover para ▾

Categorias ▾



Your abstract to SBBIOTEC-6 has been accepted



Your submitted abstract has been reviewed by one or more members of the scientific committee of the 6th Brazilian Congress of Biotechnology.

We are pleased to inform you that your abstract to SBBIOTEC-6, entitled

"Antioxidant activities and Anti-Staphylococcus aureus of extract from Crataeva tapia L."

has been accepted by the committee for presentation at the Congress and publication into BMC Proceedings.

Please note that some of you who had submitted the abstract earlier have already received this same message before. This is just due to the way that the email communication system was setup.

Please access the conference management system at <https://www.conference-service.com/sbbiotec6/welcome.cgi> to check whether the scientific committee has required any minor revision of your abstract regarding the use of the English language, content, and/or format (text, references) according to BMC required rules.

Only after all required revisions (English, format and content) have been carefully completed, your abstract will be sent for final publication into BMC Proceedings. This will happen after the Congress.

Your login details for the conference management system are:

Email: annapsantanna@hotmail.com

password: [cmnh3dva](#)

© 2015 Microsoft Termos Privacidade e cookies Desenvolvedores Português (Brasil)

POTASSIUM USNATE TOXICITY AGAINST EMBRYONIC STAGES OF THE SNAIL *Biomphalaria glabrata*

Hallysson Douglas Andrade de Araujo¹, Hianna Arely Milca Fagundes Silva¹, Luanna Ribeiro dos Santos Silva², Williams Nascimento de Siqueira², Caíque Silveira Martins da Fonseca¹, Ana Paula Santa`Anna da Silva¹, Nicácio Henrique da Silva¹, Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo², Mônica Cristina Barroso Martins¹, Vera Lúcia de Menezes Lima¹.

¹ Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

² Department of Biophysic and Radiobiology, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

Background

Schistosomiasis affects millions of people at tropical and subtropical regions. In Brazil, thousands of new cases and hundreds of deaths annually are related to environmental problems and the presence of snails of the genus *Biomphalaria* [1]. *B. glabrata* is located over Brazilian coast and is the main vector of the disease [2]. *B. glabrata* elimination or control is an important alternative to reduce or eliminate schistosomiasis. The molluscicidal (niclosamide), recommended by the World Health Organization for this purpose, has high cost and it has demonstrated a high environmental toxicity [3]. For this reason, alternative molluscicides have been researched, such as the substances obtained from lichens. Therefore, this study aimed to evaluate the effect of potassium usnate obtained from *Cladonia substellata* (lichen) over the embryonic stages of *B. glabrata*.

Keywords; *Cladonia substellata* Vanio, Molluscicidal, Schistosomiasis

Methods

Cleaned and dried stems from *C. substellata* (60 g) were subjected to four successive extractions with cold diethyl ether (150 ml) in order to isolate usnic acid. Further isolation and purification was done using a silica column eluted with chloroform/hexane (80:20 v/v). To obtain potassium usnate, 500 mg of usnic acid were partially dissolved in distilled water at 40 °C, 10% potassium hydroxide was added carefully until complete solubilization of the sample, and then the samples were lyophilized [4]. The structure of the molecule was confirmed by infrared and ¹H NMR. For biological assays, embryos (n = 100) in stages of blastocyst (E1), gastrula (E2), trocophore (E3) and veliger (E4) [5], were exposed during 24 h to the dissolved potassium usnate in filtered and dechlorinated water at concentrations ranging from 1 to 6 mg/ml. After the

exposure period, the embryos were washed and transferred to clean plates with filtered and dechlorinated water where they were monitored for 7 days in order to observe viability parameters: hatching, malformation, and death. The experiments were performed in triplicate [3].

Results and Conclusions

Potassium usnate concentrations of 3 and 4 µg/ml provoked 26% and 48% of non-viable embryos at stage E1, while lower concentrations (2 and 3 µg/ml) were needed to cause similar results in E2 embryos. E3 and E4 stage embryos were also strongly affected by potassium usnate, only 2.5 µg/ml were needed to cause 27% and 26% of malformation or death, respectively, with increased levels along the other concentrations. 100% mortality was observed in stages E1, E2, E3, and E4 on 6.0, 4.0, 4.5, and 4.5 µg/ml concentrations, respectively. By these experiments, it is possible to understand that potassium usnate is an efficient and promising molecule to be used in control and elimination of *B. glabrata* in the embryonic stages.

Acknowledgments

The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE).

References

- [1] Gryseels, B. Schistosomiasis. Infect Dis Clin N Am. 2012; doi:10.1016/j.idc.2012.03.004.
- [2] Scholte RGC, Carvalho OS, Malone JB, Utzinger J, Vounatsou P. Spatial distribution of *Biomphalaria* spp., the intermediate host snails of *Schistosoma mansoni*, in Brazil. Geospat Health. 2012; [doi:org/10.4081/gh.2012.127](https://doi.org/10.4081/gh.2012.127).
- [3] Rapado LN, Freitas GC, Polpo A, Rojas-Cardozo M, Rincón JV, Scotti MT, Kato MJ, Nakano E, Yamaguchi LF. A benzoic acid derivative and flavokawains from *Piper* species as schistosomiasis vector controls. Molecules. 2014; doi:10.3390/molecules19045205.
- [4] Martins MCB, Silva MC, Silva LRS, Lima VLM, Pereira EC, Falcão EPS, Melo AMMA, Silva NH. Usnic acid potassium salt: an alternative for the control of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). Plos One. 2014; doi:10.1371/journal.pone.0111102.

[5] Camey T, Verdonk NH. The early development of the snail *Biomphalaria glabrata* (Say) and the origin of the head organs. Neth. J. Zool. 1969; doi: [10.1163/002829670X00097](https://doi.org/10.1163/002829670X00097).

Corporation [US] <https://blu168.mail.live.com/?tid=cmq6a-KD6F5RGy8QAJfeP-YA2&fid=flsearch&srch=1&skws=douglas&sdr=4&satt=0>

 Novo
 Responder |
 Excluir
 Arquivar
 Lixo Eletrônico |
 Limpar
 Mover para
 Categorias
 ...





Área Restrita de Douglas FW: Your abstract to SBBIOTEC-6 has been accepted
 



> Dear Mr Andrade de Araujo,

>

> Your submitted abstract has been reviewed by one or more members of the scientific committee of the 6th Brazilian Congress of Biotechnology.

>

> We are pleased to inform you that your abstract to SBBIOTEC-6, entitled

>

> "Potassium Urate Toxicity Against Embryonic Stages of the Snail *Biomphalaria glabrata*"

>

> has been accepted by the committee for presentation at the Congress and publication into BMC Proceedings.

>

> Please note that some of you who had submitted the abstract earlier have already received this same message before. This is just due to the way that the email communication system was setup.

>

> Please access the conference management system at <https://www.conference-service.com/sbbiotec6/welcome.cgi> to check whether the scientific committee has required any minor revision of your abstract regarding the use of the English language, content, and/or format (text , references) according to BMC required rules.

>

> Only after all required revisions (English, format and content) have been carefully completed, your abstract will be sent for final publication into BMC Proceedings. This will happen after the Congress.

>

> Your login details for the conference management system are:

>

> Email: dough_biomar@hotmail.com

© 2015 Microsoft
 Termos
 Privacidade e cookies
 Desenvolvedores
 Português (Brasil)

APÊNDICE B - COLABORAÇÕES EM ARTIGOS PUBLICADOS

academicJournals

Vol. 10(17), pp. 578-583, 7 May, 2016

DOI: 10.5897/AJMR2014.6999

Article Number: 9EFAF0258262

ISSN 1996-0808

Copyright © 2016

Author(s) retain the copyright of this article

<http://www.academicjournals.org/AJMR>

African Journal of Microbiology Research

Full Length Research Paper

Antimicrobial activity of several Brazilian medicinal plants against phytopathogenic bacteria

Cibele Maria Alves da Silva^{1,2}, Bruna Mirely da Silva Costa¹, Alexandre Gomes da Silva^{3*}, Elineide Barbosa de Souza⁴, Márcia Vanusa da Silva^{3,5}, Maria Tereza dos Santos Correia^{1,3}, da Silva Ana Paula Sant'Anna⁵ and Lima Vera Lúcia de Menezes⁵

¹Laboratório de Química de Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, 1235, 50.670-901, Recife - PE, Brazil.

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, 1235, 50.670-901, Recife - PE, Brazil.

³Núcleo de Bioprospecção e Conservação da Caatinga, Instituto Nacional do Semiárido/Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação – INSA/MCTI, Av. Francisco Lopes de Almeida, s/n, 58.429-970, Campina Grande - PB, Brazil.

⁴Departamento de Biologia, Área de Microbiologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900, Recife - PE, Brazil.

⁵Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, 1235, 50.670-901, Recife - PE, Brazil

Received 8 July, 2014; Accepted 29 March, 2016

What is currently raised as a new approach in the management of plant diseases is the development and formulation of plant based biopesticides. The objective of present study is to evaluate the antibacterial activity of aqueous extracts of twelve species belonging to seven families collected from the Northeast of Brazil against four economically important phytopathogenic bacteria. Antibacterial activities of the aqueous extracts were studied by minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). Twelve aqueous extracts of twelve species were evaluated. Only three extracts were not active against *Ralstonia solanacearum* and other three extracts were not active against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Anadenanthera colubrina* var. *cebil*, *Croton pedicellatus* and *Eugenia brejoensis* presented a broad spectrum of the inhibitory effect (MIC 3.12 to 12.5 mg/mL). According to these results, we conclude that the flora in the northeast of Brazil can be regarded as a rich source of plants with antibacterial activity. Therefore, further screening of other plant species, identifying active fractions or metabolites and *in vivo* application of active extracts are warranted.

Key words: Caatinga, Atlantic Forest, antibacterial activity, aqueous extract, anti-phytopathogenic activity.

INTRODUCTION

The plant kingdom represents an enormous reservoir of biologically active compounds with various chemical structures and disease preventing properties (Kavitha and Satish, 2013). The use of plant compounds to treat infection is an ancient practice in a large part of the world,

especially in developing countries, where there is dependence on traditional medicine for a variety of diseases (Gangoue-pieboji et al., 2008). According to World Health Organization, medicinal plants would be the best source to obtain a variety of drugs. In recent years,

Full Length Research Paper

Syagrus coronata seed oils have antimicrobial action against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*

Cibele Maria Alves da Silva¹, Rodrigo Santana do Nascimento¹, Renata Carla Corrêa Alves¹, José Matias Anselmo², Ana Paula Sant'Anna da Silva¹, Alexandre Gomes da Silva¹, Vera Lúcia de Menezes Lima¹, Josean Fecine Tavares³, Luís Cláudio Nascimento da Silva^{1,2}, Márcia Vanusa da Silva¹ and Maria Tereza dos Santos Correia¹

¹Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, Cidade Universitária, 1235, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil.

²Faculdade Pernambucana de Saúde, Av. Jean Emile Favre, 420, Imbiribeira, 51200-080, Recife, Pernambuco, Brazil.

³Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, Castelo Branco, 58051-970, João Pessoa, Paraíba, Brazil.

Received 15 March, 2016; Accepted 20 May, 2016

Syagrus coronata (Mart.) Becc. (Arecaceae) is a native Brazilian palm (*ouricuri*) and despite the use of its derived products by traditional communities, few scientific reports have been published regarding its biomedical activity. This study investigates the chemical composition and anti-*Staphylococcus aureus* effects of both manufactured oil (SCO) and essential oil (SCEO) from *S. coronata* seeds. SCO was provided by rural inhabitants, while SCEO was obtained by hydrodistillation. Chemical characterization was performed by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). *In vitro* antimicrobial activity was determined against 17 *S. aureus* strains, including multidrug-resistant strains. Eleven compounds were detected in the SCEO, octanoic (28.61%) and dodecanoic acids (22.97%) were the major constituents. On the other hand, nineteen fatty acids (FA) were identified in the SCO, the major ones being dodecanoic acid (41.58%) and 9-octadecenoic acid (23.81%). Both oils showed strong activity against all tested strains. Most strains (68.75%) were sensitive to SCEO at minimum inhibitory concentrations (MIC) between 0.002 and 0.01 µl/ml; and minimum bactericidal concentrations (MBC) ranging from 0.002 to 0.312 µl/ml. SCO inhibited the growth of 52.94% of strains with MIC between 0.16 and 0.625 µl/ml. MBC values for SCO were between 0.16 and 5 µl/ml; however, 47.05% of isolates were killed by 2.5 µl/ml of SCO. These results encourage further research into the toxicological and pharmacological aspects of SCO and SCEO. Such work would likely support their use in the development of new antimicrobial agents for the pharmaceutical, food and cosmetic industries.

Key words: Coating, essential oil, anti-*Staphylococcus aureus*, natural products.

INTRODUCTION

Bacteria, with their increasing drug resistance and their capacity to spread around the world, have become the most complex threats to a global public health system that is increasingly in need of effective antimicrobial

treatments (Gould et al., 2012). Among human and animal pathogens, *Staphylococcus aureus* is of particular concern due to its ability to express a variety of virulence factors that facilitate cell adhesion, immune evasion, host

Full Length Research Paper

Antimicrobial activity of seaweeds of Pernambuco, northeastern coast of Brazil

Renata Carla Corrêa Alves¹, Paula Fernanda Figueiredo das Mercês¹, Isabel Renata Arruda de Souza², Clêbia Maria Alves de Almeida¹, Ana Paula Sant'Anna da Silva¹, Vera Lúcia de Menezes Lima¹, Maria Tereza dos Santos Correia¹, Márcia Vanusa da Silva¹ and Alexandre Gomes da Silva^{3*}

¹Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, CEP 50670-901, Recife, PE, Brazil.

²Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste/Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (CETENE/MCTI), Av. Prof. Moraes Rego, 01, Cidade Universitária, CEP 50740-540, Recife, Brazil.

³Núcleo de Bioprospecção e Conservação da Caatinga, Instituto Nacional do Semiárido/Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (INSA/MCTI), Av. Francisco Lopes de Almeida, s/n, Serrotão, CEP 58429-970, Campina Grande, PB, Brazil.

Received 8 June, 2015; Accepted 10 August, 2015

The antibacterial efficacy of various solvent extracts of marine algae *Caulerpa racemosa*, *Ulva lactuca* (Chlorophyta), *Jania adhaerens* (Rhodophyta), *Padina gymnospora* and *Sargassum polyceratum* (Phaeophyta) against some selected gram-positive and gram-negative human pathogenic bacteria was screened. Crude extracts were prepared from the selected marine algae using different solvents namely, hexane, chloroform, ethyl acetate and methanol and were tested for their antibacterial activity against human pathogenic bacteria using disc diffusion method. Minimum inhibitory concentration (MIC) was also determined for selected solvent extracts for all the bacterial species. A suitable positive control was also maintained. Among the five marine algae screened *C. racemosa* and *U. lactuca* were found to be more active. It was observed that the ethyl acetate extracts of all the five marine algae showed higher inhibitory activity for the selected bacterial species than other solvent extracts. The results revealed that the crude ethyl acetate extracts seem to be a good source material in identifying the effective pure antibacterial compound(s) in all the five marine algae and particularly, *C. racemosa* and *U. lactuca*. The present study showed that the ethyl acetate extracts of marine algae such as *C. racemosa*, *J. adhaerens*, *P. gymnospora*, *S. polyceratum* and *Ulva lactuca* exhibited good antimicrobial activity. But the ethyl acetate extracts of *C. racemosa* and *U. lactuca* possessed highest antibacterial activity than others and so it could be useful in seeking active principles against human pathogenic bacteria.

Key words: Seaweeds, antimicrobial activity, marine macroalgae, human bacterial pathogens.

INTRODUCTION

Bacterial infection causes high rate of mortality in human population and aquaculture organisms. Preventing disease outbreaks or treating the disease with drugs or

chemicals tackles these problems. Nowadays, the use of antibiotics increased significantly due to heavy infections and the pathogenic bacteria becoming resistant to drugs

ANEXO A - INSTRUCTIONS FOR AUTHORS BMC COMPLEMENTARY AND ALTERNATIVE MEDICINE

Research articles

[Criteria](#) | [Submission process](#) | [Preparing main manuscript text](#) | [Preparing illustrations and figures](#) | [Preparing tables](#) | [Preparing additional files](#) | [Style and language](#)

Assistance with the process of manuscript preparation and submission is available from [BioMed Central customer support team](#). See '[About this journal](#)' for information about policies and the refereeing process. We also provide a collection of links to [useful tools](#) and resources for scientific authors on our page.

Criteria

Research articles should report on original primary research, but may report on systematic reviews of published research provided they adhere to the appropriate reporting guidelines which are detailed in our [Editorial Policies](#). Please note that non-commissioned pooled analyses of selected published research will not be considered.

Submission process

Manuscripts must be submitted by one of the authors of the manuscript, and should not be submitted by anyone on their behalf. The corresponding author takes responsibility for the article during submission and peer review.

Please note that *BMC Complementary and Alternative Medicine* levies an article-processing charge on all accepted Research articles; if the corresponding author's institution is a [BioMed Central member](#) the cost of the article-processing charge may be covered by the membership (see [About](#) page for detail). Please note that the membership is only automatically recognised on submission if the corresponding author is based at the member institution.

To facilitate rapid publication and to minimize administrative costs, *BMC Complementary and Alternative Medicine* prefers [online submission](#).

Files can be submitted as a batch, or one by one. The submission process can be interrupted at any time; when users return to the site, they can carry on where they left off.

See below for examples of [word processor](#) and [graphics file formats](#) that can be accepted for the main manuscript document by the online submission system. Additional files of any type, such as [movies](#), animations, or [original data files](#), can also be submitted as part of the manuscript.

During submission you will be asked to provide a cover letter. Use this to explain why your manuscript should be published in the journal, to elaborate on any issues relating to our editorial policies in the '[About *BMC Complementary and Alternative Medicine*](#)' page, and to declare any potential competing interests.

Assistance with the process of manuscript preparation and submission is available from [BioMed Central customer support team](#).

We also provide a collection of links to useful tools and resources for scientific authors on our [Useful Tools](#) page.

File formats

The following word processor file formats are acceptable for the main manuscript document:

- Microsoft word (DOC, DOCX)
- Rich text format (RTF)
- Portable document format (PDF)
- TeX/LaTeX (use [BioMed Central's TeX template](#))
- DeVice Independent format (DVI)

TeX/LaTeX users: Please use [BioMed Central's TeX template](#) and BibTeX stylefile if you use TeX format. During the TeX submission process, please submit your TeX file as the main manuscript file and your bib/bbl file as a dependent file. Please also convert your TeX file into a PDF and submit this PDF as an additional file with the name 'Reference PDF'. This PDF will be used by internal staff as a reference point to check the layout of the article as the author intended. Please also note that all figures must be coded at the end of the TeX file and not inline.

If you have used another template for your manuscript, or if you do not wish to use BibTeX, then please submit your manuscript as a DVI file. We do not recommend converting to RTF.

For all TeX submissions, all relevant editable source must be submitted during the submission process. Failing to submit these source files will cause unnecessary delays in the publication procedures.

Publishing Datasets

Through a special arrangement with [LabArchives](#), LLC, authors submitting manuscripts to BMC Complementary and Alternative Medicine can obtain a [complimentary subscription to LabArchives](#) with an allotment of 100MB of storage. LabArchives is an Electronic Laboratory Notebook which will enable scientists to share and publish data files in situ; you can then link your paper to these data. Data files linked to published articles are assigned digital object identifiers (DOIs) and will remain available in perpetuity. Use of LabArchives or similar data publishing services does not replace

preexisting data deposition requirements, such as for nucleic acid sequences, protein sequences and atomic coordinates.

Instructions on assigning DOIs to datasets, so they can be permanently linked to publications, can be found on the LabArchives website. Use of LabArchives' software has no influence on the editorial decision to accept or reject a manuscript.

Authors linking datasets to their publications should include an Availability of supporting data section in their manuscript and cite the dataset in their reference list.

Preparing main manuscript text

General guidelines of the journal's style and language are given below.

Overview of manuscript sections for Research articles

Manuscripts for Research articles submitted to *BMC Complementary and Alternative Medicine* should be divided into the following sections (in this order):

- Title page
- Abstract
- Keywords
- Background
- Methods
- Results and discussion
- Conclusions
- List of abbreviations used (if any)
- Competing interests
- Authors' contributions
- Authors' information
- Acknowledgements
- Endnotes
- References
- Illustrations and figures (if any)
- Tables and captions
- Preparing additional files

The **Accession Numbers** of any nucleic acid sequences, protein sequences or atomic coordinates cited in the manuscript should be provided, in square brackets and include the corresponding database name; for example, [EMBL:AB026295, EMBL:AC137000, DDBJ:AE000812, GenBank:U49845, PDB:1BFM, Swiss-Prot:Q96KQ7, PIR:S66116].

The databases for which we can provide direct links are: EMBL Nucleotide Sequence Database (EMBL), DNA Data Bank of Japan (DDBJ), GenBank at the NCBI (GenBank), Protein Data Bank (PDB), Protein Information Resource (PIR) and the Swiss-Prot Protein Database (Swiss-Prot).

For reporting standards please see the information in the About section.

Title page

The title page should:

- provide the title of the article
- list the full names, institutional addresses and email addresses for all authors
- indicate the corresponding author

Please note:

- the title should include the study design, for example "A versus B in the treatment of C: a randomized controlled trial X is a risk factor for Y: a case control study"
- abbreviations within the title should be avoided
- if a collaboration group should be listed as an author, please list the Group name as an author. If you would like the names of the individual members of the Group to be searchable through their individual PubMed records, please include this information in the "acknowledgements" section in accordance with the instructions below. Please note that the individual names may not be included in the PubMed record at the time a published article is initially included in PubMed as it takes PubMed additional time to code this information.

Abstract

The Abstract of the manuscript should not exceed 350 words and must be structured into separate sections: **Background**, the context and purpose of the study; **Methods**, how the study was performed and statistical tests used; **Results**, the main findings; **Conclusions**, brief summary and potential implications. Please minimize the use of abbreviations and do not cite references in the abstract. **Trial registration**, if your research article reports the results of a controlled health care intervention, please list your trial registry, along with the unique identifying number (e.g. **Trial registration**: Current Controlled Trials ISRCTN73824458). Please note that there should be no space between the letters and numbers of your trial registration number. We recommend manuscripts that report randomized controlled trials follow the CONSORT extension for abstracts.

Keywords

Three to ten keywords representing the main content of the article.

Background

The Background section should be written in a way that is accessible to researchers without specialist knowledge in that area and must clearly state - and, if helpful, illustrate - the background to the research and its aims. Reports of clinical research should, where appropriate, include a summary of a search of the literature to indicate why this study was necessary and what it aimed to contribute to the field. The section should end with a brief statement of what is being reported in the article.

Methods

The methods section should include the design of the study, the setting, the type of participants or materials involved, a clear description of all interventions and comparisons, and the type of analysis used, including a power calculation if appropriate. Generic drug names should generally be used. When proprietary brands are used in research, include the brand names in parentheses in the Methods section.

For studies involving human participants a statement detailing ethical approval and consent should be included in the methods section. For further details of the journal's editorial policies and ethical guidelines see '[About this journal](#)'.

For further details of the journal's data-release policy, see the policy section in '[About this journal](#)'.

Results and discussion

The Results and discussion may be combined into a single section or presented separately. Results of statistical analysis should include, where appropriate, relative and absolute risks or risk reductions, and confidence intervals. The Results and discussion sections may also be broken into subsections with short, informative headings.

Conclusions

This should state clearly the main conclusions of the research and give a clear explanation of their importance and relevance. Summary illustrations may be included.

List of abbreviations

If abbreviations are used in the text they should be defined in the text at first use, and a list of abbreviations can be provided, which should precede the competing interests and authors' contributions.

Competing interests

A competing interest exists when your interpretation of data or presentation of information may be influenced by your personal or financial relationship with other people or organizations. Authors must disclose any financial competing interests; they should also reveal any non-financial competing interests that may cause them embarrassment were they to become public after the publication of the manuscript.

Authors are required to complete a declaration of competing interests. All competing interests that are declared will be listed at the end of published articles. Where an author gives no competing interests, the listing will read 'The author(s) declare that they have no competing interests'.

When completing your declaration, please consider the following questions:

Financial competing interests

- In the past three years have you received reimbursements, fees, funding, or salary from an organization that may in any way gain or lose financially from the publication of this manuscript, either now or in the future? Is such an organization

financing this manuscript (including the article-processing charge)? If so, please specify.

- Do you hold any stocks or shares in an organization that may in any way gain or lose financially from the publication of this manuscript, either now or in the future? If so, please specify.
- Do you hold or are you currently applying for any patents relating to the content of the manuscript? Have you received reimbursements, fees, funding, or salary from an organization that holds or has applied for patents relating to the content of the manuscript? If so, please specify.
- Do you have any other financial competing interests? If so, please specify.

Non-financial competing interests

Are there any non-financial competing interests (political, personal, religious, ideological, academic, intellectual, commercial or any other) to declare in relation to this manuscript? If so, please specify.

If you are unsure as to whether you, or one your co-authors, has a competing interest please discuss it with the editorial office.

Authors' contributions

In order to give appropriate credit to each author of a paper, the individual contributions of authors to the manuscript should be specified in this section.

According to ICMJE guidelines, An 'author' is generally considered to be someone who has made substantive intellectual contributions to a published study. To qualify as an author one should 1) have made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; 2) have been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content; 3) have given final approval of the version to be published; and 4) agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content. Acquisition of funding, collection of data, or general supervision of the research group, alone, does not justify authorship.

We suggest the following kind of format (please use initials to refer to each author's contribution): AB carried out the molecular genetic studies, participated in the sequence alignment and drafted the manuscript. JY carried out the immunoassays. MT participated in the sequence alignment. ES participated in the design of the study and performed the statistical analysis. FG conceived of the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

All contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, a department chair who provided only general support, or those who contributed as part of a large collaboration group.

Authors' information

You may choose to use this section to include any relevant information about the author(s) that may aid the reader's interpretation of the article, and understand the standpoint of the author(s). This may include details about the authors' qualifications, current positions they hold at institutions or societies, or any other relevant background information. Please refer to authors using their initials. Note this section should not be used to describe any competing interests.

Acknowledgements

Please acknowledge anyone who contributed towards the article by making substantial contributions to conception, design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data, or who was involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content, but who does not meet the criteria for authorship. Please also include the source(s) of funding for each author, and for the manuscript preparation. Authors must describe the role of the funding body, if any, in design, in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. Please also acknowledge anyone who contributed materials essential for the study. If a language editor has made significant revision of the manuscript, we recommend that you acknowledge the editor by name, where possible.

The role of a scientific (medical) writer must be included in the acknowledgements section, including their source(s) of funding. We suggest wording such as 'We thank Jane Doe who provided medical writing services on behalf of XYZ Pharmaceuticals Ltd.'

If you would like the names of the individual members of a collaboration Group to be searchable through their individual PubMed records, please ensure that the title of the collaboration Group is included on the title page and in the submission system and also include collaborating author names as the last paragraph of the “acknowledgements” section. Please add authors in the format First Name, Middle initial(s) (optional), Last Name. You can add institution or country information for each author if you wish, but this should be consistent across all authors.

Please note that individual names may not be present in the PubMed record at the time a published article is initially included in PubMed as it takes PubMed additional time to code this information.

Authors should obtain permission to acknowledge from all those mentioned in the Acknowledgements section.

Endnotes

Endnotes should be designated within the text using a superscript lowercase letter and all notes (along with their corresponding letter) should be included in the Endnotes section. Please format this section in a paragraph rather than a list.

References

All references, including URLs, must be numbered consecutively, in square brackets, in the order in which they are cited in the text, followed by any in tables or legends. Each reference must have an individual reference number. Please avoid excessive

referencing. If automatic numbering systems are used, the reference numbers must be finalized and the bibliography must be fully formatted before submission.

Only articles, clinical trial registration records and abstracts that have been published or are in press, or are available through public e-print/preprint servers, may be cited; unpublished abstracts, unpublished data and personal communications should not be included in the reference list, but may be included in the text and referred to as "unpublished observations" or "personal communications" giving the names of the involved researchers. Obtaining permission to quote personal communications and unpublished data from the cited colleagues is the responsibility of the author. Footnotes are not allowed, but endnotes are permitted. Journal abbreviations follow Index Medicus/MEDLINE. Citations in the reference list should include all named authors, up to the first six before adding 'et al.'.

Any *in press* articles cited within the references and necessary for the reviewers' assessment of the manuscript should be made available if requested by the editorial office.

An Endnote style file is [available](#).

Examples of the *BMC Complementary and Alternative Medicine* reference style are shown [below](#). Please ensure that the reference style is followed precisely; if the references are not in the correct style they may have to be retyped and carefully proofread.

All web links and URLs, including links to the authors' own websites, should be given a reference number and included in the reference list rather than within the text of the manuscript. They should be provided in full, including both the title of the site and the URL, as well as the date the site was accessed, in the following format: The Mouse Tumor Biology Database. <http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>. Accessed 20 May 2013. If an author or group of authors can clearly be associated with a web link, such as for weblogs, then they should be included in the reference.

Authors may wish to make use of reference management software to ensure that reference lists are correctly formatted. An example of such software is [Papers](#), which is part of Springer Science+Business Media.

Examples of the BMC Complementary and Alternative Medicine reference style

Article within a journal

Smith JJ. The world of science. *Am J Sci*. 1999;36:234-5.

Article within a journal (no page numbers)

Rohrmann S, Overvad K, Bueno-de-Mesquita HB, Jakobsen MU, Egeberg R, Tjønneland A, et al. Meat consumption and mortality - results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *BMC Medicine*. 2013;11:63.

Article within a journal by DOI

Slifka MK, Whitton JL. Clinical implications of dysregulated cytokine production. *Dig J Mol Med*. 2000; doi:10.1007/s801090000086.

Article within a journal supplement

Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Functional asplenia: demonstration of splenic activity by bone marrow scan. *Blood* 1979;59 Suppl 1:26-32.

Book chapter, or an article within a book

Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. In: Bourne GH, Danielli JF, Jeon KW, editors. International review of cytology. London: Academic; 1980. p. 251-306.

OnlineFirst chapter in a series (without a volume designation but with a DOI)

Saito Y, Hyuga H. Rate equation approaches to amplification of enantiomeric excess and chiral symmetry breaking. Top Curr Chem. 2007. doi:10.1007/128_2006_108.

Complete book, authored

Blenkinsopp A, Paxton P. Symptoms in the pharmacy: a guide to the management of common illness. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science; 1998.

Online document

Doe J. Title of subordinate document. In: The dictionary of substances and their effects. Royal Society of Chemistry. 1999. <http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document>. Accessed 15 Jan 1999.

Online database

Healthwise Knowledgebase. US Pharmacopeia, Rockville. 1998. <http://www.healthwise.org>. Accessed 21 Sept 1998.

Supplementary material/private homepage

Doe J. Title of supplementary material. 2000. <http://www.privatehomepage.com>. Accessed 22 Feb 2000.

University site

Doe, J: Title of preprint. <http://www.uni-heidelberg.de/mydata.html> (1999). Accessed 25 Dec 1999.

FTP site

Doe, J: Trivial HTTP, RFC2169. <ftp://ftp.isi.edu/in-notes/rfc2169.txt> (1999). Accessed 12 Nov 1999.

Organization site

ISSN International Centre: The ISSN register. <http://www.issn.org> (2006). Accessed 20 Feb 2007.

Dataset with persistent identifier

Zheng L-Y, Guo X-S, He B, Sun L-J, Peng Y, Dong S-S, et al. Genome data from sweet and grain sorghum (*Sorghum bicolor*). GigaScience Database. 2011. <http://dx.doi.org/10.5524/100012>.

Preparing illustrations and figures

Illustrations should be provided as separate files, not embedded in the text file. Each figure should include a single illustration and should fit on a single page in portrait format. If a figure consists of separate parts, it is important that a single composite illustration file be submitted which contains all parts of the figure. There is no charge for the use of color figures.

Please read our [figure preparation guidelines](#) for detailed instructions on maximising the quality of your [figures](#).

Formats

The following file formats can be accepted:

- PDF (preferred format for diagrams)
- DOCX/DOC (single page only)

- PPTX/PPT (single slide only)
- EPS
- PNG (preferred format for photos or images)
- TIFF
- JPEG
- BMP

Figure legends

The legends should be included in the main manuscript text file at the end of the document, rather than being a part of the figure file. For each figure, the following information should be provided: Figure number (in sequence, using Arabic numerals - i.e. Figure 1, 2, 3 etc); short title of figure (maximum 15 words); detailed legend, up to 300 words.

Please note that it is the responsibility of the author(s) to obtain permission from the copyright holder to reproduce figures or tables that have previously been published elsewhere.

Preparing tables

Each table should be numbered and cited in sequence using Arabic numerals (i.e. Table 1, 2, 3 etc.). Tables should also have a title (above the table) that summarizes the whole table; it should be no longer than 15 words. Detailed legends may then follow, but they should be concise. Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

Smaller tables considered to be integral to the manuscript can be pasted into the end of the document text file, in A4 portrait or landscape format. These will be typeset and displayed in the final published form of the article. Such tables should be formatted using the 'Table object' in a word processing program to ensure that columns of data are kept aligned when the file is sent electronically for review; this will not always be the case if columns are generated by simply using tabs to separate text. Columns and rows of data should be made visibly distinct by ensuring that the borders of each cell display as black lines. Commas should not be used to indicate numerical values. Color and shading may not be used; parts of the table can be highlighted using symbols or bold text, the meaning of which should be explained in a table legend. Tables should not be embedded as figures or spreadsheet files.

Larger datasets or tables too wide for a portrait page can be uploaded separately as additional files. Additional files will not be displayed in the final, laid-out PDF of the article, but a link will be provided to the files as supplied by the author.

Tabular data provided as additional files can be uploaded as an Excel spreadsheet (.xls) or comma separated values (.csv). As with all files, please use the standard file extensions.

Preparing additional files

Although *BMC Complementary and Alternative Medicine* does not restrict the length and quantity of data included in an article, we encourage authors to provide datasets, tables, movies, or other information as additional files.

Please note: All Additional files **will be published** along with the article. Do not include files such as patient consent forms, certificates of language editing, or revised versions of the main manuscript document with tracked changes. Such files should be sent by email to editorial@biomedcentral.com, quoting the Manuscript ID number.

Results that would otherwise be indicated as "data not shown" can and should be included as additional files. Since many weblinks and URLs rapidly become broken, *BMC Complementary and Alternative Medicine* requires that supporting data are included as additional files, or deposited in a recognized repository. Please do not link to data on a personal/departmental website. The maximum file size for additional files is 20 MB each, and files will be virus-scanned on submission.

Additional files can be in any format, and will be downloadable from the final published article as supplied by the author. We recommend CSV rather than PDF for tabular data.

Certain supported files formats are recognized and can be displayed to the user in the browser. These include most movie formats (for users with the Quicktime plugin), mini-websites prepared according to our guidelines, chemical structure files (MOL, PDB), geographic data files (KML).

If additional material is provided, please list the following information in a separate section of the manuscript text:

- File name (e.g. Additional file 1)
- File format including the correct file extension for example .pdf, .xls, .txt, .pptx (including name and a URL of an appropriate viewer if format is unusual)
- Title of data
- Description of data

Additional files should be named "Additional file 1" and so on and should be referenced explicitly by file name within the body of the article, e.g. 'An additional movie file shows this in more detail [see Additional file 1]'.

Additional file formats

Ideally, file formats for additional files should not be platform-specific, and should be viewable using free or widely available tools. The following are examples of suitable formats.

- Additional documentation
 - PDF (Adode Acrobat)
- Animations
 - SWF (Shockwave Flash)
- Movies
 - MP4 (MPEG 4)
 - MOV (Quicktime)

- Tabular data
 - XLS, XLSX (Excel Spreadsheet)
 - CSV (Comma separated values)

As with figure files, files should be given the standard file extensions.

Mini-websites

Small self-contained websites can be submitted as additional files, in such a way that they will be browsable from within the full text HTML version of the article. In order to do this, please follow these instructions:

1. Create a folder containing a starting file called index.html (or index.htm) in the root.
2. Put all files necessary for viewing the mini-website within the folder, or sub-folders.
3. Ensure that all links are relative (ie "images/picture.jpg" rather than "/images/picture.jpg" or "http://yourdomain.net/images/picture.jpg" or "C:\Documents and Settings\username\My Documents\mini-website\images\picture.jpg") and no link is longer than 255 characters.
4. Access the index.html file and browse around the mini-website, to ensure that the most commonly used browsers (Internet Explorer and Firefox) are able to view all parts of the mini-website without problems, it is ideal to check this on a different machine.
5. Compress the folder into a ZIP, check the file size is under 20 MB, ensure that index.html is in the root of the ZIP, and that the file has .zip extension, then submit as an additional file with your article.

Style and language

General

Currently, *BMC Complementary and Alternative Medicine* can only accept manuscripts written in English. Spelling should be US English or British English, but not a mixture. There is no explicit limit on the length of articles submitted, but authors are encouraged to be concise.

BMC Complementary and Alternative Medicine will not edit submitted manuscripts for style or language; reviewers may advise rejection of a manuscript if it is compromised by grammatical errors. Authors are advised to write clearly and simply, and to have their article checked by colleagues before submission. In-house copyediting will be minimal. Non-native speakers of English may choose to make use of a copyediting service.

Language editing

For authors who wish to have the language in their manuscript edited by a native-English speaker with scientific expertise, BioMed Central recommends [Edanz](#). BioMed Central has arranged a 10% discount to the fee charged to BioMed Central authors by Edanz. Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication. Please contact [Edanz](#) directly to make arrangements for editing, and for pricing and payment details.

Help and advice on scientific writing

The abstract is one of the most important parts of a manuscript. For guidance, please visit our page on [Writing titles and abstracts for scientific articles](#).

Tim Albert has produced for BioMed Central a [list of tips](#) for writing a scientific manuscript. [American Scientist](#) also provides a list of resources for science writing. For more detailed guidance on preparing a manuscript and writing in English, please visit the [BioMed Central author academy](#).

Abbreviations

Abbreviations should be used as sparingly as possible. They should be defined when first used and a list of abbreviations can be provided following the main manuscript text.

Typography

- Please use double line spacing.
- Type the text unjustified, without hyphenating words at line breaks.
- Use hard returns only to end headings and paragraphs, not to rearrange lines.
- Capitalize only the first word, and proper nouns, in the title.
- All pages should be numbered.
- Use the *BMC Complementary and Alternative Medicine* [reference format](#).
- Footnotes are not allowed, but endnotes are permitted.
- Please do not format the text in multiple columns.
- Greek and other special characters may be included. If you are unable to reproduce a particular special character, please type out the name of the symbol in full. **Please ensure that all special characters used are embedded in the text, otherwise they will be lost during conversion to PDF.**

Units

SI units should be used throughout (liter and molar are permitted, however).