

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia

MYCHELY SHEILA MELO

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIBACTERIANA E ANTIOXIDANTE DE
FOLHAS DE *Libidibia ferrea* var. *ferrea***

RECIFE
2012

MYCHELY SHEILA MELO

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIBACTERIANA E ANTIOXIDANTE DE
FOLHAS DE *Libidibia ferrea* var. *ferrea***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Área de Concentração BIOQUÍMICA E FISILOGIA, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Bioquímica e Fisiologia.

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

Co-orientador: Prof^a. Dra. Márcia Vanusa da Silva

Recife
2012

Catálogo na Fonte

Elaine Cristina Barroso

Melo, Mychely Sheila

Avaliação das atividades antibacteriana e antioxidante de folhas de *Libidibia ferrea* var. *ferrea* / Mychely Sheila Melo. – Recife, 2012.

77 f. : il., fig., tab.

Orientadora: Maria Tereza dos Santos Correia

Coorientadora: Márcia Vanusa da Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, Recife, 2012.

Inclui referências e anexos

1. Plantas medicinais 2. Caatinga 3. Metabólitos I. Correia, Maria Tereza dos Santos (orient.) II. Silva, Márcia Vanusa da (coorient.) III. Título.

581.634

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-669

MYCHELY SHEILA MELO

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIBACTERIANA E ANTIOXIDANTE DE
FOLHAS DE *Libidibia ferrea* var. *ferrea***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Área de Concentração BIOQUÍMICA E FISILOGIA, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Bioquímica e Fisiologia.

Aprovada em: 28/09/2012

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dra. Janete Magali de Araújo
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Aos meus pais, Sebastião e Maria José, e
a todos os meus amigos, por todo amor,
carinho e apoio a mim dedicados.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, por guiar meus passos, por me conceder perseverança para chegar até o final e por ter me dado tantas oportunidades e bênçãos.

A meus pais, Sebastião e Maria José, a minha irmã, Marília, por todo amor e carinho.

A Paulo Luna, meu noivo, pelos momentos maravilhosos compartilhados e por todo incentivo, principalmente nos momentos mais difíceis.

A Professora Maria Tereza dos Santos Correia, minha orientadora, pelos ensinamentos, exemplo de pessoa e profissional e por todo o carinho dedicado, desde a iniciação científica.

A professora Márcia Vanusa da Silva, minha co-orientadora, por todo carinho, amizade e dedicação na realização deste trabalho.

A todos os funcionários e professores do Departamento de Bioquímica e Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Fisiologia.

A todos os amigos do Laboratório de Glicoproteínas por todos os momentos, conhecimentos compartilhados, apoio e amizade.

A todos do Laboratório de Síntese orgânica, especialmente a professora Janaína Versiani, pelo apoio, amizade e receptividade.

A todos do Laboratório de Biotecnologia, especialmente Isabel e Romero por toda amizade e apoio na realização deste trabalho.

A todo o grupo da Caatinga pelos momentos compartilhados e contribuição científica.

A minha amiga Raiana Apolinário, por todo carinho, amizade, apoio, pelas risadas e longas conversas na hora do lanchinho e por toda contribuição científica.

A minhas amigas, Larissa, Amanda, Gigi, Mayara, Mary e Priscilla que estiveram comigo durante toda a graduação compartilhando momentos maravilhosos e inesquecíveis, muito obrigada pelo carinho e amizade.

A minhas amigas Pollyana, Mayara e Alexsandra que estiveram ao meu lado durante todos esses anos, me apoiando e vibrando com minhas conquistas.

A Universidade Federal de Pernambuco e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

“Quem deseja ver o arco-íris, precisa aprender a gostar da chuva”.

Paulo Coelho

RESUMO

Diversas plantas têm sido avaliadas, ao longo dos anos, quanto aos seus efeitos terapêuticos, buscando isolar novas substâncias capazes de auxiliar no tratamento de diversas patologias como infecções bacterianas e doenças ligadas ao estresse oxidativo. *Libidibia ferrea* var *ferrea* é uma planta de grande ocorrência na região semiárida brasileira, muito utilizada pelas populações locais como forrageira e para fins medicinais. Portanto, a partir de extrações das folhas de *L. ferrea* var *ferrea* em diferentes solventes, os objetivos do presente estudo foram identificar os componentes presentes, através da análise fitoquímica, bem como avaliar as atividades antibacteriana e antioxidante. A análise fitoquímica de extratos por cromatografia em camada delgada (CCD) revelou a presença de alcalóides, carboidratos, derivados cinâmicos, flavonóides, terpenos e taninos. Os constituintes químicos do extrato ciclohexânico (LFCH) e suas frações, obtidas por cromatografia em sílica gel, foram identificados por GC-MS, revelando a presença de ácidos graxos, alcanos, terpenos e esteróides, destacando-se como composto majoritário o terpeno Fitol. Todos os extratos apresentaram atividade antibacteriana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, pela técnica de microdiluição em caldo. LFCH foi o extrato mais eficaz com concentração inibitória mínima (CIM) variando de 0.39mg/ml a 3.12mg/ml. Entretanto, suas frações exibiram uma menor atividade contra *Staphylococcus aureus*, com CIM variando de 0.625mg/ml a 10mg/ml, sugerindo a possibilidade de sinergismo entre as moléculas presentes no extrato. No ensaio antioxidante *in vitro*, sequestro do radical livre DPPH, foi observado que LFEtAc, LFMeOH e LFAq exibiram alto poder antioxidante, destacando-se os dois últimos extratos, pois se mostraram mais eficazes que o padrão quercetina.

Palavras-chaves: Metabólitos secundários. Caatinga. Pau-ferro.

ABSTRACT

Several plants have been evaluated over the years as to their therapeutic effects seeking to isolate new substances may be used for treatment of various diseases such as bacterial infections and diseases related to oxidative stress. *Libidibia ferrea* is a plant of great occurrence in the Brazilian semiarid region used by population as fodder and for medicinal purposes. Therefore, extraction of leaves of *L. ferrea* var *ferrea* in different solvents the objectives of this study were to identify the components present, through the phytochemical analysis, as well as evaluating the antibacterial and antioxidant activities. The phytochemical analysis of extracts by TLC revealed the presence of alkaloids, carbohydrates, cinnamic derivatives, flavonoids, tannins and terpenes. The chemical constituents of LFCH and their fractions obtained by silica gel chromatography were identified by GC-MS which showed the presence of fatty acids, alkanes, terpenes and steroids, highlighted as major compound phytol, a terpen. All extracts showed antibacterial activity against gram-positive and gram-negative bacteria by broth microdilution technique. LFCH extract was more effective with MIC ranging from 0.39mg/ml to 3.12mg/ml. However, its fractions exhibited a lower activity against *Staphylococcus aureus* with MIC ranging from 0.625mg/ml to 10mg/ml, suggesting the possibility of synergism between molecules present in extract. In vitro antioxidant assay, scavenging free radical DPPH, was observed that LFEtOAc, LFMeOH and LFAq exhibited high antioxidant power, especially the last extracts, were more effective than standard quercetin.

Key-words: Secondary metabolites. Caatinga. Pau-ferro.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

FIGURA 1 - PRINCIPAIS VIAS DE BIOSÍNTESE DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	4
FIGURA 2 - ESTRUTURA GERAL DOS FLAVONÓIDES	7
FIGURA 3 - ESTRUTURA DA QUERCETINA	8
FIGURA 4 - PARQUE NACIONAL DA SERRA DO CATIMBAU.....	15
FIGURA 5 - ÁRVORE E FOLHAS DE <i>Libidibia ferrea</i> var. <i>ferrea</i>	16

ARTIGO

FIGURE 1 - DPPH RADICAL SCAVENGING OF EXTRACTS, QUERCETIN WAS USED AS REFERENCE. ABSORBANCE OF THE REACTION WAS MEASURED AT 517 NM. VALUES ARE MEANS $\pm$ S.D. (N = 3).....	60
--	----

LISTA DE TABELAS

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS	6
TABELA 2 - SOLVENTES UTILIZADOS NA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS VEGETAIS E PRINCIPAIS SUBSTÂNCIAS EXTRAÍDAS	12
TABELA 3 - PRINCIPAIS BACTÉRIAS CAUSADORAS DE INFECÇÃO HOSPITALAR E SÍTIOS DE INFECÇÃO	18

TABELAS DO ARTIGO

TABLE 1 - SCREENING OF PHYTOCHEMICALS OF <i>L. ferrea</i> LEAVES EXTRACTS	56
TABLE 2 - CHEMICAL COMPOSITION OF <i>L. ferrea</i> LEAF EXTRACT AND PURIFIED FRACTIONS	57
TABLE 3 - ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF <i>L. FERREA</i> LEAVES EXTRACTS AGAINST GRAM-POSITIVE AND GRAM-NEGATIVE BACTERIA.....	58
TABLE 4 - ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF FRACTIONS ISOLATED FROM LFCH EXTRACT OF <i>L. FERREA</i> AGAINST <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATP: adenosina trifosfato

BHA: butilhidroxianisol

BHT: butilhidroxitolueno

CAT: catalase

CCD: cromatografia em camada delgada

C6-C3-C6: difenilpropano

CDC: Centros para Controle e Prevenção de Doenças (do inglês, *Centers for Disease Control and Prevention*)

CG-EM: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

DNA: ácido desoxirribonucleico (do inglês, *desoxyribonucleic acid*)

DPPH: 2,2-difenil-picril-hidrazila

EM: espectrometria de massas

GPX: glutational peroxidase

GR: glutational redutase

GSH: glutational

HL60: células leucêmicas humanas (do inglês, *Human promyelocytic leukemia cells*)

H₂O: água

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (do inglês, *meticillin resistant Staphylococcus aureus*)

O₂: oxigênio

O₂⁻: superóxido

OH⁻: hidroxila

PARNA Catimbau: Parque Nacional da Serra do Catimbau

PG: propilgalato

PRX: peroxiredoxinas

RMN: ressonância magnética nuclear

ROS: Metabólitos reativos do oxigênio (do inglês, *reactive oxygen species*).

SOD: superóxido dismutase

TBHQ: terciobutilhidroxinona

UV: ultravioleta

UV-VIS: ultravioleta visível

IV: infravermelho

ARTIGO

CC: Cromatografia em coluna (do inglês, *column chromatography*)

CFU: unidade formadora de colônia (do inglês, *colony forming units*)

C₆H₁₄: Hexano

CH₂CL₂: Diclorometano

DMSO: dimetilsulfóxido (do inglês, *dimethylsulfoxide*)

DPPH: 2,2-difenil-picril-hidrazila

F1: fração hexano

F2: fração hexano/diclorometano (9:1)

F3: fração hexano/diclorometano (1:1)

F4: fração diclorometano

FRS: sequestro de radical livre (do inglês, *free radical scavenging*)

GC-MS: Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (do inglês, *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*)

IC: isolado clínico

LFAq: extrato aquoso de folhas de *Libifibia ferrea*

LFCF: extrato clorofórmico de folhas de *Libifibia ferrea*

LFCH: extrato ciclohexânico de folhas de *Libifibia ferrea*

LFEtOAc: extrato de acetato de etila de folhas de *Libifibia ferrea*

LFMeOH: extrato metanólico de folhas de *Libifibia ferrea*

MBC: concentração bactericida mínima (do inglês, *Minimum bactericidal concentration*)

MIC: concentração inibitória mínima (do inglês, *Minimum inhibitory concentration*)

NA: meio ágar nutritivo (do inglês, *Nutrient Agar medium*)

OD: densidade óptica (do inglês, *optical density*)

TLC: cromatografia em camada delgada (do inglês, *thin layer chromatography*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	3
2.1 PLANTAS MEDICINAIS	3
2.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS	3
2.2.1 Composto fenólicos	5
2.2.2 Flavonóides	6
2.2.3 Taninos	8
2.2.4 Terpenos	9
2.2.5. Purificação e identificação de metabólitos secundários	10
2.3 CAATINGA	12
2.4 <i>Libidibia ferrea</i> var <i>ferrea</i>	15
2.5 INFECÇÕES BACTERIANAS	16
2.5.1 Infecções hospitalares	16
2.5.2 Resistência à antimicrobianos	18
2.6 METABÓLITOS REATIVOS DO OXIGÊNIO (ROS)	20
2.6.1 Antioxidantes	22
3. OBJETIVOS	24
3.1. GERAL	24
3.2 ESPECÍFICOS	24
4 REFERÊNCIAS	25
5 CAPÍTULO 1 – ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY.....	37
6 CONCLUSÕES	60
ANEXO A - NORMAS PARA PUBLICAÇÃO DO ARTIGO NO PERIÓDICO	61

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana. A utilização de vegetais é uma prática generalizada baseada na crença popular e nas formações culturais que as usam como recurso terapêutico. As antigas civilizações foram selecionando, ainda que empiricamente, plantas comestíveis e espécies com capacidade medicinais dotadas de pouca toxicidade e apesar do emprego empírico, as plantas continuam a ser usadas pela população e não foram completamente substituídas pelos fármacos sintéticos (BRESOLIN e FILHO, 2003).

Com a evolução do conhecimento científico, intensificaram-se os estudos das plantas medicinais, relacionando a sua composição química com os seus efeitos, confirmando, muitas vezes, a sua utilização popular. Porém, das 250 a 500.000 espécies de plantas superiores existentes no planeta estima-se que apenas 1% tem sido estudada pelo seu potencial farmacológico (MELENDEZ e CAPRILES, 2006).

O Brasil é o país com maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com 55 mil espécies catalogadas. Todavia, menos de 10% dessas plantas foram avaliadas sob aspectos biológicos e não mais que 5% sob aspectos químicos até meados dos anos 90 (DI STASI, 1996). Dessa forma, as plantas constituem ainda uma fonte importante para a descoberta de novas substâncias biologicamente ativas.

A região Nordeste do Brasil tem 70% de seu território ocupado pela Caatinga, único bioma exclusivamente brasileiro, que compreende uma área de aproximadamente 800.000km², que abrange os estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e Minas Gerais, (ANDRADE et al., 2005). A caatinga tem como característica o potencial hídrico reduzido no solo com acentuado período de estação seca, entre sete e dez meses, sua flora nativa apresenta então características anatômicas, morfológicas e funcionais especializadas para a sobrevivência destas plantas às condições adversas de clima e solo (DRUMOND et al., 2000).

O interesse na diversidade molecular das plantas tem estimulado a busca pelo conhecimento do seu metabolismo secundário, o qual é responsável pela síntese de grande parte dos compostos vegetais com atividade biológica. Grupos de compostos de estruturas complexas como alcalóides, terpenos e compostos fenólicos, bem como seus derivados tem sido alvo de investigação a respeito de suas propriedades medicinais. A diversidade, em termos de estruturas e propriedades químicas, na qual essas substâncias ocorrem na natureza, podem servir para o desenvolvimento de um grande número de produtos naturais de interesse industrial e farmacológico. Diversas atividades biológicas têm sido atribuídas aos compostos secundários, tais como antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, antitumoral, entre outras (KSOURI et al., 2009; KANG et al., 2008; ROMAGNOLO et al., 2012).

Embora as indústrias química e farmacêutica tenham produzido uma grande variedade de antibióticos, frequentemente tem sido observado o aumento de microorganismos resistentes aos medicamentos disponíveis no mercado, incentivando a busca por novas fontes de substâncias com atividade antimicrobiana. Além disso, a alta incidência de infecções aumenta a importância da descoberta de compostos terapêuticos alternativos, que atinjam, nas células, alvos diferentes daqueles utilizados pelos fármacos usados rotineiramente.

Desta forma, diante do potencial botânico da Caatinga e da necessidade de encontrar novos compostos bioativos, este trabalho se propôs a avaliar o potencial antibacteriano e antioxidante de folhas de *Libidibia ferrea* obtidas no Parque Nacional da Serra do Catimbau, reserva da caatinga localizada no município de Buíque, Pernambuco.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 PLANTAS MEDICINAIS

Há milhares de anos, o Homem vem utilizando os recursos da flora no tratamento de diversas patologias. Foi através da observação e da experimentação pelos povos primitivos que as propriedades terapêuticas de determinadas plantas foram sendo descobertas e propagadas de geração em geração, fazendo parte da cultura popular.

As plantas medicinais têm apresentado um importante papel na terapêutica, pois parte dos medicamentos prescritos mundialmente é de origem vegetal (RATES, 2001). Além disso, são produtos de grande interesse científico, devido a possibilidade da descoberta de novos fármacos, dada a grande variedade de seus constituintes químicos. Desta forma, sempre houve, ao longo da História, a necessidade de se estudar o conhecimento e uso das plantas por grupos humanos de diferentes culturas, resgatando informações essenciais à descoberta de substâncias biologicamente ativas que possam ser utilizadas na produção de medicamentos.

Atualmente, nota-se um retorno do interesse pelas plantas medicinais, devido a grande procura por terapias alternativas. Isto se deve principalmente à ineficiência de alguns produtos sintéticos, ao alto custo dos medicamentos e à busca por tratamentos menos agressivos ao organismo (LIMA et al., 2006).

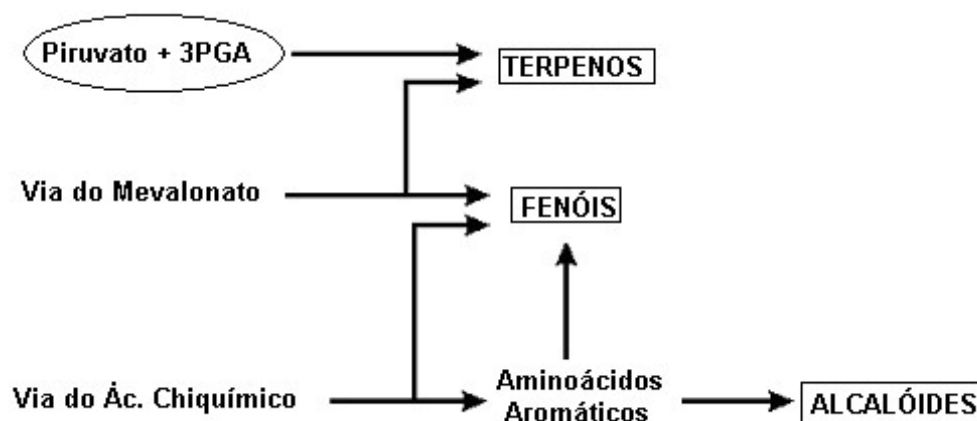
2.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS

Metabólitos secundários, em contraste com os primários, nem sempre estão envolvidos em funções vitais do vegetal ou mesmo presente em todos eles. São conhecidos por serem sintetizados em células especializadas e em diferentes estágios de desenvolvimento, por isso cada família, gênero ou espécie de planta produz uma categoria química característica ou uma mistura deles, podendo em alguns casos serem utilizados para classificação taxonômica dos vegetais (BELL et al., 1980).

Estes produtos têm como função proteger a planta contra herbivoria, ataque de patógenos, bem como beneficiá-la na competição com outros

vegetais. Os metabólitos secundários podem ainda favorecer a atração de polinizadores, de dispersores de sementes e microorganismos simbiontes. Além disso, a produção destes componentes pode proteger a planta de fatores externos como variações de temperatura, umidade, exposição à radiação ultravioleta (UV) e deficiência de nutrientes minerais (ATSATT, 1976; LUCKNER, 1984; EVANS, 1989). Uma classificação simples para os metabólitos secundários inclui três grandes grupos: compostos fenólicos, terpenos e alcalóides. Os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico e do ácido mevalônico. Os terpenos são produzidos a partir do ácido mevalônico ou piruvato e 3-fosfoglicerato. Os alcalóides, compostos secundários nitrogenados, são produzidos a partir de aminoácidos aromáticos, os quais são derivados do ácido chiquímico e de aminoácidos alifáticos (Figura 1). Flavonoides, taninos e ligninas fazem parte dos compostos fenólicos; saponinas, carotenóides e a maioria dos hormônios vegetais são terpenos; nicotina e cafeína são alguns exemplos de alcalóides. (BELL et al., 1980).

Figura1. Principais vias de biossíntese dos metabólitos secundários.



Fonte: adaptado de Peres, (2004).

Diversos tipos de metabólitos secundários têm sido identificados como princípios ativos de plantas com diversas atividades terapêuticas. KANG et al.(2008) avaliaram a atividade antibacteriana dos taninos metil galato e ácido gálico de *Galla rhois* e observaram a inibição da formação de biofilme por patógenos orais. Extratos metanólicos de *Myracrodruon urundeuva* contendo

derivados cinâmicos, flavonoides, ácido gálico e taninos mostraram atividade antifúngica contra *Fusarium* (SÁ et al., 2009). Flavonóides presentes em extratos de *Ginkgo biloba* foram capazes de reduzir os níveis de espécies reativas de oxigênio em cérebros de camundongos (ECKERT, 2012).

A abrangente atuação dos metabólicos secundários dos vegetais, desde a produção de substâncias farmacologicamente ativas até a interferência na interação entre vegetais, mostra a importância e a necessidade do conhecimento sobre esses compostos. A compreensão de sua atuação pode levar a inúmeras possibilidades de estudos que direcionem a busca pela solução de importantes problemas enfrentados atualmente, como a resistência microbiana às drogas sintéticas.

2.2.1 Compostos Fenólicos

Compostos fenólicos são biossintetizados nas plantas por meio de diferentes rotas, razão pela qual constituem um grupo bastante heterogêneo do ponto de vista metabólico. As duas rotas metabólicas básicas são: a rota do ácido mevalônico e a do ácido chiquímico, sendo esta última participante na biossíntese da maioria dos fenóis vegetais (TAIZ et al., 2004). Os compostos fenólicos são caracterizados por possuírem pelo menos um anel aromático ligado a um ou mais grupos hidroxilas (OH), podendo ter vários grupos substituintes, como carboxilas, metoxilas, estruturas cíclicas não aromáticas, entre outras (NYCHAS et al., 1995). A tabela 1 mostra a classificação dos compostos fenólicos considerando sua estrutura básica.

Tabela 1. Classificação dos compostos fenólicos.

Estrutura Básica	Classe de Compostos Fenólicos
C6	Fenóis simples, benzoquinonas
C6-C1	Ácidos fenólicos
C6-C2	Acetofenonas e ácidos fenilacéticos
C6-C3	Fenilpropanóides; ácidos cinâmicos e compostos análogos, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas e cromonas
C6-C4	Naftoquinonas
C6-C1-C6	Xantonas
C6-C2-C6	Estilbenos, antraquinonas
C6-C3-C6	Flavonóides e isoflavonóides
(C6-C3)2	Lignanas
(C6-C3-C6)2	Biflavonóides
(C6)n	Melaninas vegetais
(C6-C3)n	Ligninas
(C6-C1)n	Taninos hidrolisáveis
(C6-C3-C6)n	Taninos condensados

Fonte: Adaptado de Carvalho et al.(2004).

Os ácidos fenólicos são estruturalmente fenóis simples que incluem dois grupos: ácidos hidroxibenzóicos e os ácidos hidroxicinâmicos. O primeiro corresponde ao maior grupo de ácidos fenólicos encontrados na natureza. Neste grupo, destacam-se os ácidos gálico e elágico, que possuem atividade antioxidante, geralmente, determinada pelo número de hidroxilas presentes na molécula, além da proximidade do grupo –COOH com o grupo fenil (HARBORNE 1998).

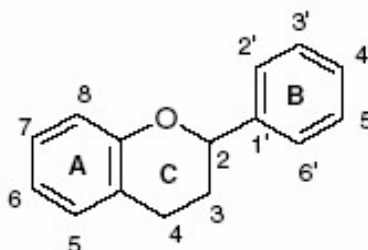
2.2.2 Flavonóides

Os flavonoides são os compostos fenólicos mais comumente encontrados em vegetais e apresentam uma variedade de formas estruturais que possuem em comum o esqueleto difenilpropano (C6-C3-C6), consistindo de dois anéis aromáticos (A e B) unidos por um anel heterocíclico oxigenado (C) (Figura 2).

Os flavonóides podem ocorrer de forma livre (agliconas) ou ligados à açúcares (glicosídeos). São classificados de acordo com características

químicas e biossintéticas em dez subclasses: antocianinas, proantocianidinas, flavonóis, flavonas, glicoflavonas, biflavonilas, chalconas, auronas, flavononas e isoflavonas. (MARKHAM 1982, HARBONE et al. 1975).

Figura 2. Estrutura geral dos flavonóides.



Fonte: Crozier, (2006).

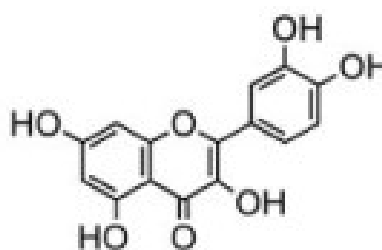
Os flavonóides são importantes agentes de defesa contra insetos e microrganismos fitopatogênicos, como vírus, bactérias e fungos, atuando como defensores naturais das plantas na forma de resposta química à invasão de patógenos. Estas características de defesa sugerem diversas atividades biológicas atribuídas aos flavonóides e muitas têm sido descritas, como por exemplo, atividade antioxidante, anticarcinogênica, antimicrobiana, antiviral, ação anti-inflamatória e antialérgica (ZUANAZZI, 2000; YAO-LAN et al., 2002).

A presença de flavonóides oferece ainda uma proteção à radiação UV, pois ao incidir nas plantas, principalmente nas folhas, essa radiação é absorvida pelos pigmentos formados pelos flavonóides, que funcionam como filtros evitando que a radiação atue sobre outras moléculas celulares importantes, como o DNA, prevenindo a formação de células defeituosas (HARBONE, 1975).

Os flavonóides possuem grande potencial antioxidante, pois tem uma grande capacidade de sequestrar radicais livres e quelar íons metálicos, atividade que é aumentada quando a molécula possui dois grupos hidroxila em orto no anel B, uma dupla conjugada com a carbonila na posição 4 e hidroxilas em 3 e 5. Dentre os flavonóides que possuem uma excelente reposta antioxidante ao estresse oxidativo temos a quercetina (figura 3), pertencente ao

grupo dos flavonóis. Flavonóides como quercetina, isoramnetina, kaempferol e seus derivados C- ou O- glicosídeos detectados em *Annona crassiflora*, demonstraram atividade antioxidante utilizando dois métodos, frente ao radical DPPH e ao β -caroteno (ALVES et al., 2007).

Figura 3. Estrutura da quercetina.



Fonte: Crozier, (2006).

Efeitos benéficos dos flavonóides são geralmente relacionados às propriedades antioxidantes e inativadoras de radicais livres (ISHIGE et al. 2001). Pesquisas sugerem que alguns flavonóides são responsáveis por uma ação antitumoral considerável, podendo ainda agir como antivirais, antioxidantes, anti-hemorrágicos, hormonais, anti-inflamatórios e antimicrobianos, (ZUANAZZI e MONTANHA, 2004; ROMAGNOLO et al., 2012).

2.2.3 Taninos

Os taninos são compostos de alto peso molecular, formados pela polimerização de unidades de flavonoides. São moléculas altamente hidroxiladas e, podem formar compostos insolúveis com carboidratos e/ou proteínas (TAIZ et al., 1998). As propriedades defensivas dos taninos são geralmente atribuídas a sua habilidade em se ligar às proteínas dificultando a digestão nos insetos. A limitação da disponibilidade de proteínas também deve ser fator de inibição do crescimento e desenvolvimento de patógenos, podendo apresentar atividade antimicrobiana (MONTEIRO et al., 2005).

Classicamente distinguem-se dois grandes grupos: os taninos hidrolisáveis e os taninos condensados. Os taninos hidrolisáveis são

compostos que após hidrólise produzem carboidratos e ácidos fenólicos. São unidos por ligações éster-carboxila, sendo prontamente hidrolisáveis em condições ácidas ou básicas (NASCIMENTO e MORAIS, 1996; MONTEIRO et al., 2005). Taninos condensados são oligômeros e polímeros formados pela ligação de dois ou mais monômeros de flavan-3-ol ou flavan-3-4diol. Essa classe de taninos também é denominada proantocianidina devido à produção de pigmentos avermelhados da classe das antocianidinas, tais como cianidina e delphinidina (ZUANAZZI et al., 2000).

O papel biológico dos taninos nas plantas tem sido investigado e acredita-se que esteja envolvido na defesa química das plantas contra o ataque de herbívoros vertebrados ou invertebrados (TEMMINK et al., 1989) e contra microrganismos patogênicos (TAKECHI et al., 1985). Devido essas propriedades, diversas atividades farmacológicas dos taninos têm sido investigadas, incluindo atividade antimicrobiana, anti-helmíntica e antioxidante (COSTA et al., 2002; OKUDA, 2005).

2.2.4 Terpenos

Os terpenos ou terpenóides são compostos que ocorrem em todas as plantas e compreendem uma classe de metabólitos secundários com uma grande variedade estrutural (RAVEN et al., 2001). São formados pela fusão de unidades de cinco carbonos que quando submetidos a altas temperaturas, podem se decompor em isoprenos, podendo referir-se, ocasionalmente, a todos os terpenos como isoprenóides (TAIZ et al. 2004). Os terpenos podem ser classificados de acordo com o número de isoprenos que constituem: hemiterpenos (C₅), monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos, (C₁₅), diterpenos (C₂₀), triterpenos (C₃₀) e carotenos (C₄₀) (OLIVEIRA et al., 2003).

Os hemiterpenos são classificados como o menor grupo dos terpenos e seu representante mais conhecido e estudado é o isopreno, um produto volátil liberado de tecidos fotossinteticamente ativos (CROTEAU et al., 2000). Os monoterpenos são formados por duas unidades de isopreno. Devido a sua baixa massa molecular, estes costumam ser voláteis, sendo os constituintes das essências voláteis e óleos essenciais, atuando na atração de

polinizadores, principalmente. Os sesquiterpenos são encontrados nos óleos essenciais e em hormônios vegetais, constituindo a maior classe de terpenóides (OLIVEIRA et al., 2003). Os diterpenos compreendem um grande grupo de compostos não voláteis, possuindo uma vasta gama de atividades diferentes que incluem os hormônios, ácidos resínicos e agentes anticancerígenos e antimicrobianos (ROBBERS et al., 1997; CROTEAU et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2003). Os triterpenos formam os componentes das resinas, látex, ceras e cutícula das plantas. Entre os triterpenos encontra-se uma importante classe de substâncias, os esteróides, os quais são componentes dos lipídios de membrana e precursores de hormônios esteróides em mamíferos, plantas e insetos. Outra classe importante de triterpenos são as saponinas, que nas plantas desempenham um importante papel na defesa contra insetos e microorganismos (PERES, 2004). Os carotenóides são pigmentos responsáveis pela coloração amarela, laranja, vermelha e púrpura dos vegetais, apresentando função essencial na fotossíntese e, especialmente, na pigmentação de flores e frutos. Os politerpenóides são aqueles com mais de oito unidades de isopreno, ou seja, com mais de 40 carbonos na sua estrutura, como os longos polímeros encontrados na borracha (ROBBERS et al., 1997, CROTEAU et al., 2000, OLIVEIRA et al., 2003).

Os terpenos apresentam inúmeras atividades biológicas de interesse farmacêutico, dentre elas estão as ações anestésica local (DOLARA et al., 2000), citotóxica (CHEN et al., 1990; KHIEV et al., 2012), anti-helmintica (NIRMAL et al., 2007) e, mais notadamente, antimicrobiana (TAN et al., 2008, GALVÃO et al., 2012).

2.2.5. Purificação e Identificação de Metabólitos Secundários

O isolamento de metabólitos secundários de plantas consiste em um estudo fitoquímico que compreende basicamente três etapas: 1) Coleta e classificação botânica da espécie a ser estudada; 2) Extração e purificação dos constituintes químicos; 3) Caracterização e determinação estrutural.

Na primeira etapa, depois de estabelecido a planta e local de coleta, o material botânico deve ser encaminhado a um herbário, onde será feita a identificação e registro da planta (nomes científico e popular, família botânica, local e data da coleta, indicações terapêuticas, entre outros). Depois de identificadas, as amostras coletadas são prensadas, secas e armazenadas para posterior preparação dos extratos.

A extração refere-se à separação, a partir dos tecidos das plantas (folhas, frutos, raízes, etc.) mediante o uso de solventes seletivos. A preparação de extratos é feita geralmente por percolação (método de extração a frio) ou Soxhlet (método de extração a quente). Para uma única extração (a frio ou a quente) usa-se geralmente um solvente polar (metanol ou etanol); para mais de uma extração utiliza-se pelo menos três tipos de solventes: apolar (hexano ou éter de petróleo), de polaridade moderada (clorofórmio ou diclorometano) e polar (metanol ou etanol). Os diferentes tipos de solventes utilizados irão extrair preferencialmente alguns compostos, como listados na tabela 2.

Tabela 2. Solventes utilizados na extração de compostos vegetais e principais substâncias extraídas.

SOLVENTE	SUBSTÂNCIAS EXTRAÍDAS
Éter de petróleo; Hexano	Lipídeos; ceras, pigmentos; furanocumarinas
Éter etílico, Diclorometano; Clorofórmio	alcalóides; antraquinonas; terpenos; heterosídeos cardiotônicos; esteróides.
Acetato de etila; Butanol	flavonóides, cumarinas; terpenos e esteróides
Etanol; Metanol	heterosídeos
Misturas hidroalcoólicas; Água	saponinas; taninos; flavonóides; açúcares

Fonte: adaptado de Souza et al., (2004).

A separação dos compostos presentes nos extratos é feita geralmente por técnicas cromatográficas. Cromatografia em coluna de gel de sílica é bastante utilizada e as frações obtidas da purificação são monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando-se variados tipos de reagentes reveladores específicos para cada classe de metabólito secundário. O critério de pureza a ser adotado é aquele em que variando o sistema de solvente empregado, observa-se apenas uma única mancha uniforme em CCD. Outros procedimentos, no entanto, podem ser adotados como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) preparativa.

Para a caracterização e identificação dos compostos os principais métodos utilizados são cromatografia gasosa e líquida e métodos espectroscópicos como: ultravioleta visível (UV-VIS), infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (EM). Técnicas unidas (hifenadas) têm sido bastante utilizadas na caracterização de compostos, como a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). A cromatografia gasosa é rápida e sensível podendo detectar substâncias na ordem de nanogramas (10^{-9} g) a picogramas (10^{-12} g), podendo indicar o número de compostos de uma mistura, a presença de impurezas e muitas vezes o esclarecimento aproximado da identidade de um composto. Com um espectrômetro de massas acoplado ao cromatógrafo gasoso, diversas varreduras de massas em pontos diferentes dos picos cromatográficos podem ser feitas, fornecendo a relação massa/carga de íons que pode ser usada para confirmar a massa molecular do composto. A identificação dos grupos químicos é feita comparando o espectro obtido com o de uma amostra pura ou com os espectros de uma biblioteca de referência (FIFIELD et al., 1995).

2.3 CAATINGA

O Nordeste do Brasil tem a maior parte de seu território ocupado por uma vegetação xerófila, de fisionomia e florística variada, denominada “caatinga”. Fitogeograficamente, a caatinga ocupa cerca de 11% do território nacional, distribuindo-se pelos estados da Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Ceará, Piauí e Minas Gerais.

Abrangendo uma área de aproximadamente 800.000 km², o que corresponde a 70% da região Nordeste, o bioma caatinga é considerado uma das 37 grandes regiões geográficas do planeta (AGUIAR et al. 2002), possuindo a vegetação mais heterogênea dentre os biomas brasileiros (RIZZINI, 1997). Ao analisar os recursos hídricos, aproximadamente 50% das terras recobertas com a caatinga são de origem sedimentar, ricas em águas subterrâneas. Os rios, em sua maioria, são intermitentes e o volume de água, em geral, é limitado, sendo insuficiente para a irrigação. A altitude da região varia de 0- 600m. A temperatura varia de 24 a 28°C e precipitação média de 250 a 1000 mm, resultando em déficit hídrico elevado durante todo o ano (SAMPAIO et al. 1994).

A vegetação de caatinga é constituída, especialmente, de espécies lenhosas e herbáceas, de pequeno porte, na maioria das vezes dotada de espinhos, sendo, geralmente, caducifólias, perdendo suas folhas no início da estação seca, e de cactáceas e bromeliáceas. As famílias mais frequentes são Caesalpinaceae, Mimosaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae e Cactaceae, sendo os gêneros *Senna*, *Mimosa* e *Pithecellobium* com maior número de espécies (SAMPAIO et al. 1994). Em termos forrageiros, a caatinga mostra-se bastante rica e diversificada. Entre as diversas espécies, merecem ser destacadas: o angico (*Anadenanthera macrocarpa* Benth), o pau-ferro (*Libidibia ferrea* Mart. ex. Tul.), a catingueira (*Caesalpinia pyramidalis* Tul.), a catingueira rasteira (*Caesalpinia microphylla* Mart.), a canafistula (*Senna spectabilis* var. *excelsa* (Sharad) H.S.Irwin & Barnely), o marizeiro (*Geoffraea spinosa* Jacq.), o mororó (*Bauhinia* sp.), o sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.), o rompe-gibão (*Pithecellobium avaremotemo* Mart.) e o juazeiro (*Zizyphus joazeiro* Mart.), entre as espécies arbóreas, constituindo-se em forragem para caprinos, ovinos, bovinos e muares (ALBUQUERQUE e BANDEIRA 1995). Dentre as espécies frutíferas que são exploradas de forma extrativista pela população local, destacam-se: o umbu (*Spondias tuberosa* Arruda - Anacardiaceae), araticum (*Annona glabra* L., *A. coriacea* Mart., *A. spinescens* Mart. - Annonaceae), mangaba (*Hancornia speciosa* Gomez - Apocynaceae), jatobá (*Hymenaea* spp.- Caesalpinaceae), juazeiro (*Zizyphus joazeiro* Mart. - Rhamnaceae), murici (*Byrsonima* spp. - Malpighiaceae), e o Licuri, (*Syagrus coronata* (Mart.) Becc. -

Arecaceae) (MENDES 1994). Esta forma de exploração tem levado a uma rápida diminuição das populações naturais destas espécies vegetais, que estão ameaçadas de extinção.

Entre as diversas espécies da caatinga, várias plantas são notoriamente consideradas como medicamentosas de uso popular, pois diversos tecidos como folhas, cascas e raízes são comercializados em calçadas e ruas das principais cidades, bem como em mercados e feiras livres. Entre elas, destacam-se a *Myracrodruon urundeuva* (adstringente), *Annona* sp. (antidiarréico), *L. ferrea* (antiasmática e anticéptica), catingueira (antidiarréica), *Anadenanthera macrocarpa* Benth. (adstringente), *Ziziphus joazeiro* Mart. (estomacal), *Selaginella convoluta* Spring (diurético), entre outras (AGRA 1996). Dessa forma, as plantas da caatinga tornam-se excelentes alvos para a busca de novas substâncias ativas.

Diante da velocidade do fenômeno de devastação da caatinga, unidades de conservação têm sido criadas. Atualmente, a caatinga conta com 47 unidades de conservação que somam 4.956km², aproximadamente 6,4% do bioma (SILVA et al.,2004). Dentre essas unidades temos o Parque Nacional da Serra do Catimbau (PARNA Catimbau), localizado no Sertão Pernambucano, distribuída entre os municípios de Buíque, Ibimirim e Tupanatinga, com área de 607 km². Criado em 13 de dezembro de 2002, o PARNA Catimbau está inserido em uma região definida como área prioritária para pesquisa científica (MMA, 2002).

Figura 4. Parque nacional da Serra do Catimbau.



Fonte: Melo, 2012.

2.4 *Libidibia ferrea* var. *ferrea*

Libidibia ferrea (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz var. *ferrea* é uma árvore que pertence à família Leguminosae - Caesalpinioideae (Caesalpinaceae) e que cresce em todo o Brasil, largamente distribuída nas regiões Norte e Nordeste, principalmente em Pernambuco e no Ceará, sendo conhecida popularmente como pau-ferro, jucá, ibirá-obi, imirá-itá, muirá-obi, muiré-itá (PIO CÔRREA, 1984; LORENZI, 2002).

A espécie *L. ferrea* é composta por três variedades: *ferrea*, *leiostachya* e *parvifolia*. A variedade *ferrea* ocorre predominantemente no Nordeste, sendo mais comum em regiões da Caatinga, onde é conhecida principalmente por Jucá. Diferentemente, as variedades *leiostachya* e *parvifolia* são bastante semelhantes e características da Mata Atlântica, (DUCKE, 1953; RIZZINI e MATTOS FILHO, 1968).

L. ferrea var. *ferrea* possui flores amarelas pequenas e em forma de cachos, frutos marrom escuro, na forma de vagem indeiscente (não se abre quando maduro), muito duro e com sementes escuras. Chega a atingir altura de 10-15 m, com tronco curto de 40 a 60 cm de diâmetro que possui manchas claras (Figura 5). Suas folhas são compostas, bipinadas de 15-19 cm de comprimento, com 5-11 pinas opostas e folíolos em número de 8-24 por pina (figura 5). A árvore é bastante ornamental, podendo ser empregada na arborização de ruas e avenidas e aproveitada para plantios em áreas degradadas, além de fornecer lenha e madeira para construção civil (PIO CÔRREA, 1984; LORENZI, 2002). Além disso, o pau-ferro é considerado uma forrageira importante no Nordeste, tanto pela sua adaptação natural à região, como também por fornecer forragem durante a seca (NASCIMENTO et al., 2002).

Figura 5. Árvore e folhas de *Libidibia ferrea* var. *ferrea*.



Fonte: Queiroz, (2009).

Na medicina popular, diversas propriedades terapêuticas de *L. ferrea* foram descritas, que inclui tratamento de feridas, contusões, combate à asma e à tosse crônica, diarreia e anemia (BRAGA, 1960; AGRA, 2007). Estudos recentes têm comprovado as propriedades medicinais tanto de *L. ferrea* var *ferrea* como das outras variedades. NAKAMURA et al., (2002a, 2002b) estudaram dois componentes extraídos de *L. ferrea*, var *ferrea* o ácido gálico e metil galato que apresentaram atividade anti-tumoral e inibitória ao vírus Epstein-Barr. NOZAKI et al., (2007) isolaram um metabólito de *L. ferrea* Martius, o Pauferrol A, que exibiu atividade inibitória a DNA topoisomerase II e induziu a apoptose em células leucêmicas humanas (HL60). SILVA et al. (2011) avaliaram o potencial antioxidante de frutos de *L. ferrea*, observando significativo poder redutor do radical peróxido e inibição da degradação do DNA. Além disso, extratos de *L. ferrea* var *ferrea* apresentaram atividade antimicrobiana frente a patógenos orais, bem como inibiram a formação de biofilme (SAMPAIO et al., 2009; TRENTIN et al., 2011).

2.5 INFECÇÕES BACTERIANAS

2.5.1 Infecções hospitalares

Os avanços tecnológicos relacionados aos procedimentos invasivos, diagnósticos e terapêuticos, e o aparecimento de microrganismos multirresistentes aos antimicrobianos usados rotineiramente na prática

hospitalar tornaram as infecções hospitalares um grave problema de saúde pública.

Infecção hospitalar ou nosocomial pode ser definida como qualquer processo infeccioso que se manifesta quando da permanência do paciente no hospital ou que pode ser relacionado à hospitalização (PITTET 2008). Estas infecções atingem o mundo todo e representam uma das maiores causas de morbidade e mortalidade, provocando o aumento da permanência hospitalar, resultando, além de maiores custos, em um aumento do estresse e sofrimento ao paciente (PANHOTRA, 2005; MOURA, 2007). No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, a taxa média de infecção hospitalar é aproximadamente 15%, no entanto esse índice varia significativamente, pois está diretamente relacionado com o nível de atendimento e complexidade de cada hospital. (BRASIL, 2004). Diferentes microrganismos como bactérias, fungos, e vírus causam infecções hospitalares. Dentre os agentes causadores destacam-se as bactérias, pois constituem a microbiota humana, que normalmente não trazem riscos a indivíduos saudáveis, porém podem causar infecção em indivíduos com estado clínico comprometido, denominadas assim de bactérias oportunistas (MAKEDOU et al., 2005).

Geralmente os sítios de infecção hospitalar mais frequentemente acometidos são o trato urinário, feridas cirúrgicas e o trato respiratório. Dentre os principais patógenos associados a estas infecções encontram-se bactérias gram-negativas e gram-positivas, listadas na tabela 3.

Tabela 3. Principais bactérias causadoras de infecção hospitalar e sítios de infecção.

BACTÉRIAS	SÍTIOS COMUNS DE ISOLAMENTO
Gram negativas	
<i>Escherichia coli</i>	Trato urinário, feridas cirúrgicas, sangue
<i>Pseudomonas sp</i>	Trato urinário, trato respiratório, queimaduras
<i>Proteus sp</i>	Trato urinário, feridas cirúrgicas
<i>Klebsiella sp</i>	Trato urinário, trato respiratório, feridas cirúrgicas
<i>Enterobacter sp</i>	Trato urinário, trato respiratório, feridas cirúrgicas
Gram positivas	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Pele, feridas cirúrgicas, sangue
<i>Staphylococcus epidermitis</i>	Pele, feridas cirúrgicas, sangue
<i>Streptococcus sp</i>	Trato urinário, trato respiratório, feridas cirúrgicas

Fonte: Adaptado de Brasil, (2004).

2.5.2 Resistência a antimicrobianos

A introdução e o desenvolvimento do uso de antibióticos configuram, sem dúvida, entre as mais importantes intervenções farmacológicas em relação à redução da morbidade e mortalidade humana. Nas últimas décadas a resistências a antimicrobianos tem aumentado significativamente em todo o mundo, especialmente em hospitais. O uso intensivo de antibióticos aumentou drasticamente a frequência de resistência dos patógenos humanos, reduzindo a possibilidade de tratamento eficaz das infecções, aumentando o risco de complicações e morte para o paciente (WOODFORD e LIVERMORE, 2009; ANDERSSON e HUGHES, 2010).

Entre as espécies mais associadas à resistência a antimicrobianos estão *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (conhecido como MRSA), *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*,

Clostridium difficile, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (THEURETZBACHER et al., 2012).

Infecções por MRSA têm sido descritas mundialmente, tratando-se, portanto de uma das bactérias mais disseminadas em todo o mundo. Nos Estados Unidos, estudos realizados pelos Centros para Controle e Prevenção de Doenças (CDC) avaliaram que o número de infecções por MRSA estaria próximo de 100 mil por ano, com cerca de 20 mil casos fatais (KLEVENS, 2007). Estudo realizado entre países da América Latina (México, Argentina e Brasil) mostrou incidência média de 26,5% de MRSA como agente de infecção comunitária de trato respiratório, sendo 31,3% no Brasil (MENDES et al., 2003).

Outros tipos de bactérias resistentes relacionadas com surtos mundiais de infecções hospitalares são as produtoras de enzimas β -lactamases. A produção dessas enzimas, em geral, é o mecanismo de resistência mais prevalente e importante na família *Enterobacteriaceae*. Diferentes tipos de β -lactamases já foram descritas e segundo AMBLER (1980), elas podem ser classificadas com base na estrutura molecular e na homologia da sequência de aminoácidos, resultando em quatro grandes grupos: A-carbapenemases do tipo serina, B- Metalo- β -lactamases, C- AmpC ou cefalosporinases, D-oxacilinases.

O mecanismo de resistência das bactérias produtoras de carbapenemases está diretamente associado à liberação dessa enzima, que atua rompendo e inativando o anel betalactâmico, importante componente da estrutura química dos antimicrobianos, impedindo assim a ação dos mesmos. As carbapenemases de classe A já foram identificadas nas bactérias *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* e são conhecidas como KPC (sigla de *Klebsiella pneumoniae*-carbapenemases) por terem sido encontradas inicialmente nessa bactéria (YIGIT et al., 2008). No Brasil, bactérias produtoras dessa enzima foram registradas pela primeira vez em 2005, mas somente em 2010 elas passaram a causar surtos mais graves no país, pois segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 246 pacientes foram contaminados, em vários estados, e 19 casos de morte foram relatados (Brasil, 2010).

Além da resistência a antimicrobianos, as bactérias possuem a capacidade de formar biofilme que consiste de comunidades de células bacterianas envolvidas por uma matriz polissacarídica produzida pelas bactérias que permanecem aderentes a superfícies inertes ou vivas. Os biofilmes podem ser formados tanto nas mucosas (fibrose cística), nos dentes (placa dentária) como em polímeros utilizados na prática médica. A formação do biofilme parece ocorrer em duas etapas: adesão da bactéria a uma superfície e adesão intercelular, formando múltiplas camadas de células bacterianas. Portanto, a presença de um biofilme contribui para a patogênese da infecção em si, e ainda limita a eficácia da terapêutica antimicrobiana para o ponto que a intervenção cirúrgica é muitas vezes necessária para remover tecidos infectados e/ou dispositivos implantados (YAMANE et al., 2010).

Apesar da grande diversidade de estruturas químicas e diferentes mecanismos de ação dos antibacterianos, o tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes tem sido cada vez mais difícil. Não há, atualmente, um único antibacteriano em uso clínico, contra o qual não exista, pelo menos, uma cepa a ele resistente. Desta forma, o sucesso no combate às infecções bacterianas e o controle sobre o aparecimento de bactérias resistentes é dependente do emprego criterioso dos antibacterianos e da descoberta de novas moléculas (CLANCY et al., 2010).

2.6 METABÓLITOS REATIVOS DO OXIGÊNIO (ROS)

Metabólitos reativos do oxigênio (ROS, do termo em inglês: *reactive oxygen species*), radicais livres e oxidantes são termos usados, para identificar os intermediários químicos reativos do metabolismo do oxigênio (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2003). Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H_2O . Durante esse processo, são formados intermediários reativos como: os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e hidroxila ($OH^{\cdot}$) e, o não radical, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; NORDBERG e ARNÉR, 2001).

O Radical superóxido (O_2^-) é um radical livre, formado a partir do oxigênio molecular pela adição de um elétron. Sua formação ocorre espontaneamente, especialmente na membrana mitocondrial, através da cadeia respiratória. É também produzido por flavoenzimas, lipoxigenases e cicloxigenases. Sua formação ocorre em quase todas as células aeróbicas e são produzidos durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos e eosinófilos. É um radical pouco reativo e não tem a habilidade de penetrar membranas lipídicas, agindo, portanto, apenas no compartimento onde é produzido (NORDBERG e ARNÉR, 2001).

Radical hidroxila (OH^-) é considerado o radical livre mais reativo em sistemas biológicos, sendo capaz de causar mais danos do que qualquer outro ROS. É formado a partir do peróxido de hidrogênio em uma reação catalisada por íons metais (Fe^{++} ou Cu^+), denominada reação de Fenton (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; NORDBERG e ARNÉR, 2001). O principal alvo da ação do radical hidroxila é o DNA (que sofre quebra da dupla cadeia) e os ácidos graxos insaturados (que sofrem peroxidação lipídica) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2003, THOMAS et al., 2009).

O Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não é um radical livre, mas um metabólito do oxigênio extremamente deletério porque participa como intermediário na reação que produz o OH^- ; tem vida longa e é capaz de atravessar membranas biológicas (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; NORDBERG e ARNÉR, 2001). Uma vez produzido, o H_2O_2 é removido por um dos três sistemas de enzimas antioxidantes: catalase, glutathione peroxidase e peroxiredutases (NORDBERG e ARNÉR, 2001).

O processo de oxidação é fundamental para a vida aeróbica. Os radicais livres são formados fisiologicamente pelos organismos, como resultado do processo de respiração celular que ocorre nas mitocôndrias, utilizado para converter em energia os nutrientes absorvidos dos alimentos, a fim de gerar ATP (MURPHY, 2009). Macrófagos e neutrófilos produzem radicais livres que são cruciais na defesa contra bactérias e fungos invasores. Existem ainda algumas fontes exógenas de radicais livres, tais como radiação, fumo e

diversas substâncias tóxicas como solventes, herbicidas e medicamentos. (VALKO et al., 2007; HALLIWELL, 2005).

As espécies radicalares são altamente reativas podendo provocar reações em cadeia, como a oxidação lipídica. Quando a geração de radicais livres é maior que a sua degradação pelas defesas antioxidantes, um desequilíbrio é gerado no organismo, denominado estresse oxidativo, que pode levar a danos às macromoléculas biológicas como lipídios, proteínas e DNA. (MURPHY, 2009)

O estresse oxidativo tem um papel importante na patogênese de muitas doenças, pois com passar dos anos, os danos causados aos componentes celulares se acumulam, contribuindo para a degeneração de células somáticas e indução de doenças crônico-degenerativas, especialmente associadas com o envelhecimento, destacando-se câncer, doenças cardiovasculares, pulmonares, inflamatórias, mal de Parkinson, mal de Alzheimer e catarata (SCALBERT et al., 2005; FEARON et al., 2009; CIENCEWICKI et al., 2008; MOREIRA et al., 2008; DESAI et al., 2010).

2.6.1 Antioxidantes

Compostos antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparado àquela do substrato oxidável, retarda ou previne significativamente, a oxidação daquele substrato. (HALLIWELL et al., 1995; MATKOWSKI, 2008). Essa ação é resultado de sua habilidade em reagir com radicais livres, estabilizando-os.

Nos organismos há um sistema de defesa formado principalmente pelos antioxidantes enzimáticos, composto pelas enzimas: superóxido dismutase (SOD); catalase (CAT), peroxiredoxinas (Prx), glutathione (GSH), glutathione redutase (GR) e glutathione peroxidase (GPX). Auxiliando este sistema, existe o não enzimático, composto principalmente pelas vitaminas, polifenóis, e outros (AMAROWICZ et al., 2004).

Adicionalmente, os antioxidantes podem ser subdivididos em sintéticos e naturais. Os sintéticos são comumente usados na indústria alimentícia, para prevenir a deterioração oxidativa, aumentando a vida de prateleira de alimentos lipídicos. São exemplos de antioxidantes sintéticos: o butilhidroxitolueno (BHT), o butilhidroxianisol (BHA), o propilgalato (PG) e o terciobutilhidroxinona (TBHQ) (BARREIROS e DAVID, 2006). No entanto, propriedades carcinogênicas têm sido apontadas para os antioxidantes sintéticos, dando ênfase a pesquisa de antioxidantes naturais (CHEUNG et al., 2003).

O uso de antioxidantes naturais tem aumentado com as descobertas das propriedades dos componentes que são produzidos pelas plantas através do metabolismo secundário. Atribui-se a presença de compostos fenólicos, com destaque aos flavonóides, a atividade antioxidante dos componentes produzidos pelos vegetais. Esses componentes podem atuar como agentes redutores, sequestradores de radicais livres, quelantes de metais e /ou exibir mais de uma dessas funções simultaneamente (ECKERT, 2012; CRACIUNESCU et al., 2012).

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Avaliar a atividade antibacteriana e o sequestro de radicais livres, bem como investigar os constituintes químicos de folhas de *Libidibia ferrea*.

3.2. ESPECÍFICOS

- Obter os extratos com solventes de diferentes polaridades (ciclohexano, clorofórmio, acetato de etila, metanol e água) a partir de folhas de *Libidibia ferrea*;
- Realizar a abordagem fitoquímica dos extratos;
- Avaliar a atividade antibacteriana dos extratos;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos;
- Efetuar o fracionamento do extrato ciclohexânico (LFCH) por cromatografia em coluna em sílica gel;
- Analisar o extrato ciclohexânico e suas frações por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM);
- Avaliar a atividade antibacteriana das frações purificadas de LFCH;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) das frações;
- Determinar a atividade antioxidante in vitro dos extratos, por meio do ensaio de sequestro do radical DPPH.

4 REFERÊNCIAS

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

AGUIAR, J.; LACHER, T.E.; SILVA, J.M.C. **The Caatinga**. In: R.A. Mittermeier, C.G. Mittermeier, P. Robles Gil, J. Pilgrim, G.A.B. da Fonseca, T. Brooks & W.R. Konstant (eds.). *Wilderness: earth's last wild places*. Cemex, Agrupación Serra Madre, S.C., México, 2002, 174-181p.

AHMAD I.; BEG, A.Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 indian plants against multi-drug resistant human pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, 113-123, 2001.

ALVES, C. Q.; BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; LIMA, L. S. Avaliação da atividade antioxidante de flavonóides. **Diálogos e Ciência - Revista da Rede de Ensino FTC**, v. 5, n. 12, p. 1-8, 2007.

ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? **Nat. Rev. Microbiology**, v. 8, 260-71, 2010.

ANDRADE, L.A.; PEREIRA, I.M.; LEITE, U.T.; BARBOSA, M.R.V. Análise da cobertura de duas fitofisionomias de caatinga, com diferentes históricos de uso, no município de São João do Cariri, estado da Paraíba. **Cerne**, v. 11, 253- 262, 2005.

AMBLER, R.P. The structure of beta-lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*: **Biological Science**, v.289, 321-331,1980.

AMAROWICZ, R.; PEGG, R.B.; MOGHADDAM, P.R.; BARL, B.; WEIL, J.A. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. **Food Chemistry**, v. 84, 551–562, 2004.

ATSATT, P.R.; O'DOWD, D.J. Plant defense guilds. **Science**, 193, 24, 1976.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v.99, 191-203, 2006.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v.29, 113-123, 2006.

BELL, E.A.; CHARLWOOD, B.V. **Secondary plant products**, in Encyclopedia Plant Physiology, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. Vol.8, 1980.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. Fortaleza: Departamento Nacional de Obras Contra as Secas, 540, 1960.

BRASIL. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde**, 2004. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 1º edição, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Medidas para identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por microrganismos multirresistentes**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota Técnica N° 1/2010.

BRESOLIN, T. M. B.; FILHO, V.C. **Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao Desenvolvimento de Novos Fármacos e Medicamentos**. Itajaí, UNIVALI, 2003.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. **Compostos fenólicos simples e heterosídicos** In. SIMÕES, C. M. O. et al. (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis, Brasil, 519-535, 2004.

CIENCEWICKI, J.; TRIVEDI, S.; KLEEGER, S.R. Oxidants and the pathogenesis of lung diseases. **Journal of Allergy Clinical Immunology**, v.122, 456-468, 2008.

CHEN, G. F. Structure and stereochemistry of pseudolaride - I, a novel cytotoxic peroxytriterpene dilactone from *Pseudolarix Kaempferi*. **Heterocycles**, v.31, 1903-1906, 1990.

CHEUNG, L.M.; CHEUNG, P.C.K.; OOI, V.E.C. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. **Food Chemistry**, v.81, 249-255, 2003.

CLANCY K. W.; MELVIN J. A.; MCCAFFERTY, D. G. Sortase transpeptidases: insights into mechanism, substrate specificity, and inhibition. **Biopolymers**, v.94, 385-96, 2010.

COSTA, C.T.C.; MORAIS, S. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; SOUZA, M. M. C.; LEITE, F. K. A. Efeito Ovicida de extratos de sementes de *Mangifera indica* L. Sobre *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.11, 57-60, 2002.

CRACIUNESCU, O.; CONSTANTIN, D.; GASPARI, A.; TOMA, L., UTOIU, E.; MOLDOVAN, L. Evaluation of antioxidant and cytoprotective activities of Arnica montana L. and Artemisia absinthium L. ethanolic extracts. **Chemistry Central Journal**, v. 6, 97, 2012.

CROTEAU, R., KUTCHAN, T. M., LEWIS, N. **Natural Products (Secondary Metabolites)** In: BUCHANAN, B., GRUISSEM, W., JONES, R. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Physiologists, 2000, p.1250-1318.

CROZIER, A.; CLIFFORD, M.N.; ASHIHARA, H. **Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet**. Blackwell Publishing Ltd, UK, 2006.

DESAI, A.; SINGH, N.; RAGHUBIR, R. Neuroprotective potential of the NF-kB inhibitor peptide IKK-NBD in cerebral ischemia-reperfusion injury. **Neurochemical International**, v.57, 876-883, 2010.

DI STASI, L.C. **Plantas Medicinais: Arte e Ciência. Um guia de Estudo Interdisciplinar**. Editora as Universidade Estadual de Paulista. São Paulo, 1996.

DOLARA, P.; LUCERI, C.; GHELARDINI, C.; MONSERRAT, C. Local Anaesthetic, Antibacterial and Antifungal Properties of Sesquiterpenes from Myrrh. **Planta Medica**, v.66, 356-358, 2000.

DUCKE, A. **As leguminosas de Pernambuco e Paraíba**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 51, 417-461, 1953.

DRUMOND, M.A.; KIILL, L.H.P.; LIMA, P.C.F.; OLIVEIRA, M.C.; OLIVEIRA, V.R.; ALBUQUERQUE, S.G.; NASCIMENTO, C.E.S.; CAVALCANTE, J. **Estratégias para o uso sustentável da biodiversidade da caatinga. In Seminário para avaliação e identificação de ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade do bioma Caatinga**. Embrapa/Cpatsa, UFPE e Conservation International do Brasil, Petrolina, 2000.

ECKERT, A. Mitochondrial effects of Ginkgo biloba extract. **International Psychogeriatric**, v.24, 18-20, 2012.

EVANS, W.C. **Trease and Evans' Pharmacognosy**, 13th ed., Bailliere Tindall, London, England, 1989.

FEARON I.M.; FAUX, S.P. Oxidative stress and cardiovascular disease: novel tools give (free) radical insight. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v.47, 372-81, 2009.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, 61-68, 1997.

FIFIELD, F.W.; HAINES, P.J. **Environmental analytical Chemistry**. London, Blackie Academic & Professional, p.424, 1995.

GALVÃO, L.C. et al. Antimicrobial Activity of Essential Oils against *Streptococcus mutans* and their Antiproliferative Effects. **Evidence Based Complementary Alternative Medicine**, v.12, 2012.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford, UK: Oxford University Press, 2003.

HALLIWELL, B.; RAFTER, J.; JENNER, A. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? **American Journal of Clinical Nutrition**, v.81, 268-276, 2005.

HARBORNE, J.B. **Phytochemical Methods: A guide to modern techniques of plant analysis**., 3 ed. ed. Chapman & Hall, London, 1998.

HARBORNE, J.B.; MABRY, J.J.; MABRY, H. **The Flavonoids**. London: Chapman and Hall, 1975, p 5-39.

ISHIGE, K.; SCHUBERT, D.; SAGARA, Y. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. **Free Radical Biology & Medicine**, v.30, 433-446, 2001.

KANG, M. O.; KANG, I.; HONG, S.; CHOI, C. Inhibitory effect of methyl gallate and gallic acid on oral bacteria. **The Journal of Microbiology**, v.46, 744-750, 2008.

KHIEV, P.; KWON, O.K.; SONG, H.H., et al. Cytotoxic Terpenes from the Stems of *Dipterocarpus obtusifolius* Collected in Cambodia. **Chem. Pharm. Bull**, v.60, 955-61, 2010.

KLEVENS, R.M.; MORRISON, M.A. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. **Journal of American Medical Association**, v. 298, 1.763, 2007.

KSOURI, R.; FALLEH, H.; MEGDICHE, W. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents. **Food and Chemical Toxicology**, v.47, 2083–2091, 2009.

LIMA, M.R.F.; XIMENES, E.C.P.A.; LUNA, J.S.; SANT'ANA, A.E.G. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16, 300-306, 2006.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 2^oed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002, p.162.

LUCKNER, M. **Secondary Metabolism in Microorganisms, Plants, and Animals**. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1984.

MAKEDOU, K.G.; TSIKIRI, E.P.; BISIKLIS, A.G.; et al. Changes in antibiotic resistance of the most common Gram-negative bacteria isolated in intensive care units. **Journal of Hospital Infection**, v.60, 245-248, 2005.

MARKHAM, K.R. **Techniques of flavonoid identification**. New York: Academic Press, 1982, p.113.

MATKOWSKI, A.; TASARZ, P.; SZYPUŁA, E. Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from *Lamiaceae*, subfamily *Lamioideae*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.2, 321-330, 2008.

MELENDEZ, P.A.; CAPRILES, V.A. Antibacterial properties of tropical plants from Puerto Rico. **Phytomedicine**, v.13, 272-276, 2006.

MENDES, C.; MARIN, M.E.; QUIÑONES, F.; et al. Antibacterial Resistance of Community-Acquired Respiratory Tract Pathogens Recovered from Patients in Latin America: Results from the PROTEKT Surveillance Study (1999–2000). **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.7, 44-61, 2003.

Brasil. MMA – Ministério do Meio Ambiente. **Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da caatinga**. Brasília: Universidade Federal de Pernambuco, Conservation International, Fundação Biodiversitas, 2002.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P. D.; ARAÚJO, E. D. L. et al. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v.28, 892-896, 2005.

MOREIRA, L.; DIAS, L.G.; PEREIRA, J.A.; ESTEVINHO, L. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. **Food Chemical Toxicology**, v.46, 3482–3485, 2008.

MOURA, B. E. M.; CAMPELO, S. M. A.; BRITO, F.C.P.; et al. Infecção hospitalar: estudo de prevalência em um hospital público de ensino. **Revista Brasileira de Enfermagem, Brasília**, v.60, 416-421, 2007.

MURPHY, M.P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochemical Journal**, v.417, 1-13, 2009.

NAKAMURA, E.S.; KUROSAKI, F.; ARISAWA, M.; et al. Cancer chemopreventive effects of a Brazilian folk medicine, Juca, on in vivo two-stage skin carcinogenesis. **Journal of Ethnopharmacology**, v.81, 135-137, 2002a.

NAKAMURA, E.S; KUROSAKI, F.; ARISAWA, M.; et al. Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. **Cancer Letters**, v.177, 119-124, 2002b.

NASCIMENTO, E.A.; MORAIS, S.A.L. Polifenóis da madeira de *Eucalyptus grandis*. Parte 1: análise por espectroscopia e cromatografia líquida. **Ciência & Engenharia**, v.5, 13-18, 1996.

NIRMAL S.A.; GIRME, A.S.; BHALKE, R.D. Major constituents and anthelmintic activity of volatile oils from leaves and flowers of *Cymbopogon martini* Roxb. **Natural Product Research**, v.13, 1217-1220, 2007.

NOZAKI, H.; HAYASHI, K.; KIDO, M.; et al. Pauferrol A, a novel chalcone trimer with a cyclobutane ring from *Caesalpinia ferrea* mart exhibiting DNA topoisomerase II inhibition and apoptosis-inducing activity. **Tetrahedron Letters**, v.48, 8290–8292, 2007.

NORDBERG, J.; ARNÉR, S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v.31, 1287-1312, 2001.

NYCHAS, G.J.E. Natural antimicrobial from plants. **New methods of food preservation**, 59-87, 1995.

OLIVEIRA, R.B.; GODOY, S.A. P.; COSTA, F.B. **Plantas tóxicas: conhecimento e prevenção de acidentes**. Ribeirão Preto – SP: Editora Holos, 2003, p64.

OKUDA, T. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 66, 2012-2031, 2005.

PANHOTRA, R.B.; SAXENA, K.A.; AL-MULHIM, S. A. Contamination of patients' files in intensive care units: An indication of strict handwashing after

entering case notes. **American Journal of Hospital Infection**, v.33, 398-401 2005.

PERES, L.E.P. **Metabolismo Secundário**. Piracicaba – São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. ESALQ/Universidade de São Paulo, 2004. p. 1-10.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário de plantas úteis no Brasil**. Rio de Janeiro, Brasil: Imprensa Nacional, 1984.

PITTET, D.; ALLEGIANZI, B.; STORR, J.; et al. Infection control as a major World Health Organization priority for developing countries. **Journal of Hospital Infection**, v.68, 285-292, 2008.

RATES, S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.11, 57-59, 2001.

RAVEN, P. H., EVERT, R. F., EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, p.906.

RIZZINI, C.T. **Tratado de fitogeografia do Brasil**. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural Edições Ltda., 1997, 157p.

RIZZINI, C.T.; MATTOS FILHO, A. **Espécies novas da flora brasileira**. Anais da Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro 40, 231-235, 1968.

ROBBINS, R.J. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, 2866-2887, 2003.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Farmacognosia e farmacobiotechnologia**. São Paulo: Premier, 1997, 327p.

ROMAGNOLO, D.F.; SELMIN, O.I. Flavonoids and cancer prevention: a review of the evidence. **Journal of Nutrition in Gerontology Geriatric**, v. 31,206-38, 2012.

SÁ, R.A.; ARGOLO, A.C.C.; NAPOLEAO, T.H.; et al. Antioxidant, *Fusarium* growth inhibition and *Nasutitermes corniger* repellent activities of secondary metabolites from *Myracrodruon urundeuva* heartwood. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.63, 470-477, 2009.

SAMPAIO, F.C.; PEREIRA, M.S.V.; DIAS, C.S.; et al. *In vitro* antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, v.124, 289–294, 2009.

SCALBERT, A.; MANACH, C.; MORAND, C., REMESY, C.; JIMENEZ, L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.45, 287-306, 2005.

SILVA, L.C.N.; SILVA-JÚNIOR, C.A.; SOUZA, R.M.; MACEDO, A.J.; SILVA, M.V.; CORREIA, M.T.S. Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. **Food and Chemical Toxicology**, v.49, 2222–2228, 2011.

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

TAKECHI, M; TANAKA, Y.; TAKEHARA, M.; NONAKA, G.; NISHIOKA, I. (1985) Structure and antiherpetic activity among tannins. **Phytochemistry**, v.24, 2245-2250, 1985.

TAN, M.; ZHOU, L.; HUANG, Y.; WANG, Y.; HAO, X.; WANG, J.; Antimicrobial activity of globulol isolated from the fruits of *Eucalyptus globulus* Labill. **Natural Product Research**, v.7, 569-575, 2008.

GIULIETTI, A. M. et al. **Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga**. In: SILVA, J. M. C.; TABARELLI, M.; FONSECA, M. T.; LINS, L. V. (Org.). **Biodiversidade da caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação**. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, Universidade Federal de Pernambuco, 2003. 382 p.

THEURETZBACHER, U. Accelerating resistance, inadequate antibacterial drug pipelines and international responses. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.39, 295– 299, 2012.

TEMMINK, J.H.M. Acute and sub-acute toxicity of bark tannis in carp (*Cyprinus carpio* L.) **Water Research**, v.23, 341-344, 1989.

TRENTIN, D.S. et al. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **Journal of Ethnopharmacology**, v.137, 327– 335, 2011.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry and Cellular Biology**, v.39, 44-84, 2007.

WOODFORD, N.; LIVERMORE, D.M. Infection caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge. **Journal of Infection**, v. 59, 4-16, 2009.

YAMANE, K.; ARAKAWA, Y. M. Recent trend and research issues related to antimicrobial-resistant bacteria. **Massui**, v.59, 4-16, 2010.

YAO-LAN, L.; SHUANG-CHENG, M.; YI-TING, Y.; SHAO-MING, Y.; PAUL, H.B. Antiviral activities of flavonoids and organic acid from *Trollius chinensis* Bunge. **Journal of Ethnopharmacology**, v.79, 365-8, 2002.

YIGIT, H., QUEENAN, A.M.; ANDERSON, G.J.; BIDDLE, J.W.; STEWARD, C.D.; ALBERTI, S.; BUSH, K.; TENOVER, F.K. Novel carbanpenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.52, 809, 2008.

ZUANAZZI, J.A.S. Flavonóides. 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**. 2. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade, 2000, p. 489-515.

**5 CAPÍTULO 1 - ARTIGO A SER SUBMETIDO AO JOURNAL OF
ETHNOPHARMACOLOGY**

Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Libidibia ferrea* leaves

Mychely Sheila Melo^{a*}, Renata Isabel Arruda^a, Janaína Versiani dos Anjos^b,
Márcia Vanusa da Silva^a, Maria Tereza dos Santos Correia^a.

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

^b Departamento de Química Fundamental, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brazil.

* Corresponding author. Avenida Professor Moraes Rêgo, s/n Cidade Universitária, Recife, PE, 50670-420 Pernambuco, Brazil. Tel.: +55(81)21268540; fax: +55(81)21268541. E-mail address: mychely.melo@gmail.com

ABSTRACT

Aim: This study aimed to evaluate antibacterial and antioxidant potential and characterize chemical composition of *Libidibia ferrea* leaves collected from Vale do Catimbau, Pernambuco- Brazil.

Materials and methods: GC-MS and TLC were used to determine the chemical constituents of extracts and fractions from *L. ferrea* leaves. The antibacterial activity was performed using micro-dilution broth method against gram positive and gram negative bacteria and was determined MIC and MBC. Antioxidant activity of extracts was determined by DPPH radical scavenger method.

Results: Chemical analysis of extracts and fractions from *L. ferrea* revealed presence of several compounds as fatty acids, hydrocarbons, alkaloids, flavonoids, cinnamic derivatives, terpenes, steroids and tannins. All the extracts from *L. ferrea* leaves showed inhibitory effect against tested bacteria (MIC ranged from 0.39 mg/ml to 12.5 mg/ml) with bactericidal activity (MBC varied from 0.39 mg/ml to 50 mg/ml) mainly against gram positive species. The best antibacterial activity was observed in LFCH (MIC ranged from 0.39 mg/ml to 3.12 mg/ml) but to their four fractions isolated were less active. LFEtOAc, LFMeOH and LFAq extracts showed even high potential antioxidant capturing stable radical DPPH.

Conclusion: *Libidibia ferrea* leaves extracts can inhibit *in vitro* growth of human pathogens and has high antioxidant power.

Keywords: Caatinga biome, *Libidibia ferrea*, antibacterial, antioxidants.

1.Introduction

The caatinga (semi-arid) vegetation is a Brazilian biome that covers a vast area in the northeastern. Marked by a severe climate with accentuated dryness, caatinga plants have unique characteristics thus excellent for the search for new active substances (Sampaio et al., 2002). Many medicinal plants species from the caatinga are widely known and used in folk medicine and for commercial manufacturing of phytotherapeutic products. (Albuquerque et al., 2007; Agra et al., 2008).

Numerous plants used in traditional medicine are effective in treating various ailments caused by oxidative stress, bacterial and/or viral infections. Research has shown that medicinal plants exhibit antioxidant (Silva et al., 2011; Asghar et al., 2011;), as well as antimicrobial (Trentin et al., 2011;Iqbal et al., 2012;Silva et al., 2012b) activity.

Libidibia ferrea var. *ferrea* (= *Caesalpinia ferrea*; Caesalpinioideae) is a leguminous tree widely distributed in the northern and northeastern regions of Brazil, where it is commonly known as pau-ferro. The bark, seeds, roots, leaves and fruits from this plant are used in Brazilian folk medicine (anti-inflammatory, treatment of bronchitis, anemia, labyrinthitis, renal problems, inflammations in general, antiulcerogenic, stress, fatigue) (Nakamura et al., 2002; Albuquerque et al., 2002; Albuquerque et al., 2007; Gonzalez, 2005). The folkloric use of this plant led various researchers to investigate its properties. It has been reported that *L. ferrea* reduced blood glucose levels in rats (Vasconcelos et al., 2011). It also showed antimicrobial (Sampaio et al., 2009; Silva et al., 2012a), antioxidant (Silva et al., 2011), antitumoral (Nozaki et al., 2007), anti-inflammatory (Carvalho et al., 1996), antiulcer (Bacchi et al., 1994), well as cancer chemopreventive properties (Nakamura et al., 2002).

The aims of the present study were to evaluate antioxidant and antibacterial activities as well characterize the composition of *Libidibia ferrea* leaves collected from Caatinga area. This study represents the first systematic

analysis of phytochemicals, antioxidant and antimicrobial properties of *L. ferrea* leaves as a potentially new source of biologically active natural products.

2. Materials and methods

2.1 Plant material

Leaves of *L. ferrea* were collected from Vale do Catimbau, Pernambuco-Brazil, a preservation area of Caatinga bioma, at non-raining season. Botanical identification was made from Herbarium of Instituto de Pesquisa Agronômica de Pernambuco (IPA-PE), Brazil and voucher specimen was submitted in the herbarium.

2.2 Extraction

The dried and crushed *L. ferrea* leaves (0.34 kg) were extracted with organic solvents as a result of increasing polarity: cyclohexane (LFCH), chloroform (LFCF), ethyl acetate (LFEtOAc), methanol (LFMeOH) and distilled water (LFAq). The extraction took place at room temperature, under stirring at 3000 rpm for 12 hours. Then the extracts were filtered and solvents were removed using a rotary evaporator. The yield of the dried extracts obtained was 2.66, 0.47, 1.07, 11.9 and 4.9% for LHCH, LFCF, LFEtOAc, LFMeOH and LFAq, respectively.

2.3 Purification and identification of active compounds

Among the five extracts, the preliminary antibacterial test shows that LFCH was more active than other extracts so it was analyzed by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS).

The purification of the LFCH extract was performed by column chromatography (CC) on silica gel using C₆H₁₄; C₆H₁₄- CH₂CL₂ mixtures (9:1, 1:1, v/v) and

CH₂CL₂ solvents for elution, corresponded the fractions F1, F2, F3 and F4, respectively. Subsequently four fractions were analyzed by (GC-MS). Identification of the components was accomplished by comparison of retention times with matching mass spectral data with the data base Library. The analyses by GC-MS were performed on Central Analítica, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil.

2.3 Phytochemical analysis

Phytochemical evaluation of the five extracts was performed. Samples were analyzed by thin layer chromatography (TLC) on polyamide sheet (Merck®). The analyses used several systems of development as mobile phase, reagents for adequate revelation and chromatographic standards. Each sample was investigated for the presence of tannins, alkaloids, flavonoids, carbohydrates, cinnamic derivatives and terpenes. (Harborne, 1998; Markhan, 1982; Wagner and Bladt, 1996).

2.4 Antibacterial Activity

2.4.1 Microorganism

Gram-positive (*Bacillus subtilis* ATCC-6633, *Staphylococcus aureus* ATCC-6538) and Gram-negative (*Escherichia coli* ATCC-25922, *Proteus vulgaris* ATCC-13315 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-27853) bacterial strains were provided by the Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil. All bacteria were maintained in Nutrient Agar (NA) and stored at 4° C. The cultures were adjusted turbidimetrically at a wavelength of 490 nm to 1×10^8 colony forming units (CFU)/ml (0.5 in McFarland scale).

2.4.2 Determination of the Minimum inhibitory concentration (MIC) and the Minimum bactericidal concentration (MBC)

The samples were resuspended in dimethylsulfoxide (DMSO). Aliquots (150 µL) of extract (100 mg/ml) or fraction (20 mg/ml) and Clindamicin (10mg/ml) were submitted to a serial dilution in microtiter plate containing Mueller Hinton Broth (150 µL per well). Subsequently, 20 µL of bacterial suspension was applied to each well and the plate was incubated at 37 °C for 24 h. After incubation, the optical density at 490 nm (OD₄₉₀) was measured using a spectrophotometer for microplates. The assays were performed in triplicate. Control assay contained Mueller Hinton Broth and microorganism. The minimal inhibitory concentration (MIC) corresponded to the lowest sample concentration able to inhibit the growth of 50% or more of microorganisms relative to the negative control (Amsterdam, 1996).

Minimal bactericide concentration (MBC) was determined starting from the results of MIC assay. Inoculations (10 µL) from the wells in which the sample inhibited bacterial growth were transferred to petri plates containing Mueller Hinton agar. The number of CFU grown in plates was determined after incubation at 37 °C for 24 h. The MBC corresponded to the minimum concentration of extract/fraction in which no bacterial growth was observed.

2.5 DPPH radical scavenging activity

DPPH free radical scavenging activities of the extracts were determined according to the method of Brand-Williams et al. (1995), with a few modifications. In plate with 96 wells was added 0.04 mL of diluted in methanol samples and 0.25 mL of the DPPH (2.22 mg/mL). After 30 min at room temperature and in the dark, absorbance was measured at 517 nm. For the blank was added 0.04 mL of solvent with 0.25 mL of DPPH solution. For the positive control was used 0.04 mL of quercetina (Sigma-Aldrich®) in presence of the DPPH solution. All extracts and standard were at concentrations at 10 to 50µg/ml. DPPH free radical scavenging (FRS) activity was calculated according to the equation: **FRS (%) = $\frac{Ac - As}{Ac} \times 100$** where, *Ac* is the absorbance of the control and *As* is the absorbance of the sample.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Phytochemical analysis

The phytochemical assay revealed presence of several classes of secondary compounds listed in Table 1. Flavonoids were observed in all extracts. The presence of cinnamic derivatives and tannins was observed in LFEtAc, LFMeOH and LFAq. Alkaloids were observed only at LFEtAc. Terpenes were found in LFCH and LFCF. Carbohydrates, specifically sucrose, were observed in LFEtAc and LFAq.

Aqueous extracts of *L. ferrea* fruits, characterized by Carvalho (1996) contained tannins, alkaloids, anthraquinones, sugars, flavonoids, saponins and triterpenes. A phytochemical study of *L. ferrea* bark revealed the presence of flavonoids, saponins, tannins, coumarins, steroids and phenolic compounds (Gonzalez et al., 2004). Nakamura et.al. (2002) have isolated two components extracted from pauferro, methyl gallate and gallic acid, which showed antitumor and inhibitory to the Epstein-Barr virus activities. Nozaki et al. (2007) isolated a metabolite of *C. ferrea*, Pauferrol A, with showed inhibitory activity of DNA topoisomerase II enzyme and induces apoptosis in human leukemia cells. This present study was the first to report phytochemical constituents of *L. ferrea* leaves.

3.2 GC-MS analysis

The GC-MS analysis (Table 2) of LFCH showed aldehydes, alkanes and a diterpen, phytol, major compound, has been reported with antimicrobial agent against mycobacteria (Rajab et al., 1998). The fractions obtained of purified extract by column chromatography revealed by GC-MS analysis 16 compounds, including fatty acids, terpenes, steroids and alkanes with various activities.

The first fraction (F1) showed a fatty acid and sesquiterpenes, nerolidol and globulol. Tan et al (2008) reported antimicrobial activity of *Eucalyptus globulus Labill* fruits and suggested that globulol was the main compound bioactive present in ethanol extract. Brehm & Johnson (2003) showed that

nerolidol sensitized *S. aureus* and *E. coli*, increasing susceptibility of these microorganisms to important antimicrobial agents as ciprofloxacin and clindamycin. Antileishmanial activity of nerolidol also has been reported (Arruda et al., 2005). Fraction F2 is composed of two fatty acids, palmitic acid and linoleic acid. Some studies show that fatty acids found in plants may be responsible for the antimicrobial activity (Nazif, 2002; Shafaghat, 2011; Tamokou et al., 2012). The fraction F3 showed the highest amount of identified compounds, including carboxylic acids, steroids and terpenes (sesquiterpene, and diterpene). γ - Sitosterol is a phytosteroid present in many plants with antifungal and antibacterial activities (Zang et al., 2011). Another compound found, viridiflorol, is a sesquiterpene present in many essential oils of plant with insecticidal activity (Aboua et al., 2010). The last fraction (F4) is composed only by heptacosane alkane, which has been described as one of the major components of essential oil isolated from *Dieffenbachia picta* with antibacterial activity (Oloyede et al., 2011).

3.2 Antibacterial Activity

The results of antibacterial activity of *L. ferrea* using micro-dilution broth method are shown in Table 3. The five leaf extracts showed inhibitory effect against all tested bacteria. The MIC ranged from 0.39 mg/ml to 12.5 mg/ml and MBC varied from 0.39 mg/ml to 50 mg/ml. Among the tested extracts, LFCH, LFCF and LFEtOAc showed the best inhibitory effects for gram-positive and gram-negative bacteria. The strongest activity was of LFCH with MIC ranging from 0.39 mg/ml to 3.12 mg/ml and MBC ranging from 0.78 mg / ml to 12.5 mg ml. This may be related to the presence of terpenes and flavonoids in extract, compounds that showed antibacterial and antifungal activities (Erasto et al., 2004; Galvão, et al., 2012) as phytol, major compound of extract, that showed antibacterial activity in previous study (Rajab et al., 1998). The antimicrobial activity of terpenes has been attributed to their interaction with cellular membranes (Sikkema et al., 1995). The extracts LFMeOH and LFAq exhibited moderate antibacterial activity however, *S. aureus* was more sensitive to the action of LFMeOH with MIC of 0.39 mg/ml and MBC of 1.56 mg/ml.

Clindamycin, positive control, inhibited bacterial growth with MIC values ranging from 0.019 to 0.19 mg/ml and MBC between 0.039 to 0.39 mg/ml.

The highest levels of antibacterial activity of the extracts were observed against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*, Gram-positive bacteria species. Urzua, (1998) suggested that Gram-negative bacteria are less susceptible to active compounds present in the extracts due to the presence of the outer membrane consisting of lipoproteins and lipopolysaccharides, which is selectively permeable and thus regulates access of various molecules. Our results show that increase of antibacterial activity was observed with decreasing polarity of extracts, this suggest that compounds present in less polar extracts are responsible for the potential activity. Silveira et al (2005) found similar results.

The MBC/MIC ratio ranged from 1 to 2 for LFCF, 1 to 4 for LFCH and LFMeOH, 2 to 4 for LFEtAc. Antimicrobial substances are considered bacteriostatic agents when the $MBC/MIC > 4$ ratio, and bactericides when $MBC/MIC \geq 4$ (Gatsing et al., 2009). Therefore, most of the extracts exhibited bactericidal activity against the bacteria tested, except LFAq that showed a relationship $MBC / MIC > 4$ against *Proteus vulgaris* and clinical isolates of *S. aureus* (IC 660, IC 676), suggesting a bacteriostatic agent.

Extracts of fruits of *Caesalpinia ferrea* Martius showed potent antimicrobial activity against oral pathogens (Sampaio et al., 2009). Previous studies have also evaluated the antimicrobial activity of plants found in Northeastern Brazil (Ramos et al., 2009; Padilha et al., 2010; Silva et al., 2012).

The purified fractions from LFCH exhibited moderate antibacterial activity when compared with the extract (Table 4). All fractions exhibited MIC ranging from 5 mg/ml to 10 mg/ml for clinical isolates, except UFPEDA02 strain that MIC varied from 0.625mg/ml to 5 mg / ml. The MBC/MIC ratio varied for all fractions between 2 to > 4 , thus suggesting a bacteriostatic effect. The antimicrobial activity of compounds present in LFCH was reduced after fractionation, suggesting the possibility of synergism between molecules present in the extract (Delasquis et al., 2002).

3.3 Antioxidant activity

The total antioxidant activity of extracts was determined by the ability of antioxidants present in the samples to capture the stable radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl). The method is based on the DPPH radical scavenger by antioxidants with conversion to its reduced form, consequently, producing a decrease in absorbance. Thus, the methanol solution of DPPH, initially violet, turns yellow and the degree of discoloration indicates the ability of the antioxidant free radical scavenger (Lugasi et al., 1998). According to the results obtained, *L. ferrea* extracts exhibited high antioxidant activity, compared to quercetin, shows in Figure 1. The ability of extracts towards scavenging DPPH radicals can be ranked LFAq > LFMeOH > LFEtOAc. The extracts LFCH and LFCF did not exhibit antioxidant activity in tested concentrations. Silva et al (2011) reported strong antioxidant activity of *L. ferrea* fruits evaluated by *in vitro* assays. The ethanol extract of leaves of *Caesalpinia bonduc* also shows high antioxidant activity (Sivasankari, et al 2011).

Free radicals have been implicated in many disease conditions, mainly chronic diseases such as cancer, cardiovascular and neurological disease (Pratico and Delant, 2000). Herbal drugs containing radical scavengers are gaining importance in the treatment of such diseases. Many plants exhibit efficient antioxidant activities owing to their phenolic constituents, including flavonoids (Pourmorad et al., 2006; Chang et al., 2002; Bashi et al., 2012). Caatinga plants showed antioxidant activity related with high phenolic content in previous study (Silva et al., 2011). Increased production of these compounds maybe related a protective effect in response to high incidence of the solar radiation in environments as Caatinga.

4. CONCLUSIONS

According to the results presented in this study *L. ferrea* leaves exhibited strong antibacterial activity and cyclohexane extract (LFCH) showed the most active among the fractions/extracts tested, mainly against *Staphylococcus aureus*, a important human pathogen related in nosocomial infections. Leaves

extracts even showed high potential antioxidant with similar capacity of commercial quercetin.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the support from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). The authors acknowledge the cooperation from the inhabitants of the areas of study, the financial support from NANOBIOTEC–Brasil from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) for authorizing collections in PARNA do Catimbau and the curator of Herbarium IPA (Instituto Agrônômico de Pernambuco) for allowing access to the collection.

REFERENCES

- Aboua, L.R.N., Seri-kouassi, B.P., Koua, H.K., 2010. Insecticidal activity of essential oils from three aromatic plants on *Callosobruchus maculatus* F. in Cotê D'ivoire European Journal of Scientific Research 39, 243-250.
- Agra, M.F., Silva, K.N., Basílio, I.J.L.D., França, P.F., Barbosa-Filho, J.M., 2008. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. Brazilian Journal of Pharmacognosy 18, 472-508.
- Albuquerque, U.P., Andrade, L.H.C., 2002. Uso dos recursos vegetais da caatinga: o caso do agreste do Estado de Pernambuco. Interciência 27, 7336-7345.
- Albuquerque, U.P., Monteiro, J.M., Ramos, M.A., Amorim, E.L.C., 2007. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. Journal of Ethnopharmacology 110, 76–91.
- Amsterdam, D., 1996. Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. Antibiotics in Laboratory Medicine. Baltimore: Williams and Wilkins, 52–111.
- Arruda, D.C., D'Alexandri, F.L., Katzin, A.M., Uliana, S.R.B., 2005. Antileishmanial Activity of the Terpene Nerolidol. Antimicrobial agents and chemotherapy, 1679–1687.
- Asghar, M. N.; I. Khan, I.U., Bano, N., 2011. In vitro antioxidant and radical-scavenging capacities of *Citrullus colocynthes* (L) and *Artemisia absinthium* extracts using promethazine hydrochloride radical cation and contemporary assays. Food Science and Technology International, 17. 481.
- Bacchi, E.M., Sertie, J.A.A., 1994. Anti-ulcer action of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea* in rats, Planta Medica 60, 118–120.

Bashi, D.S., Fazly Bazzaz, B.S., Sahebkar, A., Karimkhani, M.M., Ahmadi, A., 2012. Investigation of optimal extraction, antioxidant, and antimicrobial activities of *Achillea biebersteinii* and *A. wilhelmsii*. *Pharmaceutical Biology* 50, 1168-1176.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* 28, 25-30.

Brehm-stecher, B.F., Johnson, E.A., 2003. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to Antibiotics by the Sesquiterpenoids Nerolidol, Farnesol, Bisabolol and Apitone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47, 3357-3360.

Carvalho, J.C.T., Teixeira, J.R.M., Souza, P.J.C., Bastos, J.K., Santos Filho, D., Sarti, S.J., 1996. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. *Journal of Ethnopharmacology* 53, 175–178.

Chang W.C., S.C. Kim, S.S. Hwang, B.K. Choi, H.J. Ahn, M.Y. Lee, S.H. Park, and S.K. Kim. 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science* 163, 1161-1168.

Delasquis, P.J. et al., 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and *eucalyptus* essential oils. *Food Microbiology* 74, 101- 119.

Erasto, P., Bojase-Moleta, G., Majinda, R.R.T., 2004. Antimicrobial and antioxidant flavonoids from the root wood of *Bolusanthus speciosus*. *Phytochemistry* 65, 875–880.

Markhan, K.R., 1982. Techniques of Flavonoid Identification. Academic Press, London.

Nakamura, E.S., Kurosaki, F., Arisawa, M., Mukainaka, T., Okuda, M., Tokuda, H., Nishino, H., Pastore Jr., F., 2002. Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. Cancer Letters 177, 119–124.

Nozaki, H., Hayashi, K., Kido, M., Kakumoto, K., Ikeda, S., Matsuura, N., Tani, H., Takaoka, D., Iinuma, M., Akao, Y., 2007. Pauferrol A, a novel chalcone trimer with a cyclobutane ring from *Caesalpinia ferrea* mart exhibiting DNA topoisomerase II inhibition and apoptosis-inducing activity. Tetrahedron Letters 48: 8290–8292.

Galvão, L.C., Furletti, V.F., Bersan, S.M., da Cunha, M.G., Ruiz, A.L., de Carvalho, J.E., Sartoratto, A., Rehder, V.L., Figueira, G.M., Teixeira, Duarte, M.C., Ikegaki, M., de Alencar, S.M., Rosalen, P.L., 2012. Antimicrobial Activity of Essential Oils against *Streptococcus mutans* and their Antiproliferative Effects. Evidence Based Complementary Alternative Medicine.

Gatsing, D., Tchakoute, V., Ngamga, D., Kuate, J.R., Tamokou, J.D.D., Nji Nkah B.F., Tchouanguep, F.M. and Fodouop, S.P.C., 2009. *In vitro* antibacterial activity of *Crinum purpurascens* Herb leaf extract against the *Salmonella* species causing typhoid fever and its toxicological evaluation. Iran Journal Medicine Science 34, 126-136.

Gonzalez, F.G., 2005. *Caesalpinia ferrea*, pau-ferro. Revista Saúde, São Paulo.

Harborne, J.B., 1998. Phytochemical Methods: A guide to modern techniques of plant analysis., 3 ed. Chapman & Hall, London.

Iqbal, J., Zaib, S., Farooq, U., Khan, A., Bibi, I., Suleman, S., 2012. Antioxidant, Antimicrobial, and Free Radical Scavenging Potential of Aerial Parts of

Periploca aphylla and *Ricinus communis*. International Scholarly Research Network 6.

Lugasi, A., Dworschák, E., Blázovics, A., Kéry, Á., 1998. Antioxidant and free radical scavenging properties of squeezed juice from black radish (*Raphanus sativus* L. var *niger*) root. *Phytotherapy Research* 12, 502-506.

Nazif, N.M., 2002. Phytoconstituents of *Zizyphus spina-christi* L. fruits and their antimicrobial activity. *Food Chemistry* 76, 77–81.

Oloyede, G.K., Onocha, P.A., Abimbade, S.F., 2011. Chemical Composition, Toxicity, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Leaf and Stem Essential Oils of *Dieffenbachia picta* (Araceae). *European Journal of Scientific Research* 49, 567-580.

Padilha, I.Q.M., Pereira, A.V., Rodrigues, O.G., Siqueira-Júnior, J.P. and Pereira, M.S.V., 2010. Antimicrobial activity of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. from Northeast Brazil against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 20, 45-47.

Pratico, D., Delanty, N., 2000. Oxidative injury in disease of the central nervous system: focus on Alzheimer's disease. *American Journal Medicine* 109, 577-585.

Pourmorad, F., Hosseini-mehr, S.J., Shahabimajd, N., 2006. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology* 5, 1142-1145.

Rajab, M.S., Cantrell, C.L., Franzblau, S.G., Fischer, N.H., 1998. Antimycobacterial activity of (*E*)-phytol and derivatives: a preliminary structure activity study. *Planta Medica Journal* 64, 2–4.

Ramos, S.C.S, Oliveira, J.C.S., Câmara, C.A.G., Castelar, I., Carvalho, A.F.F.U. and Lima-Filho, J. V., 2009. Antibacterial and cytotoxic properties of

some plant crude extracts used in Northeastern folk medicine. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 19,376-381.

Sampaio, E.V.S.B., Giuliatti, A.M., Virginio, J., Gamarra-Rojas, C.F.L., 2002. Vegetação e flora da caatinga, Plantas do Nordeste: Centro Nordestino de Informações sobre Plantas, Recife, 49–90.

Sampaio, F.C., Pereira, M.S.V., Dias, C.S., Costa, V.C.O., Conde, N.C.O., Buzalaf, M.A.R., 2009. *In vitro* antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. *Journal of Ethnopharmacology* 124, 289–294

Sikkema, J., de Bont, J.A.M., Poolman, B., 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews* 59, 201– 222.

Silva, L.C.N., Silva-Júnior, C.A., Souza, R.M., Macedo, A.J., Silva, M.V., Correia, M.T.S., 2011. Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 2222–2228.

Silva, L.C.N., Sandes, J.M., Paiva, M.M., Araújo, J.M., Figueiredo, R.C.B.Q., Silva, M.V., Correia, M.T.S., 2012a. Anti-Staphylococcus aureus action of three Caatinga fruits evaluated by electron microscopy. *Natural Product Research*, 37-41

Silva, M.S.P., Brandão, D.O., Chaves, T.P., Formiga-Filho, A.L.N., Costa, E.M.M.B., Santos, V.L., Medeiros, A.C.D., 2012b. Study Bioprospecting of Medicinal Plant Extracts of the Semiarid Northeast: Contribution to the Control of Oral Microorganisms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.

Silveira, C.S., Pessanha, C.M., Lourenço, M.C.S., Neves-Junior, I., Menezes, F.S., Kaplan, M.A.C., 2005. Antimicrobial activity of *Syagrus oleracea* and *Mauritia vinifera* fruits. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 15, 143-148.

Sivasankari, K., Veerabathran, S., Janaky, S., Sekar, T., 2011. Antioxidant status of leaves of *Caesalpinia bonduc*. *International Journal of Pharmaceutical Applications* 4, 262-266.

Shafaghat, A., 2011. Antioxidant, antimicrobial activities and fatty acid components of flower, leaf, stem and seed of *Hypericum scabrum*. *Natural Products Commun* 61, 739-42.

Tamokou, J.D., Simo, M., Petga, D.J., Keilah Lunga, P., Tene, M., Tane, P., Kuiate, J.R., 2012. Antioxidant and antimicrobial activities of ethyl acetate extract, fractions and compounds from stem bark of *Albizia adianthifolia* (Mimosoideae) *BMC Complementary Alternative Medicine* 12, 99.

Tan, M., Zhou, L., Huang, Y., Wang, Y., Hao, X., Wang, J., 2008. Antimicrobial activity of globulol isolated from the fruits of *Eucalyptus globulus* Labill. *Natural Product Research* 7, 569-575.

Trentin, D.S., Giordani, R.B., Zimmer, K.R., Silva, A.G., Silva, M.V., Correia, M.T.S. Baumvol, I.J.R. Macedo, A.J., 2011. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. *Journal of Ethnopharmacology* 137, 327– 335.

Urzua A., Caroli M., Vasquez L, Mendonza L., Wilkens M., Tojo, E., 1998. Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids isolated from *Eupatorium salvia* (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology* 62, 251–254.

Vasconcelos, C.F.B., Maranhão, H.M.L., Batista, T.M., Carneiro, E.M., Ferreira, F., Costa, J., Soares, L.A.L., Sá, M.D.C., Souza, T.P., Wanderley, A.G., 2011. Hypoglycaemic activity and molecular mechanisms of *Caesalpinia ferrea* Martius bark extract on streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology* 137, 1533– 1541.

Wagner, H., Bladt, S., 1996. Plant Drug Analysis, 2 ed. ed. Springer, New York.

Zhang, Z., Xia-yan, Z., 2011. GC/MS Analysis on Benzene/Alcohol Extractives of *Manglietia Glauca* Leavies for Biomedicine Engineering, Advanced Materials Research, 213 - 475.

Table 1: Screening of phytochemicals of *L.ferrea* var. *ferrea* leaves extracts.

Extract	Tannin s	Flavon oids	Alkalo ids	carbohydr ates	Cinnamic derivatives	Terpe nes
LFCH	-	+	-	-	-	+
LFCH	-	+	-	-	-	-
LFCH	+	+	+	+	+	+
LFCH	+	+	-	-	+	-
LFCH	+	+	-	+	+	-

(+) Present; (-) Absent

Table 2. Chemical composition of *L.ferrea* extract and purified fractions.

SAMPLE	CONSTITUENTS	RT*(minutes)	T.P*.(%)
LFCH	octadecanal	28.740	5.07
	n-dodecanal	28.858	3.76
	octacosane	30.377	17.34
	Docosane	30.504	16.86
	pentadecane	43.032	3.77
	Phytol	53.220	53.21
F1	Pentadecanoic acid	16.883	0.59
	globulol	23.208	65.12
	nerolidol	26.625	34.29
F2	Palmitate acid	23.700	7.10
	Linolenic acid	27.983	92.90
F3	n-decanal	15.958	1.76
	14-methyl-pentadecanoate	16.797	6.87
	1,2-benzenedicarboxylic acid	17.994	4.26
	Phytol	19.142	25.25
	Hexanoic acid	21.001	11.18
	1,2-benzenedicarboxylic acid	22.652	4.97
		26.222	11.49
	Benzoic acid	26.549	16.82
	Pyrrolidine	39.027	9.48
	γ- Sitosterol	40.617	6.93
	2,4-pyridinedicarboxylic acid	40.683	0.97
F4	nonacosane	53.093	100

*RT= Retention Time, T.P. = Total Percentage.

Table 3. Antibacterial Activity of *L. ferrea* extracts against gram-positive and gram-negative bacteria.

Microorganism	Antibiotic		<i>Libidibia ferrea</i> Extracts									
	Clindamicyn		LFCH		LFCF		LFEtAc		LFMeOH		LFAq	
	MIC*	MBC*	MIC*	MBC*	MIC*	MBC*	MIC*	MBC*	MIC*	MBC*	MIC*	MBC*
<i>B. subtilis</i>	0.039	0.039	0.78	1.56	0.78	0.78	1.56	6.25	3,12	6,25	12,5	50
<i>E. coli</i>	0.019	0.039	1.56	6.25	6.25	6.25	6.25	12.5	12,5	50	12,5	50
<i>Proteus vulgaris</i>	0.039	0.039	3.12	12.5	6.25	12.5	12.5	25	12.5	25	50	>100
<i>P. aeruginosa</i>	0,190	0,390	1.56	3.12	3.12	3.12	1.56	3.12	6,25	12,5	6,25	25
<i>S. aureus</i>	0.019	0.078	0.39	0.78	0.78	1.56	0.78	3.12	0,39	1,56	6.25	12.5
IC 660	0.156	0.312	3.12	6.25	6.25	6.25	6.25	12.5	12.5	12.5	25	>100
IC 663	0.039	0.039	0.78	0.78	0.19	0.39	0.39	0.78	6,25	12,5	12,5	25
IC676	0.019	0.078	3.12	12.5	3.12	3.12	1.56	3.12	6,25	6,25	50	>100
IC 712	0.019	0.039	3.12	12.5	1.56	3.12	3.12	12.5	0,78	6,25	25	50

*mg/ml

Table 4. Antimicrobial activity of fractions isolated from LFCH extract of *L.ferrea* against *Staphylococcus aureus*.

S.aureu s	Soucer	F1		F2		F3		F4	
		MIC	MBC	MIC	MBC	MIC*	MBC	MIC	MBC
		*	*	*	*		*	*	*
02	Standard strain	5	10	2,5	5	0.62 5	5	2,5	10
660	Vaginal secretion	5	10	5	>10	5	10	5	>10
663	Catheter Tip	10	>10	10	>10	10	>10	5	10
676	Prothesi s Secretion	10	>10	5	>10	5	10	5	>10
712	Wound Secretion	10	>10	5	10	5	10	10	>10

*mg/ml

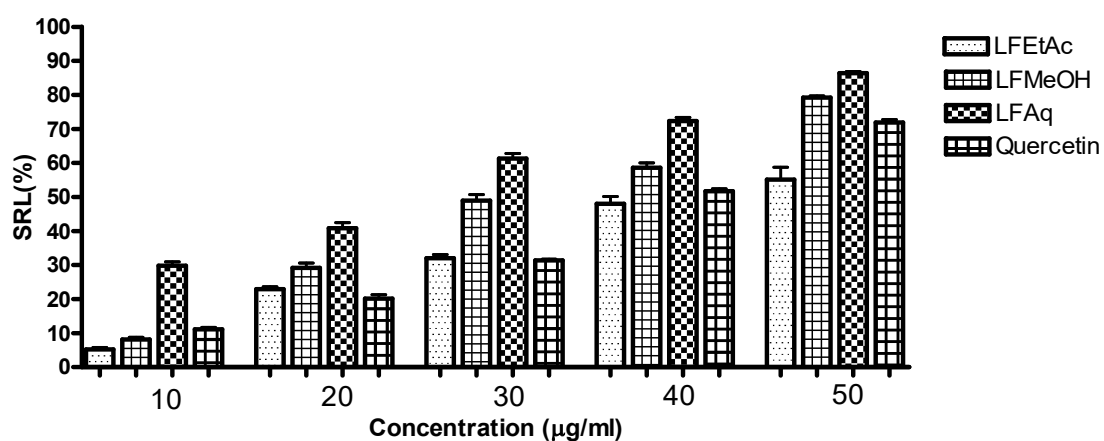


Figure 1. DPPH radical scavenging of extracts, quercetin was used as reference. Absorbance of the reaction was measured at 517 nm. Values are means $\pm$ S.D. (n = 3).

4 CONCLUSÕES

Com base nos estudos realizados, podemos concluir que:

- Os extratos de folhas de *Libidibia ferrea* contêm alcalóides, carboidratos, derivados cinâmicos, flavonóides, taninos e terpenos;
- Os extratos apresentaram significativa atividade antibacteriana, com efeito bactericida, demonstrando maior atividade frente às bactérias gram-positivas;
- LFCH apresentou maior atividade antibacteriana quando comparado com os demais extratos, sendo mais eficaz contra *Staphylococcus aureus*;
- As frações de LFCH são constituídas de ácidos graxos, alcanos, esteróides e terpenos e apresentaram moderada atividade antibacteriana;
- Os extratos LFEtAc, LFMeOH e LFAq apresentaram potente atividade antioxidante, destacando-se os dois últimos que demonstraram maior sequestro de DPPH que a quercetina.

ANEXO A

1. NORMAS PARA PUBLICAÇÃO DO ARTIGO NO PERIÓDICO



JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY

An Interdisciplinary Journal Devoted to Indigenous Drugs

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

•	Description	p.1
•	Audience	p.2
•	Impact Factor	p.2
•	Abstracting and Indexing	p.2
•	Editorial Board	p.2
•	Guide for Authors	p.4



ISSN: 0378-8741

DESCRIPTION

The *Journal of Ethnopharmacology* is dedicated to the exchange of information and understandings about people's use of plants, fungi, animals, microorganisms and minerals and their biological and pharmacological effects based on the principles established through international conventions. Early people confronted with illness and disease, discovered a wealth of useful therapeutic agents in the plant and animal kingdoms. The empirical knowledge of these medicinal substances and their toxic potential was passed on by oral tradition and sometimes recorded in herbals and other texts on *materia medica*. Many valuable drugs of today (e.g., atropine, ephedrine, tubocurarine, digoxin, reserpine) came into use through the study of indigenous remedies. Chemists continue to use plant-derived drugs (e.g., morphine, taxol, physostigmine, quinidine, emetine) as prototypes in their attempts to develop more effective and less toxic medicinals.

In recent years the preservation of local knowledge, the promotion of indigenous medical systems in primary health care, and the conservation of biodiversity have become even more of a concern to all scientists working at the interface of social and natural sciences but especially to ethnopharmacologists. Recognizing the sovereign rights of States over their natural resources, ethnopharmacologists are particularly concerned with local people's rights to further use and develop their autochthonous resources.

Accordingly, today's ethnopharmacological research embraces the multidisciplinary effort in the:

- documentation of indigenous medical knowledge,
- scientific study of indigenous medicines in order to contribute in the long-run to improved health care in the regions of study, as well as
- search for pharmacologically unique principles from existing indigenous remedies.

The *Journal of Ethnopharmacology* publishes original articles concerned with the observation and experimental investigation of the biological activities of plant and animal substances used in the traditional medicine of past and present cultures. The journal will particularly welcome interdisciplinary papers with an **ethnopharmacological**, an **ethnobotanical** or an **ethnochemical** approach to the study of indigenous drugs. Reports of **anthropological** and **ethnobotanical** field studies fall within the journal's scope. Studies involving **pharmacological** and **toxicological** mechanisms of action are especially welcome. **Clinical studies** on efficacy will be considered if contributing to the understanding of specific ethnopharmacological problems. The journal welcomes review articles in the above mentioned fields especially those highlighting the multi-disciplinary nature of ethnopharmacology. Commentaries are by invitation only.

AUDIENCE

Ethnopharmacologists, Medicinal Chemists, Pharmacologists, Toxicologists, Anthropologists, Pharmacognosists, Ethnobotanists, Economic Botanists, Ethnobiologists

IMPACT FACTOR

2011: 3.014 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2012

ABSTRACTING AND INDEXING

AGRICOLA
 BIOSIS
 CAB Abstracts
 Cambridge Scientific Abstracts
 Chemical Abstracts
 Current Contents/Life Sciences
 EMBASE
 EMBiology
 International Pharmaceutical Abstracts
 MEDLINE®
 NAPRALERT (Natural Products Alert)
 Science Citation Index
 Scopus

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief:

R. Verpoorte, Gorlaeus Lab., HB024, Universiteit Leiden, Einsteinweg 55, 2333 CC Leiden, Netherlands, **Email:** verpoort@chem.leidenuniv.nl

Editor:

Associate Editor:**D. Guo**, Chinese Academy of Sciences (CAS), Shanghai, China**Y.S. Kim**, Seoul National University (SNU), Seoul, South Korea**P.K. Mukherjee**, Jadavpur University, Kolkata, India**G. Schmeda Hirschmann**, Universidad de Talca, Talca, Chile**J. van Staden**, University of KwaZulu-Natal, Scottsville, South Africa**A.M. Viljoen**, Tshwane University of Technology, Pretoria, South Africa**E. Yesilada**, Yeditepe University, Erenkoy-Istanbul, Turkey**Reviews Editor (including Commentaries and Book Reviews):****M. Heinrich**, The School of Pharmacy, University of London, 29-39 Brunswick Square, London, WC1N 1AX, UK,**Email:** m.heinrich@ucl.ac.uk**Editorial Board:****S. Alban**, Kiel, Germany**M.J. Balick**, Bronx, NY, USA**R. Bauer**, Graz, Austria**G. Bourdy**, Cayenne, French Guiana**J.B. Calixto**, Florianópolis, Brazil**C-T. Che**, Hong Kong, Hong Kong**G.A. Cordell**, Evanston, IL, USA**V.S. da S. Bolzani**, Araraquara, Brazil**J. Ding**, Shanghai, China**V.M. Dirsch**, Vienna, Austria**T. Efferth**, Heidelberg, Germany**E. Elisabetsky**, Porto Alegre, Brazil**J. Fleurentin**, Metz, France**B.L. Furman**, Glasgow, UK**M.P. Germano**, Messina, Italy**J. Gertsch**, Bern, Switzerland**A.H. Gilani**, Karachi, Pakistan**M.P. Gupta**, Panama City, Panama**A. Hensel**, Münster, Germany**P.J. Houghton**, London, UK**Z. Ismail**, Penang, Malaysia**W. Jia**, Kannapolis, NC, USA**T. Johns**, Ste. Anne de Bellevue, QC, Canada**A.K. Jäger**, Copenhagen, Denmark**G. Kavalali**, Istanbul, Turkey**H-S. Kim**, Cheongju, South Korea**J. Kim**, Seoul, South Korea**Y. Kimura**, Ehime, Japan**M.A. Lacaille-Dubois**, Dijon, France**M. Leonti**, Cagliari, Italy**G. Lin**, Hong Kong, Hong Kong**E. Matteucci**, Pisa, Italy**I. Merfort**, Freiburg, Germany**J.J.M. Meyer**, Pretoria, South Africa

D.E. Moerman, Ypsilanti, MI, USA
D.A. Mulholland, Guildford, England, UK
A. Panthong, Chiang Mai, Thailand
X. Peigen, Beijing, China
A. Pieroni, Pollenzo/Bra, Italy
D.D. Soejarto, Chicago, IL, USA
E. Speroni, Bologna, Italy
A.J. Vlietinck, Antwerpen, Belgium
H. Wagner, München, Germany
C.S. Weckerle, Zurich, Switzerland
C.W. Wright, Bradford, UK
S. Zacchino, Rosario, Argentina
Founding Editors:
J.G. Bruhn, Tomelilla, Sweden
L. Rivier, Lausanne, Switzerland
C. Christoffel,

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

The *Journal of Ethnopharmacology* is dedicated to the exchange of information and understandings about people's use of plants, fungi, animals, microorganisms and minerals and their biological and pharmacological effects based on the principles established through international conventions. Early people, confronted with illness and disease, discovered a wealth of useful therapeutic agents in the plant and animal kingdoms. The empirical knowledge of these medicinal substances and their toxic potential was passed on by oral tradition and sometimes recorded in herbals and other texts on *materia medica*. Many valuable drugs of today (e.g., atropine, ephedrine, tubocurarine, digoxin, reserpine) came into use through the study of indigenous remedies. Chemists continue to use plant-derived drugs (e.g., morphine, taxol, physostigmine, quinidine, emetine) as prototypes in their attempts to develop more effective and less toxic medicinals.

Please note that figures and tables should be embedded in the text as close as possible to where they are initially cited. It is also mandatory to upload separate graphic and table files as these will be required if your manuscript is accepted for publication.

Classification of your paper

Please note that upon submitting your article you will have to select **at least one classification** and **at least three of the given keywords**. You can preview the list of classifications and keywords ([here](#)). This information is needed by the Editors to more quickly process your article. In addition to this, you can submit free keywords as described below under "Keywords".

The "rules of 5"

The Editors and Editorial Board have developed the "Rules of 5" for publishing in JEP. We have produced five clear criteria that each author needs to think

about before submitting a manuscript and setting the whole process of editing and reviewing at work. [Click here](#).

For more details on how to write a world class paper, please visit our Pharmacology Author Resources page.

Authors are encouraged to submit video material or animation sequences to support and enhance your scientific research. For more information please see the paragraph on video data below.

Types of paper

The *Journal of Ethnopharmacology* will accept the following contributions:

1. Original research articles - whose length is not limited and should include Title, Abstract, Methods and Materials, Results, Discussion, Conclusions, Acknowledgements and References. As a guideline, a full length paper normally occupies no more than 10 printed pages of the journal, including tables and illustrations.
2. Ethnopharmacological communications (formerly Short Communications) - whose average length is not more than 4 pages in print (approx. 2000-2300 words, including abstract and references). A maximum of 2 illustrations (figures or tables) is allowed. See paragraph below for description and format.
3. Letters to the Editors.
4. Reviews - Authors intending to write review articles should consult and send an outline to the Reviews Editor (see inside front cover for contact information) before preparing their manuscripts. The organization and subdivision of review articles can be arranged at the author's discretion. Authors should keep in mind that a good review sets the trend and direction of future research on the subject matter being reviewed. Tables, figures and references are to be arranged in the same way as research articles in the journal. Reviews on topics that address cutting-edge problems are particularly welcome. Outlines for potential reviews need to include: A detailed abstract using the structure provided in the guidelines An annotated table of contents A short CV of the lead author
5. Book reviews - Books for review should be sent to the Reviews Editor.
6. Commentaries - *invited*, peer-reviewed, critical discussion about crucial aspects of the field but most importantly methodological and conceptual-theoretical developments in the field and should also provide a standard, for example, for pharmacological methods to be used in papers in the *Journal of Ethnopharmacology*. The scientific dialogue differs greatly in the social / cultural and natural sciences, the discussions about the common foundations of the field are ongoing and the papers published should contribute to a transdisciplinary and multidisciplinary discussion. The length should be a maximum of 2-3 printed pages or 2500 words. Please contact the Reviews Editor j.ethnopharmacol@pharmacy.ac.uk with an outline.
7. Conference announcements and news.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics>; www.elsevier.com/ethicalguidelines.

Policy and ethics

In the covering letter, the author must also declare that the study was performed according to the international, national and institutional rules considering animal experiments, clinical studies and biodiversity rights. See below for further information. The ethnopharmacological importance of the study must also be explained in the cover letter.

Animal and clinical studies - Investigations using experimental animals must state in the Methods section that the research was conducted in accordance with the internationally accepted principles for laboratory animal use and care as found in for example the European Community guidelines (EEC Directive of 1986; 86/609/EEC) or the US guidelines (NIH publication #85-23, revised in 1985). Investigations with human subjects must state in the Methods section that the research followed guidelines of the Declaration of Helsinki and Tokyo for humans, and was approved by the institutional human experimentation committee or equivalent, and that informed consent was obtained. The Editors will reject papers if there is any doubt about the suitability of the animal or human procedures used.

Biodiversity rights - Each country has its own rights on its biodiversity. Consequently for studying plants one needs to follow the international, national and institutional rules concerning the biodiversity rights.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see www.elsevier.com/postingpolicy), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck www.elsevier.com/editors/plagdetect.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts: *Before the accepted manuscript is published in an online issue*: Requests to add or remove an author, or to

rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author

of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should

be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication. The fee of \$3,000 excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at www.elsevier.com/fundingbodies. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: www.elsevier.com/authorsrights.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageservices> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Additional information

Authors who want to submit a manuscript should consult and peruse carefully recent issues of the journal for format and style. Authors must include the following contact details on the title page of their submitted manuscript: full postal address; fax; e-mail. All manuscripts submitted are subject to peer review. The minimum requirements for a manuscript to qualify for peer review are that it has been prepared by strictly following the format and style of the journal as mentioned, that it is written in good English, and that it is complete. Manuscripts that have not fulfilled these requirements will be returned to the author(s).

In addition, you are recommended to adhere to the research standards described in the following articles:

Cos P, Vlietinck AJ, Berghe DV, et al. *Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'*. J Ethnopharmacol 2006, 106: 290-302. Click here.

Matteucci, E., Giampietro, O. *Proposal open for discussion: defining agreed diagnostic procedures in experimental diabetes research*. J Ethnopharmacol 2008, 115: 163-172. Click here.

T.SA. Froede and Y.S. Medeiros *Animal models to test drugs with potential antidiabetic activity*. J Ethnopharmacol 2008, 115: 173-183. Click here.

PREPARATION

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered

1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Glossary

Please supply, as a separate list, the definitions of field-specific terms used in your article.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name.

The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The author should divide the abstract with the headings ***Ethnopharmacological relevance, Materials and Methods, Results, and Conclusions***. Click here to see an example.

Graphical abstract

A Graphical abstract is mandatory for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples. Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

Keywords

After having selected a classification in the submission system, authors must in the same step select 5 keywords. These keywords will help the Editors to categorize your article accurately and process it more quickly. A list of the classifications and set keywords can be found here.

In addition, you can provide a maximum of 6 specific keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

Please do not:

- Supply files that are optimised for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Please note that figures and tables should be embedded in the text as close as possible to where they are initially cited. It is also mandatory to upload separate graphic and table files as these will be required if your manuscript is accepted for publication.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding**

the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with "Unpublished results".

"*Personal communication*" will not be accepted as a reference. Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by "et al." and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically. Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al.

(2000) have recently shown"

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication. Please use full journal names.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000. The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communication*. 163, 51-59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., cSmith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281-304.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*): <http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan

the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For no extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. For detailed instructions on the preparation of electronic artwork, please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs at <http://www.elsevier.com/authorFAQ> and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.