



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

ALAN LUCENA DE VASCONCELOS

**PERFIL ANATÔMICO, FITOQUÍMICO, ANTIMICROBIANO E
CITOTÓXICO DE *Luetzelburgia auriculata* (Allemão) Ducke**

RECIFE 2012



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

ALAN LUCENA DE VASCONCELOS

**PERFIL ANATÔMICO, FITOQUÍMICO, ANTIMICROBIANO E
CITOTÓXICO DE *Luetzelburgia auriculata* (Allemão) Ducke**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO, COMO PARTE DOS
REQUISITOS PARA OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: OBTENÇÃO E
AVALIAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS E
BIOATIVOS.

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. KARINA PERRELLI RANDAU.
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. HAROUDO SATIRO XAVIER.

RECIFE. 2012

Catálogo na Publicação
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

V331p Vasconcelos, Alan Lucena de.
Perfil anatômico fitoquímico, antimicrobiano e citotóxico de
Luetzelburgia auriculata (allemao) Ducke / Alan Lucena de Vasconcelos. –
Recife: O autor, 2012.
90 folhas : il.; tab.; quadr.; 30 cm.

Orientador: Karina Perrelli Randau.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2012.
Inclui bibliografia e anexos.

1. Fabaceae. 2. Morfoanatomia. 3. Perfil fitoquímico. 4. Atividade
antimicrobiana. 5. Atividade citotóxica. I. Randau, Karina Perrelli
(Orientador). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2012-231)



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

ALAN LUCENA DE VASCONCELOS

Dissertação a ser defendida em 27 de agosto de 2012 e cuja Banca Examinadora será constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E EXAMINADOR INTERNO: Prof^a. Dr^a. Karina Perrelli Randau
(Universidade Federal de Pernambuco).

Assinatura:_____

EXAMINADOR EXTERNO: Prof^a. Dr^a. Rejane Magalhães de Mendonça Pimentel

Assinatura:_____

EXAMINADOR INTERNO: Prof^a. Dr^a. Elba Lúcia Cavalcanti Amorim

Assinatura:_____

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

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Sílvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Souza Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof.^a Dr.^a Vânia Pinheiro Ramos

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Dalci José Brondani

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria

COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

Prof.^a Dr.^a Nereide Stela Santos Magalhães

VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof.^a Dr.^a Ana Cristina Lima Leite

Aos meus pais, por sempre acreditarem em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por preparar meus caminhos antes mesmo que eu existisse e me capacitar para os desafios que me fazem crescer.

À profa. Dr^a. Karina Perrelli Randau, que me acompanhou durante toda minha formação. Agradeço por sua orientação, seus conselhos, sua atenção, por sua amizade e por me formar acima de tudo para vida. Sem suas orientações nada disso seria concretizado.

À profa. Dr^a. Eulália Azevedo Ximenes, que me acolheu em seu laboratório com solicitude e por todos os conhecimentos transmitidos ao longo desse período.

Ao querido prof. Dr. Haroudo Satiro Xavier, pelos ensinamentos, pela paciência, pelo carinho durante esses anos de minha formação.

Às professoras Dr^a. Rejane Pimentel e Dr^a. Teresinha Gonçalves Alves de Lima pela colaboração e uso das dependências dos seus laboratórios.

Ao professor Dr. Luiz Alberto de Lira Soares, pelo seu apoio, orientação, pela amizade e por estar do nosso lado em tantos momentos.

À minha primeira professora de química Lúcia Vasconcelos, pelos ensinamentos, pelo exemplo de amor à profissão, acima de tudo pela amizade e por participar de minha formação como ser humano.

Aos queridos amigos de Laboratório Alex Lucena, Evanilson Alves, Márcia Maria Barbosa, Luciana Gomes Arrais, Luma Gomes e Rafaela Damasceno, Risoleta Nogueira, Bárbara Nunes, Andrea Vidal, José Antônio, Gibson Gomes, Gustavo Dimech, Amanda Mesquita, Lucas Pacheco.

Às amigas, que ganhei de presente e estavam do meu lado em momentos de extrema dificuldade Maria Lúcia Araújo, Paula Lima, Ana Flávia Loureiro, Mariana Beltrão.

Aos meus pais, Aurilene Lucena e José Alves, aos meus avós Maria de Lourdes e José Severino e Maria Alice e José Alves que onde estiverem sempre olham por mim.

Aos Meus Amigos de trabalho que aguentaram minhas preocupações e sempre na torcida e compreensão.

A toda a minha família pelo amor, torcida, força e por compreender minha ausência por este período que não pude dar a devida atenção.

Ao Raul Nigro e sua família que me acolheram com tanto amor, o que foi indispensável para me fortalecer nos momentos de desânimo.

A todos que de alguma forma contribuíram para concretização deste trabalho que não tiveram os nomes aqui descritos, devido a grande quantidade de colaborações, mas que tenho consciência da participação ativa em todos os experimentos realizados. Com profundo carinho deixo a todos o meu muito obrigado.

INSTITUIÇÕES

Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas – UFPE.

CNPQ – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Laboratório de Farmacognosia – UFPE.

Laboratorio de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos - UFPE

AOS PROFESSORES

Profa. Dr^a. Karina Perrelli Randau

Profa. Dr^a. Eulália Azevedo Ximenes

Prof. Luiz Alberto de Lira Soares

Prof. Dr. Haroudo Satiro Xavier

Profa. Dr^a. Rejane Magalhães de Mendonça Pimentel

Profa. Dr^a. Teresinha Gonçalves Alves de Lima

AOS AMIGOS E COLEGAS DE CURSO

Alex Lucena

Rafaela Damasceno

Amanda Mesquita

Risoleta Nogueira

Andrea Vidal

Asaph Santos

Bárbara Nunes

Evanilson Alves

Gibson Gomes

Gustavo Dimech

Hyalyne Barboza

José Antonio Pereira

Lucas Pacheco

Magda Ferreira

Márcia Maria Barbosa

“Cuidado com seus pensamentos, pois eles tornam-se palavras.

Cuidado com as palavras, pois elas tornam-se ações.

Cuidado com as ações, pois elas tornam-se hábitos.

Cuidado com os hábitos, pois eles tornam-se o seu caráter.

Cuidado com o seu caráter, pois ele torna-se o teu destino.

Nós nos tornamos o que nós pensamos”.

(Margaret Thatcher)

RESUMO

Luetzelburgia auriculata Ducke, Fabaceae, da subfamília Papilionoideae, é conhecida como pau-mocó. Etnobotanicamente é utilizada por conta das peculiaridades de sua raiz e folhas. Estas possuem notória toxicidade e as raízes são ricas em amido, usado em períodos de seca como fonte nutritiva. Baseado nas utilizações populares reportadas, e no reduzido quantitativo de trabalhos científicos sobre o gênero, buscou-se por meio deste, realizar a caracterização macro e microscópica dos caracteres morfoanatômicos além da identificação dos constituintes químicos e avaliação do potencial antimicrobiano e citotóxico das raízes e folhas desta espécie. Por meio da diagnose macroscópica, foram observadas, raízes tuberosas, folhas alternas espiraladas, estipuladas, compostas imparipinadas. Por meio de microtécnicas de corte transversal, foi possível observar na raiz grupos de esclerênquima no floema e no xilema. Grãos de amido no parênquima cortical. Feixes xilemáticos em número de sete com raios medulares de até três células de largura. Pecíolo com grande feixe vascular colateral central e dois menores laterais na face adaxial. Em vista frontal pode-se observar que a folha é hipostomática, com estômatos, dos tipos, paracítico, anomocítico e anisocítico e tricomas tectores simples unisseriados. Em secção transversal observa-se que a lâmina foliar é revestida por epiderme unisseriada e mesofilo dorsiventral com quatro camadas de paliádico e quatro de esponjoso, sem espaços intercelulares. O feixe vascular da nervura principal é colateral aberto e colênquima angular nas costelas. A partir da preparação de extratos brutos obtidos de diferentes solventes em polaridade crescente foram obtidos os extratos hexânico (EHex), acetato de etila (EAc), metanólico (EMe) e aquoso (EAq), onde por meio dos quais foi possível determinar o perfil fitoquímico da raiz e folha, além de avaliar seu potencial antimicrobiano e citotóxico. Por meio de cromatografia em camada delgada foram identificados nos extratos compostos como mono e sesquiterpenos, triterpenos e esteroides, saponinas, cumarinas e flavonoides, onde os compostos de menor polaridade mostram-se majoritariamente presentes. Através do fracionamento de seus constituintes químicos por cromatografia em coluna clássica obtiveram-se três frações purificadas, onde uma pertence à classe química dos mono e sesquiterpenos e as outras duas à cumarinas. Na avaliação de atividade antimicrobiana foi utilizado o método de microdiluição em caldo, onde os extratos foram testados frente às cepas padronizadas e multirresistentes de *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus mirabilis*. O extrato acetato de etila da raiz apresentou alta atividade inibindo o crescimento tanto de bactérias Gram-negativas (*Proteus mirabilis*) quanto de Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*), o que permite inferir a existência de diferentes mecanismos de ação ao interagir com as membranas destes microorganismos. Os extratos hexânicos e acetato de etila da folha também apresentaram forte atividade antimicrobiana, mostrando-se ativos contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*). A partir da avaliação do potencial citotóxico dos extratos pelo método do MTT, o extrato acetato de etila na raiz e hexânico nas folhas, mostraram alta atividade citotóxica contra linhagens humanas de câncer de pulmão, cólon e laringe na concentração de 25 µg/mL chegando a apresentar 87% de atividade. Estes dados contribuem com os estudos científicos acerca desta espécie, que mostra-se como promissora fonte de biomoléculas com importantes atividades.

Palavras-chave: *Fabaceae*, morfoanatomia, perfil fitoquímico, atividade antimicrobiana, atividade citotóxica.

ABSTRACT

Luetzelburgia auriculata Ducke, Fabaceae, subfamily Papilionoideae, is known as “pau-mocó”. Etnobotanically is used because of the peculiarities of its root and leaves. These have notorious toxicity and the roots are rich in starch, used in periods of drought as nutritional source. Based on the popular uses reported, and the small quantity of scientific papers on the genus, we aim through this, to characterize the macroscopic and microscopic morphological and anatomical features, in addition to the identification of chemical constituents and evaluation of antimicrobial and cytotoxic potential of roots and leaves of this species. Through macroscopic diagnosis were observed in the species, tuberous roots, alternate and spiral leaves, stipulated, compounded imparipinnate; petiole 2.4-4cm. In transversal view, the root shows sclerenchyma groups of cells in the phloem and xylem. Starch grains into the cortical parenchyma. Xylematic bundles in number of seven with medullary rays until three cells in width. Petiole with large central collateral vascular bundle and two smaller on each side of the xylem, on the adaxial face, and perpendicular to the large bundle. In frontal view, the leaf is shown hypostomatic with paracytic, anomocytic and anisocytic stomata and simple uniseriate trichomes. The anticlinal cell walls are slightly sinuous on both sides. In transversal section view, the mesophyll is shown dorsiventral with four layers of palisade and four of spongy, without intercellular lacunas. The vascular bundle of midrib side is open with angular collenchyma in the ribs. From the preparation of crude extracts, obtained from different solvents in increasing polarity, it was possible to determine the phytochemical profile of the root and leaf, and to evaluate their potential antimicrobial and cytotoxic. By thin layer chromatography were identified in extracts compounds as mono- and sesquiterpenes, steroids and triterpenoids, saponins, coumarins and flavonoids, which compounds of lower polarity shown to be mainly present. By fractionating its chemical constituents by column chromatography, were obtained three classical purified fractions, which one belongs to a chemical class of monoterpenes and two others to coumarins group. In the evaluation of antimicrobial activity, we used the broth microdilution method, where the extracts were tested against standard and multidrug-resistant strains of *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis*. The ethyl acetate extract of the root showed high activity inhibiting the growth of both Gram-negative bacteria (*Proteus mirabilis*) and Gram-positive (*Staphylococcus aureus*). This allows to infer the existence of different mechanisms of action by interacting with the membranes of these microorganisms. The hexane and ethyl acetate extracts of leaf also showed strong antimicrobial activity, proved to be active against Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*). These same extracts showed high cytotoxic activity against human strains of lung, colon and larynx cancer at a concentration of 25 mg / mL reaching to present 87% of activity. These data are relevant within an environment of scarcity of studies on the genus, thus contributing to scientific studies about this species, which shows up as a promising source of biomolecules with important activities.

Keywords: *Fabaceae*, Morphoanatomy, Phytochemistry Profile, Antimicrobial Activity, Cytotoxic Activity.

LISTA DE ABREVIACÕES

- A.Ac – Ácido acético.
- AcOEt – Acetato de etila.
- AF – Ácido fórmico.
- APG II - The Angiosperm Phylogeny Group.
- ATCC - American Type Culture Collection.
- CIP -Ciprofloxacino
- CLSI - Clinical Laboratory Standards Institute.
- DMEM - Dulbecco'S Modified Eagle Medium.
- EAc – Extrato acetato de etila.
- EAq - Extrato aquoso.
- EHex - Extrato n-hexano.
- EMe - Extrato metanólico.
- FAA 50 - Ácido fórmico, ácido acético e álcool etílico (5:5:90).
- HEp-2 – Linhagem de células de câncer de laringe humano.
- HT29 – Linhagem de células de câncer de colo humano.
- ILDIS - International Legume Database and Information Service
- IMI - Imipinem.
- Média IC% - Percentual médio de inibição do crescimento calular.
- MRSA – Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.
- MTT - 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium.
- NCI-H-292 – Linhagem de células de câncer de pulmão humano.
- POL B - Polimixina B.
- Rf – fator de retenção.
- TEI - Teicoplanina.
- UFC - Unidades Formadoras de Colonias.

SUMÁRIO

1 Introdução	13
2 Objetivos	15
2.1 Geral	15
2.2 Específico	15
3 Referencial Teórico	16
3.1 Família das Fabáceas (APG II)	17
3.2 O Gênero <i>Luetzelburgia</i>	19
3.3 <i>Luetzelburgia auriculata</i>	21
3.4 Aplicações e Usos	24
3.5 Fitoconstituintes e Atividades Biológicas	24
Capítulo 1 - Diagnose Morfoanatômica de folha e raiz de <i>Luetzelburgia auriculata</i> (Allemao) Ducke	28
1 Introdução	29
2 Material e Métodos	31
2.1 Material vegetal	31
3 Resultados e Discussão	32
3.1 Diagnose Macroscópica	32
3.2 Diagnose Microscópica	33
3.2.1 Raiz	33
3.2.2 Folha	34
Pecíolo	34
Lâmina Foliar	35
4 Referências	38
Capítulo II - Perfil Fitoquímico e Biológico de <i>Luetzelburgia auriculata</i>	42
1 Introdução	43
2 Material e Métodos	47
2.1 Material vegetal	47
2.2 Preparação dos Extratos	48
2.3 Prospecção Fitoquímica	50

2.4 Fracionamento de Constituintes químicos de <i>Luetzelburgia auriculata</i>	53
2.5 Avaliação da Atividade Antimicrobiana	53
2.6 Avaliação da atividade Citotóxica	54
3 Resultados e Discussão	56
3.1 Prospecção Fitoquímica	57
3.2 Fracionamento de Constituintes químicos de <i>Luetzelburgia auriculata</i>	65
3.3 Avaliação da atividade Antimicrobiana	66
3.4 Avaliação da atividade Citotóxica	71
4 Conclusão	76
5 Referências	78
Anexo A	86

1 Introdução

As espécies da família Leguminosae, encontram-se entre as plantas mais difundidas no mundo, utilizadas frequentemente com fins nutricionais ou em arborização de espaços públicos. Constitui a terceira maior família de angiospermas e distribui-se em todos os continentes, nos mais variados tipos de domínios. No Brasil, representa quase um terço do total de espécies que compõem o bioma caatinga, com 293 espécies distribuídas em 77 gêneros (POLHILL et al. 1981; LEWIS et al. 2005; QUEIROZ 2006).

Para a população sertaneja as leguminosas são mais do que plantas alimentícias e ornamentais. Além de estarem presentes na base de sua produção, como o feijão, apresentam influencia marcante em suas vidas, fornecendo-lhes alimento, pastagens, lenha, material para construção, produtos medicinais e até mesmo fazendo parte de seu folclore e rituais religiosos (QUEIROZ, 2009).

O condicionamento destas espécies vegetais no bioma caatinga resulta da interação de fatores ambientais e da história da sua biota, permitindo-lhes desenvolver ao longo do processo evolutivo peculiaridades morfoanatômicas e fitoquímicas, importantes à sua adaptabilidade e ao seu desenvolvimento em ambientes adversos. Assim, diversas espécies de leguminosas, que a princípio eram conhecidas por seu caráter tóxico, tornaram-se fontes importantes de biomoléculas de interesse farmacológico.

Assim, elegeu-se como objeto desta pesquisa a leguminosa *Luetzelburgia auriculata* (Allemao) Ducke, que se destaca em meio à paisagem do semiárido, pois apesar de estabelecida em solo raso e pedregoso, mantém a exuberância e viçiosidade de suas folhagens durante todas as estações, com exceção do período de floração. Levantamentos bibliográficos reportam principalmente a utilização de suas folhas, que mesmo possuindo notória toxicidade são utilizadas para acelerar o amadurecimento de frutos, e suas raízes feculosas, como fonte nutritiva em períodos de escassez de recursos.

A pesquisa de trabalhos científicos sobre este táxon permitiu constatar a escassez de estudos não apenas deste, mas de forma geral dos representantes do gênero, formado por apenas oito espécies. Dos poucos estudos encontrados, os trabalhos demonstram a presença de determinadas substâncias no caule e alguns testes de atividade biológica realizados apenas em seus frutos. Desta maneira, objetivou-se realizar de forma pioneira a diagnose morfoanatômica, macro e microscópica de seus constituintes funcionais e caracterização do perfil fitoquímico, além de avaliar as atividades antimicrobiana e citotóxica de sua raiz e folhas. Assim, no intuito de valorizar a flora regional, buscou-se lançar as bases dos primeiros

estudos desta natureza para esta espécie, que apresenta grande potencial terapêutico, porém pouco explorada sob este aspecto.

2 Objetivos

2.1 Geral

Estudar os aspectos farmacognósticos e atividades biológicas de *Luetzelburgia auriculata* (Allemao) Ducke.

2.2 Específicos

- Realizar a caracterização morfoanatômica da espécie;
- Identificar os principais grupos de metabólitos secundários presentes no vegetal;
- Avaliar atividade antibacteriana frente a diferentes cepas multirresistentes;
- Determinar a citotoxicidade *in vitro* frente a três linhagens de células tumorais de pulmão, cólon e laringe.

3Referencial Teórico

Historicamente, o interesse pela diversidade florística mundial data do fim do século XVIII quando Carl Von Linné, em 1753, documentou cerca de 6000 binômios em seu trabalho intitulado *Species plantarum* (JARVIS 2007), prevendo que no mundo houvesse apenas 10 mil espécies de plantas. Atualmente estima-se que das 298 mil espécies vegetais existentes no planeta, 215.644 foram descritas e catalogadas, sendo o Brasil detentor de 20% da biodiversidade mundial, com um acervo científico que não ultrapassa 1% (MONTE, 2007; MORA et al., 2011).

Diante da insuficiência de pesquisas científicas e políticas de proteção às áreas de diversidade biológica, foi criado, no final da década de 1980, o conceito de “país megadiverso”, para identificar aqueles que apresentam grande variedade de espécies de elevado potencial terapêutico, econômico e biológico. Sabe-se que um número pequeno de países, principalmente tropicais, concentra grande proporção da biodiversidade mundial, como Brasil, Colômbia, México, Congo, Madagascar e Indonésia, sendo estes os primeiros a receberem esse título, importante na conservação ambiental dentro das diferentes realidades de cada governo (MITTERMEIER et al., 1997).

Devido às suas dimensões continentais, o Brasil, possui um rico panorama no que se refere à composição de sua flora. Apresenta diferentes domínios fitogeográficos, compreendendo desde florestas úmidas ao sul até ambientes de caatinga no Nordeste (MAIA, 2002). Este último é considerado como o único bioma exclusivamente brasileiro e ocupa uma área de 850.000 km². Isto significa que grande parte do patrimônio biológico dessa região não é encontrada em nenhum outro lugar do mundo além do Nordeste do Brasil. Sua vegetação apresenta uma heterogeneidade marcante com uma flora rica em metabólitos secundários necessários à sua adaptação frente aos mais diversos tipos de intempéries advindas de fatores bióticos, como herbivoria, ataque de patógenos e competição entre espécies; e abióticos como escassez de nutrientes, alta incidência solar e má distribuição de chuvas aliada a uma baixa densidade pluviométrica (PRADO, 1993; QUEIROZ, 2009).

O nome originado do tupi caa (mata), tinga (branca) alude ao aspecto de mata branca característico de vegetações secas, como observado nas áreas localizadas nesse bioma, que apresentam um regime de poucas chuvas e elevada evapotranspiração (MENEZES; SAMPAIO, 2000). Por ser um ambiente extremo de características marcantes, as espécies inseridas neste ecossistema apresentam diferentes estratégias adaptativas sejam morfológicas ou químicas. A flora característica de tal bioma pode ser descrita como uma floresta baixa

composta principalmente por árvores pequenas e arbustos que apresentam microfilia, com caules geralmente retorcidos e espinhosos. Diversas pesquisas indicam a presença de espécies com elevado potencial químico-terapêutico, dentre elas pode-se citar *Cajanus cajan*(L.) Millsp(Fabaceae), bastante utilizada como alimento humano além de empregada na medicina popular para tratamento de diabetes, infecções e parasitoses intestinais graças às suas propriedades antimicrobianas cientificamente comprovadas (BRITO, 2011).

3.1 Família das Fabáceas (APG II)

Dentre os taxa encontrados na caatinga, as leguminosas são espécies próprias deste bioma consideradas como importantes parâmetros para descrição fisionômica dos diferentes domínios. Este fato é baseado na especificidade que essas espécies apresentam por determinados tipos de solo e recursos disponíveis (QUEIROZ, 2006).

Os representantes da família Leguminosae (Fabaceae) encontram-se distribuídos em todos os continentes e nos mais variados tipos de domínios, principalmente em regiões tropicais e temperadas. Possui cerca de 19.000 espécies e 727 gêneros, constituindo a terceira maior família de angiospermas, depois das Orchidaceae e Asteraceae (POLHILL et al., 1981; LEWIS et al., 2005). No Brasil encontra-se entre as famílias mais representativas da maioria dos ecossistemas, sendo formada por 200 gêneros nativos e 1.500 espécies (SOUZA; LORENZI, 2005). Na caatinga representa quase um terço do total de espécies que compõem este bioma, com 293 espécies distribuídas em 77 gêneros (QUEIROZ, 2006).

Crítérios filogenéticos para classificação das angiospermas (APG II, 2003) sustentam esta família, na classificação monofilética juntamente com Polygalaceae, Quillajaceae e Surianaceae. Comumente Fabaceae é encontrada dividida em três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae (BENTHAM 1865; POLHILL et al., 1981).

Entretanto alguns sistemas de classificação as consideram como famílias distintas (e.g. CRONQUIST, 1981). Embora as três subfamílias sejam distinguidas por suas características morfológicas peculiares, pode-se inferir a classificação filogenética de Caesalpinioideae como parafiléticas, tendo em vista que alguns de seus gêneros apresentam características filogenéticas tendentes a outras subfamílias (DOYLE 1995; KAJITA et al., 2001; KÄSS; WINK 1996, WOJCIECHOWSKI et al., 2004; BRUNEAU et al. 2008). Mimosoideae, com excessão de um gênero (Dinizia), que possui características relacionadas às Caesalpinioideae, está fortemente enquadrado em um clado distinto (LUCKOW et al., 2003; WOJCIECHOWSKI et al., 2004). Papilionoideae é a única subfamília onde o conjunto de

suas espécies origina-sede um único ancestral comum (monofiléticas) (WOJCIECHOWSKI et al. 2004; MCMAHON; SANDERSON 2006).

Dessa forma, Papilionoideae, constitui a maior das subfamílias, com caracteres considerados os mais diversificados das leguminosas (BARROSO et al. 1991). Apresenta 110 gêneros distribuídos no Brasil e 41 típicos de caatinga representados por ervas, trepadeiras, árvores ou arbustos caracterizando-se por folhas pinadas (frequentemente trifolioladas), flores papilionóides com simetria zigomorfa e corola com prefloração imbricativa vexilar (i.e. descendente) (POLHILL 1981a; LEWIS et al. 2005). Além disso, possui sementes com a região do hilo bem delimitada e embrião com eixo da radícula curvo (GUNN 1981). A descrição e classificação das estruturas funcionais do vegetal são importantes parâmetros para correta identificação de uma espécie, gênero ou família. Assim espécies que compartilham das mesmas características morfoanatômicas podem ser distinguidas evitando assim, homônimos de táxons diferentes. Pate; Kuo (1981) afirmam que espécies leguminosas possuem uma miríade de características anatômicas de grande valor para a taxonomia. Características morfológicas a respeito de órgãos reprodutivos de Fabaceae vêm sendo utilizadas como parâmetro taxonômico de características filogenéticas (GUNN 1984, LIMA 1985, LIMA 1989-1990).

Um caso que merece especial atenção é a substituição, onde é possível observar com facilidade a troca de determinadas espécies com propriedades medicinais por outras de morfologia análoga, porém com propriedade terapêutica e toxicidade não embasadas cientificamente. Como exemplo, pode-se encontrar a substituição de *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae), conhecida popularmente por espinheira-santa, que possui ação analgésica, antiséptica e cicatrizante, por seu homólogo papilionóide *Zollernia ilicifolia* (Brongn.) Vogel (Leguminosae) que não possui as mesmas atividades e provoca indesejáveis alterações fisiológicas (GONZALÉZ et al, 2001; RALPH SANTOS-OLIVEIRA et. al, 2009; MACHADO, SANTOS, 2011).

Apesar de muitas leguminosas apresentarem-se como tóxicas a primeira vista e inadequadas para tratamento de determinadas patologias, muitas são na verdade importantes fontes de biomoléculas potencialmente ativas. Como exemplo, temos a papilionoide *Melilotus officinalis* (L.) Pall. popularmente conhecida como “trevo-amarelo” que apresenta toxicidade aos animais que se alimentam de suas folhas fermentadas provocando-lhes doenças hemorrágicas. Apesar do aparente efeito tóxico observado, este fato levou à descoberta da ação anticoagulante do dicumarol, consagrado como o primeiro fármaco anticoagulante por via oral, que serviu de protótipo para o desenvolvimento de uma nova classe de

substâncias com esta atividade, como a varfarina (SIMÕES et al., 2007). Fato semelhante acontece em algumas outras espécies de papilionóide, como em *Luetzelburgia auriculata*, onde é possível observar sintomas de toxicidade nos animais que se alimentam de suas folhas, porém possui metabólitos que apresentam diferentes atividades biológicas, sejam elas anti-inflamatória, inseticida ou antifúngica em testes realizados com seu fruto (MELLO et al, 2010; MELO et al, 2005; ALENCAR et al, 2009; SOUZA, 2011) .

3.2 O Gênero *Luetzelburgia*

Descrito inicialmente e catalogado no Museu de Botânica da Baviera (Alemanha) por Philipp Von Luetzelburg (1880-1948), farmacêutico, formado pela Universidade de Munique em 1906, enviado pela Bayerische Akademie der Wissenschaften, para estudar a flora brasileira. Dentre os importantes trabalhos deixados encontra-se a obra “Estudo Botânico do Nordeste”, subsidiada pela Inspetoria Federal de Obras Contra as Secas (1922/1923). Dividida em três volumes, traz em sua última seção, volume de maior importância científica, a classificação da vegetação do nordeste brasileiro e lista das espécies características. O botânico e entomólogo do Museu Paraense Emílio Goeldi, Walter Adolpho Ducke, brasileiro, com vastas publicações sobre leguminosas, foi um mordaz crítico da vida e da obra de Philipp Von Luetzelburg, onde continuamente revisava publicações, sendo comum alterações e correções de nomenclaturas incorretas. O que justifica a coautoria na denominação atual de diversos *taxa* (EGLER, 1963; PAIVA, 2003).

De um total de 15 binômios científicos utilizados para designar as espécies deste gênero, oito nomenclaturas botânicas são oficialmente aceitas pelo International Legume Database and Information Service (ILDIS), compreendendo: *Luetzelburgia auriculata* (Allemao) Ducke; *Luetzelburgia andrade-limae* H.C.Lima; *Luetzelburgia bahiensis* Yakovlev; *Luetzelburgia guassara* Toledo; *Luetzelburgia pallidiflora* (Rizzini) H.C.Lima; *Luetzelburgia praecox* (Harms) Harms; *Luetzelburgia reitzii* Burkart; *Luetzelburgia trialata* (Ducke) Ducke. Sinônimos e nomenclatura em desuso compõem os demais binômios constantes na literatura.

Luetzelburgia spp. tem distribuição exclusivamente no leste e centro do Brasil, com concentração nos estados contemplados pelo bioma de caatinga em uma unidade de vegetação, descrita por Andrade-Lima, 1981, como floresta de caatinga média encontrada também em áreas próximas às serras (Fig 1).

Figura 1. Mapa de Distribuição Global de *Luetzelburgia auriculata*.



Informações fornecidas por Global Biodiversity Information Facility.

Imagem: google maps.

O gênero apresenta características morfológicas marcantes nas espécies que o constituem. Assim é comum encontrar sinapomorfias compartilhadas pelos táxons desse clado, como fruto do tipo sâmara com ala apical com nervação reta e não reticulada e duas pequenas alas laterais ou nervuras sobre o núcleo seminífero. Tais particularidades são também comuns a *Sweetia* (Sophoreae), *Vatairea* e *Vataireopsis* (Dalbergieae), os quais, juntos, formam o clado vataireóide. A semelhança entre tais caracteres origina dificuldade em estabelecer os limites entre os gêneros, como foi evidenciado por autores que descreveram algumas espécies de *Luetzelburgia* dentro de *Vatairea* ou em *Vataireopsis*.

A presença de alas ou nervuras laterais no núcleo seminífero da sâmara agrupa as espécies de *Luetzelburgia* em dois clados distintos. O que foi comprovado através de um estudo cladístico, baseado em caracteres morfológicos, realizado com todas as espécies de *Luetzelburgia* e dos demais gêneros incluídos no clado vataireóide, o qual sustenta o monofiletismo do gênero.

Além das estruturas citadas anteriormente, aspectos morfológicos marcantes são importantes na identificação do gênero, como a combinação de pétalas auriculadas e indumentadas na face externa, estandarte com margem enrugada e ápice inteiro, pétalas laterais simétricas e não diferenciadas em alas e carena, esculturas lamelares presentes em todas as pétalas laterais, estames com filetes levemente condescidos na base, ovário inserido no fundo do hipanto e mesocarpo indistinto ou paleáceo. Outro caráter interessante de *Luetzelburgia*, comum nas espécies de caatinga, é a presença de raízes tuberosas que acumulam água. Tal característica confere a estas espécies a capacidade de manterem as folhas na estação seca, as quais são perdidas apenas durante as fases de floração e frutificação. A margem dos folíolos, às vezes esparsamente crenada a serreada, também pode ser um caráter importante para distinguir vegetativamente algumas espécies de *Luetzelburgia* das demais Sophoreae (PENNINGTON et al., 2001; MANSANO et al. 2004; CARDOSO, 2008).

3.3 *Luetzelburgia auriculata*

Das oito espécies que compõem o gênero, *Luetzelburgia auriculata*(Allemão) Ducke chama a atenção por suas peculiaridades. Trata-se de uma árvore de pequeno a médio porte, podendo chegar a 22 metros de altura quando em ambientes que apresentam recursos favoráveis ao seu desenvolvimento (Fig. 2). Com raízes tuberosas e feculentas, possui madeira clara revestida por casca marrom acinzentada, lisa a rugosa. Suas folhas, imparipinadas com 5-11 folíolos ovais e variavelmente coriáceas, apresentam a face adaxial fortemente verde diferentemente da face oposta. Suas Flores são pequenas revestidas de pétalas brancas com a base rósea, apresentadas em panícula terminal sem cheiro. Seus frutos são do tipo sâmara costada na porção basal do epicarpo.

Figura 2. *Luetzelburgia auriculata* (Allemão) Ducke, Fabaceae.



Árvore em seu habitat. Foto: Haroudo Satiro Xavier, 2010.

A identificação da espécie foi realizada inicialmente por Francisco Freire Allemão e Cysneiro (1797–1874), médico, nascido no Rio de Janeiro, o qual foi Membro do Conselho Real, ministrava curso de botânica médica e princípios elementares de zoologia na Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro. Posteriormente foi professor de botânica das princesas Isabel e Leopoldina (1843). Foi ainda presidente e chefe da seção botânica da Comissão Científica de Exploração (1859-1861), proposta pelo Instituto Histórico e Geográfico Brasileiro, conhecida como "Comissão das Borboletas" percorrendo as províncias do Ceará, Piauí, Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte onde as espécies identificadas foram incorporadas ao acervo do então Museu Imperial e Nacional, no Rio de Janeiro. Seus estudos sobre as espécies vegetais do Brasil eram geralmente enviados à Europa, os quais lhe conferiram a fama de "primeiro fitografista da América do Sul" (FONSECA; MORAIS, 1832-1930).

A espécie tem distribuição reportada no nordeste do Brasil, propagando-se do leste do Maranhão ao Ceará e, para o sul, alcançando Paraíba, Pernambuco e Piauí, nas áreas de

caatinga arbustiva, mais característica da depressão sertaneja setentrional, geralmente em solos arenosos ou pedregosos pouco profundos nas chapadas e encostas de serras. Ainda ocorre em regiões de floresta latifoliada subcaducifolia. Segundo o International Legume Database and Information Service (ILDIS) o táxon em questão possui como sinônimos botânicos: *Tipuana auriculata*Allemão, *Bowdichia freirei*Ducke, *Luetzelburgiapterocarpoides*Harms, *Luetzelburgia brasiliensis* Yakovlev. Como nomenclatura vernácula a literatura traz nomes como guaisara, pau-de-chapada, pau-ripa, pau-serrote, pau-de-mocó e pau-mocó.

Distribui-se também no cerrado de Minas Gerais e São Paulo até o Paraná, na floresta latifoliada semidecídua (LEWIS, 1987;MAIA, 2004;LORENZI, 2008;QUEIROZ, 2009).

Esta espécie chama a atenção ao bioma em que se encontra, por possuir cheiro desagradável, além de manter-se verde durante todo o ano em meio à paisagem seca da caatinga, perdendo as folhas apenas no período de floração (agosto a setembro), a cada dois anos, seguida pela frutificação, o que a caracteriza como perenifólia. Aparentemente as primeiras folhas que surgem no início da estação chuvosa são tóxicas para os animais (MAIA, 2004; QUEIROZ, 2009).

Monk (1966) postulou que o hábito perene (as folhas só caem durante a senescência da planta) é uma adaptação aos habitats com menor teor de nutrientes disponíveis. Em condições de limitação de água, plantas perenifólias que conseguem manterem-se verdes mesmo sob climas desérticos, são capazes de arrefecer o excesso de energia oriundos dos altos níveis de luz saturada, graças, em parte, ao prolongado fechamento dos estômatos, que ao manter alta concentração de carbono internamente (resultado do metabolismo na forma gasosa), funciona como um eficiente dissipador de energia. Características anatômicas e morfológicas das folhas e demais partes do vegetal que reduzem sua exposição aos altos níveis de luminosidade são também importantes no sustento da atividade e sobrevivência da espécie (HAMERLYNCK, HUXMAN, 2009). Estudos mostram que a dominância de espécies perenifólias em ambientes adversos pode ser explicada por possuírem um metabolismo adaptado a uma baixa taxa de perda de nutrientes. O que pode ser explicado, dentre outros motivos, por possuírem tecidos com longo tempo de vida, que requerem uma baixa taxa de nutrientes como caules e raízes, além de uma eficiente ressorção de nutrientes advindos de tecidos senescentes (AERTS, 1995).

3.4 Aplicações e Usos

Dentre os diversos usos dos constituintes da família Fabaceae observa-se em *Luetzelburgia auriculata* diferentes aplicações:

Ornamental: A árvore é extremamente ornamental. A viçosidade de sua copa globosa, formada por folhas verde-escuras brilhantes, a torna ideal para o paisagismo, especialmente para arborização de ruas e avenidas.

Restauração Florestal: Especialmente indicado para a recuperação do solo, combate à erosão e na recomposição da vegetação de áreas degradadas.

Sistemas Agroflorestais: Como componente em faixas arbóreas entre plantações, como árvore de sombra para acompanhar estradas rurais e limites de propriedade. Rejeitado pelo gado como árvore de sombra em pastos. Usado para acelerar o amadurecimento de bananas, as quais são recobertas por suas folhas.

Apicultura: Abelhas utilizam o pólen de suas flores na estação seca.

Importância comercial: Além da utilização como estaca e matéria-prima para lenha, a madeira de coloração clara é utilizada na indústria moveleira para fabricação de móveis de luxo, acabamentos internos e na construção civil.

Alimentação Humana: As raízes tuberosas acumulam amido, fato relatado por Allemão (1864), que por essa razão são procuradas por roedores conhecidos como mocó, de onde deriva seu nome popular. Queiroz (2009) reporta que há relatos de que em uma seca severa na década de 1930, as túberas eram coletadas e moídas, produzindo uma farinha semelhante à de tapioca utilizada com fins nutricionais (MAIA, 2004).

3.5 Fitoconstituintes e Atividades Biológicas

Dentre as classes de substâncias químicas que se distribuem na família das leguminosas é possível encontrar diversos compostos resultantes de seu metabolismo secundário, utilizados como defesa química, contra fatores que causam algum tipo de estresse ao seu desenvolvimento. Através do mapeamento da ocorrência de compostos majoritários em Fabaceae, pôde-se observar a presença de vários tipos de alcaloides, aminas, flavonoides,

isoflavonas, cumarinas, fenilpropanoides, antraquinonas, di, sesqui e triterpenos, glicosídeos cianogênicos e lecitinas (WINK, 2003).

De modo geral estes podem ser divididos em dois grandes grupos: Metabólitos secundários nitrogenados e não nitrogenados. O primeiro grupo pode ser representado por alcaloides pirrolizidínicos, quinolizidínicos e aminoácidos não proteicos, por exemplo. Algumas destas substâncias são importantes marcadores químicos restritos a determinada subfamília, o que facilita sua padronização do ponto de vista químico. É o que acontece com a albizziina e a canavanina. A primeira é característica de espécies de Momosideae e a última utilizada para compilação filogenética em Papilionoideae. A canavanina exibe potente atividade antimetabólica em vírus, seres procariontes e animais em geral. Essa propriedade pode ser encontrada em diversas espécies de Papilionoideae que a utilizam para defender-se de ataques de micro-organismos e/ou herbívoros (WINK, 2003; MAKKAR et al., 2007).

O segundo grupo, formado por substâncias que não possuem nitrogênio em sua composição química, pode ser representado por flavonoides, proantocininas, cumarinas e furanocumarinas e terpenoides.

Compostos cumarínicos apresentam grande importância na defesa vegetal por conta de sua característica de deterência alimentar (também presente em saponinas, alcaloides e flavonoides) que desestimula sua ingestão por herbívoros. Estas substâncias são muito comuns em espécies de Apiaceae, porém restritas a algumas Papilionoideae como *Amburana cearenses* (LEITE, 2004). Os terpenos encontram-se distribuídos por toda família Fabaceae, mais especificamente a classe dos triterpenos e saponinas esteroidais (incluindo glicosídeos cardiotônicos), os quais são importantes compostos de defesa contra micro-organismos e animais fitófagos. Flavonoides como vitexina, por exemplo, são reportados em espécies desta subfamília como em *Lupinus lanatus* Benth (FILHO, 2004). Isoflavonoides e seus derivados fitoalexinas pterocarpanos são característicos da subfamília Papilionoideae, como os presentes em *Erythrina subumbrans* (VENTURA, 2010). Estes compostos apresentam atividade antibacteriana contra diferentes cepas de micro-organismos resistentes, como *Staphylococcus* sp. Esta classe de substâncias obtida a partir da biotransformação de isoflavonas é capaz de inibir muitos micro-organismos. O que explica o fato de que todos os relatos de pterocarpanos com atividade antifúngica e antibacteriana encontrados na literatura são de origem natural (PHILLIPS; KAPULNIK, 1995).

Uma vasta lista de Papilionoideae já possui respaldo científico sobre a atividade antimicrobiana, como em *Sesbania grandiflora* (L.) PERS (VIPIN, 2011), *Erythrina*

velutina Willd (VIRTUOSO, 2005), *Lupinus lanatus* Benth (FILHO, 2004), *Pterodon emarginatus* Vogel (SANTOS AP, 2010), dentre outras.

De uma forma geral, os compostos fenólicos possuem ação efetiva contra vírus, bactérias e fungos. Flavonoides agem por interação celular em diferentes alvos.

Compostos terpênicos possuem atividades terapêuticas contra bactérias, fungos, vírus e protozoários devido ao caráter lipofílico de suas moléculas facilitando a interação da membrana com estes compostos, ocasionando a desorganização e ruptura da membrana citoplasmática (DEMO, 2008).

Diversas publicações têm demonstrado também a atividade de tais substâncias com potencial atividade inibitória de carcinogênese, sendo úteis tanto no tratamento, quanto na prevenção das neoplasias (YANG et al., 2001). Como os trabalhos realizados com os derivados cumarínicos presentes em *Garcinia hanburyi* Hook (SIMÕES et al., 2007) ou estudos de ação antiproliferativa de compostos flavonoídicos em melanomas de ratos (CALTAGIRONE et al., 2000) ou ainda atividade de substâncias terpênicas em *Clitoria ternatea* Linn (KUMAR; BHAT, 2011).

Pesquisas químicas específicas sobre plantas do gênero *Luetzelburgia* foram iniciadas há pouco tempo. Os Estudos fitoquímicos em *Luetzelburgia auriculata* evidenciaram a presença de Lecitinas (lecitina 123.5-kDa) e isoflavonas (5-7-di-OH-4'-Ome-isoflavona e a 5,7-de-OH-2', 4'-di-Ome-isoflavona) presentes nas sementes (KING, GRUNDON, NEIL, 1952; BRAZ FILHO et al., 1973; MELO et al., 2005). Não foi encontrado na literatura um estudo fitoquímico que identifique as classes de metabólitos secundários majoritários presentes nas demais partes desta espécie.

Diferentes atividades biológicas, como anti-inflamatória, inseticida, antifúngica e antineoplásica foram relatadas para os frutos da espécie em questão, no entanto, sem referência a testes voltados às outras partes do táxon (MELO et al, 2005; ALENCAR et al., 2009; SOUZA et al. 2011, ; FERREIRA et al., 2011).

Apesar do conhecimento e utilização das espécies do gênero *Luetzelburgia* do ponto de vista etnobotânico, constatou-se a escassez de pesquisas científicas que determinem aspectos farmacognósticos da espécie, necessários para que seja padronizada morfoanatomicamente e seus constituintes fitoquímicos prospectados. A partir da definição destes aspectos, torna-se possível encontrar uma relação de causa e efeito entre as atividades biológicas e as classes de substâncias presentes, sendo este o propósito deste trabalho.

Assim, diante da grande diversidade de metabólitos secundários observados na sua família e subfamília, *Luetzelburgia auriculata* representa potencial fonte de pesquisa para realização de um trabalho inédito dentro do gênero.

Capítulo I

Artigo Submetido à Revista Brasileira de Farmacognosia.

Diagnose Morfoanatômica de folha e raiz de *Luetzelburgia auriculata* (Allemão) Ducke

RESUMO:

Luetzelburgia auriculata(Allemão) Ducke, Fabaceae, da subfamília Papilionoideae, é conhecida como pau-mocó. Com notória toxicidade foliar, apresenta em suas raízes amido, usado em períodos de seca como fonte nutritiva. Este trabalho objetiva uma diagnose macro e microscópica da raiz e folhas. Amostras foram coletadas em São José do Espinharas-PB e analisadas por meio de microtécnicas usuais. Apresenta raízes tuberosas. Folhas alternas espiraladas, estipuladas, compostas imparipinadas; com pecíolo de 2,4 a 4 cm. Em vista transversal, a raiz apresenta grupos de esclerênquima no floema e no xilema. Grãos de amido no parênquima cortical. Feixes xilemáticos em número de sete com raios medulares de até três células de largura. Pecíolo com grande feixe vascular colateral central e dois menores laterais na face adaxial com xilema voltado perpendicularmente ao grande feixe. A folha é hipostomática, com estômatos, dos tipos, paracítico, anomocítico e anisocítico. As paredes anticlinais são levemente sinuosas em ambas as faces. O mesofilo é dorsiventral com quatro camadas de paliádico e quatro de esponjoso, sem espaços intercelulares. O feixe vascular da nervura principal é colateral aberto e colênquima angular nas costelas. Este manuscrito tem um importante papel na diagnose morfoanatômica da espécie, tendo em vista a escassez de estudos sobre o gênero.

Palavras-chave: Fabaceae, *Luetzelburgia auriculata*, Morfoanatomia, Pau-mocó.

1 Introdução

A família Leguminosae se destaca entre os taxa encontrados na caatinga no nordeste do Brasil, apresentando indivíduos autóctones deste bioma, o único exclusivamente brasileiro (Silva et al., 2003). Representa quase um terço do total de espécies que compõem este ecossistema, com 293 delas distribuídas em 77 gêneros (Queiroz, 2006). As leguminosas apresentam grande potencial econômico, sendo largamente utilizadas como alimento, forragem, fibras, corantes, gomas, resinas, óleos, adubação verde, dentre outros usos (Watson & Dallwitz, 1992).

O gênero *Luetzelburgia* apresenta 13 espécies, com uma variedade, segundo o Tropicos® do Missouri Botanical Garden em 2012, 10 espécies segundo Cardoso (2010), e 8 espécies segundo o International Legume Database and Information Service (ILDIS,

2011), com distribuição exclusivamente no leste e centro do Brasil, concentrada nos estados que apresentam vegetação de caatinga, caracterizada por Andrade-Lima (1981) como Floresta de Caatinga Média, encontrada, também, em serras e montanhas. A espécie *Luetzelburgia auriculata* é uma árvore de madeira alva, raízes tuberosas e podem atingir dez metros de altura. Seu endemismo é reportado para o nordeste do Brasil, distribuindo-se do leste do Maranhão ao Ceará e, para o sul, alcançando os estados da Paraíba, Pernambuco e Piauí.

Popularmente conhecida por guaisara, pau-de-chapada, pau-ripa, pau-serrote, pau-de-mocó e pau-mocó, é utilizada com fins ornamentais (Maia, 2004), na produção de móveis e como fonte de pólen para a produção apícola. Queiroz (2009) faz citação de trabalhos que reportam que em uma seca severa na década de 1930, as túberas eram cortadas e moídas, produzindo uma farinha semelhante à da tapioca e utilizada com fins nutricionais em períodos de escassez de recursos hídricos.

Existem relatos de toxicidade para suas folhas jovens fornecidas para animais após o período chuvoso; apesar disso, a literatura documenta a utilização destas folhas para acelerar o amadurecimento de frutos, como bananas (Mello et al., 2010; Queiroz, 2009).

Estudos químicos de *L. auriculata* evidenciaram a presença de lecitinas e isoflavonas (5-7-di-OH-4'-Ome-isoflavona e a 5,7-di-OH-2',4'-di-Ome-isoflavona) presentes nas sementes (King, Grundon, Neil, 1952; Braz Filho et al., 1973), sem, no entanto, realizar estudos fitoquímicos mais aprofundados quanto a constituição dos grupos de metabólitos secundários presentes nas demais partes do vegetal. Diferentes atividades biológicas, anti-inflamatórias, inseticidas ou antifúngicas, foram relatadas para os frutos (Melo et al., 2005; Soares et al. 2007; Alencar et al., 2009; Ferreira et al., 2011; Souza et al., 2011).

Devido aos escassos estudos sobre a espécie, o objetivo deste trabalho foi realizar um diagnóstico macroscópico e microscópico da raiz e folhas de *L. auriculata*, a fim de contribuir para um controle de qualidade farmacognóstico das espécies que compõem a Flora Brasileira.

2 Material e Métodos

2.1 Material Vegetal

Amostras de folha e raiz de *Luetzelburgia auriculata* foram coletadas, em outubro de 2010, no município de São José de Espinharas, no estado da Paraíba (Brasil), na microrregião de Patos (6°52'11,4''S / 37°17'22,87''W, a 239 m de altitude). Este município possui clima quente e seco e está incluído no semiárido brasileiro, com vegetação de caatinga. A exsicata encontra-se depositada no Herbário IPA - Dárdano de Andrade Lima, pertencente ao Instituto Agrônomo de Pernambuco, sob o número 87183.

A descrição e a classificação das estruturas morfológicas foliar seguiram a terminologia de Radford (1974) e a classificação do tipo de venação seguiu Hickey (1979).

O material foi fixado em FAA50 (Johansen, 1940) e, posteriormente, confeccionadas lâminas histológicas semipermanentes, de secções transversais e paradérmicas, seguindo procedimentos usuais em anatomia vegetal (Johansen, 1940; Sass, 1951).

As secções transversais da raiz e da região mediana da lâmina foliar foram obtidas, à mão livre, usando lâmina comum de barbear e, como material de suporte, medula do pecíolo de embaúba (*Cecropiasp.*). Porções da lâmina foliar foram diafanizadas em solução de hipoclorito de sódio a 30% e coradas com safranina e azul de astra (Johansen, 1940) para análise das células epidérmicas em vista frontal.

A classificação dos estômatos e tricomas seguiu Metcalfe & Chalk (1950). As análises foram realizadas em imagens digitais capturadas por microscópio óptico (*Olympus*) acoplado com câmera digital (*Sony*); a densidade estomática foi determinada através do uso de programa de análise de imagens, *Image Tool 3.0* (Wilcox et al., 2002).

3 Resultados e Discussão

3.1 Diagnose Macroscópica

A raiz de *Luetzelburgia auriculata* é tuberosa, apresenta tronco de 40 cm de diâmetro, revestido por casca acinzentada com ritidoma escamoso. Folhas alternas, espiraladas, estipuladas, compostas imparipinadas, com 5-11 folíolos de forma variável (ovalados até elípticos à oblongos), subopostos a alternos, de margens subcrenadas, subcoriáceos, glabros, com a nervura principal imersa na face superior e proeminente na inferior, ápice obtuso e emarginado, base arredondada a ligeiramente cordada, glabros ou esparsamente pubérulos na face abaxial, reticulados nas duas faces; de 5 a 9 cm de comprimento por 3 a 4 cm de largura; com pecíolo de 2,4 a 4 cm; raque de 2,5 a 6 cm. Panículas de 5 a 15 cm de comprimento, ramos densamente pubérulos, tricomas acinzentados; unidades da inflorescência racemos, os basais ca. 4 a 5 cm; pedicelo com 2 mm de comprimento. O fruto é tipo sâmara, seco, indeiscente, glabro (Figura 1).

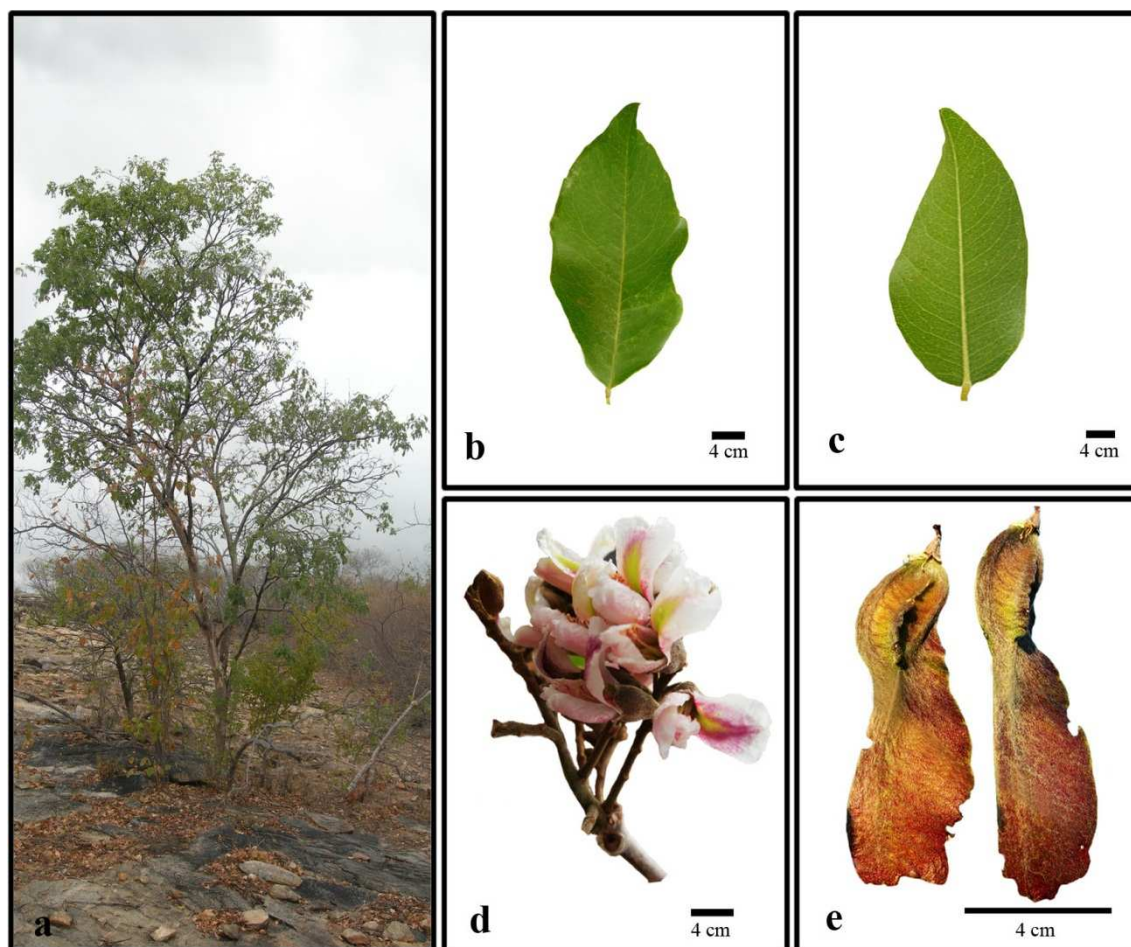


Figura 1. *Luetzelburgia auriculata* (Allemão) Ducke, Fabaceae. a. Árvore inserida em seu habitat. b. Vista adaxial da folha. c. Vista abaxial da folha. d. Detalhe das flores. e. Fruto tipo sâmara.

3.2 Diagnose Microscópica

3.2.1 Raiz

A raiz, em estrutura secundária, está revestida por periderme, com células do súber achatadas periclinalmente. No parênquima cortical são encontrados grupos de fibras distribuídos em diferentes níveis, em faixas curtas com disposição periclinal (Figura 2a). As células parenquimáticas do córtex apresentam grande quantidade de grãos de amido em seu interior (Figura 2b). O cilindro central apresenta feixes vasculares do tipo colateral dispostos radialmente e separados por raios parenquimáticos contendo fileira de até três células de

espessura. Na área do xilema são encontrados grupos de fibras com estrutura e disposição semelhante àquela encontrada no córtex. Na região medular são encontradas células de xilema primário.

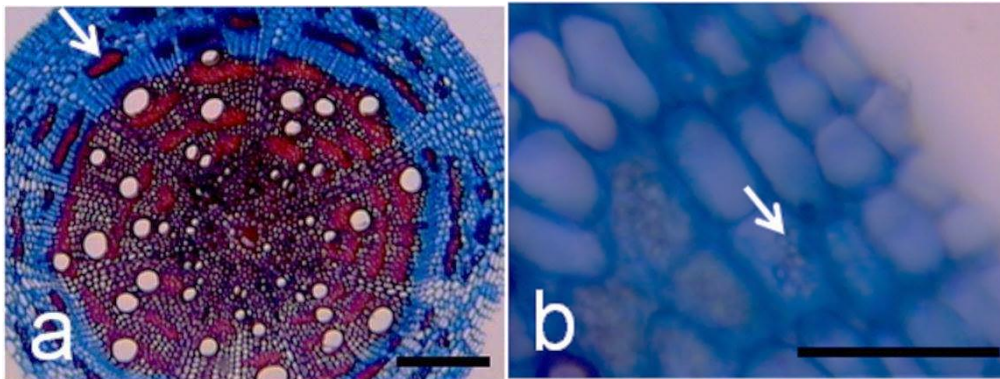


Figura 2. Raiz de *Luetzelburgia auriculata* (Allemão) Ducke (Fabaceae). a. Estrutura secundária mostrando faixas de fibras de esclerênquima (seta); b. Parênquima cortical contendo grãos de amido em seu interior (seta). Barras: a = 200 µm; b = 50 µm.

3.2.2 Folha

Pecíolo

O pecíolo apresenta contorno ligeiramente reniforme (Figura 3a), revestido por epiderme simples e uniestratificada. Na região adaxial do córtex são observados dois diminutos feixes vasculares laterais, um de cada lado, circundados por grande quantidade de fibras de esclerênquima (Figura 3a). Estes dois feixes menores estão dispostos perpendicularmente ao feixe maior e central (Figura 3b).

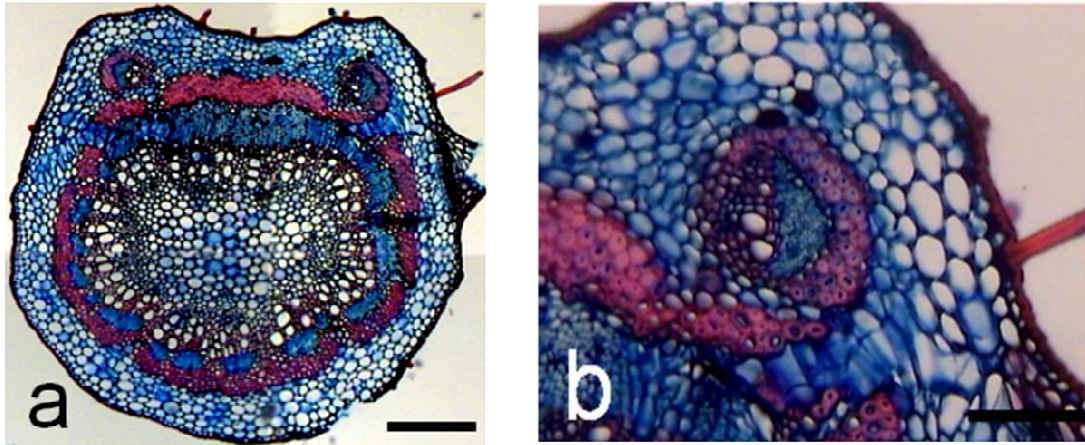


Figura 3. Pecíolo de *Luetzelburgia auriculata* (Allemão) Ducke (Fabaceae). a. Vista transversal mostrando contorno reniforme; b. Detalhe do feixe vascular lateral, em sentido perpendicular ao feixe maior, revestido por fibras de esclerênquima. Barras: a = 200 μm ; b = 100 μm .

Lâmina Foliar

A lâmina foliar, em vista frontal, apresenta células da epiderme com paredes anticlinais levemente sinuosas em ambas as faces (Figura 4ab). Tricomas tectores simples unisseriados (Figura 4ab), constituídos por paredes delgadas, ocorrem em ambas as faces da epiderme. A base dos tricomas é composta por células relativamente pequenas e as células apicais são alongadas com ápice agudo. Foram observados estômatos dos tipos paracítico, anomocítico e anisocítico, mais frequentes na superfície abaxial, caracterizando a folha como hipoestomática (Figura 4b).

Em secção transversal, a lâmina foliar é revestida por epiderme unisseriada, revestida por cutícula espessada, com células da face adaxial comparativamente maiores do que aquelas da face abaxial (Figura 4cd). Os estômatos estão localizados em leve depressão, apresentando reduzida câmara subestomática (Figura 4d, seta). O mesofilo é dorsiventral, consistindo de, aproximadamente, 4-5 camadas de parênquima paliçádico imediatamente abaixo da face adaxial da epiderme, representando 60 a 80% da altura do parênquima fotossintético, seguido

de duas camadas de parênquima esponjoso, com reduzidos espaços intercelulares (Figura 4cd).

O feixe vascular da nervura principal é do tipo colateral aberto, apresentando células de colênquima angular na costela inferior, próximas à face abaxial da epiderme (Figura 4d). O feixe vascular está circundado por fibras de esclerênquima.

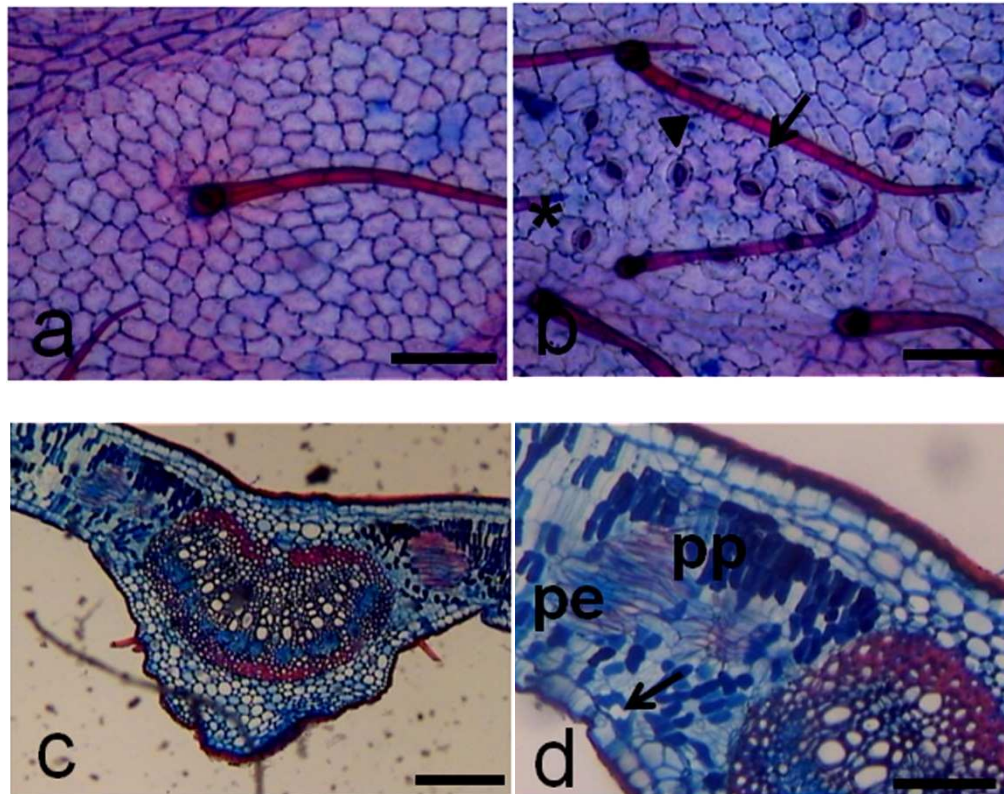


Figura 4. Folha de *Luetzelburgia auriculata* (Allemão) Ducke (Fabaceae). A. Face adaxial da lâmina foliar; b. Face abaxial da lâmina foliar mostrando estômatos paracíticos (*), anisocíticos (▼) e anomocíticos (seta); c. Nervura principal em vista transversal; d. Mesofilo dorsiventral, mostrando parênquima paliçádico (pp) e esponjoso (pe) e estômato com diminuta câmara subestomática (seta). Barras: a,b e d = 100 μ m, c = 200 μ m.

Os caracteres relativos à morfologia externa de *Luetzelburgia auriculata* observados neste estudo confirmam as descrições de diversos autores (Lewis, 1987; Maia, 2004; Lorenzi, 2008; Cardoso et al., 2008; Queiroz, 2009) para a raiz e folhas.

Metcalf & Chalk (1950) descrevem caracteres anatômicos típicos para a família Fabaceae, como a presença de tricomas não-glandulares, epiderme comumente caracterizada

pela ocorrência de forte sinuosidade nas paredes anticlinais, estômatos paracíticos, anomocíticos e anisocíticos, além de mesofilo dorsiventral. Estes autores mencionam características típicas para espécies do gênero *Luetzelburgia*, tais como a ocorrência de tricomas tectores simples, unisseriados, com curtas células basais acompanhadas por uma única célula terminal alongada, corroborando os resultados obtidos neste estudo.

Na raiz, há presença de amido no interior de células parenquimáticas do córtex, onde o processo de tuberização é resultante da proliferação do tecido parenquimático cortical, fato também considerado para *Smallanthus sonchifolius* (Poepp.) H. Rob. (Asteraceae) (Machado et al., 2004).

As fibras de esclerênquima presentes no parênquima cortical e as células de xilema com distribuição concêntrica em diferentes níveis são também descritas para outros gêneros de Papilionoideae, como *Derris*, *Lonchocarpus*, *Millettia*, *Pongamia* e *Wistaria*, onde o esclerênquima perivascular ocorre sob a forma de anel descontínuo (Teixeira & Gabrielli, 2000).

Segundo Mabagwu (2006), a presença de numerosos feixes vasculares observados neste táxon pode ser uma vantagem ecológica, permitindo à espécie um hábito perene, fato também encontrado em espécies do gênero *Vigna* (Papilionoideae).

Fatores ambientais como disponibilidade de luz e água, concentração de nutrientes no solo, tipo de relevo, altitude, clima, entre outros, influenciam, diretamente, na expressão de características morfológicas e anatômicas da folha (Gluzezak, 2005).

Folha hipoestomática, reduzida área foliar, grande densidade de tricomas, cutícula e lâmina foliar espessadas, com maior número de camadas de parênquima paliçádico e células epidérmicas de tamanho reduzido estão associadas a estratégias que permitem uma redução na perda de água em espécies estabelecidas em ambientes com forte incidência luminosa, como foi encontrado na espécie em estudo, a qual ocorre na caatinga (Lewis, 1972; Berlyn; Miksche,

1976; Ashton; Berlyn, 1992; Thompson, Kriedemann, Craig, 1992; Fahmy, 1997; Smith et al., 1997; Marques, Garcia, Fernandes, 1999; Hanba, Kogami, Terashima, 2002; Hlwatika, Bhat, 2002).

Características estruturais como cutícula espessada, estômatos em ambas as superfícies e em depressão, presença de hipoderme ou epiderme multisseriada, elevada densidade de tricomas, tecido de armazenamento de água e mesofilo simétrico são indicativos de alternativas de adaptação a solos com reduzida disponibilidade de água. Estes caracteres permitem que a espécie possa se desenvolver em condições de escassez de recursos, o que permite classificá-la como xerófita (Roth, 1984; Fahn; Cutter, 1992; Fahmy, 1997).

A diagnose das características morfo-anatomicas de *Luetzelburgiaauriculata* permite uma correta identificação da espécie, contribuindo para o seu controle de qualidade farmacognóstico.

4 Referências

- Alencar NMN, Oliveira RSB, Figueiredo JG, Cavalcante IJM, Matos MPV, Cunha FQ, Nunes JVS, Bomfim LR, Ramos MV 2009. An anti-inflammatory lectin from *Luetzelburgiaauriculata* seeds inhibits adhesion and rolling of leukocytes and modulates histamine and PGE2 action in acute inflammation models. *Inflamm. Res.* DOI 10.1007/s00011-009-0092-9.
- Andrade-Lima D 1981. The Caatingas dominium. *Rev. bras. Bot.* 4: 149-163.
- Ashton PMS, Berlyn GP 1992. Leaf adaptations of some *Shorea* species to sun and shade. *New Phytol*, Cambridge, v. 121, p. 587-596.
- Berlyn GP, Miksche JP 1976. Botanical Microtechnique and Cytochesmistry. Ames, *The Iowa state Press*, 326p.
- Braz Filho R, Gottlieb OR, Pinho SLV, Monte FJQ, Rocha AI da 1973. Flavonoids from Amazoniam Leguminosae. *Phytochemistry*, 12 (5): 1184-6,
- Cardoso DBOS 2010. *Luetzelburgia* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB029739>, acesso em setembro de 2011.

- Cardoso DBOS 2008: *Taxonomia da tribo Sophoreae s.l. (Leguminosae, Papilionoideae) na Bahia, Brasil*. Feira de Santana, 209 p. Tese de Doutorado, Pós graduação em Botânica, Universidade Estadual de Feira de Santana.
- Cardoso DBOS, Queiroz LP de, Lima HC 2008. Three new species of *Luetzelburgia* (Leguminosae, Papilionoideae) from the caatinga of Bahia, Brazil and an identification key to all species of the genus. *Kew Bulletin*, v. 63, p. 289-300.
- Fahmy GM 1997. Leaf anatomy and its relation to the ecophysiology of some nonsucculent desert plants from Egypt. *J Arid Environ*, London, v, 36, p. 499 – 525.
- Fahn A & Cutler D F 1992. *Xerophytes. Gebrüder Borntraeger*. Berlin:Stuttgart.
- Ferreira PMP, Farias DF, Viana MP, Souza TM, Vasconcelos IM, Soares BM et al 2011.. Study of the Antiproliferative Potential of Seed Extracts from Northeastern Brazilian Plants. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 83(3): 1045-1058.
- Gluzezak RM 2005. *Morfoanatomia Foliar de Miconia sellowiana Naudin (Melastomataceae) em Diferentes Formações Vegetacionais no Estado do Paraná, Brasil*. Curitiba, 75p. Dissertação de Mestrado, Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal do Paraná.
- Hanba YT, Kogami H, Terashima I 2002. The effect of growth irradiance on leaf anatomy and photosynthesis in *Acer* species differing in light demand. *Plant Cell Environ*, Oxford, v. 25, p. 1021 – 1030.
- Hickey LJ 1979. A Revised classification of the architecture of dicotyledonous leaves. In: Metcalfe, C.R.; Chalk, L. (Edit.) *Anatomy of the Dicotyledons*. v. I. 2a ed. Oxford, Claredon Press, pp. 25-39.
- Hlwatika CNM., Bhat RB 2002. An Ecological Interation. *Annals of Botany*, London, v. 89, p. 109-114.
- ILDIS. *International Legume Database and Information Service*. <http://www.ildis.org/LegumeWeb?version~10.01&LegumeWeb&tno~8909&genus~Luetzelburgia&species~brasiliensis>, access in September 2011.
- Johansen DA 1940. *Plant microtechnique*. New York: MacGraw-Hill Book Company.
- King FE, Grundon MF, Neil KQ 1952. The chemistry of Extractives from Hard-Woods. Part X. The constitution of Ferreiin and of Homoferrein. *J Chem Soc* 192.
- Kraus JE, Arduin M 1997. *Manual Básico De Métodos em Morfologia Vegetal*. Seropédica, Edur.
- Lewis GP 1987. *Legumes of Bahia*. Whitstasble: The Royal Botanic Garden.
- Lewis MG 1972. The physiological significance of variation in leaf structure. *Sci ProgJournal*, Northwood, v.60, p. 25–51.

- Lima HC 1989-1990. *Tribo Dalbergieae (Leguminosae -Papilionoideae) - morfologia dos frutos, sementes e plântulas e sua aplicação na sistemática*. Rio de Janeiro: Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro 30:1-42.
- Lima MPM 1985. Morfologia dos frutos e sementes dos gêneros da tribo Mimoseae (Leguminosae - Mimosoideae), aplicada à sistemática. *Rodriguésia* 37:53-78,.
- Lorenzi H 2008. *Árvores Brasileiras*. Instituto Plantarum. Nova Odessa – SP: Vol. 01 5º Ed.
- Machado SR, Oliveira DMT, Dip MR, Menezes NL 2004. Morfoanatomia do sistema subterrâneo de *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson (Asteraceae). *Rev Bras Bot* 27:115-123.
- Maia G.N 2004. *Caatinga arvoredas e arbustos e suas utilidades*. São. Paulo: D&Z Computação Gráfica e Editora, 1 Ed, 413 p.
- Marques AR, Garcia QS, Fernandes GW 1999. *Effects of sun and shade on leaf structure and sclerophylly of Sebastiania myrtilloides (Euphorbiaceae) from Serra do Cipó*. São Paulo: Boletim Botânico, v.18, p. 21-27.
- Mbagwu FN & Edeoga HO 2006. Anatomical Studies on the roots of some *Vigna* savi species (Leguminosae-Papilionoideae). *Agric Journal* 1 (1): 8-10.
- Mello GWS, Oliveira DM, Carvalho CJS, Cavalcante MVFL, Costa FAL, Riet-Correa F, Silva SMMS 2010. Poisoning of goats by the pods of *Luetzelburgia auriculata*. *Toxicon* 55 1115–1118.
- Melo VMM, Vasconcelos IM, Gomes VM, Cunha MD, Soares AA, Oliveira, JTA 2005. A cotyledonary agglutinin from *Luetzelburgia auriculata* inhibits the fungal growth of *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani* and *Aspergillus niger* and impairs glucose-stimulated acidification of the incubation medium by *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Plant Sci Journal* (169) 629–639.
- Metcalf CR, Chalk L 1950. *Anatomy of the dicotyledons*. Oxford: Clarendon Press. v. 2.
- Queiroz LP de 2009. *Leguminosas da caatinga*. Bahia: Universidade Estadual de Feira de Santa.
- Queiroz, L. P. 2006. The Brazilian Caatinga: Phytogeographical Patterns Inferred from Distribution Data of the Leguminosae. In: Pennington RT, LEWIS GP & RATTER JA. Neotropical Caatingas and Dry Forests: Plant Diversity, Biogeography, and Conservation. Boca Raton, FL, Taylor & Francis CRC-Press.
- Radford AE, Dickison WC, Massey JR, Bell CR 1974. *Vascular plant systematics*. New York: Harper and Row p.877.
- Roth I 1984. *Stratification of tropical forest as seen in leaf structure. Tasks for vegetation science* 6. Junk, the Hague, Boston, Lancaster: Ed. H. Lieth,.
- Tabarelli M & Silva JMC (org), 2003: *A Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação*. Ministério do Meio Ambiente.

- Sass JE 1951. *Botanical Microtechnique*. Iowa: The Iowa State College Press.
- Smith WK, Vogelmann TC, Delucia EH, Bell, Shepherd KA 1997. *Leaf form and photosynthesis: Do leaf structure and orientation interact to regulate internal light and carbon dioxide?* Washington: Bioscience v. 47 (11), p. 785-793.
- Soaresa EL, Freitas Cle´verson DT, Oliveiraa JS, Sousab PAS, Sales M P, Barreto-Filhoa JDM, Bandeiraa GP, Ramosa MV 2007. Characterization and insecticidal properties of globulins and albumins from *Luetzelburgia auriculata* (Allemão) Ducke seeds towards *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *Jour Stored Prod Res* 43 459–467.
- Souza Tm, Farias Df, Soares Bm, Viana Mp, Lima Gp, Machado Lk, Morais Sm, Carvalho Af 2011. Toxicity of Brazilian plant seed extracts to two strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and nontarget animals. *J. Med. Entomol.* 48(4):846-851.
- Teixeira SP, Gabrielli AC 2000. Anatomia do eixo vegetativo de *Dahlstedtiapinnata* (Benth.) Malme e *D. pentaphylla* (Taub.) Burk. (Leguminosae, Papilionoideae). *Rev Bras Bot* v.23, n.1, p.1-11.
- Thompson WA, Kriedemann PE, Craig IE 1992. Photosynthetic Response to light and nutrients in sun-tolerant and shade-tolerant rainforest trees. I. Growth, leaf anatomy and nutrient content. *Aust J Plant Physiol.* Collingwood, v. 19, p. 1–18.
- Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. Disponível em: <http://www.tropicos.org>. Consultado em: 19 de julho de 2012.
- Watson L, Dallwitz, MJ 1992. The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. Version: 18th May 2012. Disponível em: <http://delta-intkey.com>. Acesso em: 04/2012.
- Wilcox DB, Dove D, McDavid DG 2002. *Image Tool*. University of Texas Health Science Center, Texas.

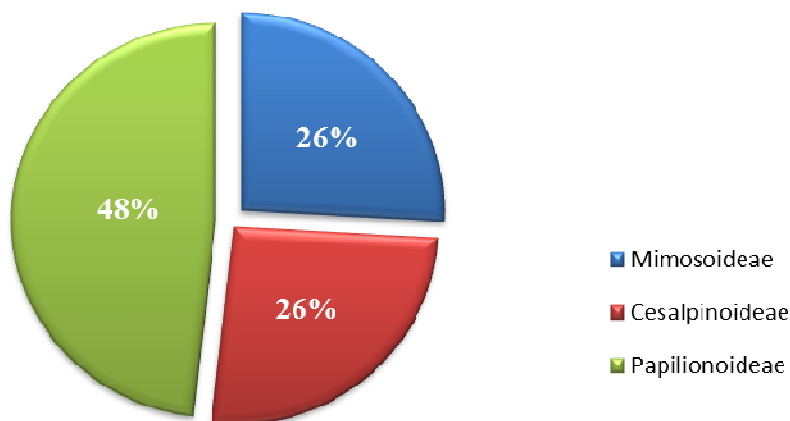
Capítulo II

Perfil Fitoquímico e Biológico de *Luetzelburgia auriculata*

1 Introdução

Fabaceae (Leguminosae) constitui a terceira maior família de angiospermas, depois da Orchidaceae e Asteraceae, e encontra-se comumente dividida em três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae. Do total de leguminosas distribuídas na caatinga 48% (41 gêneros) pertencem à sub-família Papilionoideae (Faboideae), considerada uma das mais numerosas (Fig. 1) (BENTHAM, 1865; POLHILL et al., 1981; LEWIS et al., 2005).

Figura 1 - Distribuição das subfamílias de Fabaceae na Caatinga.



Fonte: Informações extraídas de Córdula (2008).

As leguminosas caracterizam-se quimicamente por possuir uma panóplia de substâncias, resultantes de seu metabolismo secundário, divididas, de um modo geral, em dois grandes grupos: Metabólitos secundários nitrogenados, que compreende diferentes tipos de alcaloides, aminoácidos não proteicos e aminas, e os metabólitos secundários não nitrogenados, que inclui flavonoides, isoflavonas, cumarinas, fenilpropanoides, antraquinonas, di, sesqui e triterpenos, glicosídeos cianogênicos e lecitinas (WINK, 2003; WINK; MOHAMED, 2003). Algumas substâncias destas classes podem ser utilizadas como marcadores químicos das subfamílias. Do primeiro grupo pode-se citar a canavanina, um aminoácido não protéico utilizado para compilação filogenética em Papilionoideae, que exibe potente atividade antimetabólica em vírus, bactérias e animais em geral devido ao seu mecanismo de ação, agindo primariamente como um antagonista de arginina, onde é incorporada ao interior do núcleo celular interferindo na formação do ácido desoxirribonucleico (DNA) e ribonucleico (RNA). Testes realizados com macacos mostraram

ser responsável por causar anormalidades hematológicas e sorológicas, semelhantes ao lúpus eritematoso em humanos por provocar a despolarização de membrana em células autoimune β (MAKKAR et al., 2007; WINK, 2003). Do segundo grupo, como marcadores da subfamília Papilionoideae tem-se isoflavonoides e derivados, incluindo diversas fitoalexinas, do tipo pterocarpano. Substâncias desta classe, isoladas de *Erythrina subumbrans* (Papilionoide), por exemplo, apresentam atividade antibacteriana contra diferentes cepas de micro-organismos resistentes, como *Staphylococcus sp* (VENTURA, 2010).

Há aproximadamente 50 anos, desde o surgimento das primeiras cepas de *Staphylococcus aureus* (produtoras de penicilases), resistentes às penicilinas recém-chegadas ao mercado, a indústria farmacêutica iniciou uma busca por alternativas de tratamento para debelar micro-organismos resistentes, os quais têm crescido quase que proporcionalmente à quantidade de antibióticos descobertos (NASCIMENTO et al., 2000). Em 1997, Baquero e Blázquez já discutiam o perigo do retorno a uma era pré-antibiótico, considerando, particularmente, que nenhuma nova classe de antibiótico havia sido descoberta até então.

Assim, compostos bioativos, resultantes do metabolismo secundário vegetal, produzidos em resposta a fatores de estresse de origem biótica ou abiótica, constituem uma promissora fonte de agentes terapêuticos incluindo antimicrobianos (CHUNG P.Y., NAVARATNAM; CHUNG L.Y., 2011).

Importantes atividades farmacológicas são encontradas em espécies de Papilionoideae. Compostos cumarínicos, flavonoídicos e terpênicos são indicados por numerosos estudos científicos como responsáveis por atividades antimicrobianas contra numerosas cepas de micro-organismos Gram positivos e Gram negativos (VIRTUOSO et al., 2005; SANTOS et al., 2010; VINOTH et al., 2011). Estudos recentes mostram ainda importante atividade citotóxica referida a estes compostos, contra diferentes linhagens de células tumorais humanas testadas (RUKACHAISIRIKUL et al., 2007; NETTO et al., 2010; WONG, KADIR, LING, 2011).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2012 e o subsequente, mostram a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer, o que evidencia a problemática do tema no país. Sem os casos de câncer da pele não melanoma, estima-se um total de 385 mil casos novos. Os tipos mais incidentes serão os cânceres de pele não melanoma (mais incidente 134 mil casos novos), seguido pelos tumores de próstata (60 mil), mama feminina (53 mil), cólon e reto (30 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (18 mil) (BRASIL, 2011).

Baseado nisso, o Instituto Nacional do Câncer, a partir de pesquisas e informações epidemiológicas sobre as linhagens de células neoplásicas de maior prevalência no Brasil,

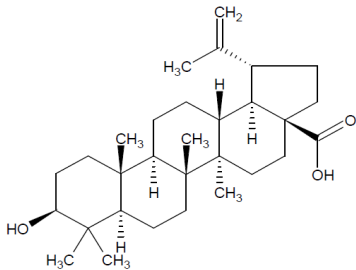
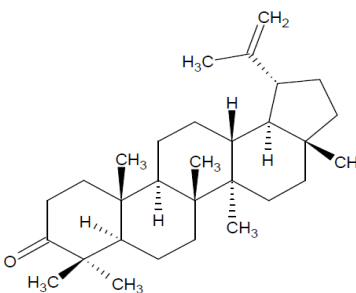
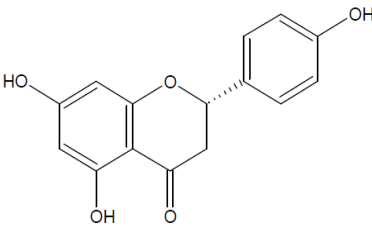
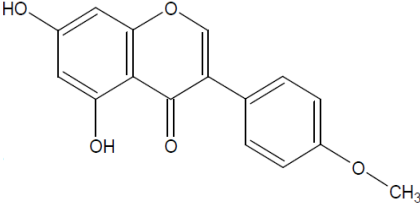
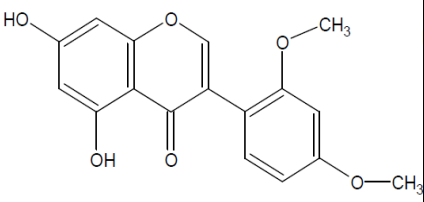
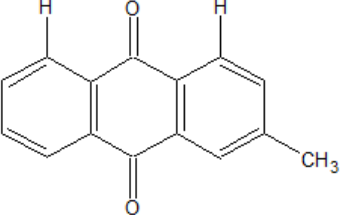
indica que o câncer de pulmão, um dos tipos de neoplasias mais comuns e susceptíveis a metástases, apresenta um aumento anual de 2% em sua incidência mundial, com maior predominância em homens (8,8%). O câncer de cólon e reto representa o segundo tipo de câncer mais prevalente no mundo, após o câncer de mama. É o quinto tipo mais freqüente de neoplasias para homens e o terceiro tipo em mulheres da região nordeste. O câncer da laringe é o segundo mais frequente do trato respiratório superior, sendo responsável por 25% dos tumores malignos da cabeça e pescoço e 2% do total das neoplasias malignas, ocorrendo predominantemente em homens sob o tipo histológico de carcinoma epidermóide (BRASIL, 2011).

Devido à sua diversidade estrutural e por apresentar novas rotas de mecanismo de ação farmacológica, moléculas isoladas de plantas de caatinga tem sido alvo de diversos estudos demonstrando grande potencial citotóxico na busca do tratamento do câncer, como por exemplo, os terpenos pentacíclicos encontrados em *Combretum oliviforme* Chao, pela primeira vez isolados de uma fonte biológica(WU et al., 2010).

Dentre os metabólitos presentes em *Luetzelburgia auriculata*, algumas substâncias foram caracterizadas como os terpenos ácido betulínico e lupenona, flavonóides como a narigenina, a 5-7-diOH-4'-OMe-isoflavanona e 5,7-di-OH-2',4'-di-OMe-isoflavanona e antraquinonas como o ácido crisofânico (Quadro 1) (MATOS,MACHADO,BARRETO, 1988).

Alguns estudos realizados também demonstram o potencial terapêutico apresentado por esta espécie, como ação antifúngica, anti-inflamatória, inseticida e citotóxica. Porém, dentre os poucos estudos existentes, a grande maioria foi realizado utilizando apenas os seus frutos para realização das análises (MELO et al., 2005; SOARES et al.2007; ALENCAR et al., 2009; FERREIRA et al., 2011; SOUZA et al., 2011).

Quadro 1 - Metabólitos secundários isolados de caule e fruto de *Luetzelburgia auriculata* (Allemão) Ducke.

CLASSE DO METABÓLITO	COMPOSTO	ESTRUTURA	REFERÊNCIA
Terpeno	Ácido Betulínico		MATOS,MACHADO,BARRETO, 1988.
Terpeno	Lupenona		MATOS,MACHADO, BARRETO, 1988.
Flavanona	Naringenina		MATOS,MACHADO, BARRETO, 1988.
Isoflavona	5-7-diOH-4'-OMe-isoflavanona		KING, GRUNDON, NEIL, 1952; BRAZ FILHO et al., 1973.
Isoflavona	5,7-di-OH-2',4'-di-OMe-isoflavanona		KING, GRUNDON, NEIL, 1952; BRAZ FILHO et al., 1973.
Antraquinona	Ácido Crisofânico		MATOS,MACHADO, BARRETO, 1988.

Como é possível constatar, os estudos fitoquímicos e atividades biológicas encontrados em *Luetzelburgia auriculata* restringem-se a testes realizados em caule e fruto sem referência às demais partes do táxon.

Registros em literatura evidenciam sua utilização popular a partir das peculiaridades de suas folhas e raízes. Características estratégicas para manutenção do intenso verde de suas folhas durante todo o ano, como gemas axilares peruladas (folhas pré-formadas que se expandem rapidamente quando há água disponível), e um sistema de armazenamento de água em suas raízes tuberosas, fazem a espécie destacar-se na paisagem seca da caatinga, chamando sua atenção para uso decorativo. Apesar de relatos de toxicidade suas folhas são utilizadas ainda para o amadurecimento de frutos. As raízes, ricas em fécula, são utilizadas como fonte de alimento em épocas de estresse hídrico (MAIA, 2004).

Apesar das promissoras atividades constatadas em seus frutos e da ampla utilização etnobotânica de suas raízes e folhas, observa-se a escassez de estudos referentes aos táxons deste gênero. Diante disto este trabalho teve por objetivo caracterizar o perfil fitoquímico e avaliar preliminarmente o potencial de atividades antibacteriana e citotóxica de *L. auriculata*.

2 Material e Métodos

2.1 Material vegetal

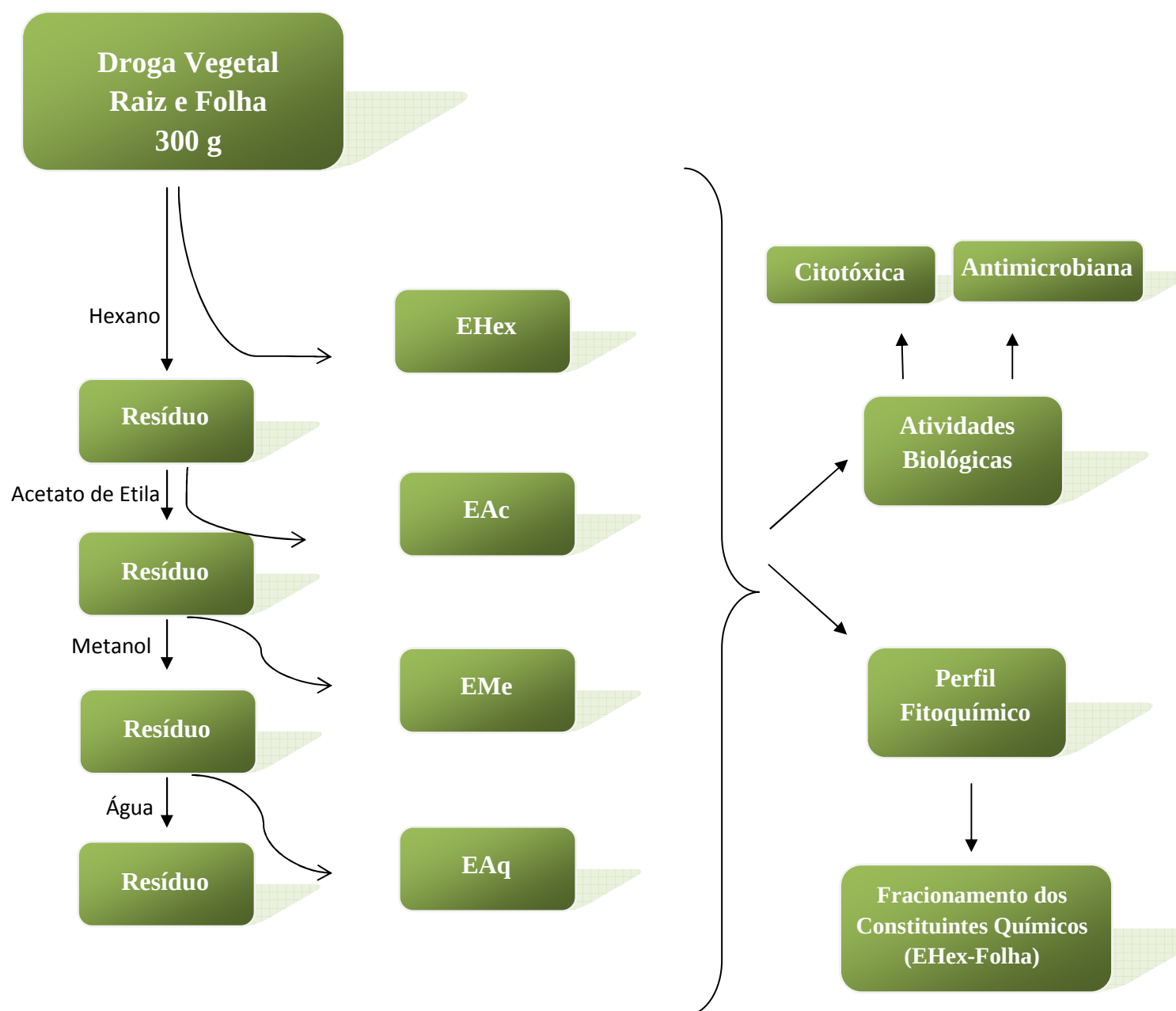
Luetzelburgia auriculata, Fabaceae foi coletada em outubro de 2010, no município de São José de Espinharas, localizado no estado da Paraíba (Brasil), na microrregião de Patos (6° 52' 11,4''S/ 37° 17' 22,87'' W a 239 m de altitude) e identificada, sob o número 87183 onde a amostra foi depositada no Herbário IPA - Dárdano de Andrade Lima, pertencente ao Instituto Agrônomo de Pernambuco.

2.2 Preparação dos Extratos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Farmacognosia (LF) do departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco.

Amostras de raiz e folhas, foram secas ao abrigo da luz sob temperatura ambiente. Após processo de cominuição, cerca de 300 g de droga vegetal de cada amostra foram submetidas ao processo de maceração por 72 horas, com eventual agitação e renovação do solvente. O processo foi realizado utilizando-se diferentes solventes de polaridade crescente, para a obtenção de frações extrativas enriquecidas com os metabólitos aos quais possuem afinidade. Ao final deste procedimento os diferentes extratos foram levados à secura utilizando-se um rotaevaporador sob pressão reduzida obtendo-se assim os respectivos extratos brutos secos hexânico (EHex), acetato de etila (EAc), metanólico (EMe) e aquoso (EAq), o qual foi obtido através de liofilização, utilizados nos ensaios fitoquímicos e nas atividades biológicas (Fig. 2).

Figura 2 - Fluxograma da metodologia utilizada.



2.3 Prospecção Fitoquímica

Para o estudo fitoquímico, os extratos obtidos foram submetidos à filtração simples em papel e posteriormente analisados por cromatografia em camada delgada (Kieselgel 60, 0.2 mm, Merck), empregando-se sistemas e reveladores adequados a cada pesquisa com algumas modificações, apoiados nos estudos de Harborne (1984) e Wagner&Bladt (1996) (Quadro 2). Para pesquisa de saponinas foi realizado o teste preliminar de afrogenicidade.

Quadro 2 – Sistema eluente, revelador e padrão utilizados na abordagem fitoquímica de *Luetzelburgia auriculata*.

METABÓLITO	SISTEMA ELUENTE	PROPORÇÃO	REVELADOR	CRITÉRIO DE AVALIAÇÃO	ESPECTRO DE OBSERVAÇÃO	PADRÃO
Alcalóides	AcOEt ¹ : A.F ² : A.Ac ³ : H ₂ O	(100:11:11:27)	Dragendorff	Presença de bandas de coloração alaranjada intensa	visível	Pilocarpina
Mono e Sesquiterpenos	Tolueno: AcOEt ¹	(97:3)	Vanilina sulfúrica e aquecimento em estufa (100°C -5 minutos)	Presença de bandas de coloração rosa, roxo, azul escura	visível	Timol
Triterpenos e Esteróides	Tolueno: AcOEt ¹	(90:12)	Liebermann Buchard e aquecimento em estufa (100°C, durante 5 minutos)	Presença de bandas de coloração levemente rósea a avermelhada	visível	β-sitosterol
Saponinas	AcOEt ¹ : A.F ² : A.Ac ³ : H ₂ O	(100:11:11:27)	Anisaldeído	Presença de bandas de cor acinzentada	visível	Saponina
Cumarinas	N-Hexano: AcOEt ¹	(9,5:0,5)	KOH 10% em etanol	Presença de bandas de fluorescência azul	Ultra-violeta (365nm)	Umbeliferona
Flavonóides	Tolueno: AcOEt ¹ : A.F ²	(6:4:1)	Difenilboriloxetilamina	Presença de bandas de fluorescência alaranjada (vermelha, amarela laranja ou verde)	Ultra-violeta (365nm)	Rutina

2.4 Fracionamento de Constituintes químicos de *Luetzelburgia auriculata*

Cromatografia em Coluna

A partir da análise dos ensaios cromatográficos (CCD) realizados, optou-se pela tentativa de isolamento de duas moléculas presentes no EHex da folha. Uma molécula majoritária de intensa fluorescência azul (R_f 0,4 - M1), caracterizada como uma possível cumarina de baixa polaridade, e uma substância mono terpênica de coloração violácea (R_f 0,9 - T1).

Desta forma, cerca de 2 g do extrato bruto seco foram submetidos à cromatografia em coluna (180 mm×30 mm) de gel de sílica (Merk 0.05–0.200 mm).

Como fase móvel utilizou-se inicialmente n-hexano, com 300 mL de volume morto, seguida da eluição de sistema com aumento gradual de acetato de etila e consequente aumento da polaridade, obtendo-se ao final, misturas desses solventes na proporção de 1:0,5. As frações resultantes que apresentaram o mesmo perfil cromatográfico foram reunidas e recromatografadas sob as mesmas condições de fase estacionária e sistema eluente N-hexano e Acetato de etila nas proporções 10:0 / 9,9:0,1 / 9,8:0,2 / 9,7:0,3 / 9,6:0,4 / 9,5:0,5.

2.5 Avaliação da Atividade Antimicrobiana

Os extratos da raiz e folha a serem analisados, foram solubilizados em um sistema composto por DMSO (dimetil sulfoxido 10%)/ Tween80/ água (1:1:8), obtendo-se assim soluções estoque padronizadas de concentração igual a 1000 µg/ml. Essas soluções foram esterilizadas por filtração através de membranas milipore® de porosidade de 0,22 µm.

Foram testadas cepas Gram positivas como *Enterococcus faecalis* (ATCC 27212), *Enterococcus faecalis* (LFBM 02), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25932), *Staphylococcus aureus* (LFBM 26) e Gram negativas como *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Escherichia coli* enterohemorrágica (O157:H7- INCQS 0071), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (LFBM 01), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Pseudomonas aeruginosa* (LFBM 05) e *Proteus mirabilis* (LFBM 02); todas padronizadas a 0,5 MacFarland de turbidez,

correspondendo a 10^7 UFC/ mL. Os microrganismos utilizados neste ensaio foram oriundos de isolados clínicos, com comprovação de multirresistência bacteriana, adquiridos a partir de lavados e secreções teciduais. As cepas padrão utilizadas foram obtidas do American Type Culture Collection e os ensaios realizados em duplicata.

Para realização dos ensaios antimicrobianos *in vitro* foi utilizado o método da microdiluição em caldo, seguindo os parâmetros do Clinical Laboratory Standards Institute, com algumas modificações (CLSI, 2010). Os ensaios foram realizados em microplacas estéreis de 96 poços com fundo em forma de “U”, que foram preenchidos com 100 μ L de caldo Mueller-Hinton. Na linha A, foram adicionados 200 μ L das soluções extrativas estéreis, dos quais 100 μ L foram retirados e transferidos aos poços da linha seguinte até a última linha, de modo que fosse realizada uma diluição em série criando um gradiente de concentração de 1000 μ g/ mL a 3,9 μ g/ mL. A cada coluna foram adicionados 5 μ L de uma determinada cepa de microrganismo, perfazendo um total de 11 cepas diferentes já que a coluna 1 não os possuía, sendo o controle negativo.

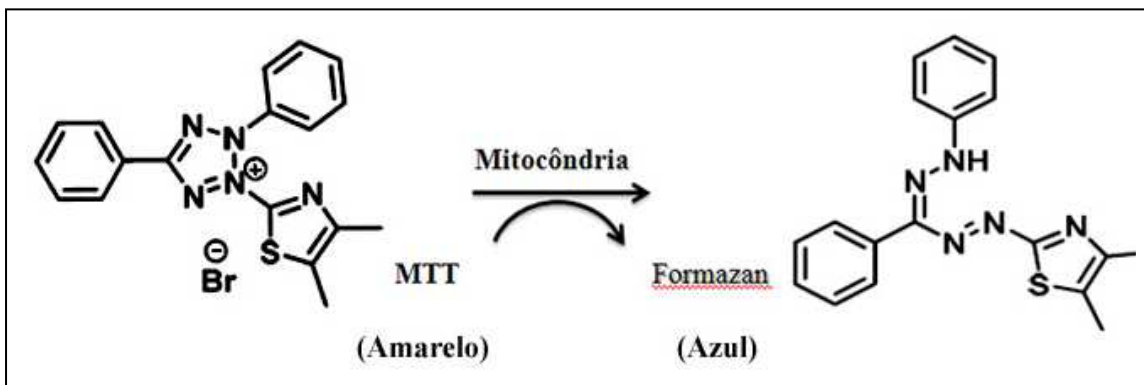
A inibição do crescimento foi demonstrada pela densidade óptica obtida em um leitor de ELISA automático de bandeja ajustada (Thermo plate –TP Reader®) a 450 nm, considerando o crescimento total 100%, obtido em uma placa controle; preparada sob as mesmas condições porém sem os extratos vegetais. Assim, o percentual de inibição foi calculado a partir da diferença das demais placas em comparação àquela. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi descrita como a mais baixa concentração dos extratos ou agentes antimicrobianos que inibiu o crescimento bacteriano após 24 h de incubação a 37°C, o que ocorreu quantitativamente nos poços que mostraram percentual de inibição de crescimento maior ou igual que 70%. Os resultados obtidos foram analisados através do comparativo das concentrações dos antibióticos padrão utilizados na terapêutica tais como ciprofloxacino, teicoplanina, polimixina B e imipenem.

2.6 Avaliação da atividade Citotóxica

A atividade citotóxica foi avaliada através do método MTT, que baseia-se na conversão do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio em azul de formazan a partir da ação das enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. Este método descrito inicialmente por Mossman (1983) é amplamente utilizado atualmente pela sua rapidez, sensibilidade e baixo custo, tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise

colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas, atuando como um indicador de viabilidade celular (FRESHNEY, 1999) (Fig. 3). O estudo citotóxico pelo método do MTT trata-se de um método colorimétrico quantitativo, permitindo assim definir facilmente a citotoxicidade, porém não o mecanismo de ação (BERRIDGE et al., 1996).

Figura 3 – Reação de formação do Azul de Formazan.



Reação enzimática das mitocôndrias sobre o MTT para obtenção do formazan.

Os extratos foram testados contra as linhagens antitumorais HT-29 (carcinoma humano de cólon), HEP-2 (carcinoma humano de laringe) e NCI-H292 (carcinoma humano de pulmão). As células foram inoculadas em microplacas de 96 poços contendo dulbecco's modified eagle medium (DMEM) suplementado com soro fetal bovino (10%), L – glutamina (1%), penicilina (100 µL/mL) e estreptomicina (250 µL/mL). As placas foram incubadas durante 24h a 37°C com atmosfera de 5 % de CO₂, para obtenção de concentração final de 1 x 10⁵ células/mL. Após esse período, as células foram tratadas com os extratos da raiz e folha, de *Luetzelburgia auriculata*, padronizados na concentração de 25 µg/mL.

As placas foram incubadas novamente por 72 horas a 37°C sob as mesmas condições anteriores e, depois desse período, foi adicionada como indicador uma solução tampão salina de MTT (5µg/mL), seguido de incubação por mais 3 horas. A leitura óptica foi realizada em leitor automático de placas Thermoplate –TP Reader® a 595 nm, após a total dissolução dos cristais de formazan com 100µL de dimetilsulfóxido estéril (WONG, KADIR, LING, 2011). A densidade óptica média das amostras foi comparada com a densidade do controle e cada amostra foi realizada em duplicata.

Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos desvios no programa Graph Pad Prism. Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas e os resultados expressos em percentual de inibição de crescimento. Amostras sem atividade (1 a 20% de inibição), com pouca atividade (inibição de crescimento celular variando de 20 a 50%), com atividade moderada (inibição de crescimento celular variando de 50 a 70%) e com alta atividade (inibição de crescimento variando de 70 a 100%) (FOUCHE et al., 2008).

3 Resultados e Discussão

Os rendimentos obtidos para os extratos brutos de raiz e folha de *Luetzelburgia auriculata* podem ser analisados na tabela a seguir:

Tabela1 - Rendimento dos extratos brutos secos de *Luetzelburgia auriculata*.

SOLVENTE	RENDIMENTO (%)	
	RAIZ	FOLHA
Hexano	12,06%	7,02%
Acetato de Etila	1,68%	1,74%
Metanol	3,8%	2,70%
Água	1,3%	1,8%

Os extratos hexânicos apresentaram maior rendimento tanto na raiz quanto na folha, o que demonstra a natureza apolar dos constituintes químicos majoritários. O baixo rendimento apresentado justifica-se pelo uso do método extrativo empregado, que não conduz ao total esgotamento da matéria-prima vegetal. Esta devea sua massa e volume, em parte, à presença de mucilagem e fibras em sua constituição.

3.1 Prospecção Fitoquímica

O quadro a seguir apresenta os resultados obtidos a partir da análise por cromatografia em camada delgada dos extratos supracitados (Quadro3).

Quadro3 - Perfil Fitoquímico da raiz e folha de *Luetzelburgia auriculata*.

METABÓLITOS	EXTRATOS							
	RAIZ				FOLHA			
	EHex	EAc	EMe	Eaq	EHex	EAc	EMe	Eaq
Alcaloides	-	-	-	-	-	-	-	-
Mono e Sesquiterpenos	7	2	-	-	4	-	-	-
Triterpenos e Estereoides	2	2	-	-	2	4	-	-
Saponinas	-	-	2	-	-	-	-	-
Cumarinas	6	4	-	-	1	1	-	-
Flavonoides	-	2	3	-	-	-	3	3
Fenilpropanoglicosídeos	-	-	-	-	-	-	-	-
Derivados cinâmicos	-	-	-	-	-	-	-	-
Antraquinonas	-	-	-	-	-	-	-	-
Proantocianidinas e Leucoantocianidinas	-	-	-	-	-	-	-	-

Expressão dos resultados considerando o número de bandas. (-) Ausência de bandas.

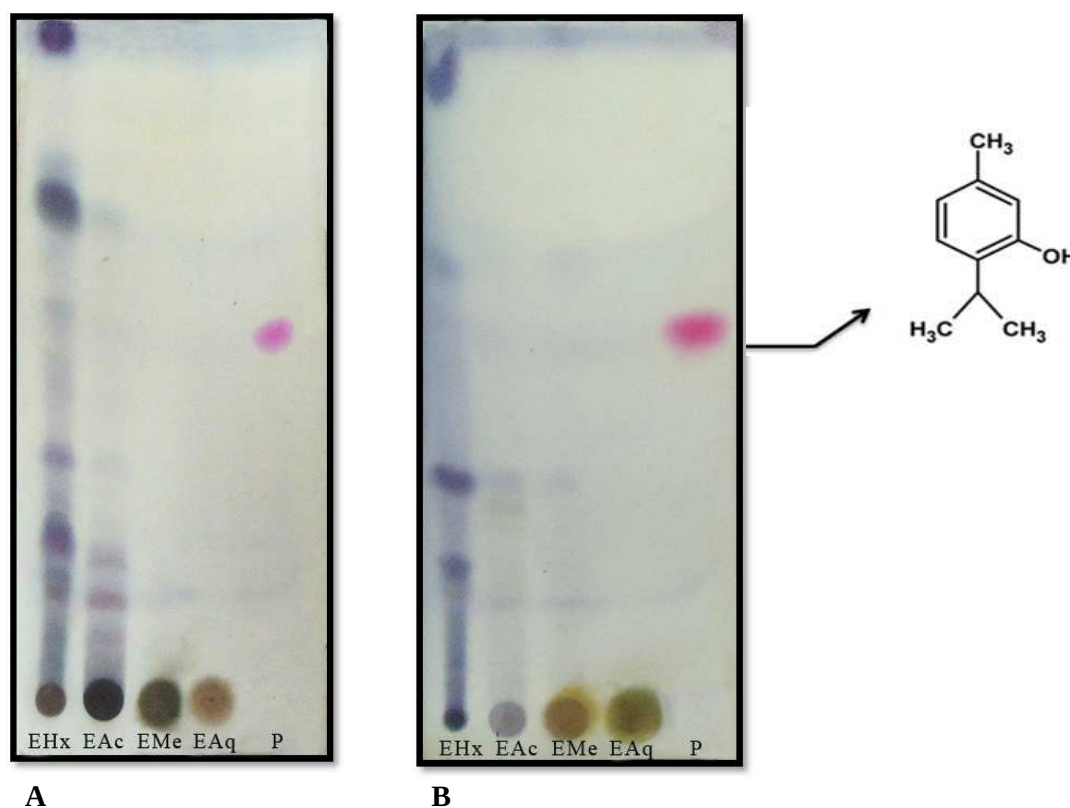
EHex: extrato bruto hexânico, EAc: extrato bruto de acetato de etila, EMe: extrato bruto metanólico, Eaq: extrato bruto aquoso.

A partir da análise dos dados apresentados é possível a constatação da presença de mono/sesquiterpenos, triterpenos e esteroides, cumarinas, flavonoides e saponinas nos extratos brutos da raiz e folha. A classe de saponinas foi identificada apenas no extrato metanólico da raiz, por cromatografia em camada delgada além do teste de afrogenicidade realizado paralelamente. A pesquisa para, derivados cinâmicos,

fenilpropanoglicosídeos, antraquinonas, proantocianidinas e alcaloides demonstrou-se negativa para a espécie. Apesar do relato de presença de alcaloides em extrato etanólico dos frutos de *Luetzelburgia auriculata* nos trabalhos de Carvalho (2012) e ácido crisofânico no lenho do caule, descritos nos trabalhos de Matos, Machado, Barreto (1988), não foi encontrada a presença destas classes de compostos nas demais partes do vegetal coletado nesta região do semiárido Paraibano. Para investigação de alcaloides procedeu-se cromatografia em camada delgada, através de extração ácida da marcha de alcaloides.

Na pesquisa de mono e sesquiterpenos pode-se observar a maior predominância destas substâncias no EHex, onde há presença de pelo menos sete diferentes bandas na raiz e quatro na folha. Pode-se inferir que as bandas de Rf 0,3; 0,4; 0,7 e 0,9 são comuns à raiz e folha, embora nenhuma apresente Rf correspondente ao padrão de timol (0,6), porém apresentaram coloração azulada que caracteriza a presença desta classe química, segundo Wagner, Bladt (1996) (Fig. 4).

Figura 4 – CCD para pesquisa de mono e sequiterpenos em *Luetzelburgia auriculata* (SiO₂, Tolueno/AceOEt-97:3)

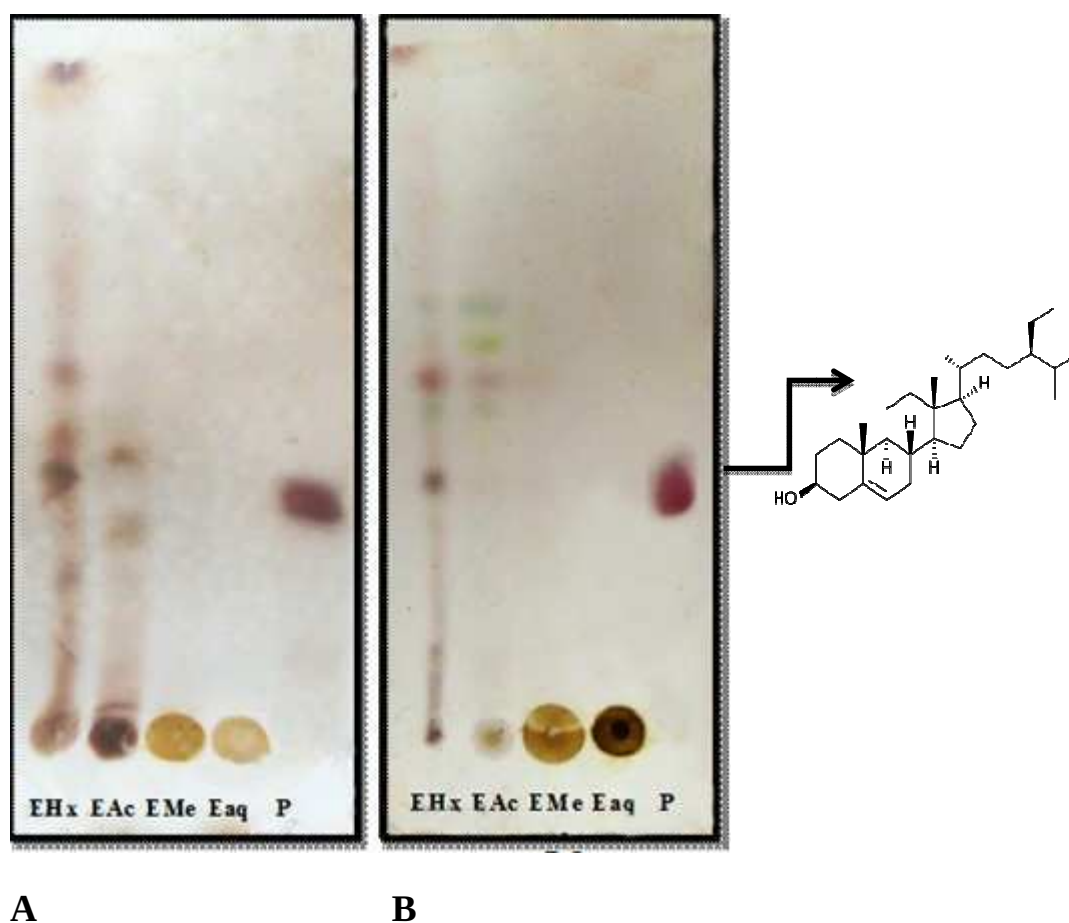


A: Extratos obtidos de raiz, **B:** Extratos obtidos de folha. **EHx:** extrato bruto hexânico, **EAc:** extrato bruto acetato de etila, **EMe:** extrato bruto metanólico, **Eaq:** extrato bruto aquoso, **P:** Padrão de timol, Revelador: Vanilina Sulfúrica.

Compostos monoterpênicos são facilmente encontrados nas leguminosas, sobretudo em espécies de Papilionoideae com importante atividade biológica de atração de polinizadores e ao mesmo tempo inseticida e antimicrobiana, como os monoterpenos oxigenados (linalool) encontrados em *Cyathostegia mathewsii* (Papilionoideae) (LEWIS et al., 2003). Estudos científicos a respeito de suas propriedades farmacológicas têm os revelado como importantes agentes anti-fúngicos, anti-microbianos, antioxidante, anticancerígenos, antiespasmódico. Além dessas atividades Santos et al. (2011) citam além destes, efeitos significativos sobre o sistema cardiovascular como vasorelaxamento, hipotensão e diminuição do ritmo cardíaco, atribuídos a esses compostos.

A partir da análise da cromatoplaca para pesquisa de triterpenos e esteroides, é possível observar que existe maior concentração destes compostos no extrato hexânico da raiz seguido do mesmo tipo de extrato para folha, por tratar-se de uma classe de compostos que possuem maior afinidade por solventes de baixa a média polaridade, sendo possível verificar a presença de bandas que possuem o mesmo R_f e coloração do β -sitosterol (R_f 0,5) (Fig. 5).

Figura 5 –CCD para pesquisa de triterpenos e esteroides em *Luetzelburgia auriculata*(SiO₂, Tolueno/AceOEt-90:12)



A: Extratos obtidos de raiz, **B:** Extratos obtidos de folha. **EHx:** extrato bruto hexânico, **EAc:** extrato bruto acetato de etila, **EMe:** extrato bruto metanólico, **Eaq:** extrato bruto aquoso, **P:** Beta Sitosterol, Revelador: Liebermann Buchard.

Compostos terpênicos são largamente distribuídos em leguminosas, sendo um dos mais importantes compostos de defesa em espécies de Cesalpinoideae/Mimosoideae e em tribos basais de Papilionoideae (WINK, 2003). Dentre as inúmeras espécies da subfamília pode-se citar os compostos terpênicos encontrados em *Tipuana tipu* (Benth.) Kuntze (β -amirina hexadecanoato) (DOS SANTOS, DE AQUINO NETO, 2003) e em *Amburana cearensis* A.C. Smith (β -sitosterol e estigmasterol) (CANUTO, SILVEIRA 2006) com diferentes atividades farmacológicas.

A partir de testes de afrogenicidade realizados nos extratos, observou-se a indicação de saponinas no EMe da raiz. Assim, procedeu-se a análise a partir de experimentos em cromatografia em camada delgada evidenciando a presença de duas bandas de coloração acinzentada e Rf 0,2 e 0,4, respectivamente confirmando a sua presença, segundo Wagner & Bladt (1996). Espécies de Papilionoideae também são reportadas pela presença de saponinas em seu metabolismo secundário, como em raízes de *Hedysarum polybotrys* (Papilionoideae) (LIU et al., 2007).

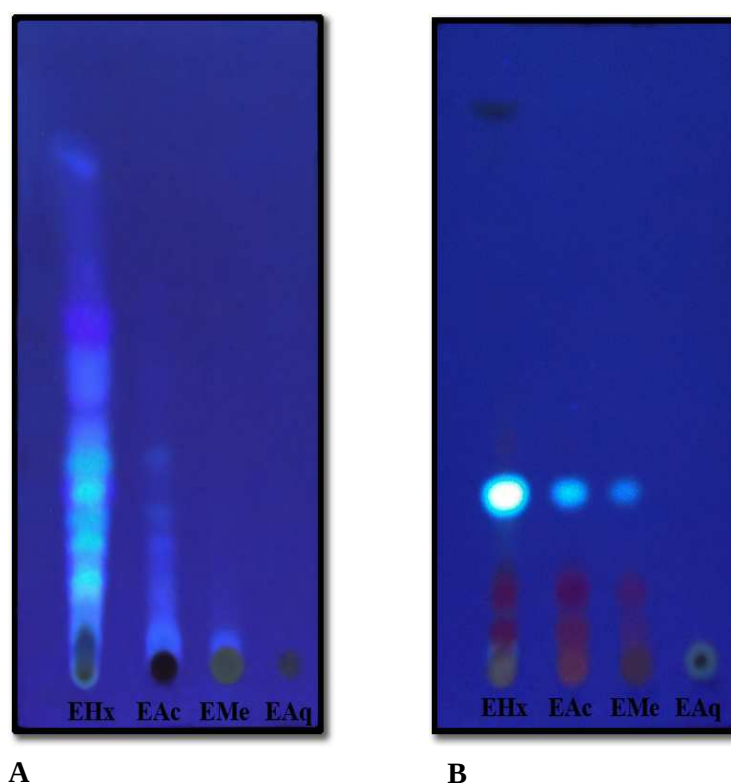
Vários saponósidos de origem terpênica podem ser encontrados nas leguminosas, como as saponinas identificadas em gêneros de *Securigera* e *Coronilla* (Papilionoideae). Muitos compostos como este são amplamente distribuídos nesta família, podendo ser observada a sua presença inclusive em plantas utilizadas frequentemente na alimentação humana como soja, grão de bico, amendoim, broto de feijão, vagem, feijão americano, lentilha, ervilha, etc. (HOSTETTMANN, MARSTON, 1995).

A complexidade química apresentada por essa classe de substâncias é devida principalmente à presença de oligossacarídeos em sua estrutura que, aliado ao seu elevado peso molecular, dificulta o processo de isolamento e elucidação estrutural. A enorme variedade de estruturas encontradas, aliada a importantes características físico-químicas, como a elevada solubilidade em solventes aquosos (principalmente em meio levemente básico) e alcoóis, complexação com o colesterol e propriedade emulsificante, prevê um grande espectro de atividades de interesse farmacêutico. Entre as atividades biológicas mais citadas para as saponinas incluem-se: atividade ictiotóxica, moluscicida, antiinflamatória, antifúngica, antimicrobiana, antiparasitária, antiviral, citotóxica e antitumoral, dentre outras menos citadas (FRANCIS et al., 2002; SPARG et al., 2004).

A partir da análise da cromatoplaça para pesquisa de cumarinas é possível observar a presença destes compostos pela coloração azul intensa característica, com Rf

0,4 tanto na raiz como na folha, principalmente nos extratos hexânicos (Fig. 6). Nestes, observa-se a presença de bandas de maior fluorescência e com menos moléculas associadas.

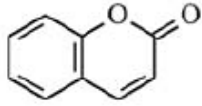
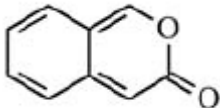
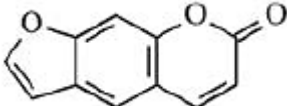
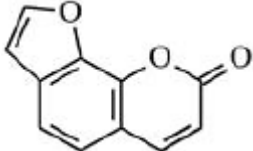
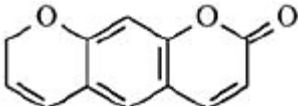
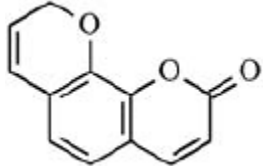
Figura 6 – CCD para pesquisa de cumarinas em *Luetzelburgia auriculata* (SiO₂, N-Hexano/AcOEt-9,5:0,5).



A: Extratos obtidos de raiz, **B:** Extratos obtidos de folha. **EHx:** extrato bruto hexânico, **EAc:** extrato bruto acetato de etila, **EMe:** extrato bruto metanólico, **Eaq:** extrato bruto aquoso, Revelador: KOH 10% em etanol.

Os compostos cumarínicos encontram-se predominantemente distribuídos nas angiospermas, sendo encontrados com maior frequência estruturas mais simples. Podem ser divididos em quatro classes e adicionalmente em quatro subclasses, como demonstrado no quadro a seguir.

Quadro 4 - Classificação geral das cumarinas.

Classificação das Cumarinas			
Classe	Subclasse	Exemplo	Estrutura
Cumarinas Simples		Umbeliferona, Herniarina, Escopoletina, Esculetina, Fraxetina, Ostol, Ostenol, Dicumarol.	 Cumarina
		Feralolida, Meleína, Polígonolida, Paepalantina, Seswcandelina, etc.	 Isocumarina
Furanocumarinas	Psoraleno	Psoraleno, Bergapteno, Xantotoxina, Imperatorina, Isopimpinellina, Marmesina, etc.	 Psoraleno
	Angelicina	Angelicina, Pimpinellina, Isobergapteno, etc.	 Angelicina
Piranocumarinas	Xantiletina	(Xantiletina, Calanolida, etc.)	 Xantiletina
	Sesselina	Sesselina, Laserpitina, Visnadina, Samidina, etc.	 Sesselina

Fonte: Matosiuk, Gralak & Rysnar, 2011.

São comumente encontradas em espécies de Apiaceae, e em algumas espécies de leguminosas, com maior distribuição nos gêneros Psoralea, Bituminaria e Melilotus, porém com poucos estudos que as referencie. As espécies vegetais utilizam-nas como potentes compostos de defesa devido às suas atividades biológicas, dentre elas inseticida, repelente de insetos e deterrente (inibidora da alimentação por herbívoros) (WINK, 2003; SAITO et al., 2004; SIMÕES et al., 2007). A procura por medicamentos de origem vegetal tem despertado o interesse farmacêutico, pelo fato de suas propriedades farmacológicas mostrarem-se potentes, relevantes e de baixa toxicidade em mamíferos. Cerca de 1300 cumarinas já foram isoladas de fontes naturais. A escoparona (6,7-dimetoxicumarina) encontrada também em *Sida galheirensis* ULBR. (Malvaceae) é reportada por suas atividades imunossupressora, relaxante vascular, hipolipidêmica e hipotensora. O ostol encontrado em *Angelica pubescens* Maxim (Apiaceae) mostra uma resposta hipotensora de curta duração após injeções intravenosas em cães. Cumarinas isopreniladas de *Mammea americana* L. apresentam atividade antioxidante e citotóxica para linhagens de câncer de cólon humano (SIMÕES et al., 2007).

Dentre as principais classes de cumarinas a grande diferença estrutural é a presença ou ausência de anéis heterocíclicos e suas características - hidroxilas e alcoxilas livres (Quadro 4). Desta forma existe uma dificuldade natural para explicar o seu perfil de atividade assim como seu comportamento no processo cromatográfico. Ocorrendo algumas vezes, uma zona de superposição de compostos quando analisados em cromatografia em camada delgada. O que evidencia a dificuldade de isolamento de compostos em fase estacionária normal obtendo-se geralmente grupos divididos em frações de acordo com sua polaridade (WAGNER; BLADT, 1996; MATOSIUK; GRALAK; RYSNAR, 2011).

Testes cromatográficos (Quadro 2) mostraram que na polaridade resultante do sistema de solventes utilizados, as cumarinas presentes em Luetzelburgia, possuem alta lipofilicidade quando comparadas à escopoletina e umbeliferona, apresentando R_f cerca de 7 vezes maior que o destes compostos. A partir de informações do trabalho de Matosiuk, Gralak e Rysnar (2011), pode-se inferir que este fato é comparável à lipofilia das furanocumarinas.

Compostos flavonoídicos representam um dos grupos fenólicos de maior distribuição e diversidade dentre os vegetais constituindo o grupo de metabólicos secundários presente em todas plantas terrestres vasculares. Devido a sua ampla

variabilidade de conformação química e potenciais grupos substituintes apresentam importantes funções biológicas para o vegetal e muitos possuem diversas atividades farmacológicas como antitumoral, antimicrobiana e antioxidante (SIMÕES et al., 2007). A presença desses compostos em determinada espécie pode ser de grande utilidade para sua identificação quimiotaxonômica. Isoflavonoides, por exemplo, são restritos à subfamília Papilionoideae.

Os resultados dos ensaios cromatográficos para tal classe de substâncias permite a constatação da presença de flavonoides nos extratos EAc EMe da raiz e EMe e EaQ da folha.

As bandas flavonoídicas correspondentes nas duas placas apresentam-se em cor esverdeada, semelhante à Vitexina, com Rf 0,3; 0,6 e 0,8 com zona de sobreposição na última banda (EAc e EMe na raiz) e Rf 0,3; 0,4 e 0,75 (EMe na folha) e Rf 0,3; 0,5 e 0,8 (EaQ na folha). Pode-se inferir que as variâncias nos Rfs desta substância deve-se ao padrão de glicosilação do composto. Assim quanto menor o Rf maior será o número de ligações desmosídicas que a moléculapossui.

3.2 Fracionamento de Constituintes químicos de *Luetzelburgia auriculata*

Após análise dos constituintes químicos distribuídos na espécie e verificação de sua polaridade e afinidade pelos solventes, selecionaram-se dois compostos para tentativa de purificação: Molécula presente no EHex da folha de fluorescência azul e Rf 0,4 - M₁, caracterizada por CCD como uma possível cumarina de baixa polaridade e uma substância mono terpênica de coloração roxa e Rf 0,9 - M₂. Tais compostos foram escolhidos por não serem citados em nenhum dos trabalhos existentes acerca da espécie. Além disso, a natureza de tais compostos fornecem-lhes propriedades farmacológicas de interesse, como antimicrobianas e citotóxicas. Desta forma a obtenção de frações enriquecidas destas substâncias trazem a perspectiva de realizações de trabalhos futuros mais específicos.

Assim, após cromatografia em coluna clássica, como descrita anteriormente na metodologia utilizada, foram coletadas um total de 128 frações de 30 mL, que foram cromatografadas para identificação da cumarina e do mono terpeno. As primeiras frações obtidas forneceram um precipitado cristalino - M₂ (149,2 mg - Rendimento

7,46%) que ao ser cromatografado, utilizando como sistema eluente Benzeno, indicou sua natureza monoterpênica.

As frações 74 à 87, que apresentavam mesmo perfil de constituintes químicos, foram reunidas totalizando 80 mg (M_1). Esta alíquota obtida foi novamente cromatografada para obtenção de frações purificadas. Desta forma, obtiveram-se dois compostos cumarínicos A e B de R_f 0,35 e 0,4, respectivamente. O composto de menor R_f foi cromatografado com o mesmo sistema de eluentes utilizado no Quadro 2, revelando-se potencialmente livre de moléculas de outras classes químicas associadas, apresentando rendimento de 0,11% (2,2 mg). A fração referente à cumarina B foi cromatografada em placa preparativa, e purificada obtendo-se um rendimento de 0,5 % (10 mg).

Devido às frações purificadas obtidas não apresentarem rendimento suficiente, não foi possível a realização de ensaios espectroscópicos para identificação estrutural.

3.3 Avaliação da atividade Antimicrobiana

A partir da realização dos testes de microdiluição em caldo foi possível avaliar o perfil de atividade antimicrobiana dos extratos de raiz e folha particionados em diferentes solventes para separação dos constituintes químicos de acordo com sua polaridade.

A análise dos resultados obtidos permitiu a construção das tabelas 2 e 3, onde foram considerados apenas os extratos que apresentaram uma inibição do crescimento bacteriano acima de 70 %.

Tabela2– Valores de CMI dos extratos da raiz de *Luetzelburgia auriculatae* antibióticos padrões frente a microrganismos Gram positivos e negativos.

MICROORGANISMO	ORIGEM	CMI DOS EXTRATOS TESTADOS - RAIZ				PADRÃO CMI - µg/ML	
		EHex	EAc	EMe	EAq		
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 27212	ATCC	1000	500	1000	1000	0,25	TEI
<i>Enterococcus faecalis</i> LFBM 02	Hemocultura	1000	500	1000	1000	8	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	ATCC	500	< 7,8	1000	500	64	CIP
<i>Staphylococcus aureus</i> LFBM 26	Hemocultura	1000	< 7,8	1000	1000	64	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	ATCC	1000	500	1000	1000	≤ 4	
<i>Escherichia coli</i> O157:H7- INCQS 0071	Fiocruz – RJ	1000	500	1000	1000	≤ 4	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	ATCC	500	500	1000	1000	≥ 4	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> LFBM 01 (produtora de carbapenemase)	Hemocultura	500	500	1000	1000	≤ 0,25	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	ATCC	1000	500	1000	1000	≤ 0,25	POL B
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LFBM 05	Hemocultura	1000	1000	1000	1000	4	
<i>Proteus mirabilis</i> LFBM 02	Urocultura	1000	250	1000	1000	≥16	IMI

CMI: Concentração Mínima Inibitória; ATCC: American Type Culture Collection; Extratos de *L. auriculata* testados - EHex: extrato hexânico, EAc: extrato de acetato de etila; EMe: extrato metanólico, EAq: Extrato aquoso; Antibióticos Padrão – CIP: Ciprofloxacino; TEI: Teicoplanina; POL B: Polimixina B; IMI: Imipinem.

Tabela3– Valores de CMI dos extratos das folhas de *Luetzelburgia auriculatae* antibióticos padrões frente a microrganismos Gram positivos e negativos.

MICRORGANISMO	ORIGEM	CMI DOS EXTRATOS TESTADOS - FOLHA				PADRÃO CMI - µg/ML	
		EHex	EAc	EMe	EAq		
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 27212	ATCC	500	500	-	-	0,25	TEI
<i>Enterococcus faecalis</i> LFBM 02	Hemocultura	1000	1000	-	-	8	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	ATCC	62,5	62,5	-	1000	64	CIP
<i>Staphylococcus aureus</i> LFBM 26	Hemocultura	1000	500	-		64	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	ATCC	1000	1000	-	1000	≤ 4	
<i>Escherichia coli</i> O157:H7- INCQS 0071	Fiocruz – RJ	1000	1000	-	1000	≤ 4	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	ATCC	1000	500	-	1000	≥ 4	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> LFBM 01 (produtora de carbapenemase)	Hemocultura	1000	1000	-	1000	≤ 0,25	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	ATCC	1000	500	-	1000	≤ 0,25	POL B
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LFBM 05	Hemocultura	500	500	-	1000	4	
<i>Proteus mirabilis</i> LFBM 02	Urocultura	1000	500	-	1000	≥16	IMI

CMI: Concentração Mínima Inibitória; ATCC: American Type Culture Collection; Extratos de *L. auriculata* testados - EHex: extrato hexânico, EAc: extrato de acetato de etila; EMe: extrato metanólico, EAq: Extrato aquoso; Antibióticos Padrão – CIP: Ciprofloxacino; TEI: Teicoplanina; POL B: Polimixina B; IMI: Imipinem; (-) ausência de atividade.

É possível a constatação de que os melhores resultados apresentados foram os EAc (Extrato bruto de Acetato de Etila) da raiz e EHex (Extrato bruto Hexânico) e EAc (Extrato bruto de Acetato de Etila) da folha.

Na raiz, o EAc promoveu uma inibição de crescimento bacteriano acima de 90% em concentração de 250 µg/mL em *Proteus mirabilis* 86 % de inibição em concentrações menores que 7,8 µg/mL para cepas de *Staphylococcus aureus*. Neste último caso, isto representa uma concentração quase nove vezes menor para inibir o seu crescimento, quando comparado com o padrão de ciprofloxacina (64 µg/ mL) (Tabela 2). Segundo, Sartoratto et al (2004), a atividade antimicrobiana é considerada como forte quando encontramos CIM com valores entre 50 – 500 µg /mL, atividade moderada para valores entre 600 – 1500 µg /mL e atividade fraca quando os valores obtidos estão acima de 1500 µg /mL.

Staphylococcus aureus é considerado o patógeno humano mais importante do gênero *Staphylococcus*. Apresentam ampla distribuição na natureza e fazem parte da microbiota normal da pele e mucosa de uma grande parte de mamíferos. Porém, devido ao fenômeno de resistência encontrado atualmente, a frequência de infecções ocasionadas por cepas metilina resistente (MRSA) tem representado um aumento contínuo a nível mundial (RATTI, SOUZA, 2009). Eles estão envolvidos em diversas infecções nosocomiais oportunistas, de origem hospitalar ou mesmo comunitária, como foliculite, impetigo, furúnculos e até mesmo infecções sistêmicas potencialmente fatais em diferentes sítios de colonização, como pregas cutâneas, axilas, orofaringe, períneo e vagina (DAVENPORT et al., 1986).

Apesar da falta de estudos sobre a temática em espécies do gênero *Luetzelburgia*, metabólitos presentes comumente em espécies de *Papilionoideae* possuem atividade antimicrobiana por interferir no metabolismo bacteriano, alguns mecanismos relacionam-se com a síntese de DNA e RNA (WINK, 2003;MAKKAR et al., 2007).

Estudos em *Poiretia bahiana* C. Müller (*Papilionoideae*) comprovam atividade antimicrobiana de terpenoides contra *Staphylococcus aureus*, inclusive cepas resistentes, *Proteus mirabilis*, dentre outras espécies de fungos e bactérias. Compostos fenólicos flavonoídicos presentes em *Erythrina latissima* E. Meyer mostram-se ativos contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Candida mycoderma*.

Do ponto de vista químico o extrato de acetato de etila da raiz de *Luetzelburgia auriculata* é constituído por mono e sesquiterpenos, triterpenos e esteroides e compostos fenólicos de menor polaridade.

De forma geral os compostos fenólicos possuem atividade contra vírus, bactérias e fungos. O mais provável mecanismo de ação destes compostos sobre a atividade antibacteriana envolve a inibição enzimática pela oxidação de seus componentes através de reações com os grupamentos sulfidrilas e de interações inespecíficas (relacionadas com o caráter hidrofóbico dessas moléculas) com os grupamentos tiol das proteínas (COWAN, 1999, GIBBONS, 2004; DEMO, OLIVA, 2008).

Compostos terpênicos apresentam importantes atividades terapêuticas contra bactérias, fungos, vírus e protozoários. O mecanismo de ação destas substâncias não está totalmente definido, mas agem contra os microrganismos devido ao caráter lipofílico de suas moléculas facilitando a interação da membrana com estas estruturas. Isto resulta em uma expansão da membrana citoplasmática, aumento de permeabilidade, inibição da respiração e alteração do transporte de íons, ocasionando na desorganização e ruptura da membrana citoplasmática (COWAN, 1999; TROMBETTA et al., 2005; DEMO, OLIVA 2008;).

Nas folhas, os compostos terpênicos, cumarínicos e flavonoídicos, presentes nos extratos hexânicos e acetato de etila, apresentaram acima de 72 % de atividade de inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus*, a uma concentração menor que a utilizada como antibiótico de escolha 62,5 µg/mL (Ciprofloxacino) (Tabela 3).

Compostos cumarínicos também possuem propriedades inibitórias do crescimento bacteriano reconhecidas. Souza (2005) demonstra em seus trabalhos que tal atividade varia conforme o padrão de substituição do composto cumarínico. Assim, cumarinas preniladas como o ostenol apresentou forte atividade antimicrobiana contra cepas Gram positivas de *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, com CMI de 62,5 µg/ml. Os resultados mostram a importância da C9-prenilação para a atividade antibacteriana. A alta lipofilia demonstrada para este grupo de cumarinas nos trabalhos de Matosiuk, Gralak e Rysnar (2011) pode estar relacionada ao seu mecanismo de ação, que ainda não foi esclarecido totalmente, por facilitar a interação dessas substâncias com a membrana dos microrganismos.

3.4 Avaliação da atividade Citotóxica

O desenvolvimento tumoral é um processo de múltiplas etapas onde fatores genéticos e epigenéticos desencadeiam a transição do processo mitótico normal a um estado desregulado de divisão celular. Nesse processo vários pontos regulatórios estão comprometidos na progressão tumoral, entre eles, o equilíbrio entre homeostase e apoptose celular, comunicação entre células vizinhas e com a matriz celular, angiogênese tumoral e a disseminação metastática (COMPAGNI, CHRISTOFORI, 2000).

Biomoléculas de origem vegetal já são utilizadas com fins terapêuticos para tratamento do câncer devido sua grande diversidade estrutural e por apresentar novos mecanismos de ação biológica, mostrando-se potenciais agentes citotóxicos para tratamento de neoplasias (CRAGG, KINGSTON, NEWMAN, 2005). Princípios ativos de espécies como *Angelica gigas*, *Catharanthus roseus*, *Podophyllum peltatum*, *Podophyllum emodii*, *Taxus brevifolia*, *Ocrosia elliptica*, e *Campototheca acuminata* são bastante comuns no meio científico por sua utilização contra neoplasias ou mesmo como protótipos para delineamento de novos fármacos quimioterápicos (PATELSR., SUTHAR; PATEL M. 2009). A partir da avaliação do potencial citotóxico dos extratos de raiz e folha de *Luetzelburgia auriculata* pelo método do MTT, foi possível agrupar os resultados nas tabelas 4 e 5.

Tabela 4- Percentual de inibição do crescimento celular $\pm$ desvio padrão das linhagens testadas frente aos extratos da raiz de *Luetzelburgia auriculata*.

RAIZ						
AMOSTRAS	LINHAGENS					
	NCI-H-292		HT29		HEp-2	
	Média IC %	SD	Média IC %	SD	Média IC %	SD
EHx	36,3	$\pm 4,7$	61,2	$\pm 6,2$	*77,8	$\pm 1,3$
EAc	*75,1	$\pm 1,7$	65,5	$\pm 1,9$	*77,2	$\pm 1,2$
EMe	2,7	$\pm 1,9$	0	0	19,4	$\pm 2,2$
EAq	5,1	$\pm 0,1$	0	0	25,2	$\pm 1,8$

*Resultados com alta atividade citotóxica (Acima de 70%), NCI-H-292 (carcinoma de pulmão), HT-29 (carcinoma de cólon), HEp-2 (carcinoma de laringe), EHex - extrato hexânico, EAc - extrato acetato de etila, EMe - extrato metanólico, EAq - extrato aquoso, Média IC% - Percentual médio de inibição do crescimento celular, SD - Desvio Padrão.

Tabela 5- Percentual de inibição do crescimento celular $\pm$ desvio padrão das linhagens testadas frente aos extratos das folhas de *Luetzelburgia auriculata*.

FOLHA						
AMOSTRAS	LINHAGENS					
	NCI-H-292		HT29		HEp-2	
	Média IC %	SD	Média IC %	SD	Média IC %	SD
EHx	*87,1	$\pm 0,3$	*80,4	$\pm 0,7$	*83,9	$\pm 0,6$
EAc	47,1	$\pm 0,2$	61,2	$\pm 3,1$	*78,4	$\pm 0,6$
EMe	0,5	$\pm 2,2$	0	0	14,2	$\pm 0,5$
EAq	7,6	$\pm 0,1$	0	0	14	$\pm 1,8$

*Resultados com alta atividade citotóxica (Acima de 70%), NCI-H-292 (carcinoma de pulmão), HT-29 (carcinoma de cólon), HEp-2 (carcinoma de laringe), EHex - extrato hexânico, EAc - extrato acetato de etila, EMe - extrato metanólico, EAq - extrato aquoso, Média IC% - Percentual médio de inibição do crescimento celular, SD - Desvio Padrão.

A partir da análise das tabelas pode-se constatar que as amostras que apresentaram melhor atividade citotóxica foram o EAc na raiz e EHex nas folhas, onde a primeira apresentou 75,1% de atividade para linhagens de câncer de pulmão humano e 77,2% de atividade contra carcinoma de laringe humano, enquanto que a amostra da folha chegou a apresentar 87,1 % de atividade inibitória de câncer de pulmão humano, 80,4% em linhagem de carcinoma de cólon humano e 83,9% carcinoma de laringe humano.

Ao identificar os dois extratos com melhor atividade, é possível realizar inferências a partir de seus respectivos constituintes químicos, que foram agrupados nos quadros 5 e 6 relacionando a quantidade de bandas cromatográficas e sua similaridade nos extratos da raiz e da folha.

Quadro5 - Similaridade entre os grupos de metabolitos presentes no extrato hexânico da raiz e da folha.

Extrato Hexânico		
Metabólitos	Quantidade de Bandas Cromatográficas	
	Raiz	Folhas
Mono e Sesquiterpenos	7	4
Triterpenos e Esteróides	2	2
Saponinas	-	-
Cumarinas	6	1
Flavonoides	-	-

Quadro6 - Similaridade entre os grupos de metabolitos presentes no extrato acetato de etila da raiz e da folha.

Extrato Acetato de Etila		
Metabólitos	Quantidade de Bandas Cromatográficas	
	Raiz	Folhas
Mono e Sesquiterpenos	2	-
Triterpenos e Esteróides	2	4
Saponinas	-	-
Cumarinas	4	1
Flavonoides	2	-

Pode-se afirmar que a atividade do extrato EAc da raiz não provém da atividade das saponinas. Os compostos monoterpênicos e cumarínicos também não são os prováveis responsáveis por tal atividade, pois se apresentam maior proporção no EHex, o qual não demonstrou atividade citotóxica. A investigação de compostos triterpênicos e esteroidais evidenciou presença de duas bandas de Rf 0,4 e 0,55 que se encontram presentes majoritariamente no extrato EAc. Também foram evidenciadas bandas características de compostos flavonoídicos presentes neste extrato, o qual apresentou a melhor atividade citotóxica para os extratos da raiz. Desta forma, pode-se levantar como hipótese a ser testada por experimentos mais específicos, a possível atividade citotóxica dos compostos terpênicos e flavonoídicos presentes na raiz.

O extrato hexânico das folhas de *Luetzelburgia auricula* apresenta em sua constituição mono e sesquiterpenos, triterpenos e esteroides e cumarinas. A alta atividade citotóxica do extrato hexânico presente nas folhas pode estar associada à classe de compostos cumarínicos já que os

compostos terpênicos presentes apresentam similaridade nas bandas (coloração e Rf) dos grupos de metabólitos que se mostraram inativos no extrato da raiz. Sob esta óptica, vê-se a necessidade de investigação por testes mais específicos se os compostos cumarínicos presentes na folha possuem constituição diferente dos encontrados na raiz, haja vista sua inatividade neste extrato. Também deve ser levado em consideração que a relação de causa e efeito de atividade biológica muitas vezes está ligada não a um composto isolado, mas ao sinergismo de diferentes compostos presentes no fitocomplexo. Assim vê-se a necessidade de proceder a um isolamento bio guiado para identificar o(s) responsável(is) por tal atividade.

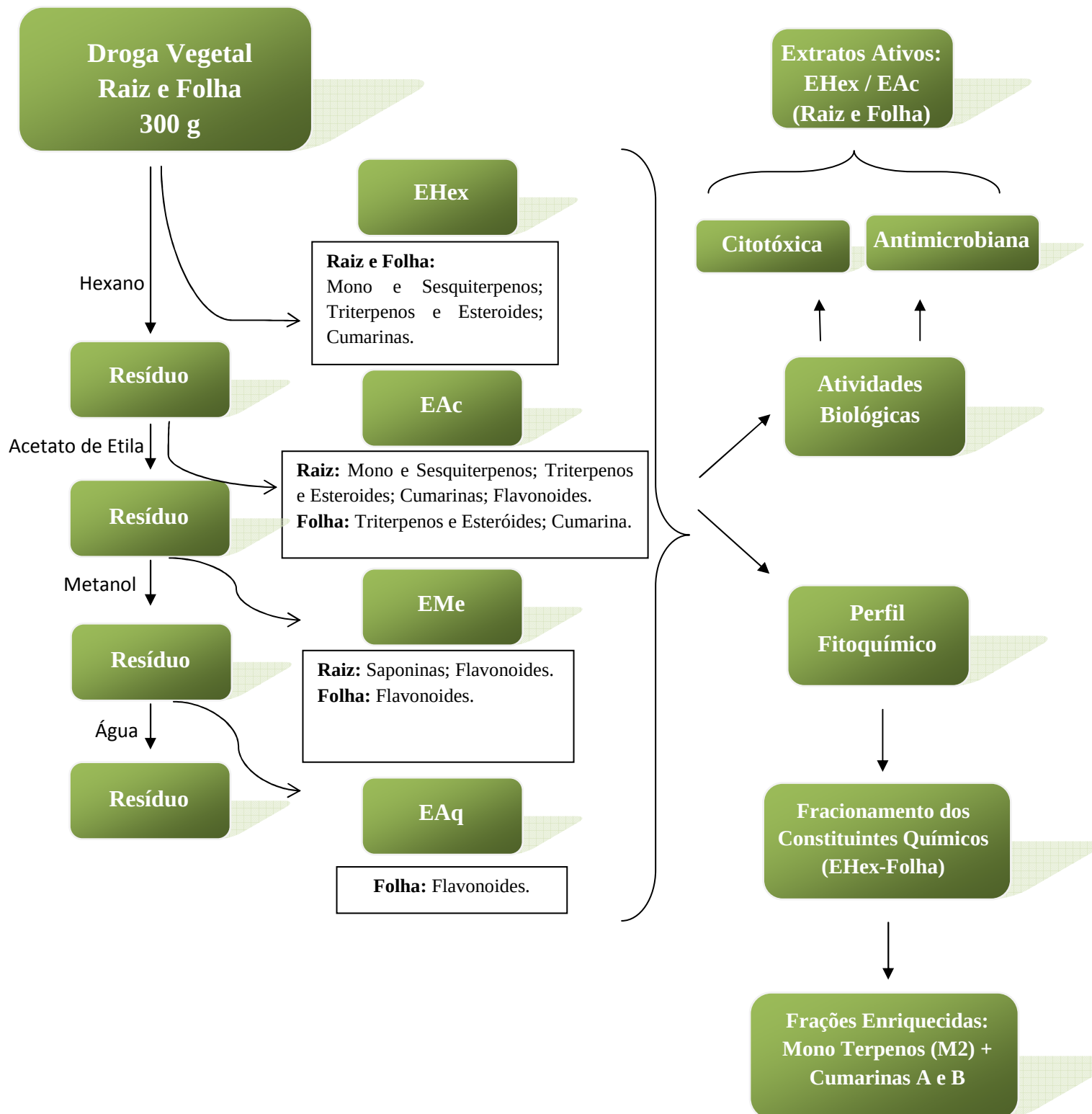
Jaafari et al., (2012), demonstra em suas pesquisas o sinergismo de compostos terpênicos com quimioterápicos de referência utilizados na terapêutica, aumentando o percentual de inibição e a eficácia citotóxica desses fármacos. Lucena et al. (2012) mostra a atividade antitumoral do sitosterol em *Cissus sicyoides* L., Vitaceae, cujo mecanismo de ação está relacionado a indução de apoptose em associação ao TNF- α .

Diversas cumarinas apresentam ação em alguns processos relacionados à gênese tumoral, dentre elas podem-se citar a dafnetina, que possui ação antiproliferativa por ser inibidora de proteínas quinases (YANG et al., 1999; FINN, CREAVER, EGAN, 2004,); A escopoletina com efeitos antiproliferativos comprovados por meio de indução de apoptose em células PC3 (LIU et al. 2001) ou ainda a cumarina e a 7-hidroxycumarina (umbeliferona) que induziram distúrbios no ciclo celular e apoptose em células do carcinoma humano (LOPEZ-GONZALEZ et al., 2004).

Flavonoides e isoflavonoides tem mostrado diversas atividades biológicas, dentre elas a quimioproteção do câncer. Recentemente uma considerável atenção tem sido dada a sua habilidade de inibir o ciclo celular, proliferação de células neoplásicas, estresse oxidativo e apoptose. Ensaios de citotoxicidade in vivo foram realizados em ratos com melanoma, demonstrando que a aplicação intraperitoneal de quercetina e apigenina era responsável pela ação antiproliferativa do tumor (CALTAGIRONE et al., 2000). A naringenina e seus análogos também são referenciados por suas atividades contra linhagens de câncer como 7-O-Butyl Naringenina que possui atividade contra o câncer de mama (PARK et al., 2010).

A condensação dos dados obtidos em forma de fluxograma, permitiu maior visibilidade aos resultados obtidos (Fig. 7).

Figura7 - Condensação dos resultados obtidos a partir do perfil fitoquímico, antimicrobiano e citotóxico de *Luetzelburgia auriculata*.



Assim, os resultados obtidos nos ensaios realizados com essa espécie originária do semiárido paraibano, corroboram com os estudos apresentados, uma vez que os extratos que apresentaram maior atividade são os detentores da maior parte dos compostos de mesma classe química, o que justifica sua alta atividade citotóxica.

4 Conclusão

Através da identificação e descrição morfológica de *Luetzelburgia auriculata* foi possível realizar sua correta caracterização botânica, e por meio de cortes histológicos transversais e paradermicos, de sua raiz e folhas foi possível constatar a presença de estruturas microscópicas desenvolvidas pela espécie ao longo do processo evolutivo, necessárias à sua adaptação no biótopo inserido, sendo este o primeiro relato de caracterização.

A partir da prospecção fitoquímica da raiz e folha de *Luetzelburgia auriculata*, foi possível identificar as principais classes de metabólitos secundários que a constitui, sendo mono e sesquiterpenos, triterpenos e esteroides, cumarinas, flavonóides e saponinas os compostos presentes majoritariamente.

Tais substâncias mostraram-se quimicamente ativas mostrando por meio dos testes biológicos preliminarmente realizados a potencialidade antimicrobiana e citotóxica.

Assim, o EAc da raiz mostrou-se fortemente ativo, a uma concentração cerca de nove vezes menor que antibiótico de referência, contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Proteus mirabilis*), denotando diferentes mecanismos de ação para tal atividade.

Os extratos EAc e EHex da folha também demonstraram-se fortemente ativos contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*), a uma concentração discretamente menor que a droga de escolha.

Além desses aspectos os EAc da raiz e EHex da folha apresentaram alta atividade citotóxica contra linhagens humanas de câncer de pulmão, cólon e laringe a uma concentração de 25 µg/mL mostrando-se potencialmente promissores como adjuvantes no arsenal quimioterápico, ou ainda na utilização como modelos para delineamento de novos fármacos anticancerígenos, o que evidencia a necessidade de experimentos mais sensíveis para caracterização de todos os parâmetros necessários. Tal resultado mostra-se de grande importância devido à interessante atividade apresentada além do ineditismo do resultado para a espécie e gênero.

Diante dos resultados obtidos pode-se observar que a espécie *Luetzelburgia auriculata* (Allemão) Ducke, apesar de tóxica a primeira vista, com todas as suas peculiaridades morfoanatômicas caracterizadas, possui uma diversificada constituição química com promissoras

atividades antimicrobianas e citotóxicas, constituindo assim, um acervo de biomoléculas de interesse farmacêutico de grande importância na busca por agentes alternativos para o tratamento de doenças infecciosas e neoplásicas.

Assim, este trabalho contribui com o aumento de informações científicas a respeito do táxon e do gênero que encontram-se praticamente inexplorados, além de colaborar com a valorização das espécies de caatinga que constituem a flora brasileira.

5 Referências

- ALENCAR, N.M.N.; OLIVEIRA, R.S.B.; FIGUEIREDO, J.G.; CAVALCANTE, I.J.M.; MATOS, M.P.V.; CUNHA F.Q.; NUNES J.V.S.; BOMFIM L.R.; RAMOS M.V. An anti-inflammatory lectin from *Luetzelburgia auriculata* seeds inhibits adhesion and rolling of leukocytes and modulates histamine and PGE2 action in acute inflammation models. **Inflamm. Res.** Birkhäuser Verlag, Basel/Switzerland, 2009.
- Allemao, FF. **Trabalhos da comissão científica de exploração do Ceará**. Seção Botânica. Rio de Janeiro, 1862.
- ANDRADE-LIMA, D. The Caatingas dominium. **Revista Brasileira de Botânica**. v. 4, p. 149-163, 1981.
- APG-The Angiosperm Phylogeny Group. An update of the Angiosperm Phylogeny Group Classification for the Orders and Families of Flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**. v. 141. p. 399 - 436, 2003.
- BAQUERO, F.; BLÁZQUEZ, J. Evolution of antibiotic resistance. **Trends Ecol Evol**. v. 12, p. 482-487, 1997.
- BARROSO, G.M.; PEIXOTO, A.L.; ICHASO, C.L.F.; COSTA, C.G.; GUIMARÃES, E.F. & LIMA, H.C. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. V.2. Imprensa Universitária, UFV. Viçosa, 1991.
- BENTHAM, G. Leguminosae. In: Bentham, G. & Hooker, J.D. **Genera Plantarum**. London: Lovell Reeve & Co. v. 1, pp. 434-600, 1865.
- BERRIDGE, M.V.; TAN A.S.; MCCOY K.D.; WANG R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. **Biochemica**. v. 4, p. 14-19. 1996.
- BRAZ FILHO, R.; GOTTLIEB, O.R.; PINHO, S.L.V.; MONTE, F.J.Q.; ROCHA, A.I. DA. Flavonoids from Amazonian Leguminosae. **Phytochemistry**, v. 12 n-5, p. 1184-1186, 1973.
- BRITO, S.A.: **Estudo Químico e Biológico de *Cajanus cajan* (L.) Millsp (Fabaceae)**. Dissertação (Mestrado em Bioprospecção Molecular). Universidade Regional do Cariri, Crato-Ceará, 2011.
- BRUNEAU, A.; MERCURE, M.; LEWIS, G.P.; HERENDEEN, P.S. Phylogenetic patterns and diversification in the caesalpinoid legumes. **Botany**. v. 86 p. 697-718, 2008.
- CALTAGIRONE, S.; ROSSI, C.; POGGI, A.; RANELLETTI, F.O.; NATALI, P.G.; BRUNETTI, M.; AIELLO, F.B.; PIANTELLI, M. Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. **Int. Jour. Cancer**. v. 87. p. 595 – 600, 2000.
- CANUTO, K.; M.; SILVEIRA, E.R. Constituintes Químicos da Casca do Caule de *Amburana Cearensis* A.C. Smith. **Quim. Nova**, v. 29, n-6, p. 1241-1243, 2006.
- CARDOSO, D.B.O.S. **Taxonomia da tribo Sophoreae s.l. (Leguminosae, Papilionoideae) na Bahia, Brasil**. Tese (Doutorado em Botânica), Universidade Estadual de Feira de Santana-Bahia, 2008.

CARVALHO, C.J.S. **Toxicidade dos Extratos Aquosos de *Brunfelsia uniflora* e *Luetzelburgia auriculata* em Camundongos Swiss**. Dissertação de mestrado em Ciência Animal. Universidade Federal do Piauí, 2012.

CHUNG, P.Y.; NAVARATNAM, P.; CHUNG, L.Y. Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. v. 10. p. 25, 2011.

CLSI – CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing M100-S20**, 2010.

COMPAGNI, A.; CHRISTOFORI, G. Recent advances in research on multistage tumorigenesis. **Br J Cancer**, v. 83, n. 1, p. 1-5, 2000.

CÓRDULA, E. **Distribuição e Diversidade de Leguminosae em Áreas de Caatinga no Município de Mirandiba – Pe**. Dissertação de mestrado em Biologia Vegetal. Universidade Federal de Pernambuco, 2008

COWAN, M. Plant products as Antimicrobial Agents. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 12, p. 564-582, 1999.

CRAGG, G.M.; KINGSTON, D.G.I.; NEWMAN, D.J. **Anticancer Agents from Natural Products**. CRC Press; Boca Raton, FL: 2005.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981.

DAVENPORT, D.S.; MASSANARI, R.M.; PFALLER, M.A.; BALE, M.J.; STREED, S.A.; HIERHOLZER, W.J.J. Usefulness of a test for smile production as a marker for clinically significant infections with coagulase negative Staphylococci. **Journal of Infectious Diseases**. v. 153. p. 332-339, 1986.

DEMO, M.S.; OLIVA M.M. **Antimicrobial activity of medicinal plants from South America**. In: Preedy, V.; Watson, R. Botanical Medicine and Clinical Practice. Oxford USA Professio. United States: 2008.

DOS SANTOS, P.A.; DE AQUINO NETO, F.R. Chemical composition of Tipuana tipu, a source for tropical honey bee products. **Z Naturforsch C**. v. 5 n-3-4 p. 201-206, 2003.

DOYLE, J.J. **DNA data and legume phylogeny: a progress report**. In: Crisp, M.D.; Doyle, J.J. *Advances in Legume Systematics*, part 7, Phylogeny. Kew: Royal Botanic Gardens, p. 11-30, 1995.

HAMERLYNCK, E.P.; HUXMANT.E. Ecophysiology of two Sonoran Desert evergreen shrubs during extreme drought. **Journal of Arid Environments**. v. 73 p. 582–585, 2009.

EGLER, W. ADOLPHO. **Ducke-Traços Biográficos, Viagens e Trabalhos**. Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém do Pará, Brasil, 1963.

FERREIRA, P.M.P.; FARIAS, D.F.; VIANA, M.P.; SOUZA, T.M.; VASCONCELOS, I.M.; SOARES, B.M.; PESSOA, C.; LOTUFO, L.V.C.; MORAES, M.O.; CARVALHO, A.F.U. Study of the antiproliferative potential of seed extracts from Northeastern Brazilian plants. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**. v. 83 n-3 p. 1045-1058, 2011.

- FILHO, P.A.C.S. **Estudo Químico e Biológico em *Lupinuslanatus* Bentham (Leguminosae-Papilionoideae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2004.
- FINN, G.J.; CREAVER, B.S.; EGAN, D.A. Daphnetin induced differentiation of human renal carcinoma cells and its mediation by p38 mitogen-activated protein kinase. **Biochemical Pharmacology**, n. 67, p. 1779-1788, 2004.
- FONSECA, M.R.F.; MORAIS, R.C.J. **Francisco Freire Allemão de Cysneiros**. Dicionário Histórico-Biográfico das Ciências da Saúde no Brasil (1832-1930). Disponível em: <<http://www.dichistoriasaude.coc.fiocruz.br/iah/P/verbetes/cisfranfrei.htm#topo>>. Acessado em [02/01/2012].
- FOUCHE, G.; CRAGG, G.M.; PILLAY, P.; KOLESNIKOVA, N.; MAHARAJ, V.J.; SENABE, J. *In vitro* anticancer screenin of South African plants. **Jour. Ethnopharmacology**, v. 119, n. 3, p. 455 - 461, 2008.
- FRANCIS, G.; HEREM, Z.; MAKAR, H.P.S.; BECKER, K. The Biological Action of Saponins in animal systems: a review. **Br J Nutr**, v. 88 n-6 p.587-605, 2002.
- FRESHNEY, R. I. **Freshney's Culture of animal cell- a multimedia guide**. New York, 1999.
- GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural Product Reports**. v. 21 n-2 p. 263-277, 2004.
- GONZALEZ, F.G.; PORTELA, T.Y.; STIPP, E.J.; DI STASI, L.C. Antiulcerogenic and analgesic effects of Maytenus aquifolium, Sorocea omplandii and Zolernia ilicifolia. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 77 p. 41-47, 2001.
- GUNN, C. R. **Fruits and seeds of genera in the subfamily Mimosoideae (Fabaceae)**. U. S. Department of Agriculture, Technical Bulletin n° 1681, 1984.
- GUNN, C.R. **Seeds of Leguminosae**. In: Polhill, R.M. & Raven, P.H. (eds.) Advances in Legume Systematics, part 2. Kew: Royal Botanic Gardens, p. 913-925, 1981.
- HARBORNE, J.B. **Phytochemical Methods**. 3ªed. London: Chapman & Hall, 1998.
- HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. **Chemistry and Pharmacology of Natural Products: Saponins**. Cambridge University Press, 1995.
- JAAFARI, A.; TILAOU, M.; MOUSE, H.A.; M'BARK, L.A.; ABOUFATIMA, R.; CHAIT, A.; LEPOIVRE, M.; ZYAD, A. Comparative study of the antitumor effect of natural monoterpenes: relationship to cell cycle analysis. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 22 n-3 p.534-540, 2012.
- JARVIS, C. **Order out of Chaos. Linnaean Plant Names and their Types**. Londres: Linnean Society of London and Natural History Museum, 2007.
- KAJITA, T.; OHASHI, H.; TATEISHI, Y.; BAILEY, C.D.; DOYLE, J.J. *rbcL* and legume phylogeny, with particular reference to Phaseoleae, Millettieae, and allies. **Systematic Botany**. v. 26 n-3 p. 515-536, 2001.
- KÄSS, E. & WINK, M. Molecular evolution of the Leguminosae: Phylogeny of the three subfamilies based on *rbcL* sequences. **Biochemical Systematics and Ecology**. v.24p. 365-378, 1996.

KING, F.E.; GRUNDON, M.F.; NEIL, K.Q. The chemistry of Extractives from Hard-Woods. Part X. The constitution of Ferreïn and of Homoferreïn. **J. Chem Soc.**, p. 4580, 1952.

KUMAR, S. BHAT, K.I. In -vitro cytotoxic activity studies for *Clitoria ternatea* Linn flower extracts. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**. v. 6. n. 2p. 120, 2011.

LEITE, E.J. State-of-knowledge on *Amburana cearensis* (Fr. Allem.) A.C. Smith (Leguminosae: Papilionoideae) for genetic conservation in Brazil. **Journal for Nature Conservation**. v. 13, p. 49 - 65, 2005.

LEWIS, G.P.; KNUDSEN, J.T.; KLITGAARD, B.B.; PENNINGTON, R.T. The floral scent of *Cyathostegia mathewsii* (Leguminosae, Papilionoideae) and preliminary observations on reproductive biology. **Biochem Syst Ecol**. v. 31, n. 9, p. 951-962, 2003.

LEWIS, G.P. **Legumes of Bahia**. The Royal Botanic Garden, Whitstasble, 1987.

LEWIS, G.P.; SCHRIRE, B.D.; MACKINDER, B.A.; LOCK, M. (eds.). **Legumes of the World**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2005.

LIMA, H.C. **Tribo Dalbergieae (Leguminosae -Papilionoideae) - morfologia dos frutos, eementes e plântulas e sua aplicação na sistemática**. Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro v. 30, p. 1-42, 1989-1990.

LIMA, M.P.M. **Morfologia dos frutos e sementes dos gêneros da tribo Mimoseae (Leguminosae - Mimosoideae), aplicada à sistemática**. Rodriguésia v. 37, p. 53-78, 1985.

LINNAEI, C, **Species Plantarum, Exhibentes Plantas Rite Cognitas, Ad Genera Relatas, Cum Differentiis Specificis, Nominibus Trivialibus, Synonymis Selectis, Locis Natalibus, Secundum Sistema Sexuale Digestas**. Tomus II Impensis Laurentii SAL VII, 1753

LIU, X.L.; ZHANG, L.; FU, X.L.; CHEN, K.; QIAN, B.C. Effect of scopoletin on PC₃ cell proliferation and apoptosis. **Acta Pharmacol Sin**, v. 22, n. 10, p. 929-933, 2001.

LIU, Y.; ZHANG, Q.Y.; ZHAO, Y.Y.; WANG, B.; HAI, L.Q.; YING, Y.P.N.G.; CHEN, H.B. Saponins from the roots of *Hedysarum polybotrys*. **Biochem Syst Ecol**. v. 35, p. 389-391, 2007.

LOPEZ-GONZALEZ, J.S.; PRADO-GARCIA, H.; AGUILAR-CAZARES, D.; MOLINA-GUARNEROS, J.A.; MORALES-FUENTES, J.; MANDOCKI, J.J. Apoptosis and cell cycle disturbances induced by coumarin and 7-hydroxicoumarin on human lung carcinoma cell lines. **Lung Cancer Journal**, v. 43, p. 275-283, 2004.

LORENZI, H. **Arvores Brasileiras**. Instituto Plantarum, v. 1, 5° Ed., p. 170, Nova Odessa, 2008.

LUCENA, F.R.S.; ALMEIDA, E.R.; AGUIAR, J.S.; SILVA, T.G.; SOUZA, V.M.O. NASCIMENTO S.C. Cytotoxic, antitumor and leukocyte migration activities of resveratrol and sitosterol present in the hidroalcoholic extract of *Cissus sicyoides* L., Vitaceae, leaves. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 5, p. 729-733, 2010.

LUCKOW, M.; MILLER, J.T.; MURPHY, D.J.; LIVSHULTZ, T. **A phylogenetic analysis of the Mimosoideae (Leguminosae) based on chloroplast DNA sequence data**. In: Klitgaard, B.B. & Bruneau, A. (eds.). *Advances in Legume Systematics*, part 10. Kew: Royal Botanic Gardens, p. 197-220, 2003.

- MACHADO, A., SANTOS, M. **Morfo-anatomia foliar comparativa de espécies conhecidas como espinheira-santa: *Maytenus ilicifolia*(Celastraceae), *Sorocea bonplandii* (Moraceae) e *Zollernia ilicifolia*(Leguminosae).**INSULA Revista de Botânica, 33, set. 2011. Disponível em: <<http://www.periodicos.ufsc.br/index.php/insula/article/view/20428>>. Acesso em: 14 Abr. 2012.
- MAIA, G.N. **Caatinga árvores e arbustos e suas utilidades.** São Paulo :D&Z Computação Grafica e Editora,1 Ed., 2004.
- MAIA, L.C.; MELO, A.M.Y.; CAVALCANTE, M.A. **Diversidade de fungos no estado de Pernambuco.** In: M. Tabarelli & J.M.C. da Silva (orgs.). Diagnóstico da biodiversidade de Pernambuco. v.1. Recife: Editora Massangana. p. 15-50, 2002.
- MAKKAR, H.P.S.; SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. **Methods in Molecular Biology: Plant Secondary Metabolites.** v. 393, Humana Press Inc. Totowa, NJ, 2007.
- MANSANO, V.F.; BITTRICH, V.; TOZZI,A.M.G.A.; SOUZA, A.P. Composition of the Lecointea clade (Leguminosae, Papilionoideae, Swartzieae), a re-evaluation based on combined evidence from morphology and molecular data. **Taxon**,v. 53 n.4, p. 1007- 1018, 2004.
- MATOS, F.J.A.; MACHADO, M.IL.; BARRETO, A.L.H.Estudo Químico e Farmacológico preliminar de *Luetzelburgia auriculata* Ducke. **Supl. Acta Amazônica**, Universidade Federal do Ceará, v. 18, n. 1-2, p. 353-355, 1988.
- MATOSIUK, D.; GRALAK, D.; RYSNAR, M.Lipophilicity of natural coumarines. **Annales Universitatis Mariae Curie - Sklodowska.** Lublin-Polonia.v.24, n. 2,3 p. 500, 2011.
- MCMAHON, M.M.; SANDERSON, M.J. Phylogenetic supermatrix analysis of GenBank sequences from 2228 papilionoid legumes.**Systematic Biology**,v. 55, n.5, p.818-836, 2006.
- MELLO, G.W.S, OLIVEIRA, D.M., CARVALHO C.J.S., CAVALCANTE,M.V.F.L, COSTA, F.A.L., CORREA, F.R., SILVA, S.M.M.S.. Poisoning of goats by the pods of *Luetzelburgia auriculata*.**Toxicon**, v. 55, p. 1115–1118, 2010.
- MELO, V.M.M.; VASCONCELOS, I.M.; GOMES, V.M.; CUNHA, M.D.; SOARES A.A.; OLIVEIRA, J.T.A.A cotyledonary agglutinin from *Luetzelburgia auriculata* inhibits the fungal growth of *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani* and *Aspergillus niger* and impairs glucose-stimulated acidification of the incubation medium by *Saccharomyces cerevisiae* cells.**Plant Science**, v. 169, p. 629–639, 2005.
- MENEZES, R. S. C.; SAMPAIO, E. V. S. B. **Agricultura sustentável no semi-árido nordestino.** In: Oliveira, T. S.; Romero, R. E.; Assis Jr., R. N.; Silva, J. R. C. S. (ed.). Agricultura, sustentabilidade e o Semi-árido. Fortaleza: SBCS, DCS-UFC, cap.2, p.20-46, 2000
- BRASIL.Ministério da Saúde. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2012 : incidência de câncer no Brasil.** Rio de Janeiro (Brasil): INCA, 2011.
- MITTERMEIER, R.A.; ROBLES-GIL,P.; MITTERMEIER,C. G. **Megadiversity: Earth's biologically wealthiest nations.** CEMEX, Agrupación Serra Madre, S.C., Mexico, 1997.
- MONK, C. D. An ecological significance of evergreenness. **Ecologia**v. 47, p. 504-505, 1966.
- MONTE, C. Fitos e Interfaces. **T&C Amazônia**, Ano V, n. 11, p.1-79, 2007.

- MORA, C.; TITTENSOR, D.P.; ADL, S.; SIMPSON, A.G.B.; WORM, B. How Many Species Are There on Earth and in the Ocean? **PLoS Biol.** 9, n.8, p. 1-5, 2011.
- MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63. 1983.
- NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C.; SILVA, G. L. E. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemical on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 247-256, 2000.
- NETTO, C.D.; SILVA, A.J.M.; SALUSTIANO, E.J.S.; BACELAR, T.S.; RIÇA, I.G.; CAVALCANTE, M.C.M.; RUMJANEK, V.M.; COSTA, P.R.R. New pterocarpanquinones: Synthesis, antineoplastic activity on cultured human malignant cell lines and TNF- α modulation in human PBMC cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.18, p.1610-1616, 2010.
- NGUYEN, P.H.; LE, T.V.T.; THUONG, P.T.; DAO, T.T.; NDINTEH, D.T.; MBAFOR, J.T.; KANG, K.W.; OH, W.K. Cytotoxic and PTP1B inhibitory activities from *Erythrina abyssinica*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.19, p.6745-6749, 2009.
- PAIVA, M.P., Os Naturalistas e o Ceará: IX - Philipp Von Luetzelburg (1880-1948). **Revista do Instituto Ceará**, Tomo CXVII, n. 117, p.41-53, 2003.A004, 2003.
- PARK, J.H.; LEE, J.W.; PAIK, H.D.; CHO, S.G.; NAH, S.Y.; PARK, Y.S.; HAN, Y.S. Cytotoxic Effects of 7-O-Butyl Naringenin on Human Breast Cancer MCF-7 Cells. **Food Sci. Biotechnol.** v. 19, n. 3, p. 717-724, 2010.
- PATE, J.S.; KUO, J. **Anatomical studies of legume pods – a possible tool in taxonomic research.** Pp. 903-912. In: R.M. Polhill & P.H. Raven (eds.). *Advances in Legume Systematics*. Kew, Royal Botanic Garden, 1981.
- PATEL, S.R.; SUTHAR, A., R P.; PATEL, M. *In Vitro* Cytotoxicity Activity of *Semecarpus anacardium* Extract Against Hep 2 Cell Line and Vero Cell Line. **Int. Jour. Pharm Tech Res.** v.1. n.4. p. 1429 - 1433, 2009.
- PENNINGTON, R.T.; LAVIN, M.; IRELAND, H.; KLITGAARD, B.; PRESTON, J.; HU, J.M. Phylogenetic relationships of basal papilionoid legumes based upon sequences of the chloroplast *trnL* intron. **Syst. Bot.** v. 26, n. 3, p. 537-556, 2001.
- PHILLIPS, D.A.; KAPULNIK, Y. Plant isoflavonoids, pathogens and symbionts. **Trends in Microbiology**, v.3, n. 2, p.58-64, 1995.
- POLHILL, R.M. **Papilionoideae.** In: Polhill, R.M. & Raven, P.H. (eds.). *Advances in Legume Systematics*, part 1. Kew: Royal Botanic Gardens, p. 191-208, 1981.
- PRADO, D.E.; GIBBS P.E. Patterns of species distributions in the dry seasonal forest of South America. **Annals Missouri Botanic Garden**, v.80, p. 902-927, 1993.
- QUEIROZ, L. P. DE. **The Brazilian Caatinga: Phytogeographical Patterns Inferred from Distribution Data of the Leguminosae.** In: PENNINGTON, R. T.; LEWIS, G. P. & RATTER, J. A. (Eds.) *Neotropical Caatingas and Dry Forests: Plant Diversity, Biogeography, and Conservation*. Boca Raton, FL, Taylor & Francis CRC-Press, 2006.
- QUEIROZ, L.P. DE. **Leguminosas da caatinga.** Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana, 467 p, 2009.

OLIVEIRA, R. S., CUNHA S. C.; COLAÇO W. Revisão da *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, Celastraceae. Contribuição ao estudo das propriedades farmacológicas. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 2B, p. 650-659, 2009.

RATTI, R.P.; SOUSA, C.P. *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA) e infecções nosocomiais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 30. n. 2. p. 137-143, 2009.

RIEN AERTS. The advantages of being evergreen. **Tree**, v. 10, n. 10, p. 402-407, 1995.

RUKACHAISIRIKUL, T.; SAEKEE, A.; THARIBUN, C.; WATKUOLHAM, S.; SUKSAMRARN, A. Biological Activities of the Chemical Constituents of *Erythrina stricta* and *Erythrina subumbrans*. **Archives of Pharmacal Research**, v.30, n. 11, p.1398-1403, 2007.

SAITO, M.L.; POTT, A.; FERRAZ, J.M.G.; NASCIMENTO, R.S. Avaliação de Plantas com Atividade Deterrente Alimentar em *Spodoptera Frugiperda* (J.E.Smith) e *Anticarsia gemmatalis* Hubner. **R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 14, p. 1 a 10, 2004.

SANTOS, A.P.; ZATTA, D.T.; MORAES, W.F.; BARA, M.T.F.; FERRI, P.H.; SILVA, M.R.R.; PAULA, J.R. Composição química, atividade antimicrobiana do óleo essencial e ocorrência de esteróides nas folhas de *Pterodon emarginatus* Vogel, Fabaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20 n. 6, p. 891-896, 2010.

SANTOS, M.R.V.; FRAGA, F.V.M.; BYANKA, P.; SOUSA, D.P. DE; BONJARDIM, L.R.; LUCINDO, J.;QUINTANS JÚNIOR, L. J. Cardiovascular effects of monoterpenes: a review. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**v. 21, n.4,p.764-771, 2011.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A.L.M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M.C.T.; REHDER, V.L.G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 35. p. 275-280, 2004.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: editora da UFSC, 2007.

SOARES, E.L.; FREITAS, A.; CLEVERSON, D.T.; OLIVEIRA, A.J.S.; SOUSA, B. P.A.S.; SALESC, M. P.; BARRETO-FILHO, A.J.D.M.; BANDEIRA, A.G.P.; RAMOSA, M.V. Characterization and insecticidal properties of globulins and albumins from *Luetzelburgia auriculata* (Allemão) Ducke seeds towards *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). **J.Prod.Res**, v.43, p. 459–467, 2007.

SOUZA, S.M. **Atividade Antibacteriana de Cumarinas Naturais e Derivados**. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

SOUZA, T.M.;FARIAS, D.F.; SOARES, B.M.; VIANA, M.P.; LIMA, G.P.; MACHADO, L.K.; MORAIS, S.M.; CARVALHO, A.F. Toxicity of Brazilian plant seed extracts to two strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and nontarget animals. **J. Med. Entomol.**, v. 48, n.4, p. 846-851, 2011.

SOUZA, V. CA.;LORENZI, H. **Botânica Sistemática: Guia Ilustrado para Identificação das Famílias de Angiospermas da Flora Brasileira, Baseado em APG II**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum. 2005.

SPARG, S.G.; LIGHT, M.E.; VAN STADEN, J. Biological Activities and Distribution of Plant Saponins. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p.219-243, 2004.

- TROMBETTA, D.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M.G.; VENUTI, V.; CRISTANI, M.T.; DANIELE, C.; SAIJA, A.; MAZZANTI, G.; BISIGNANO, G. Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 9, n. 6, p. 2474–2478, 2005.
- VENTURA, C.P. **Uso de Micro-Ondas na Síntese de Novos ($\pm$) Pterocarpanos com Atividade Sequestradora de Radicais Livres**. Doutorado em Ciências – Química. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.
- VINOTH, S.; KANNA, P.R.; GURUSARAVANAN, P.; JAYABALAN, N. Evaluation of Phytochemical, Antimicrobial and CG-MS analysis of Extracts of *Indigofera trita* L.F. SPP. *subulata* (vahl ex poir). **International Journal of Agricultural Research**, v. 6 n. 4, p. 358-367, 2011.
- VIPIN, K.; ARUN, G.K.; RAJESH, G. **Antimicrobial Activity of *Sesbania grandiflora* (L.) Pers.** **International Research Journal of Pharmacy**. v.2, n. 7, p. 85-88, 2011.
- VIRTUOSO, S.; DAVET, A.; DIAS, J.F.G.; CUNICO, M.M.; MIGUEL, M.D.; OLIVEIRA, A.B.; MIGUEL, O.G. Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae (Leguminosae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 15, n. 2, p. 137-142, 2005.
- WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis – A thin layer chromatography atlas**. 2ªed. Berlim: Springer-Verlag, 1996.
- WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, v. 64, p. 3–19, 2003.
- WINK, M.; MOHAMED, G.I.A. Evolution of chemical defense traits in the Leguminosae: mapping of distribution patterns of secondary metabolites on a molecular phylogeny inferred from nucleotide sequences of the *rbcL* gene. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 897–917, 2003.
- WOJCIECHOWSKI, M.F.; LAVIN, M.; SANDERSON, M.J. A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid *matK* gene resolves many well-supported subclades within the family. **Amer. J. Bot.** v. 91, n. 11, p. 1846-1862, 2004.
- WONG, Y.H.; KADIR, H.A.; LING, S.K. Bioassay-Guided Isolation of Cytotoxic Cycloartane Triterpenoid Glycosides from the Traditionally Used Medicinal Plant *Leea indica*. **Evid Based Complement Alternat Med.**, v. 2012, p. 1-11, 2011.
- WU, X.P.; HAN, C.R.; CHEN, G.Y.; YUAN, Y.; XIE, J.Y. Cytotoxic pentacyclic triterpenoids from *Combretum oliviforme*. **Nat Prod Commun.** v. 5, n. 7, p. 1027-1030, 2010.
- YANG, C.S.; LANDAU, J.M.; HUANG, M.T.; NEWMARK, H.L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Annual Review of Nutrition**. v. 21. p. 381 – 406, 2001.
- YANG, E.B.; ZHAO, Y.N.; ZHANG, K.; MACK, P. Daphnetin, One of Coumarin Derivatives, is a Protein Kinase Inhibitor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 260, p. 682-685, 1999.

ANEXO A

(Normas da Revista Brasileira de Farmacognosia)

The **Revista Brasileira de Farmacognosia** (*Brazilian Journal of Pharmacognosy*) is a periodical dedicated to the publication of original scientific work, reviews and communications in the field of Pharmacognosy (the study of biologically active natural products).

1. General rules

1.1 All submitted manuscripts must not have been published. The simultaneous submission of manuscripts describing the same work to other journals is not recommended. The journal will accept contributions on the understanding that the author has obtained the necessary authority for publication. In the case of multiple authors, each author must inform the corresponding author that he/she consents to submission of the article to The **Revista Brasileira de Farmacognosia**.

1.2 The **Revista Brasileira de Farmacognosia** accepts for publication original scientific work, reviews and communication articles written only in English. The content of the text is entirely the responsibility of the author(s), and does not necessarily reflect the opinion of the Editor, Editorial Board or members of the Advisory Board.

1.3 Manuscripts written by authors whose native language is not English should be checked by a native speaker or a professional language editing service before submission. Assistance of independent editing services can be found at <http://www.sbfgnosia.org.br/revista>. All services are paid for and arranged by the author, and the use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

1.4 The **Revista Brasileira de Farmacognosia** reserves the right to submit all received manuscripts to *ad hoc* referees, whose names will be kept confidential, and who will have the authority to decide on the pertinence for acceptance. Referees may return manuscripts to the Editor-in-Chief or Section Editors for transmission to the author(s) with suggestions for necessary alterations which are to be made to conform to the standards and editorial rules of the journal.

1.5 All articles involving studies with humans or animals should have the approval and authorization of the Ethics Committees on Research on Human Beings or on Animals of the institutions to which the author(s) belong.

1.6 All plant, microorganism and marine organism materials used in the described research should be supported by an indication of the site (including GPS coordinates, if possible) and country of origin, the name of the person identifying the biological

material and the location of the voucher specimen.

1.7 Authors should be prepared to provide documentary evidence that approval for collection was afforded from an appropriate authority in the country of collection and, if applicable, to follow the rules concerning the biodiversity rights.

1.8 Manuscripts dealing with essential oils that contain seasonal harvest and biological activity and which explore mechanisms of action or synergism are welcome.

1.9 The journal will not accept responsibility for research works that do not comply with the legislation of the country of residence of the author.

1.10 We strongly recommend that authors avoid stating that the popular or traditional use of a certain herb was confirmed by pre-clinical, *in-vitro* or *in vivo* tests using animals.

1.11 The following **immediate rejection criteria** apply:

- i. the manuscript does not fall into the areas of interest of the journal;
- ii. manuscripts not formatted in accordance with the standards of the journal (see Section 3);
- iii. the manuscript results are preliminary;
- iv. manuscripts reporting activity data without comparison with a reference, without a positive control/appropriate control or not based on adequate statistics;
- v. the biological source (*e.g.* plant, microorganism, marine organism etc.) is not clearly identified, authenticated and documented;
- vi. experimental work on antioxidant activity of crude extracts without isolation, identification and content estimation of the active compounds;
- vii. experimental work on antimicrobial activity with crude extracts without isolation and identification of the active compounds, with large MIC values ($\mu\text{g/mL}$) for antimicrobial activity ($\geq 250 \mu\text{g/mL}$ for plant extracts and $\geq 50 \mu\text{g/mL}$ for pure compounds) and without appropriate identification of culture collections/strain designation codes;
- viii. experimental work on essential oils with only one sample of a single plant specimen with a single chromatographic analysis and without appropriate statistical analyses; without oil yield (%) and characterization and component quantification not

undertaken using GC-MS-FID and analyses of the retention indices of the components not calculated using *n*-alkane homologous series together with analyses of some of the isolated natural components. Biological activity results without chemical characterization of the compounds.

- ix. too preliminary data using *in-vitro* assays will not be acceptable if (i) no information on the type of activity is given; (ii) single dose or very high concentrations (must show dose-response studies); (iii) repetition of a simple bioassay (usually one assay with replicates); (iv) lack of appropriate controls (solvents; positive or negative substances according to the study); (v) no IC₅₀ values (if applicable).
- x. manuscripts with repetition of a single bioassay for yet another extract or plant;
- xi. use of only the brine shrimp assay (*Artemia salina*) to access the toxicity of extracts;
- xii. isolation and bioassay of well-known compounds with small or no relationship to the activity, or to the medicinal use of the plant without clear justification;
- xiii. manuscripts reporting pharmacological or biological activities of crude extracts without chemical and technical standardization.¹

¹Standardization of the plant extracts is considered to be the complete description of manufacturing parameters such as granulometry, solvent-plant ratio, time of extraction, solvent composition etc., together with marker quantification or chromatographic fingerprint analyses.

2. Rules for the elaboration of contributions

2.1 The author(s) should retain a copy (electronic and paper) of the submitted manuscript in the event of loss or damage to the original sent to the journal.

2.2 Figures (photographs, charts, drawings, etc.) and tables should be inserted close to the point at which they are discussed and numbered consecutively in Arabic numerals. The respective captions should be clear, concise, with no abbreviations and located underneath the figures. Their respective position in the text should be indicated preferentially just after their citation in the body of the manuscript.

If figures are from another font, formal authorization is required.

2.3 Tables should be numbered consecutively using Arabic numerals. Tables (numerical data) should not be closed by side lines. The respective captions must be clear, concise, with no abbreviations and located above the table. There should be an indication of the approximate position in the text where tables should be placed (preferentially just after their citation in the body of the manuscript).

2.4 The captions of botanical illustrations (abbreviations of anatomical descriptions) should be in accordance with the rules adopted by the journal. Please request standards by email to revista@sbfgnosia.org.br.

3. Text formatting and contents of the work

3.1 Original papers: Original papers are research articles describing original experimental results. The manuscript should be arranged in the following order: Title, Abstract, Keywords, Introduction, Material and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References, Figures with Legends, Tables and Structural Formulae. Results and Discussion sections may appear as a combined 'Results and Discussion' section. The normal length of the main text of an Original Paper (excluding references, tables, figures and figure legends) is approximately 3,000 words. Longer manuscripts may be accepted in exceptional and well-justified cases. If submitting such manuscripts, authors should provide a justification statement in the covering letter, giving compelling reasons for the length of the paper.

3.2 Short communications: This section will cover mainly the isolation of known compounds from new neotropical sources, or complementary results of on-going work. The text should be arranged as follows: Title, Abstract of 200 words, Keywords, Introductory Remarks, Material and Methods with brief experimental details without subheadings, Results and Discussion as one body of text without headlines, Acknowledgements, References (up to 20 citations) and Figures and/or Tables (up to 3). The text should not exceed 2,000 words.

3.3 Reviews will, in general, be invited by the Editor-in-Chief and only those with more than 100 references will be considered. The main purpose of reviews is to provide a concise, accurate introduction to the subject matter and inform the reader critically of the latest developments in the field. They should be concise and not include experimental details.

3.4. In addition to these Guidelines, a template (for original papers) and a sample covering letter are available at www.sbfgnosia.org.br/revista. Authors are strongly recommended to follow these formats when preparing a manuscript.

3.5 The originals should be on A4-sized paper, double-spaced using Times New Roman size-12 font, fully justified, with margins of 2 cm.

3.6 Title and subtitle: They should be in lower case, using Times New Roman size-14 font, and in accordance with the contents of the article, taking in consideration the scope and objectives of the journal.

3.7 Authors: The authors' names should appear centred underneath the title. The first and last names should appear in full, followed by the initials of all other names (e.g. Carlos N. U. Silva). In the case of several authors, the names should be separated by commas.

3.8 Author affiliations: After each author name there should be superscript Arabic numerals indicating the institution to which they are affiliated. The list of institutions should appear immediately below the list of authors. The name of the corresponding author should be identified with a superscript asterisk indicating the address to which all correspondence should be sent. The electronic

institutional address, telephone number and fax number of the main author should appear after the References. The journal will not publish commercial e-mail addresses.

3.9 Abstract: A brief and concise abstract of ≤ 200 words highlighting the most important information (including the methodology, results and conclusions) that allows readers to evaluate their interest in the article and thus avoiding reading of the entire work.

3.10 Keywords: Very important for database searches, thus validating the article. The authors should identify a maximum of six Keywords, in alphabetical order and separated by commas, to represent the content of the article.

3.11 Introduction: The Introduction should clearly establish the objectives of the work and its relationship with other works in the same field. Extensive literature reviews should be replaced by references of more recent publications, where these reviews have been published and where they are available.

3.12 Materials and methods: The description of the Material and the Methods used should be brief and sufficiently clear for comprehension and reproducibility of the work. Processes and techniques already published, unless extensively modified, should be referenced. Plant names should be complete, including author name and family, according to <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/>; www.theplantlist.org/ or www.tropicos.org.

3.13 Results: The Results should be presented with minimum personal discussion or interpretation, and whenever possible, be accompanied by suitable tables and figures. The data, if pertinent, should be subjected to statistical analyses.

3.14 Discussion: The Discussion must be restricted to the significance of the data presented, avoiding conclusions not based upon them. Alternatively, at the discretion of the author, the Results and Discussion can be presented as one section.

3.15 Acknowledgements: This is an optional item. Please acknowledge anyone who made a substantial contribution towards the article.

3.16 Author contributions: The role of each author involved in the development of the study and/or the elaboration of the manuscript must be clearly described, and he/she should be referred to by his/her initials. Please see the template for examples.

4. References

The formatting of the references should be standardised to conform to the requirements of the journal as outlined. *Preferentially use references that can be accessed by the readers worldwide.*

4.1 References within the text: at the beginning of the citation: Author in lower case, followed by the publication year between parenthesis, *e.g.* Pereira (1999); at the end of the citation: Author in lower case and year, both between parenthesis. *e.g.* (Silva, 1999) or (Silva & Souza, 1998) or (Silva et al., 1999) or (Silva et al., 1995a,b); textual citation: the

page must be provided, *e.g.* (Silva, 1999, p. 24).

4.2 The references should be presented in alphabetical order by the last name of the first author, in lower case in ascending order of the publication date. Take into consideration the following possibilities:

4.2.1 Article from a periodical: Title of the periodical in italics abbreviated conform *Chemical Abstracts Service Source Index*

(<http://www.cas.org/sent.html> or

<http://library.caltech.edu/reference/abbreviations/>).

In the case of an authorised abbreviation of a certain periodical that cannot be located and is not obvious, the title should be cited complete (*e.g.*):

Kumar D, Bhujbal SS, Deoda RS, Mudgade SC 2010. *In-vitro* and *in-vivo* antiasthmatic studies of *Ailanthus excelsa* Roxb. on guinea pigs. *J Sci Res* 2: 196-202.

In case the cited journal is not readily accessible, the *Chemical Abstract Number* can be quoted, as follows:

Qu W, Li J, Wang M 1991. Chemical studies on *Helicteres isora* L. *Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao* 22: 203-206, apud *Chemical Abstracts* 116: 124855r.

In a citation, the sources should be shown in italics:

Wax ET 1977. Antimicrobial activity of Brazilian medicinal plants. *J Braz Biol Res* 41: 77-82, apud *Nat Prod Abs* 23: 588-593, 1978.

4.2.2 Book:

Costa AF 1996. *Farmacognosia*. Lisboa: Calouste Gulbenkian.

4.2.3 Book chapter:

El Sohly MA, Stanford DS, Murphy TP 2007. Compounds properties and drug quality. In El Sohly MA (org.) *Forensic Science and Medicine: Marijuana and the Cannabinoids*. New Jersey: Humana Press, p. 51-66.

4.2.4 Thesis or dissertation materials:

Singab ANBI 1996. *Phytochemical studies of some potential bioactive Egyptian plants*. Tokyo, 173p. PhD Thesis, Meiji College of Pharmacy. Romero MAV 1997. *Estudo químico de Brunfelsia hopeana Benth e do mecanismo de ação da escopoletina*. João Pessoa, 119p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais, Universidade Federal da Paraíba.

4.2.5 Scientific meetings:

Oliveira RMMW, Lolli LF, Santos CAM 2006. Possible involvement of GABA benzodiazepine receptor in the anxiolytic-like effect induced by *Passiflora actinia* extracts in mice. *19th ECNP Congress*. Paris, France.

4.2.6 Patents: Should be identified as indicated below; whenever possible the *Chemical Abstracts Service* number should be informed.

Ichikawa M, Ogura M, Lijima T 1986. Antiallergic flavones glycoside from *Kalanchoe pinnatum*. *Jpn. Kokai Tokyo Koho JP* 61,118,396, apud *Chemical Abstracts* 105: 178423q.

4.2.7 Internet pages:

Taylor L 2000. *Plant based drugs and medicines*.

<http://www.raintree.com/plantdrugs.htm>, access in October 2009.

5. Abbreviations

Units will be in accordance with the International System (SI) as adopted by the 11th General Conference on Weights and Measures. Common abbreviations to be used are m (meter; cm (centimeter); mm (millimeter); μ m (micrometer); nm (nanometer); kg (kilogram); g (gram); mg (milligram); μ g (microgram); ng (nanogram); mL milliliter; μ L (microliter); s (second); min (minute); h (hour); N (normal); M molar; mM (millimolar); μ M (micromolar); SD (standard deviation); SE (standard error); X (mean); Ci (Curie); mp (melting point); bp (boiling point); TLC (thin-layer chromatography); GC (gas chromatography); NMR (nuclear magnetic resonance); MS (mass spectrometry); UV (ultraviolet); CD (circular dichroism); IR (infrared); *g* instead of rpm; ppm (parts per million); cpm (counts per minute); dpm (disintegrations per minute); Hz (Hertz); LD50 (median lethal dose); LC50 (median lethal concentration); TLV (threshold limit value). When using a word that is asserted to be a proprietary term or trademark, authors must use the symbol ®.

6. Illustrations

6.1 The quality of the illustrations depends on the quality of the originals provided. Figures cannot be modified or enhanced by the production staff of the journal. The graphics must be submitted as part of the manuscript file. Contrast is important.

6.2 Remove all colour from graphics, except for those graphics that author(s) would consider for publication in colour (see Costs section for details).

6.3 Chemical structures should be drawn according to the style set by the American Chemical Society. Preferences for the drawing of structures can be found as a pre-set style in appropriate software packages.

6.4 Upload each figure in .tiff, .jpg or .eps format. The figure number and the top of the figure should be indicated. Lettering must be with Arial font of a reasonable size that will be clearly legible upon reduction and which is consistent within each figure and set of figures. If a key to symbols is required,

please include this in the figure legend.

7. Submission of manuscripts

7.1 Manuscripts which do not meet acceptable standards will be returned to the authors.

7.2 Manuscript submissions will be processed exclusively online at

<http://mc04.manuscriptcentral.com/rbfar-scielo>.

Please follow carefully the guidelines for authors.

Submissions by e-mail will not be accepted.

7.3 Important: All authors, with their respective email addresses, should be entered into the system.

7.4 The qualification of the manuscript will be certified by at least two referees indicated by the Editorial Board.

8. Costs

8.1. The journal will cover the costs of publication of manuscripts that are ≤ 15 pages (including tables and figures). The journal uses recycled paper, so colour pictures are accepted and will be available only online unless the author(s) agree to cover the extra expenses for the print publication irrespective of the number of pages of the article.

8.2. Authors may be requested to provide voluntary financial support after acceptance.

9. Proofs and reprints

9.1. Galley proofs will be sent to all authors as a PDF file. Rephrasing of sentences or additions is not permitted at the page-proof stage. It is the responsibility of the corresponding author to ensure that all authors listed on the manuscript agree with the changes made on the proofs. Galley proofs should be returned within 5 days of receipt to ensure timely publication of the manuscript.

9.2 Before publication, the articles will be available ahead of print on the Scielo Portal.

For further information, please contact:

Revista Brasileira de Farmacognosia

Professor Cid Aimbiré M. Santos, Editor
Laboratório de Farmacognosia,
Departamento de Farmácia - UFPR
Rua Pref. Lothario Meissner, 632 - Jd Botânico
80210-170, Curitiba-PR, Brasil
revista@sbfgnosia.org.br

September 2012.