



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

Ana Paula Sant' Anna da Silva

Avaliação do potencial antimicrobiano *in vitro* e anti-inflamatório *in vivo* do extrato de
Cleome spinosa Jacq.

Recife - PE
2012

Ana Paula Sant'Anna da Silva

Avaliação do potencial antimicrobiano *in vitro* e anti-inflamatório *in vivo* do extrato de
Cleome spinosa Jacq.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima

Co-orientadora: Profa. Dra. Marilene da Silva Cavalcanti

Recife - PE
2012

**Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728**

Silva, Ana Paula Sant'Anna da

Avaliação do potencial antimicrobiano *in vitro* e anti-inflamatório *in vivo* do extrato de *Cleome spinosa* Jacq./ – Recife: O Autor, 2012.

60 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Vera Lúcia de Menezes Lima

Coorientadora: Marilene da Silva Cavalcanti

**Dissertação(mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,
Centro de Ciências Biológicas, Ciências Biológicas, 2012.**

Inclui bibliografia e anexos

1. Plantas medicinais 2. Agentes antibacterianos 3. *Cleome* I. Lima, Vera Lúcia de Menezes (orientadora) II. Cavacanti, Marilene da Silva (coorientadora) III. Título

615.321

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2014- 287

Ana Paula Sant'Anna da Silva

Avaliação do potencial antimicrobiano *in vitro* e anti-inflamatório *in vivo* do extrato de
Cleome spinosa Jacq.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

APROVADA EM: 23 de agosto de 2012

BANCA EXAMINADORA:

Profª. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima - UFPE
(Orientadora)

Profª. Dra. Marilene da Silva Cavalcanti - UFPE
1º EXAMINADOR

Profª. Dra. Janete Magali de Araújo – UFPE
2º EXAMINADOR

Recife - PE

2012

DEDICATÓRIA

Dedico a minha mãe Edna Sant'Anna da Silva uma verdadeira lição de vida.

(in memoriam)

AGRADECIMENTOS

A Deus por todo amor, força e por me fazer sempre perseverar.

A minha orientadora Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima por ter me recebido de braços abertos, atenção, compreensão e todos os ensinamentos.

A minha co-orientadora Profa. Dra. Marilene da Silva Cavalcanti pelos puxões de orelha, incentivo, força e companheirismo.

A minha eterna amada mãe e amiga, Edna Sant'Anna da Silva, pelo amor, orgulho que sempre sentirá por mim, por ver em mim uma força que nunca pensei ter, o que essa criatura divina me proporcionou nada nem ninguém tira de mim; e hoje isso me faz forte, além da certeza de sempre tê-la ao meu lado em toda a minha caminhada.

Ao meu pai Antonio Pereira da Silva pelo amor, mesmo que de forma tosca, e pela confiança que depositava em mim.

Aos meus irmãos George Henrique Sant'Anna da Silva e Ana Carolina Sant'Anna da Silva pelos cuidados, carinho e compreensão.

Aos meus sobrinhos Pedro, Paulo, Gustavo, Ana Clara, Ana Beatriz, Artur e Davi, por me proporcionarem tantas alegrias.

Ao casal, Isaías e Paulo Padovan, nada que eu escreva chegará à altura do carinho e gratidão que sinto por vocês.

Aos técnicos João Virgínio e Albérico Real do Espírito Santo Filho que sempre se mostraram dispostos a me ensinar e ajudar no manuseio das técnicas e manipulação dos equipamentos, e nas horas difíceis sempre tinham um abraço forte e uma palavra amiga.

Aos amigos, Mardonny Bruno de Oliveira Chagas, Cibele Maria Alves da Silva e Irailton Prazeres dos Santos. O que dizer?! Amigo é amigo, é aquele que tá com você para sorrir e chorar.

Aos companheiros da jornada diária Bianka Santana, Ingrid Ayslane, Wisley Carla, Daniel Araújo, Bruna Mirele, Janaína Campos.

E a todos que, de forma direta ou indireta, fizeram parte dessa conquista.

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

Charles Chaplin

RESUMO

As plantas utilizadas pela medicina popular são recursos promissores, tratamento das mais diversas patologias, aliadas às pesquisas que confirmem estas propriedades terapêuticas. Devido ao uso de *Cleome spinosa* Jacq. na medicina popular contra processos inflamatórios e infecções de natureza microbiológica, esse estudo tem como principal objetivo avaliar o potencial antimicrobiano *in vitro* e anti-inflamatório *in vivo* dos extratos das frações orgânicas das raízes e folhas da *C. spinosa*. A atividade antibacteriana foi realizada através do método de microdiluição para obtenção das concentração mínima inibitória (CMI), concentração mínima bactericida (CMB) dos extratos: ciclohexano folha (ECHF), clorofórmio folha (ECF), acetato de etila (EAF), metanol folha (EMF), ciclohexano raiz (ECHR), clorofórmio raiz (ECR), acetato de etila (EAR) e metanol raiz (EMR) contra as bactérias Gram-positiva (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*) e Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*). O ensaio da atividade anti-inflamatória foi realizada com o EMF e EMR nas concentrações de 100 mg, 150 mg e 200 mg; e o método utilizado foi o de indução da peritonite por carragenina e para avaliar a toxicidade de todos os extrato de folha e raiz na concentração de 100mg, 150mg e 200mg foi utilizado o método de *Artemia salina*. No presente estudo, todos os extratos testados apresentaram atividade antibacteriana, em particular contra bactérias Gram-positivas *S. aureus* com CMI do ECHF de 0,09 mg/mL e CMB 0,19 mg/mL e contra *B. subtilis* a CMI dos ECHR e ECR foi de 0,09 mg/mL e CMB de 0,19 mg/mL. Os EMF e EMR de *C. spinosa* em todas as concentrações testadas (100mg/Kg, 150mg/Kg e 200mg/Kg) apresentaram atividade anti-inflamatória. Todos os oito extratos testados nas concentrações 100mg/Kg, 150mg/Kg e 200mg/Kg não apresentaram toxicidade contra a *Artemia salina*.

Os resultados obtidos demonstraram que os extratos da espécie vegetal *C. spinosa* possui constituintes com ações antibacterianas e anti-inflamatória consideráveis. Tais resultados incitam a continuação de trabalhos experimentais para que sejam identificadas as substâncias responsáveis por estas atividades.

Palavras – chave: Planta Medicinal. Antibacteriano. Anti-inflamatório.

ABSTRACT

The plants used in popular medicine are promising resources in the treatment of several diseases when they are combined with researches that confirm their therapeutic properties. Due to the use of *Cleome spinosa* Jacq. in popular medicine against infections and inflammatory processes of microbiological nature, this study has as the main objective to evaluate the antimicrobial potential *in vitro* and the anti-inflammatory potential *in vivo* of the extracts of organic fractions of the roots and leaves of *C. spinosa*. The antibacterial activity was performed using the microdilution method for obtaining the minimal inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) of the extracts: cyclohexane of leaf (CHEL), chloroform of leaf (CEL), ethyl acetate of leaf (EAEL), methanol of leaf (MEL) cyclohexane of root (CHER), chloroform of root (CER), ethyl acetate of root (EAER) and methanol of root (MER) against Gram-positive (*Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*) and Gram-negative (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) bacteria. The test for anti-inflammatory activity was performed using MEL and MER in the following concentrations: 100 mg, 150 mg and 200 mg; and the method used was the Induction of peritonitis by carrageenan. The results showed that all extracts presented antibacterial activity, especially against the Gram-positive bacteria *S. aureus* with MIC of CHEL 0,09 mg/mL and MBC 0,19 mg/mL. Whereas against *B. subtilis* the MIC of CHER and CER was 0,09 mg/mL and a MBC of 0,19 mg/mL. The MEL and MER of *C. spinosa* exhibited anti-inflammatory activity at all concentrations tested (100 mg/kg, 150 mg/kg and 200 mg/kg). The results showed that the extracts of the plant species *C. spinosa* has shares constituents with antibacterial and anti-inflammatory actions that may be considerable. Such results incite further experimental works in order to identify substances responsible for these activities.

Keywords: Medicinal Plant. Antibacterial. Anti-inflammatory.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1. Aspectos gerais de <i>Cleome spinosa</i> Jacq.: a – visão geral do local da coleta. b – aspecto geral da planta. c – inflorescência. d – frutos.....	21

LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO 1

	Pág.
FIGURA 1. Contagem de leucócitos totais peritoneais de ratos estimulados com carragenina, dos extratos metanólicos das folhas (A) e raízes (B) <i>Cleome spinosa</i> , ácido acetilsalicílico 500 mg/kg (AAS) comparados entre si e com o grupo controle tratado solução salina a 0,9%.	39

LISTA DE TABELAS CAPÍTULO 1

	Pág.
TABELA 1. Rendimento em gramas dos extratos de <i>Cleome spinosa</i> Jacq.....	56
TABELA 2. Concentração Mínima Inibitória (CMI), Mínima Concentração Bactericida (CMB) dos extratos das folhas e raízes de <i>Cleome spinosa</i> expressa em mg/mL.....	57

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Plantas Medicinais.....	15
2.2 Antimicrobianos Naturais.....	16
2.3 Processo Inflamatório e Uso de Anti-inflamatórios Naturais.	17
2.4 Agentes Flogísticos.....	19
2.5 <i>Cleome spinosa</i> Jacq.....	20
3. OBJETIVOS.....	24
3.1 Objetivo Geral.....	25
3.2 Objetivos Específicos.....	25
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
5. CAPÍTULO 1.....	38
6. CONCLUSÃO.....	40
7. ANEXOS.....	42

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais é um dos remédios mais antigo para o tratamento de enfermidades humanas, e muitas das informações a respeito de seu uso vem através da sabedoria popular (FUNKE & MELZIG, 2006; AGRA et al.; 2007; BIAVATTI et al., 2007).

A biodiversidade e medicina tradicional estão intimamente entrelaçadas, uma vez que, há milênios a biodiversidade tem uma fonte inestimável de informação e matéria-prima que suporta sistemas de saúde tradicionais em diferentes culturas humanas (ALVES & ROSA, 2007). Muitos países, principalmente os que se encontram em desenvolvimento buscam nas plantas medicinais uma alternativa para problemas sociais da população, desde que o uso das plantas medicinais é uma prática bastante comum nas populações carentes, sejam de áreas rurais ou áreas urbanas mundial, além do caráter econômico, pois aproximadamente metade dos remédios contém material de plantas ou sintéticos derivados delas (ITOKAWA et al., 2008; KOLEWE, 2008; SAKLANI e KUTTY, 2008).

Nos países em desenvolvimento, as doenças infecciosas representam uma parcela dos problemas de saúde, devido à resistência dos micro-organismos, que tem aumentado com uso indiscriminado de antimicrobianos. Esta situação tem despertado a necessidade de se investigar novos fármacos com ação antimicrobiana de várias fontes, tais como plantas medicinais (KARAMAN et al., 2003).

Entre os inúmeros gêneros de espécies vegetais de interesse medicinal, encontra-se o gênero *Cleome* que apresenta diversos usos na medicina popular como estimulantes, anti-inflamatório, antiescorbútico, anti-helmíntico e diurético (BOSE, 2007). A *Cleome spinosa* Jacq., conhecida popularmente como mussambê, é utilizada na medicina tradicional como estimulantes do aparelho digestivo, anti-inflamatório, infecção e cicatrizante. Segundo COLLINS (2004) o estudo fitoquímico desta espécie detectou a presença de flavonoides e diterpenos cembranos, metabólitos que pode vir a justificar alguns dos seus efeitos terapêuticos.

Devido à escassez de informações científicas que justifique o uso da *Cleome spinosa* Lacq, na medicina tradicional, este estudo tem como principal objetivo investigar as propriedades terapêuticas da referida espécie contra micro-organismos e processos inflamatórios, inferindo uma alternativa terapêutica eficiente e de baixo custo à população.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plantas Medicinais

O uso de plantas no tratamento e na cura dos mais diversos males é tão antigo quanto à espécie humana. Os egípcios, por volta de 1.500 a.C, já faziam uso de plantas medicinais na cura de doenças, como descrito no “Ebers Papyrus”. Na China, em 500 a.C, surgiu o primeiro manuscrito descrevendo plantas medicinais, seus usos e forma de preparo (HELFAND & COWEN, 1990). No Brasil, o estudo da flora medicinal teve início na época do império, em 1818, quando Karl Friedrick, botânico alemão, em expedição pelo Brasil catalogou 22.767 espécies diferentes, no entanto apenas 15% dessas espécies foram estudadas cientificamente; o que só vem confirmar o quão rica é a nossa biodiversidade e o potencial biotecnológico ainda a ser explorado (KANSLER, 2011).

No Brasil, o conhecimento a respeito do uso tradicional de plantas é uma rica mistura dos conhecimentos indígena, africano e europeu, baseados em espécies tropicais desde a colonização. Esta sabedoria está cada vez mais aprofundada pelo homem e em constante modificação pela cultura moderna (SILVA, 2002; SANTOS et al., 2008).

Muito já se sabe a respeito do uso das plantas medicinais por parte da sabedoria popular, que vem de geração a geração, descrito com a intenção de preservar essa tradição milenar, por seu registro em vários tratados de fitoterapia. (CORREA JÚNIOR, 1991). Mas com os avanços científicos, em meados do século 20, esta prática milenar perdeu espaço para os medicamentos sintéticos e industrializados e as fábricas brasileiras foram, em sua maioria, desativadas ou substituídas por multinacionais. No entanto, o alto custo destes fármacos e os efeitos colaterais apresentados contribuíram para o ressurgimento da terapia através das plantas (FERNANDES, 2004).

A comprovação científica dos efeitos benéficos das plantas brasileiras, tidas popularmente como medicinais, tem despertado grande interesse junto aos pesquisadores de todo o mundo, como objeto auxiliar dos problemas sociais da população universal, além do caráter econômico, em países desenvolvidos, como os Estados Unidos, 25% dos medicamentos comercializados contém produtos ou princípios ativos de origem vegetal, articulando um mercado de bilhões de dólares por ano (FARNSWORTH e BINGEL, 1997; CALIXTO, 2001; NEWMAN et al., 2003; BOLDI, 2004).

Na busca de novos fármacos para a cura de inúmeras doenças que afetam a população deve ser levada em consideração a formulação dos fitoterápicos, necessitando de trabalhos multidisciplinares para que a espécie vegetal seja selecionada corretamente, a avaliação dos teores dos princípios ativos seja feita e para que a manipulação e a aplicação na clínica médica ocorram (TOLEDO et al., 2003).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 80% da população nos países em desenvolvimento fazem uso de plantas medicinais no tratamento de doenças primárias e esta utilização tem recebido incentivos da própria OMS (CARVALHO et al., 2006; CARVALHO et al., 2008). Apesar da vasta flora medicinal disponível, a maior parte das plantas medicinais nativas permanece sendo utilizada da mesma forma tradicional, sendo raros os exemplos de produtos registrados contendo vegetais (BRANDÃO et al., 2006; ALMEIDA, 2003). Por isso, são muitos os fatores que vêm colaborando para o desenvolvimento de práticas de saúde que incluam plantas medicinais, principalmente econômicos e sociais (ELISABETSKY, 1991; ALBUQUERQUE & HANAZAKI, 2006; SILVA et al., 2006).

2.2 Antimicrobianos Naturais

Os casos de micro-organismos patogênicos humanos resistentes a drogas são os mais bem documentados na evolução biológica e um sério problema tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. Em razão do aumento da resistência de micro-organismos patogênicos a múltiplas drogas, devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos, surge a preocupação para a procura de novas alternativas terapêuticas, incluindo as plantas (NOVAIS et al., 2003; ANTUNES et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007).

Baseados na medicina tradicional, plantas com propriedades anti-infecciosas e anti-inflamatórias têm contribuído com fármacos inovados na terapêutica antimicrobiana, incentivando o empenho dessas diversas linhas de pesquisa na área da microbiologia (HOLETZ et al., 2002; YAMAMOTO & OGAWA, 2002; ZACCHINO et al., 2003). As plantas medicinais estão dentre os produtos naturais, de grande interesse científico devido à possibilidade de empregá-las como fitofármacos, por proporcionarem grandes chances de obterem-se compostos bioativos, como os

fenólicos, devido à diversidade de seus constituintes (NASCIMENTO et al., 2000; PESSINI et al., 2003; DUARTE et al., 2004; MICHELIN et al., 2005; LIMA et al., 2006).

Partes aéreas de espécies vegetais, como ramos, folhas e flores, e partes subterrâneas, como tubérculos, rizomas e raízes, são frequentemente utilizadas nas pesquisas de novos compostos (BENKEBLIA, 2004; AIDI WANNES et al., 2010). Plantas, ervas e especiarias contêm um grande número de substâncias que inibem atividades metabólicas de bactérias, fungos leveduriformes e filamentosos (VIGIL et al., 2005).

Os princípios ativos advindo dos vegetais são responsáveis, de forma direta e indiretamente, por aproximadamente 40% de todos os fármacos disponíveis na terapêutica moderna e, se for considerado os utilizados como antibióticos e este percentual pode chegar a cerca de 70% (PHILLIPSON, 2000; YUNES & CALIXTO, 2001).

A nível mundial tem várias pesquisas sobre alternativas naturais de tratamento e cura. AHMAD et al. (1998) & DESTA (1993) relataram que os extratos alcoólicos de raízes de *Plumbago zeylanica* mostrou atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris*. O *Plumbago scandens* tem sido utilizada para tratar doenças causadas por bactérias, esta atividade é atribuída a plumbagina naftoquinona, constituinte das raízes (PAIVA, 2003).

O uso de isotiocianatos, sendo o mais representativo, Sulforafano, derivado de brócolis, tem potente ação bactericida para tratamento da infecção por *Helicobacter pylori* (FAHEY, 2002). O extrato hidroalcoólico do cajueiro (*Anacardium occidentale* Linn.) produziu significante atividade antimicrobiana *in vitro* sobre as linhagens de *Staphylococcus aureus* de origem humana hospitalar resistentes (SILVA et al., 2007)

2.3 Processo Inflamatório e Uso de Anti-inflamatórios Naturais

O processo inflamatório consiste na resposta orgânica mais precoce diante de lesão tecidual ou infecção. Este processo fisiológico envolve uma ação co-ordenada entre o sistema imunológico e o tecido no qual ocorreu a lesão. Diante de um trauma tissular, o acúmulo local de prostaglandinas, tromboxanos e outros mediadores

químicos ocasionam a sensibilização periférica da dor, que se caracteriza por uma alteração no limiar de nociceptores, provocando dor, eritema, aumento da temperatura local e edema, como uma resposta aguda ao processo inflamatório estabelecido (SMITH et al., 1998; SAKATA & ISSY, 2008).

A inflamação pode ser aguda, com duração relativamente curta, apresentando alterações vasculares, edema e infiltração basicamente de neutrófilos; ou crônica, com duração mais longa, caracterizada pela infiltração de células mononucleares (macrófagos, linfócitos e plasmócitos), destruição tecidual, tentativa de reparo por reposição do tecido conjuntivo, proliferação de pequenos vasos sanguíneos e, em particular, fibrose (RANG; DALLE; RITTER, 1997; ROBBINS et al., 2001).

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) representam uma das classes de fármacos mais comumente usados em processos inflamatórios, apresentando uma boa atividade terapêutica (EICKHOFF et al., 1996). Os AINEs são geralmente utilizados como anti-inflamatórios, antipiréticos e analgésicos, inibindo a atividade da enzima Ciclo-oxigenase (COX). Estima-se que aproximadamente 75 milhões de prescrições médicas sejam de AINEs, e que aproximadamente 50 milhões de americanos utilizam esses fármacos regularmente (BANSAL et al., 2007).

No Brasil, cerca de 80 milhões de pessoas fazem uso de automedicação, sendo que os AINEs estão entre os mais utilizados pela população (SAKATA & ISSY, 2008). Um exemplo é o ácido acetil salicílico (AAS) que é um inibidor seletivo de COX-2, comumente utilizado em processos inflamatórios agudos e/ou crônicos. Além da ação anti-inflamatória, o AAS apresenta, ainda, atividade antioxidante. Para os AINEs essa ação é considerada de grande interesse, pois a produção de radicais livres, além de contribuir na inflamação e dor, pode causar danos nos tecidos (VANE et al., 1998).

Porem a maioria dos AINEs, mesmo sendo considerados seguros, podem causar vários efeitos colaterais em uma fração significativa dos pacientes tratados por via oral, incluindo toxicidade hepática, renal e irritação da mucosa gástrica (KONTOGIORGIS et al., 2002). O AAS ao ser administrado via oral pode causar inúmeros efeitos adversos, incluindo desde indisposições gastrointestinais até toxicidade hepática e renal (WHITTLE et al., 2003; TRAVERSA et al., 2004).

A utilização de plantas no tratamento de doenças inflamatórias a partir da medicina tradicional é muito comum e essa prática está sendo estudada pela

comunidade científica, visando não apenas a cura dessas patologias, mas restituir o homem à vida natural, sem consequências tão danosas dos efeitos adversos (MARTINS et al., 2000).

Tem sido relatado que o extrato de *Tanacetum parthenium* (Asteraceae) pode inibir a COX e a 5-lipooxigenase (LOX) através da tanetina, um flavonol lipofílico. Este flavonol inibiu um derivado do ácido araquidônico, indicando uma ação anti-inflamatória. O mesmo ocorre com outros flavonóides que podem inibir COX, monooxigenase e (LOX) através do metabolismo do ácido araquidônico (WILLIAMS et al., 1995; ROTELLI et al., 2003; SVOBODOVÁ et al., 2003).

A saikosaponina-d uma saponina triterpênica, obtida da planta medicinal *Bupleurum falcatum* (Apiaceae), apresenta uma variedade de atividades farmacológicas, incluindo anti-inflamatória. Esta saponina inibe a COX, a LOX, a proliferação de linfócitos e aumenta o nível de corticosteróides endógenos (LEUNG et al., 2005).

A busca por terapias mais eficientes e específicas para o processo inflamatórios é importante e os metabólitos secundários das plantas por possuírem uma enorme diversidade química atuam em diferentes locais deste processo.

2.4 Agentes Flogísticos

Os agentes flogísticos são capazes de desencadear uma reação inflamatória, a exemplo da carragenina, histamina, bradicinina, prostaglandina E2 e substância P. A carragenina um mucopolissacarídeo derivado de algas marinhas, que desencadeia o processo inflamatório mediado por prostaglandinas, apresenta pico máximo entre 2 a 4 horas após aplicação (SARTORI, 2003; BOLETA-CERANTO; VEIGA; ARSATI, 2005). O processo inflamatório induzido pela carragenina deflagra 03 fases: primeiro o aumento de histamina, na segunda fase a mediação da cininas e por fim a proliferação das prostaglandinas (NAUSEEF; METCALF; ROOT, 1983; ROTELLI, 2003). A utilização de agentes inflamatórios, como a carragenina, induz a síntese e liberação de prostaglandinas (DI ROSA et al., 1971; SANTOS & RAO, 1998).

A histamina desempenha papel fundamental no processo inflamatório através do aumento da permeabilidade celular, pois se inicia a vasodilatação, desencadeada ao ligar-se à receptores H1 das células endoteliais. No processo inflamatório o fator de

maior relevância é o feito ativador da histamina sobre a fosfolipase A₂, enzima essa responsável pela formação de prostaglandinas (GOODMAN & GILMAN, 1996). Assim como a histamina, a bradicinina é proveniente do sistema das cininas e tem como característica principal, o controle do tônus vascular (MORAIS et al., 1999). Ela estimula também, a liberação do ácido araquidônico, por meio da ativação da fosfolipase A₂, processo fundamental para a síntese da prostaglandina - E₂ (PGE₂) e podem desencadear a produção de mediadores da inflamação como IL-1 e TNF nas células inflamatórias (GOODMAN & GILMAN, 1996). A síntese da prostaglandina E₂ é iniciada com a ativação da proteína G que resulta na ativação da proteína quinase dependente de GTP que promove a fosforilação do substrato protéico e ativação da enzima fosfolipase A₂ desencadeando a elevação citosólica do Ca²⁺ e conseqüentemente a liberação do araquidonato, precursor de sua produção (HILÁRIO, 2006).

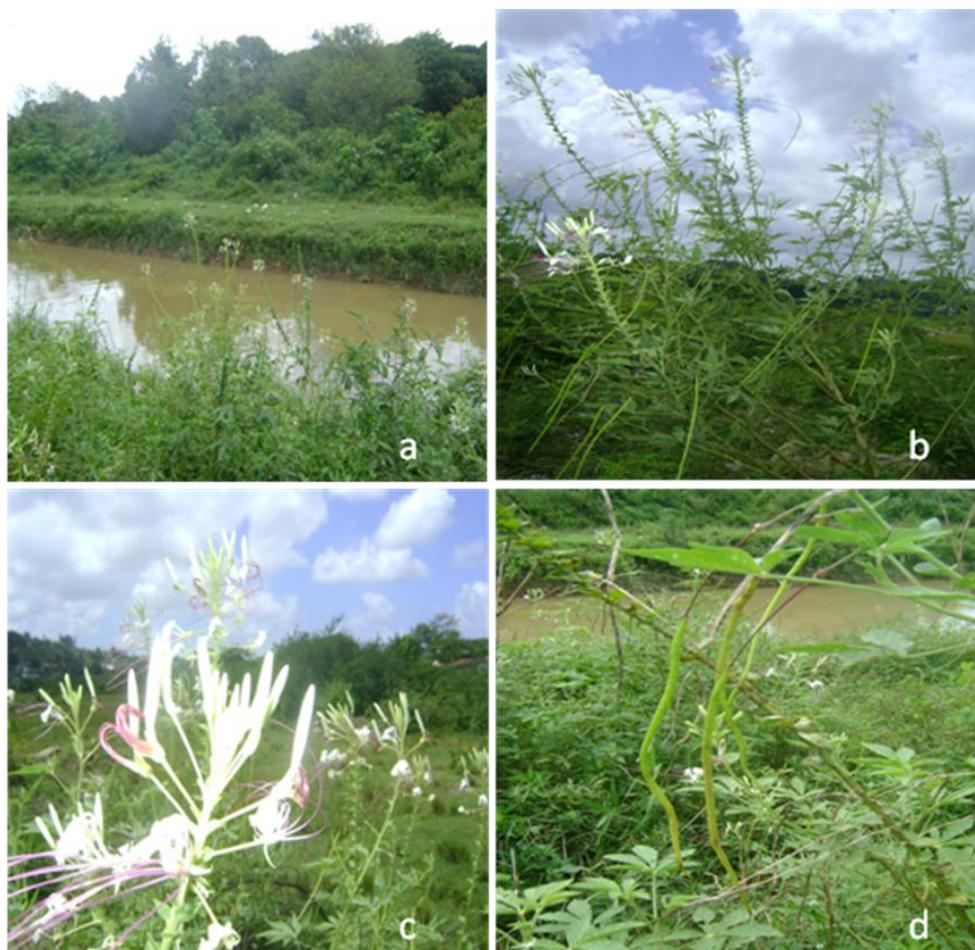
Um dos principais sinais da inflamação é caracterizado pela formação do edema ou o extravasamento do exsudato para o peritônio, decorrente ao grande fluxo de proteínas em direção ao interstício, ação essa proveniente desses mediadores da inflamação.

2.5 *Cleome spinosa* Jacq.

Consideradas até recentemente como correlacionadas, as famílias Brassicaceae e Capparaceae eram alvo de dúvidas quanto à monofilia de Capparaceae, que foi submetida inicialmente a um detalhado estudo a partir de análises filogenéticas, a partir de critérios de monofilia (*habitat*, folhas, flores, estames e frutos), e em sequência obtenção e análise dos dados de DNA encontrados em cloroplastos, comprovando-se então a filogenia dessas duas famílias de vegetal. Com os resultados obtidos, alguns gêneros de Capparaceae passaram a integrar a família Brassicaceae (HALL et al., 2002).

Atualmente, a família Brassicaceae, compreende aproximadamente 4000 espécies distribuídas em 400 gêneros, tendo resultado em função da fusão com a família Capparaceae, em um aumento significativo. Do ponto de vista econômico, a família Brassicaceae se destaca em função da grande diversidade de espécies hortícola, como alcaparras, brócolis, couve de Bruxelas, repolho, couve-flor (MATTHAU e OZCAN,

2002; SARDI e TORDA, 2005). Do ponto de vista medicinal destacam-se espécies como a *Cleome spinosa* Jacq. (Figura 1), popularmente conhecida como mussambê, classificada até recentemente, como pertencente à família Capparaceae, tendo sido confirmado que pertence à família Brassicaceae (HALL et al., 2002). *Cleome spinosa* é uma espécie herbácea, com folhas inteiras ou mais frequentemente compostas (digitadas), alternas em geral com estípulas durante todo o ano, possui flores (c) pouco vistosas de coloração branca, hermafroditas, cíclicas, hipóginas, diclamídias, heteroclamídia. Os frutos (d) são simples, seco, do tipo capsular, com deiscência longitudinal, com média de 12,5cm de comprimento, 0,26cm de largura e 0,24cm de espessura, cor verde quando jovem e bege quando maduro; sua superfície externa é rugosa com textura seca (PEREIRA et al., 2007).



FONTE: Arquivo pessoal

FIGURA 1 – Aspectos gerais de *Cleome spinosa* Jacq.: **a** – visão geral do local da coleta. **b** – aspecto geral da planta. **c** – inflorescência. **d** – frutos.

No Brasil, em média, as cinquenta espécies que integram a família Brassicaceae, encontram-se distribuídas nos seguintes gêneros: *Capparis*, *Cleome*, *Comonopus*, *Crateva*, *Dactylaena*, *Lepidium* e *Morisonia* (SOUSA, 2005). O gênero *Cleome* compreende aproximadamente cento e cinquenta espécies formadas por plantas herbáceas, arbustivas e arbóreas; sendo vinte e oito destas nativas e amplamente distribuídas, em áreas abertas. Estas plantas têm sido utilizadas pela população como medicinais e ornamentais (PEREIRA et al., 2007).

De acordo com o uso tradicional, espécies do gênero *Cleome* são utilizadas como estimulantes, antiescorbútico, anti-helmíntico, rubefaciente e vesicante, dentre outros (BOSE et al., 2006). Outras espécies do gênero *Cleome* merecem destaque quanto ao seu uso na medicina tradicional. *Cleome rutidosperma* D.C., arbusto nativo da África, presentes também em regiões tropicais da América e no sudeste da Ásia. Seu extrato aquoso apresentou atividade antibacteriana e diurética. Estudos fitoquímicos preliminares com este extrato mostraram a presença de taninos e saponinas, que são associados à atividade antibacteriana observadas em plantas (BOSE et al., 2006; 2007). Em outros extratos brutos foi possível comprovar a atividade analgésica e motora (diminuição da atividade locomotora), bem como a atividade laxativa e diurética do extrato etanólico (BOSE et al., 2006; 2007). *Cleome droserifolia* Forssk, um arbusto originário de desertos, os extratos clorofórmico, etanólico e aquoso mostraram-se eficazes na redução de índices glicêmicos. O extrato aquoso apresentou-se também como diuréticos e antimicrobianos (EL-NAGAR et al., 2005; MOTHANA et al., 2010). Outro exemplo é a *Cleome viscosa* L., erva encontrada na Índia, usada tradicionalmente no combate à febre, inflamações, bronquite, diarreias, cicatrizante e antielmíntico, além de que tem sido reportado que seu extrato aquoso apresenta atividade analgésica (SING e WEST, 1991)

No gênero *Cleome* destacam-se as seguintes classes de metabólitos: alcalóides (DELAVEREAU et al., 1973); fenoxicoumarina (RAMACHANDRAN, 1979); Esteróides glicosídeos (SRIVASTAVA, 1982); triterpenos damaranos (AHMED et al., 2001); sais de amônio quaternários (McLEAN et al 1996); flavonóides (PELOTTO et al., 1998; SHARAF et al., 200) e os diterpenos cembranos (COLLINS et al., 2004).

O levantamento bibliográfico de *C. spinosa* revelou apenas um estudo fitoquímico com isolamento de diterpenos cembranos e flavonóides (COLLINS et al., 2004)

No Brasil, as folhas, flores e raízes de *C. spinosa* são utilizadas na medicina tradicional. As folhas, após maceração, são aplicadas sobre a pele e agem como rubefacientes, o suco para a redução de otites supuradas e em infusão são estomáquicas e estimulantes do aparelho digestivo e eficazes no combate à leucorreia. Externamente, a flor é utilizada na forma de tintura em inflamações e as raízes são eficazes no tratamento de tosse e bronquites asmáticas (COLLINS et al., 2004). O óleo essencial de partes aéreas de *C. spinosa* apresentou atividade antimicrobiana moderada contra sete das oito linhagens de bactérias utilizadas, com atividade inibitória significativa contra *Streptococcus pyogenes* grupo A, quando comparado com o padrão de antibióticos ampicilina e gentamicina. *Candida albicans* foi menos sensível ao óleo essencial. Os óleos apresentaram atividade inseticida moderada contra *Cylas Formicarius elegantulus*, mas não possuía nenhuma atividade antioxidante (McNeil et al., 2010).

Há muito tempo, o homem tem usado vários recursos destinados a evitar ou combater as doenças, os quais levam à proteção da vida e à defesa da saúde, defendendo o seu interesse de viver. A espécie *Cleome spinosa* é uma planta muito utilizada na medicina popular, existindo escassez de pesquisas científicas que venham confirmar a eficácia de sua utilização tradicional e que realize um levantamento de seus metabólitos secundários para que possa ser correlacionados as atividades biológicas apresentadas. Esse estudo vem contribuir na ampliação do conhecimento das atividades biológicas da planta e sua interação com os micro-organismos, possibilitando a síntese de novos fármacos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial antibacteriano *in vitro* e anti-inflamatório *in vivo* dos extratos das raízes e folhas de *C. spinosa*.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Obter os extratos em diferentes polaridades (ciclohexano, clorofórmio, acetato de etila, metanol) a partir de raízes e folhas sadias de *C. spinosa*;
- ✓ Determinar a concentração mínima inibitória dos extratos ciclohexânico, clorofórmico, acetato de etila e metanólico das folhas e raízes de *C. spinosa*;
- ✓ Determinar a concentração mínima bactericida dos extratos ciclohexânico, clorofórmico, acetato de etila e metanólico das folhas e raízes de *C. spinosa*;
- ✓ Avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato metanólico das folhas e raízes de *C. spinosa* sobre peritonite;

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRA, M.F.; França, P.F.; Barbosa-Filho, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira Farmacognosia**,17: 114-140,2007.

AHMAD, I.; MEHMOOD, Z.; MOHAMMAD, F. Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties. **Journal Ethnopharmacology** 62: 183-193.1998.

AHMED, A. A.; KATTAB, A. M.; BODIGE, S. G.; MAO, Y.; MITTER, D. E. Acetoxycleomblyno. A from *Cleome amblyocarpa*, **Journal of Natural Products**,64: 106-107.2001.

AIDI WANNES, W.; MHAMDI, B.; SRITI, J.; BEN JEMIA, M.; OUCHIKH, O.; HAMDAROU, G.; KCHOUK, M.E.; MARZOUK, B. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. **Food and Chemical Toxicology, London**,48(5):1362-1370.2010.

ALBUQUERQUE, U.P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira Farmacognosia**. 16:678-689.2006.

ALMEIDA, M.Z. **Planta medicinais**. Salvador: Editora EDUFBA, 2 ed. 31-39,147,181.2003.

ALVES, R.R.N. and Rosa, I.L. Biodiversity, traditional medicine and public health: where do they meet? **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**. 3:1-9.2007.

ANTUNES, R.M.P.; LIMA, E.O.; PEREIRA, M.S.V.; CAMARA, C.A.; ARRUDA, T.A.; CATÃO, R.M.R.; BARBOSA, T.P.; NUNES, X.P.; DIAS, C.S.; SILVA, T.M.S. Atividade antimicrobiana “*in vitro*” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Revista Brasileira Farmacognosia**. 16: 517-524.2006.

BANSAL, S.S.; JOSHI, A.; BANSAL, A.K. New dosage formulations for targeted delivery of cyclo-oxygenase-2 inhibitors. **Drugs Aging**,24(6);441-451.2007.

BENKEBLIA, N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). **Food Science & Technology, London**. 37(2), 263-268.2004

BIAVATTI, M.W.; Marensi, V.; Leite, S.N.; Reis, A. Ethnopharmacognostic survey on botanical compendia for potential cosmetic species from Atlantic Forest. **Revista Brasileira Farmacognosia**.17: 640-653, 2007.

BOLDI, A.M. Libraries from natural product-like scaffolds. **Chemical Biology**,8:281-286.2004.

BOLETA-CERANTO, D. C. F.; VEIGA, M. C. F. A.; ARSATI, F. Efeito da carragenina na ATM de ratos. **Revista Odonto Ciência**, 20(50):354-360.2005.

- BOSE, A.; MONDAL, S.; GUPTA, J.K.; DASH, G.K.; GHOSH, T.; SI, S. Studies on diuretic and laxative activity of ethanolic extract and its fractions of *Cleome rutidosperma* aerial parts. **Pharmacognosy Magazine**.2(7):178-182.2006.
- BOSE, A; GUPTA, J.K.; DASH, G.K.; GHOSH, T.; SI, S.; PANDA, D.S. Diuretic and antibacterial activity of aqueous extract of *Cleome rutidosperma*. **India Journal of Pharmaceutical Science**,69(2):292-294.2007.
- BRANDÃO, M.G.L.; GOMES, C.G.; NASCIMENTO, A.M. Plantas nativas da medicina tradicional brasileira: uso atual e necessidade de proteção. **Revista Fitos**. 2(3):24-29.2006.
- CALIXTO, J.B. **Medicamentos Fitoterápicos**. In: Plantas medicinais sob a ótica da química moderna. Chapecó. Ed. Argos.297-315.2001.
- CARVALHO, A.C.B.; BALBINO, E.E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J.P.S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira Farmacognosia**.18: 314-319,2008.
- CARVALHO, A.C.B.; FIGUEIREDO, C.A.V.; OLIVEIRA, F.S.; BARBOSA-FILHO, J.M.; OLIVEIRA, R.A.G. As plantas medicinais e suas interações com medicamentos. In: Diniz, M.F.F.M, Oliveira, R.A.G.; Medeiros, A.C.D.; Malta Júnior, A.; Moura, M.D. (org.) **Memento de plantas medicinais**. 1.ed. João Pessoa: Editora Universitária / UFPB, 121-125.2006.
- COELHO, A.; M. S. P.; SILVA, G. A., VIEIRA, O. M. C., CHAVASCO, J. K., Atividade antimicrobiana de *Bixa orellana* L. (Urucum). **Revista Lecta, Bragança Paulista**.21(1/2)47-54.2003.
- COLLINS, D.O.; REYNOLDS, W.F.; REESE, P.B.. New Cembranes from *Cleome spinosa*. **Journal of Natural Products**.67:179-183.2004.
- CORRÊA JUNIOR, C.; LIN, C.M.; SCHEFFER, M.C. SOB, **Informa**.9(23).1991.
- DEGÁSPARI, C. H., WASZCZYNSKYJ, N., PRADO, M. R. M., Atividade antimicrobiana de *Schinus terebenthifolius* Raddi. **Ciência e Agrotecnologia,Lavras**, 29(3):167-622.2005.
- DELAVEU, P.; KOUDOGOB, B.; POUSET, J-L. Alcaloides chez lês Capparidaceae. **Phytochemistry**,12:2893-289.1973.
- DESTA, B. Ethiopian traditional herbal drugs. Part II. Antimicrobial activity of 63 medicinal plants. **Journal Ethnopharmacology**, 39: 129-139.1993.
- DI ROSA, M., GIROUD, J. P. AND WILLOUGHBY, D. A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different n different sites by carrageenan and turpentine. **Journal of Pathology**,104(4)1:15-29.1971.
- DUARTE MCT, FIGUEIRA GM, PEREIRA B, MAGALHÃES PM, DELARMELINA, C. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de espécies

da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. **Revista Brasileira Farmacognosia**, 14(Supl. 1): 6-8.2004.

EICKHOFF, W.M.; ENGERS, D.A.; MUELLER, K.R. Nanoparticulate NSAID composition. **Toxicology and Pharmacology**.50:283-289.1995.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia. **Ciência e Cultura**.55(3):3.2003.

ELISABETSKY, E. Sociopolitical, economical and ethical issues in medicinal plant research. **Jounal Ethnopharmacology**.32:235-239.1991.

EL-NAGAR, E.B.; BARTOSIKOVA, L.; ZEMLICKA, M.; SVAJDLENKA, E.; RABISKOVA, M.; STRNADOVA, V.; NECAS, J. Antidiabetic affect of *Cleome droserfolia* aerals parts: lipd peroxidation-induced oxidative stress in diabetic rats. **Acta Veterinaria Brno**,74(33):347-352.2005.

FAHEY, J.W. et al. Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori*. **Proceedings National Academy Science United States A**. 28; 99(11): 7610-5. 2002.

FANSWORTH, N.R.; BINGEL, A.S. New natural products and plant drugs with pharmacological, biological or therapeutical activity. **Springer**,61-73.1997.

FERNANDES, T.M. **Plantas medicinais: memória da ciência no Brasil**, Editora Fiocruz, 260.2004.

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

GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9º Ed., HALL, C.H.; SYTSMA, K.J.; ILTIS, H.H. Phylogeny of Capparaceae and Brassicaceae based on chloroplast sequence data. **American Journal of Botany**, 89:1826-1842.2002.

Harraz, F. M.; Ayad, A. R. Phytochemical and biological investigation of *Cleome amblycarpa* Barr. et Murb. **Zagazig Journal of Pharmaceutical Sciences**, 3 (3A), 64-71.1994.

HELFAND W.H. AND COWEN D.L. **Pharmacy – an illustrated history**, Harry N. Abrams.1990.

HILÁRIO, M. O. E. et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cyclooxygenase 2 inhibitors. **Jornal de Pediatria**. 82(5):206-212.2006.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P. Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memorial Inst Oswaldo Cruz**,97(7):1027-1031. 2002.

ITOKAWA, H.; MORRIS-NATSCHKE, S.L.; AKIYAMA, T.; LEE, K.H. Plant-derived natural product research aimed at new drug discovery. **Nature Medicine**, 62:263-280.2008.

KARAMAN, I.; SAHIN, F.; GÜLLÜCE, M.; ÖGÜTÇÜ, H.; SENGUL M, ADIGÜZEL A 2003. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **Journal Ethnopharmacology**, 2837:1-5

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

KONTOGIORGIS, C.A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.J. Non steroidal anti-inflammatory and anti-allergy agents. **Current Medicinal Chemistry**, 9:89-98.2002.

LEUNG, C.Y.; LIU, L.; WONG, R.N.S.; ZENG, Y.Y.; LI, M.; ZHOU, H. Saikosaponin-d inhibits T cell activation through the modulation of PKC ζ , JNK e NF- κ B transcription factor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 338: 1920-1927.2005.

LIMA, M.R.F.; XIMENES, C.P.A.; LUNA, J.S.; SANT'ANA, A.E.G. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 16: 300-306.2006.

LO, T.N.; ALMEIDA, A.P.; BEAVEN, M.A. Dextran and carrageenan evoke different inflammatory response in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indomethacin. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 221: 261-267.1982.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; D.C. CASTELLANI; J.E. DIAS. Buscando a saúde por meio das plantas medicinais. **Plantas medicinais**. Ed. UFV, Viçosa, 17-55.2000.

MATTHAUS, B.; OZCAN, M. Glucosinolates composition of young shoots and flower buds of capparid (*Capparis species*) growing wild in Turkey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50:7323-7325.2002.

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

McNEIL M.J.; PORTER R.B.; WILLIAMS L.A.; RAINFORD L. **Natural Product Communications**. Departamento de Química da Universidade de West Indies, Mona, 7 de Kingston, Jamaica, Aug. 5(8):1301-6.2010.

MICHELIN, D.C.; MORESCHI, P.E.; LIMA, A.C.; NASCIMENTO, G.G.F.; PAGANELLI, M.O.; CHAUD, M.V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira Farmacognosia**. 15: 316-320.2005.

MORAIS, F. V.; MOLINA, H. M.; BORGES, D. K.; KOUYOUMDJIAN, M. Enzima inativadora de bradicinina liberada de fígado preservado ex-vivo. **Revista da Associação Médica Brasileira**,45(1):p 19-23.1999.

MOTHANA, R.A.A.; ABDO, S.A.A.; HASSON, S.; ALTHAWAB, F.M.N.; ALAGHBAR, S.A.Z.; LINDEQUIST, U. Antimicrobial and Cytotoxic Activities and Phytochemical screening of some Yemeni Medical Plants. **Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine**. 7(3):323–330.2010.

NASCIMENTO, GISLENE, G. F., LOCATELLI, JULIANA, FREITAS, PAULO C. *et al.* Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal Microbiology**, 31(4):247-256.2000.

NAUSEEF, W. M.; METCALF, J. A.; ROOT, R. K. Role of myeloperoxidase in the NEWMAN, D.J.; GRAGG, G.M.;SNADER, K.M. Natural products as source of new drugs over a period 1981-2002. **Journal Nature Products**,66:1022-1037.2003

NOVAIS, T.S.; COSTA, J.F.O.; DAVID, J.P.L.; DAVID, J.M.; QUEIROZ, L.P.; FRANÇA, F.; GIULIETTI, A.M.; SOARES, M.B.P.; SANTOS, R.R. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. **Revista Brasileira Farmacognosia**.13(Supl. 2):5-8.2003.

OLIVEIRA, R.A.G.; LIMA, E.O.; SOUZA, E.L.; VIEIRA, W.L.; FREIRE, K.R.L.; TRAJANO, V.N.; LIMA, I.O.; SILVA-FILHO, R.N. Interference of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng essential oil on the anti-*Candida* activity of some clinically used antifungals. **Revista Brasileira Farmacognosia**.17:186-190.2007.

PAIVA,S.R.; FIGUEIREDO, M.R.; ARAGÃO, T.V.; KAPLAN, M.A.C. Antimicrobial Activity in Vitro of Plumbagin Isolated from *Plumbago* Species. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 98(7): 959-961. 2003.

PELOTTO, J.P.; MARTINAZ, M.A.D.P. Flavonoids aglycones from argentinian *Capparis* species (Capparaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, 26:577-580.1998.

PEREIRA, D.A.; BRITO, A.C.; AMARAL C.L.F. Biologia floral e mecanismo reprodutivos do mussambê (*Cleome spinosa* Jacq.) com vistas ao melhoramento genético. **Biotemas**, 20(4):27-34, 2007.

PESSINI, G.L.; HOLETZ, F.B.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; DIAS-FILHO, B.P.; NAKAMURA, C.V. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. **Revista Brasileira Farmacognosia**,13(Supl. 1): 21-24.2003.

PHILLIPSON, J.D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**,56:237-243.2000.

RAMACHANDRAN, N. A. G. Cleosandrin, a novel 7-phenoxy coumarin from the seeds of *Cleome isosandra*. **Indian Journal of Chemistry**,17:438-440.1979.

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

respiratory burst of human neutrophils. **Blood**. 61(3):483-492.1983.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Fundamentos de Robbins: patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001.

ROTELLI, A. E.; GUARDIA, T.; JUÁREZ, A. O.; La ROCHA, N. E.; PELZER, L. E. SAKALANI, A.; KUTTY, S.K. Plant-derived compounds in clinical trials. **Drug Discovery Today**,13:161-171.2008.

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

SANTOS, F.A.; RAO, V.S. Infl ammatory edema induced by 1,8-cineole in the hindpaw of rats: a model for screening antiallergic and anti-infl ammatory compounds. **Phytomedicine**,5:115-119.1998.

SANTOS, M.R.A.; LIMA, M.R.; FERREIRA, M.G.R. Uso de plantas medicinais pela população de Ariquemes, em Rondônia. *Horticultura Brasileira* 26:244-250.2008.

SARDI, E.; TORDI, E. Determination of fully N-methylated compound in different cabbage and bee trout varieties. **Acta Biologia Szegediensis**,49(1-2):43-45.2005.

SARTORI, L. R. et al. Atividade antiinflamatória do granulado de *Calendula officinalis* L. e *Matricaria recutita* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**,13, (supl.1):17-19. 2003.

SHARAF, M.; EL-ALSARI, M.SALEH, N.A.M. Flavonoids of four *Cleome* and *Capparis* species. **Biochemical Systematics and Ecology**,25(2),161-166.1997.

SILVA, J.G.; SOUZA, I.A.; HIGINO, J.S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J.P.; PEREIRA, J.V.; PEREIRA, M.S.V. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. 17(4): 572-577. 2007

SILVA, M. I. G.; GONDIM A. P. S.; NUNES, I. F. S.; SOUSA, F. C. F. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 16:455-462.2006.

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

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

SMITH, C.J.; ZHANG, Y.; KOBOLDT, C.M.; MUHAMMAD, J.; ZWEIFEL, B.S.; SHAFFER, A.; TALLEY, J.J.; MASFERRER, J.L.; SEIBERT, K.; ISAKSON, P.C. Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. **Proceedings of the National Academy Sciences United States American**, 95:13313-13318.1998.

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

SRIVASTAVA, S. D. Chemical Constituents of *Cleome Viscosa*. **Indian Journal of Chemistry**, Section B: Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry, 21B: 165-167.1982.

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

TOLEDO, A. C. O., HIRATA, L. L., DA CRUZ, M.,BUFFON, M., MIGUEL, M. D., MIGUEL, O. G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, 21(1/2):7-13.2003.

TRAVERSA,G.; BIANCHI, C.; DA CAS, R.; ABRAHA, I.; MENNITI-IPPOLITO, F.; VANE, L.R.; BAKHLE, Y.S. BOTTING, R.M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology**,38,97-120.1998.

VENEGONI, M. Cohort study of hepatotoxicity associated with nimesulide and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **British Medicinal Journal**, v. 327, p.901-909, 2004.

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

WHITTLE, B.J.R. Gastrointestinal effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. WILLIAMS, C.A.; HOULT, J.R.S.; HARBORE, J.B., GREENHAM, J., EAGLES, J. A YAMAMOTO, H; OGAWA, T. Antimicrobial activity of perilla seed polyphenols against oral pathogenic bacteria. **Bioscience Biotechnology and bBiochemistry**., 66(4):921-4, 2002.

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

ZACCHINO, S.A.; YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V.; ENRIZ, R.D.; KOUZNETSOV, V.; RIBAS, J.C. The need for antifungal drugs: screening for

antifungal compounds with a selective mode of action with emphasis on the inhibitors of the fungal cell wall. In: RAI, M.; MARES, D. Plant derived antimycotis: current trends and future prospects. **The Haworth Press**, 1-41, 2003.

5. CAPÍTULO 1

SILVA, A.P.S., CAVALCANTI, M.S., LIMA, V.L.M. Avaliação do potencial antimicrobiano *in vitro* e anti-inflamatório *in vivo* do extrato de *Cleome spinosa* Jacq. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 2012.

Fator de impacto: 2.148

Avaliação do potencial antimicrobiano *in vitro* e anti-inflamatório *in vivo* do extrato de
Cleome spinosa Jacq.

Ana Paula Sant'Anna da Silva, Marilene da Silva Cavalcanti*, Vera Lúcia de Menezes
Lima

Departamento de Bioquímica, *Departamento de Micologia, Universidade Federal de
Pernambuco, Rua Professor Nelson Chaves s/n, 50670-420 Recife, PE, Brasil

Abstract: this study has as the main objective to evaluate the antimicrobial potential *in vitro* and the anti-inflammatory potential *in vivo* of the extracts of organic fractions of the roots and leaves of *C. spinosa*. The antibacterial activity was performed using the microdilution method for obtaining the minimal inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) of the extracts: cyclohexane of leaf (CHEL), chloroform of leaf (CEL), ethyl acetate of leaf (EAEL), methanol of leaf (MEL) cyclohexane of root (CHER), chloroform of root (CER), ethyl acetate of root (EAER) and methanol of root (MER) against Gram-positive (*Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*) and Gram-negative (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) bacteria. The test for anti-inflammatory activity was performed using MEL and MER in the following concentrations: 100 mg, 150 mg and 200 mg; and the method used was the Induction of peritonitis by carrageenan. The results showed that all extracts presented antibacterial activity, especially against the Gram-positive bacteria *S. aureus* with MIC of CHEL 0,09 mg/mL and MBC 0,19 µg/mL. Whereas against *B. subtilis* the MIC of CHER and CER was 0,09 mg/mL and a MBC of 0,19 mg/mL. The MEL and MER of *C. spinosa* exhibited anti-inflammatory activity at all concentrations tested (100 mg/kg, 150 mg/kg and 200 mg/kg). The results showed that the extracts of the plant species *C. spinosa* has shares constituents with antibacterial and anti-inflammatory actions that may be considerable. Such results incite further experimental works in order to identify substances responsible for these activities.

Key – words: Medicinal Plant, Antimicrobial, Activity anti-inflammatory

Introdução

Alguns estudos têm mostrado que o extrato bruto de outras espécies do gênero *Cleome* apresentou atividade analgésica, laxativa, diurética e antibacteriana, e estudos fitoquímicos preliminares desses extratos, puderam constatar-se a presença de taninos e saponinas, compostos que estão relacionados a ação antibacteriana, atividade obtida na espécie *Cleome rutidosperma* (Bose et al., 2006;2007).

A *Cleome spinosa* Jacq., é uma espécie herbácea que pertence à família Brassicaceae e ocorre nos trópicos e subtropicais dos hemisférios norte e sul e no Mediterrâneo. Suas folhas, flores e raízes são utilizadas na medicina tradicional em processos inflamatórios, cicatrizantes, tosse e bronquite asmática. O estudo fitoquímico realizado com as partes aéreas de *C. spinosa* foram detectados metabólitos secundários do tipo diterpenos cembranos e flavonoides (COLLINS et al., 2004). No entanto, estes não foram analisados quanto as suas possíveis propriedades biológicas, que viesse comprovar seu uso na medicina tradicional. Permanecendo assim escassas as informações científicas que comprovem a sua utilização.

Com o aumento da resistência microbiana as mais diversas drogas, os compostos naturais são de grande interesse científico por um papel altamente significativo no desenvolvimento de novas drogas com perfil farmacológico. A *C. spinosa* devido a escassez de informações científicas que comprovem a sua eficácia no uso tradicional. Este estudo objetivou investigar as propriedades terapêuticas da referida espécie contra micro-organismos patogênicos ao homem e processos inflamatórios, contribuindo na ampliação do conhecimento de suas atividades biológicas e sua interação com os micro-organismos, possibilitando a síntese de novos fármacos.

Materiais e Métodos

Material vegetal

As folhas e raízes de *C. spinosa* foram coletadas em outubro de 2011, às margens do rio Capibaribe, no campus da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Uma amostra foi depositada no Herbário Geraldo Mariz do Departamento de Botânica

do Centro de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Pernambuco – CCB/UFPE.

Obtenção dos extratos

O material foi seco, moído e submetido à extração a quente 40° C (Soxhlet), para obtenção das frações orgânicas, com as seguintes polaridades: ciclohexânico, clorofórmio, acetato de etila e metanol, o concentrado foi transferido para evaporador rotativo para total remoção dos solventes, sob pressão reduzida a 40° C, obtendo-se assim os extratos: ciclohexano folha (ECHF), clorofórmio folha (ECF), acetato de etila (EAF), metanol folha (EMF), ciclohexano raiz (ECHR), clorofórmio raiz (ECR), acetato de etila raiz (EAR) e metanol raiz (EMR), os quais foram submetidos aos ensaios biológico *in vitro* e *in vivo*.

Ensaio da atividade antimicrobiana

Micro-organismos Testes

Os micro-organismos utilizados para os testes antimicrobianos foram seis cepas obtidas da Coleção de Culturas UFPEDA, Departamento de Antibióticos, UFPE, sendo quatro cepas de bactérias Gram-positivas e duas Gram-negativas. As Gram-positivas foram *Staphylococcus aureus* - UFPEDA-02, *Staphylococcus aureus*- UFPEDA -709 - isolada da ponta de cateter do Hospital das Clínicas da UFPE; *Staphylococcus aureus* - UFPEDA -733 isolada de fragmento ósseo (multiressistente) também obtidas do Hospital das Clínicas da UFPE, *Bacillus subtilis* - UFPEDA-86. Enquanto que as duas Gram-negativas foram *Escherichia coli* - UFPEDA-224 e *Pseudomonas aeruginosa* - UFPEDA-416.

Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) dos extratos

A CMI foi realizada pelo método de microdiluição em placa de acordo com as recomendações do National Committee for Clinical Laboratory Standart (NCCLS,

2004). Foram utilizadas microplacas estéreis de 96 poços de fundo chato e tampa nas quais foram distribuídos asépticamente, 100 µL de caldo Mueller-Hinton em todos os poços. Os poço da coluna 2 recebeu 10 µL de DMSO que ficou como controle do solvente, os poços da coluna 1 serão o controle negativo e os poços da coluna 12 o controle positivo. Nos poços da coluna 3 adicionou-se 100 µL dos extratos ECHF e ECHR, ECF e ECR, EAF e EAR e EMF e EMR de *C.spinosa* na concentração de 100mg/mL (volume final em cada poço desta coluna foi 200 µL), e, em seguida, foram feitas diluições seriadas transferindo-se 100 µL da coluna 3 até a coluna 11, descartando os 100 µL restantes. Após as diluições, foi preparada a solução bacteriana a partir de uma cultura recente (24h) com turbidez de acordo com a escala 0,5 de Mc Farland (1×10^8 UFC mL⁻¹), 10 µL dessa solução foram adicionados nos poços da coluna 2 até os da coluna 12. As placas foram tampadas e incubadas a 37° C por 24 horas. Após este período, adicionou-se em cada cavidade, 15 µL da solução aquosa de resazurina a 0,01%, como indicador colorimétrico de oxi-redução para caracterizar a viabilidade celular (KONEMAN et al., 2001). As placas foram mantidas à temperatura ambiente 28° C ± 2 ° C por quatro horas e após esse período, a leitura foi realizada de forma visual, observando a mudança da cor azul (original da resazurina) para rosa, caracterizando redução desse corante nos poços onde havia viabilidade bacteriana; em contrapartida, nas cavidades onde a cor permaneceu azul, não houve redução do corante, indicando inviabilidade bacteriana; podendo-se desta forma determinar a CMI, ou seja, a menor concentração de um produto capaz de inibir o crescimento microbiano (BANFI; BURT & REINDERS, 2003; MANN & MARKHAM, 1998). Os antibióticos padrões clorafenicol, estreptomicina, gentamicina e tetraciclina na concentração de 1mg/mL foram usados como referência para a CMI dos extratos frente aos micro-organismos.

Determinação da Concentração Mínima Bactericida

A CMB foi determinada, a partir dos poços que permaneceram azulados. Em cada um desses poços foi mergulhada a alça de platina e feita uma estria na placa de Petri com meio sólido Mueller-Hinton, após a repicagem cultivou-se por 24h.

Atividade Anti-inflamatória

Animais

Foram utilizados oito grupos com cinco camundongos *Swiss* machos com peso médio de 40g, com 60 dias de vida, sendo fornecidos e mantidos no Biotério do LIKA - UFPE. Os animais foram mantidos sob condições de temperatura de $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, em ciclo claro/escuro de 12 horas, com acesso a água e ração *ad libitum*, exceto durante os experimentos. Os animais foram mantidos no laboratório por 1 hora antes da realização dos experimentos para aclimatação, sendo que os experimentos foram conduzidos de acordo com o manejo experimental de animais de laboratório e normas para investigação em animais conscientes. O ensaio foi aprovado pelo Comitê de Ética Animais - Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, CEEA-CCB.

Avaliação da atividade anti-inflamatória – induzida por carragenina

Para esta avaliação, peritonite foi induzida a partir de uma injeção de 0,1 ml de carragenina (1% p/v) administrada intraperitoneal em cada camundongo (FOSTER et al., 1986), meia hora depois da administração do fármaco, do veículo e dos EMF e EMR de *C. spinosa* nas concentrações de 100mg, 150mg e 200mg. Quatro horas após estímulo os animais foram sacrificados em câmara de CO₂, e o líquido peritoneal coletado foi utilizado para contagem de leucócitos, de forma automatizada (Horiba ABX).

Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média e analisados, através de análise de variância (ANOVA).

Resultados

O material botânico coletado, após a extração mostrou que as folhas de *C. spinosa* tiveram o melhor rendimento de extrato bruto, em relação as raízes. O extrato metanólico foi o solvente que apresentou melhor rendimento, tanto de folha quanto o de raiz (Tabela 1).

Todas as frações dos extratos de folha e raiz de *C. spinosa* testados apresentaram-se como potentes antibacteriano. Os extratos ciclohexânico e clorofórmio, tanto de folhas como de raízes, apresentaram as menores CMI, bem como as CMB. Os resultados mostraram que esses extratos foram especialmente eficazes contra as bactérias Gram-positivas, conforme demonstrado na Tabela 2. A CMI do ECHF contra *S. aureus* – UFPEDA foi de 0,09 mg/mL e CMB de 0,19 mg/mL, sendo este resultado melhor que os apresentados pelos antibióticos de referência. Contra *B. subtilis* os ECHR e ECR apresentaram CMI de 0,09 mg/mL e CMB de 0,19 mg/mL também foram considerados bastante eficazes, sendo estes resultados semelhantes ao apresentado pela tetraciclina e menor que os demais antibióticos utilizados como drogas referência no tratamento das infecções causadas por micro-organismo. Contra as bactérias Gram-negativas os ECF, EAF e EMF apresentaram CMI de 3,12 mg/mL, inferior ao clorafenicol, e CMB entre 3,12 mg/mL e 12,5 mg/mL.

Cleome spinosa apresentou atividade anti-inflamatória. Os extratos metanólicos, tanto de folhas como de raízes, em todas as concentrações testadas – 100mg/Kg, 150mg/Kg e 200mg/Kg – provocaram redução significativa do número total de leucócitos no líquido intraperitoneal dos camundongos com peritonite, quando comparados ao total de leucócitos dos animais com peritonite tratados apenas com solução salina, conforme demonstrado na Figura 1 (A e B). Convém mencionar também que quando contrastados os resultados obtidos com a administração dos extratos de *Cleome spinosa* com a redução obtida pelo anti-inflamatório comercial – ácido acetilsalicílico (AAS) – no número total de leucócitos do líquido peritoneal, verificou-se que não houve diferença estatística entre o efeito anti-inflamatório da concentração de 100mg/Kg do extrato metanólico das folhas e a diminuição da resposta inflamatória causada pelo AAS, assim como não diferiu estatisticamente a média reduzida do número leucocitário com o extrato metanólico das raízes na concentração de 150mg/Kg

comparada com a média obtida com o uso do AAS. Com o aumento da concentração dos extratos, verificou-se que não houve um efeito anti-inflamatório concentração-dependente, pois não houve diferença estatística entre os valores de leucócitos totais no líquido intraperitoneal, com exceção daqueles encontrados nos animais que receberam o extrato metanólico da raiz na concentração de 100 mg/Kg, pois este grupo de animais foi o que apresentou maior número de leucócitos, ou seja, menor redução da resposta inflamatória em comparação com os resultados obtidos com as outras concentrações.

Discussão

Espécies vegetais continuam a representar fontes de inúmeras drogas e estudos relacionados à investigação de propriedades terapêuticas exibidas por estas constituem-se em importante ferramenta para esclarecimento científico. Assim uma espécie pode ser analisada quanto aos seus constituintes químicos obtidos em diferentes situações.

Extratos ciclohexânico, clorofórmico, acetato de etila e metanólico das folhas de *C. spinosa* apresentaram-se como potentes antibacterianos, contra todas as bactérias testadas. Extrato ciclohexano CMI entre de 0,09 mg/mL e 12,5 mg/mL e CMB entre 0,19 mg/mL e 25 mg/mL, tendo sido o melhor extrato com atividade antibacteriana. Em sequência o extrato clorofórmico apresentou CMI entre 0,78 mg/mL e 25 mg/mL e CMB entre 1,56 mg/mL e 50 mg/mL. Os extratos ciclohexânico, metanólico, clorofórmico e acetato de etila das raízes de *C. spinosa* também apresentaram atividade antibacteriana contra todas as bactérias testadas, sendo os melhores resultados também observados para os extratos ciclohexânico e clorofórmico, os quais apresentaram CMI entre de 0,09 mg/mL e 12,5 mg/mL e CMB entre 0,19 e 50 mg/mL. Os resultados também mostraram que esse extratos de *C. spinosa* foram especialmente eficazes contra as bactéria Gram-positivas. O extrato ciclohexânico da folha contra *S.aureus* – UFPEDA 02 apresentou valores de CMI e CMB de 0,09 mg/mL e 0,19 mg/mL respectivamente, sendo resultado melhor que os apresentados pelos antibióticos utilizados como referência. Os extratos ciclohexânico e clorofórmico da raiz contra *B. subtilis*, com os valores de CMI e CMB de 0,09 mg/mL e 0,19 mg/mL respectivamente, também foram considerados bastante eficazes, sendo esses resultados semelhantes ao apresentado pelo antibiótico Tetraciclina. E melhores que os

apresentados pelos demais antibióticos como drogas de referência no tratamento das infecções causadas por estes micro-organismos (Tabela 2), visto que os valores de CMI observados frente a maior parte dos micro-organismos teste utilizados nesse estudo foram inferiores a 500 µg/mL, e de acordo com Duarte et. al. (2007) produtos naturais são considerados potentes inibidores da atividade microbiana com valores de CMI menores que 500 µg/mL.

Foi relatado que entre outras espécies do gênero *Cleome* como na *Cleome ruidosperma* a atividade antibacteriana do seu extrato aquoso contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escheichia coli*. (EL-NAGAR et al., 2005; MOTHANA et al., 2008), e estudos fitoquímicos deste extrato mostrou a presença de taninos e saponinas, que estão associados à atividade antibacteriana observadas em plantas (BOSE et al., 2006; 2007). Outros estudos, têm relacionado à atividade antimicrobiana de fontes naturais com a presença de uma classe de compostos abundante em espécies vegetais, os chamados compostos fenólicos (MAJHENIC et al., 2007; EL-MASSRY et al., 2009; MAIER et al., 2009; RUDDOCK, 2011; JAISWAL, 2012). O potencial antimicrobiano apresentado nesse estudo pelos extratos das folhas e raízes de *C. spinosa* pode estar relacionado com a presença desses metabólitos, uma vez que já foi constatado nesta espécie a presença de flavonoides (COLLINS et al., 2004).

A resposta inflamatória de fase aguda é um processo rápido que o organismo desencadeia como mecanismo de defesa a danos provocados por algum agente, após reconhecimento dos epítomos, segundo DALPRA et al. (2011). Peritonite aguda ocorre com recrutamento de leucócitos para a cavidade intraperitoneal e a quantificação do número de leucócitos no líquido intraperitoneal funciona como um índice importante para a avaliação do potencial anti-inflamatório, conforme CASTELUCCI et al., (2007). O presente estudo, após a criação de um modelo animal com peritonite aguda através da carragenina, mostrou uma redução significativa do número de leucócitos presentes no líquido intraperitoneal após a administração dos extratos metanólicos, tanto de folhas como das raízes de *C. spinosa*, demonstrando assim o potencial anti-inflamatório deste vegetal, que deverá ser melhor explorado, haja vista a inexistência de estudos relacionados a este tipo de investigação sobre *C. spinosa*. Propriedades anti-inflamatória, conforme reportado por BOURICHE et al.,(2003), assim como MAYER

et al., (2009), podem ser atribuídas aos compostos fenólicos presentes nos vegetais, especialmente flavonoides, e que estes compostos ainda podem atuar de forma citoprotetora, como citado por DALPRA et al., (2011). Estes autores também mostraram que extratos metanólicos podem ser melhores para se detectar a presença de atividade anti-inflamatória por possuírem uma maior concentração de compostos polares que outros solventes orgânicos.

As três concentrações testadas (100mg/Kg, 150 mg/Kg e 200 mg/Kg), tanto de folhas como das raízes de *C. spinosa* tiveram efeito anti-inflamatório e se excetuando a concentração de 100 mg/Kg de raízes e a de 200 mg/Kg de folhas, pode-se evidenciar que todas as outras concentrações desencadearam resposta anti-inflamatória similar à obtida com a administração do ácido acetilsalicílico 500mg/Kg. Para os extratos das raízes, a melhor concentração foi a de 150 mg/Kg, não sendo necessária uma concentração maior, como a de 200 mg/Kg, para haver um melhor efeito anti-inflamatório. Quanto aos extratos das folhas de *C. spinosa* uma concentração de 100 mg/Kg já provocou um processo anti-inflamatório que não diferiu em relação aos grupos de animais que receberam concentrações maiores do extrato. Isto mostra que o potencial anti-inflamatório dos extratos metanólicos de *C. spinosa* já pode ocorrer similarmente ao de uma concentração superior, 500 mg/Kg, do ácido acetilsalicílico, apresentando-se como possíveis alternativas terapêuticas eficazes para o desenvolvimento da inflamação, caso esta passe a atuar de forma exacerbada.

Propriedades anti-inflamatórias também têm sido reportada por outras espécies de plantas do gênero *Cleome*, o que corrobora com a presente investigação. BOURICHE et al., (2003) encontraram atividade anti-inflamatória para a *Cleome arabica* após desencadeamento de inflamação induzida por carragenina. Extratos de folhas de *C. arabica* foram administradas nas concentrações de 10, 200 e 300 mg/Kg provocaram diminuição de edema e migração leucocitária, de uma forma dose-dependente, divergentemente dos resultados do presente estudo utilizando-se extrato de *C. spinosa* os quais com concentração de 100 mg/Kg e 150 mg/Kg já foram suficientes para provocar reduções bastante significativas do processo inflamatório. HARRAZ e AYAD (1994) mostraram o potencial anti-inflamatório de *Cleome amblyocarpa*. BOSE et al., (2007) contatam que o extrato etanólico, das partes aéreas de *Cleome rutidosperma* nas concentrações de 200 mg/Kg e de 400 mg/Kg, administrado via oral,

produziu, além do efeito analgésico e atividade antipirética, um importante efeito anti-inflamatório contra inflamação induzida também por carragenina. BOSE (2007) também confrontaram os resultados da atividade anti-inflamatória de *C. rutidosperma* com os obtidos por ácido acetilsalicílico, via oral, na concentração de 200 mg/Kg.

Acredita-se que as plantas do gênero *Cleome* possa atuar como anti-inflamatórios por inibirem a liberação de mediadores da resposta inflamatória aguda, tais como histamina, serotonina e bradicinina conforme reportado por (Bose et al., 2006). Também acredita-se que os extratos dessa planta possam apresentar alguma influência sobre a biossíntese das prostaglandinas, podendo intervir na segunda fase da resposta inflamatória aguda, segundo (BOSE et al., 2007)

Referências Bibliográficas

Banfi, E.; Scialino, G.; Monti-Bragadin. Development of a microdilution method to evaluate Mycobacterium tuberculosis drugs susceptibility. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 52 (5):796-800, 2003.

Bose, A; Gupta, J.K.; Dash, G.K.; Ghosh, T.; SI, S.; Panda, D.S. Diuretic and antibacterial activity of aqueous extract of *Cleome rutidosperma*. **India Journal of Pharmaceutical Science**,69 (2)292-294.2007.

Bose, A.; Mondal, S.; Gupta, J.K.; Dash, G.K.; Ghosh, T.; SI, S. Studies on diuretic and laxative activity of ethanolic extract and its fractions of *Cleome rutidosperma* aerial parts. **Pharmacognosy Magazine** .2(7),178-182.2006.

Bouriche, H.; Laid Selloum, Chafia Tigrine, and Chahra Boudoukha. Effect of *Cleome arabica* leaf extract on rat paw edema and human neutrophil migration. **Pharmaceutical Biology** 41(1):10-15.2003.

Burt, S. A.; Reinders, R. D. Antimicrobial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* 0157:H7. **Letters in Applied Microbiology**, 26(3):162-167, 2003.

Castelucci S., Rogério A.P., Ambrosio S.R., Arakawa N.S., Lira S.P., Faccioli L.H., Costa F.B. Anti-inflammatory activity of *Dasyphyllum brasiliensis* (Asteraceae) on acute peritonitis induced by β -glucan from *Histoplasma capsulatum*. *Journal Ethnopharmacology*, 112:192-198.2007.

Collins, D.O.; Reynolds, W.F.; Reese, P.B.. New Cembranes from *Cleome spinosa*. **Journal of Natural Products**.67:179-183.2004.

Dal Pra, V. et al. Anti-inflammatory activity of fractionated extracts of *Salvia officinalis* **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, 01 (07); 2011: 67-71.2011.

Duarte, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Multiciência**, Campinas, n. 7, 2006.

Echevarria, A. Plantas Medicinais: a Necessidade de Estudos Multidisciplinares. **Química Nova**, 25(3).2002.

El-Nagar, E.B.; Bartosikova, L.; Zemlicka, M.; Svajdenka, E.; Rabiskova, M.; Strnadova, V.; Necas, J. Antidiabetic affect of *Cleome droserfolia* aerials parts: lipid peroxidation-induced oxidative stress in diabetic rats. **Acta Veterinaria Brno**,74 (33),347-352.2005.

Foster, S.J.; Mc Cormick, M.E.; Howarth A.; Aked D. Leukocyte recruitment in the subcutaneous sponge implant model of acute inflammation in the rat is not mediated by leukotriene B1. **Biochemical Pharmacology** 35:1709–1717, 1986.

Hall, J.C.; Systma, K.J.; Iltis, H.H. Phylogeny of Capparaceae and Brassicaceae based on chloroplast sequence data. **American Journal of Botany**. 89:1826-1842, 2002.

Koneman, E. W.; Allen, S. D.; Janda, W. M.; Schreckenberger, P.C.; Winn JR. W.C. **Diagnóstico Microbiológico–Texto e atlas colorido**. 5 ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 30–31p, 2001.

Mann, C. M.; Markham, J. L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, 84 (5):538-544, 1998.

Mayer B., Baggio C.H., Freitas C.S., Santos A.C., Twardowschy A., Horst H., Pizzolatti G., Micke G. A., Heller M., Santos E.P., Otuki M.F., Marques A.C.A. Gastroprotective constituents of *Salvia officinalis* L. **Fitoterapia**;80:421-426.2009.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARD – NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 2 ed. Tentative standart. NCCLS Document M7-T2, V. B. n. B. Villa Nova PA, National Commitee for Clinical Laboratory Standart, 2004

Collins, D.O., Reynolds, W.F., Reese, P.B. New cembranes from *Cleome spinosa*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 2, p. 179-183, 2004.

El-Nagar, E.B., Bartosikova, L., Zemlicka, M., Svajdenka, E., Rabiskova, M., Strnadova, V., Necas, J. Antidiabetic effect of *Cleome droserifolia* aerials parts: lipid peroxidation-induced oxidative stress in diabetic rats. **Acta Veterinaria Brno**, v. 74, n. 3, p. 347-352, 2005.

Mothana, R.A.A., Abdo, S.A.A., Hasson, S. Althawab, F.M.N., Alaghbar, S.A.Z., Lindequist, U. Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Activities and Phytochemical Screening of Some Yemeni Medicinal Plants. Oxford Journal, **Evidence-Based Medicina Complementar e Alternativa**. Disponível em: <http://ecam.oxfordjournals.org-papbyrecent.dtl>. Acesso em: 28 de mai. 2008.

Duarte, M. C. T.; Leme, E. E.; Delarmelina C.; Soares, A. A.; Figueira, G. M. and Sartoratto, A. “Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*,” *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 111, no. 2, pp. 197–201, 2007.

Leite S.P.; Vieira J.R.C.; Medeiros P.L.; Leite R.M.P.; Lima V.L.M.; Xavier H.S.; Lima E.O. Antimicrobial activity of *Indigofera suffruticosa*. Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine, 3(2): 261-265, 2006.

El-Massry, K.F.; Ghorab, A.H.; Hamdy, A.S.; Shibamoto, T. Chemical compositions and antioxidant/antimicrobial activities of various samples prepared from *Schinus*

terebinthifolius leaves cultivated in Egypt. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 12, p.5265-5270, 2009.

Maier, T.; Schieber, A.; Kammerer, D.R.; Carle, R. Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. **Food Chemistry**, Barking, v. 112, n. 3, p. 551-559, 2009.

Majhenic, L.; Skerget, M.; Knez, Z. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. **Food Chemistry**, Barking, v. 104, n. 3, p. 1258-1268, 2007.

Ruddock, P. S.; Charland, M.; Ramirez, S.; López, A.; Towers, G. H. N., Arnason, J. T.; LIA, M.; Dillon, J. A. R. Antimicrobial Activity of Flavonoids From *Piper lanceaefolium* and Other Colombian Medicinal Plants Against Antibiotic Susceptible and Resistant Strains of *Neisseria gonorrhoeae*. **Sexually Transmitted Diseases**, 38 (2): 82-88. 2011.

Jaiswal, A. K.; Abu-Ghannam, N.; Gupta, S.. A comparative study on the polyphenolic content, antibacterial activity and antioxidant capacity of different solvent extracts of *Brassica oleracea* vegetables. **International Journal of Food Science & Technology**, 47 (2): 223-231. 2012.

Tabela 1: Rendimento em gramas dos extratos de *Cleome spinosa*.

Material Botânico	Rendimento				
	Peso seco	ECH	EC	EA	EM
Folha	200g	7,54g	4,30g	5,62g	12,47g
Raíz	200g	0,76g	0,54g	0,20g	6,72g

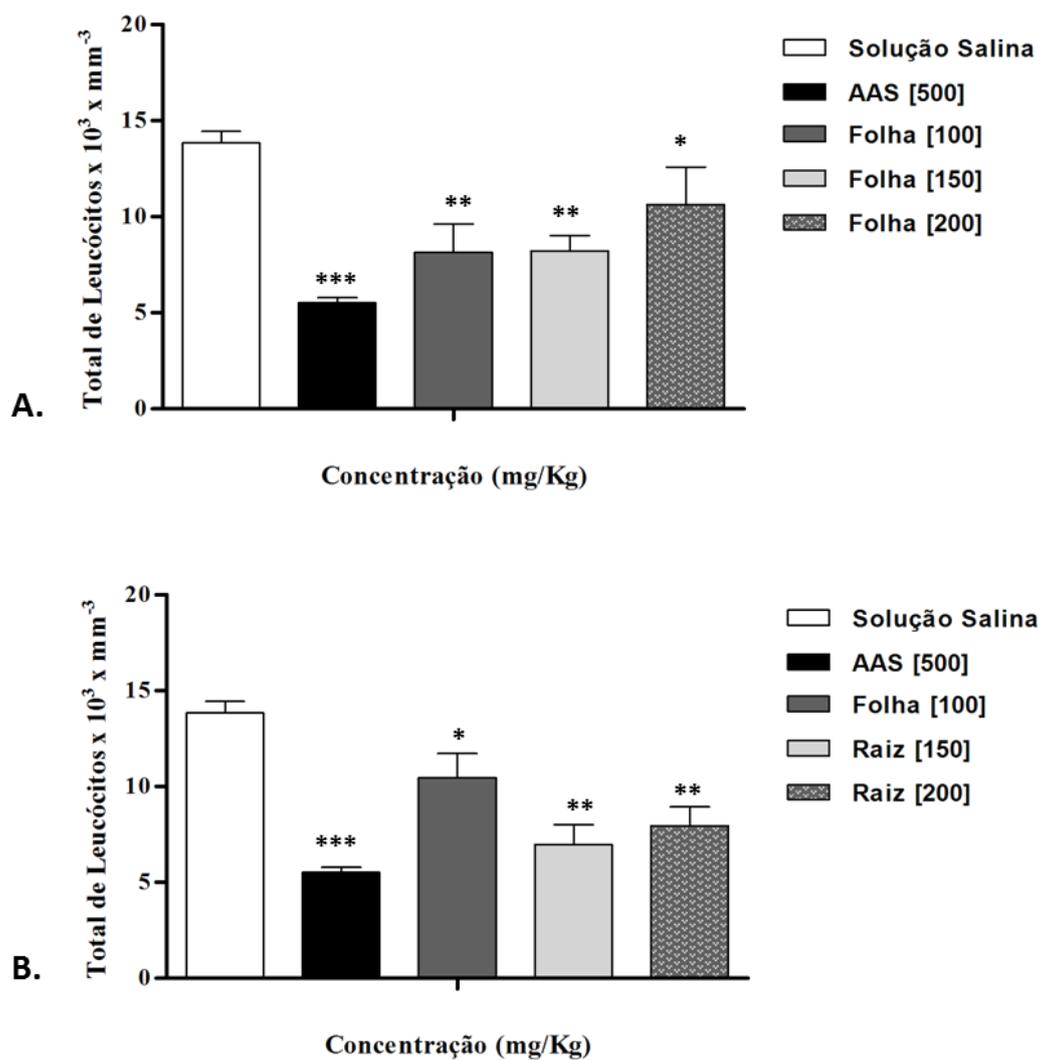
ECH= Extrato ciclohexânico; EC = Extrato clorofórmico;
EA = Extrato acetato de etila; EM= Extrato metanólico

Tabela 2. Mínima Concentração Inibitória (MIC), mínima concentração bactericida (MBC) e mínima concentração fungicida (MCF) dos extratos das folhas e raízes de *C. spinosa*, expressas em µg/mL.

Material testado	Micro-organismos Teste											
	<i>S.aureus</i> ¹		<i>S. aureus</i> ²		<i>S. aureus</i> ³		<i>B. subtilis</i>		<i>E. coli</i>		<i>P.aeruginosa</i>	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
ECHF	0,09	0,19	3,12	25	0,78	6,25	0,19	3,12	12,50	25	6,25	6,25
ECF	0,78	1,56	6,25	12,5	12,5	6,25	1,56	50	25	25	3,12	6,25
EAF	3,12	50	6,25	12,5	12,5	6,25	1,56	1,56	6,25	12,5	3,12	12,5
EMF	6,25	*	12,5	*	12,5	*	6,25	6,25	12,5	50	3,12	3,12
ECHR	0,78	12,5	6,25	*	12,5	*	0,09	0,19	12,5	50	6,25	*
ECR	0,19	3,12	3,12	12,5	3,12	6,25	0,09	0,19	12,5	*	6,25	50
EAR	1,56	12,5	6,25	*	12,5	*	0,78	0,78	12,5	50	12,5	*
EMR	6,25	50	25	*	25	*	3,12	3,12	12,5	25	12,5	*
Fármaco de referência												
Clorafenicol	3,12		0,39		6,25		1,56		0,78		6,25	
Estreptomicina	6,25		6,25		3,12		0,78		3,12		0,78	
Tetraciclina	1,56		0,09		0,09		0,09		0,09		1,56	
Gentamicina	1,56		0,19		12,5		12,5		0,19		0,09	

* Não matou.

Figura 1. Contagem de leucócitos totais peritoneais de ratos estimulados com carragenina, dos extratos metanólicos das folhas (A) e raízes (B) *C. spinosa*, AAS comparados entre si e com o grupo controle tratado solução salina a 0,9%.



6. CONCLUSÃO

De acordo com o presente estudo, os extratos ciclohexânico e clorofórmico das folhas e raízes apresentam resultados promissores, o que instigam a realização de novos estudos com esta espécie vegetal para a determinação de substâncias presentes no extrato, as quais contribuem para a atividade biológica,

Este estudo provém evidências de que extratos metanólicos em concentrações de 100 mg/Kg e 150 mg/Kg das folhas e raízes, respectivamente, de *C. spinosa* possam apresentar compostos com atividade anti-inflamatória suficientes para dar suporte ao uso desta planta na medicina popular, bem como para a investigação de um novo fármaco anti-inflamatório proveniente de *C. spinosa*. E para entender seu mecanismo de ação e avaliar através de outros ensaios sua toxicidade, visando uma possível aplicação farmacêutica.

7. Anexos

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

The manuscript should be prepared using standard word processing software and should be printed (font size 12) double-spaced throughout the text, figure captions, and references, with margins of at least 3 cm. The figures should come in the extension tiff, with a minimum resolution of 300 dpi. Tables and legends to figures must be submitted all together in a single file. Figures, must be uploaded separately as supplementary file.

The manuscript should be arranged in the following order:

Running title: with up to 40 characters (letters and spaces)

Title: with up to 250 characters

Author's names: without titles or graduations

Institutional affiliations: full address of the corresponding author only

Summary: up to 200 words (100 words in case of short communications). It should emphasize new and important aspects of the study or observations.

Key words: 3-6 items must be provided. Terms from the Medical Subject Headings (Mesh) list of Index Medicus should be used.

Sponsorships: indicating the sources of financial support and change of address.

Introduction: should set the purpose of the study, give a brief summary (not a review) of previous relevant works, and state what new advance has been made in the investigation. It should not include data or conclusions from the work being reported.

Materials and Methods: should briefly give clear and sufficient information to permit the study to be repeated by others. Standard techniques need only be referenced.

Ethics: when reporting experiments on human subjects, indicate whether the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional or regional) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 1983. When reporting experiments on animals, indicate whether the institution's or a national research council's guide for, or any national law on the care and use of laboratory animals was followed.

Results: should be a concise account of the new information discovered, with the least personal judgement. Do not repeat in text all the data in the tables and illustrations.

In case of describing New Species, should follow:

Name of the new species, authors (when it is the case), sp. nov.,
(Figs x-y)
[Ex: *An. (Nyssorhynchus) atacamensis* González and Sallum, sp.
nov. (Figs 1-4)]

Previous reference to the new species (when it is the case)
[Ex: *An. pictipennis* of Rueda et al. (2008): 448.]

Diagnosis (or Description; all stages are described);

Type host (when it is the case);

Site of Infection (when it is the case);

Type-locality;

Type data and depository;

Other material examined (when it is the case);

Distribution;

Host-parasite data (such prevalence and other important data, when it is the same case);

Bionomics;

Etymology;

Taxonomic discussion (or simply DISCUSSION as internal title).

Discussion: should be limited to the significance of the new information and relate the new findings to existing knowledge. Only unavoidable citations should be included.

Acknowledgements: should be short and concise, and restricted to those absolutely necessary.

REFERENCES

Must be accurate. Only citations that appear in the text should be referenced. Unpublished papers, unless accepted for publication, should not be cited. Work accepted for publication should be referred to as "in press" and a letter of acceptance of the journal must be provided. Unpublished data

should only be cited in the text as "unpublished observations", and a letter of permission from the author must be provided. The references at the end of the paper should be arranged in alphabetic order according to the surname of the first author. [CLICK HERE \[+\]](#)

FIGURES AND TABLES MUST BE UNDERSTANDABLE WITHOUT REFERENCE TO THE TEXT

Figures: presented in tiff format with a minimum of 300 dpi and photographs must be sharply focused, well contrasted, and if mounted onto a plate, the figures should be numbered consecutively with Arabic numbers. Magnification must be indicated by a line or bar in the figure, and referenced, if necessary in the caption (e.g., bar = 1 mm). Plates and line figures should either fit one column (8 cm) or the full width (16.5 cm) of the page and should be shorter than the page length to allow inclusion of the legend. Letters and numbers on figures should be of a legible size upon reduction or printing. A colour photograph illustrates the cover of each issue of the Journal and authors are invited to submit illustrations with legends from their manuscript for consideration for the cover.

Tables: should supplement, not duplicate, the text and should be numbered with Roman numerals. A short descriptive title should appear above each table, with any explanations or footnotes (identified with a, b, c, etc.) below.

Technical Notes: Technical Notes should communicate rapidly single novel techniques or original technical advances. The entire note should occupy no more than three printed pages including figures and/or tables (it means around 10 double-spaced typed Word file maximum). The text must not be not divided into sections. Therefore, the state of art must be very briefly presented; results must be rapidly presented and discussed at a time. Complementary

tables and figures may be published as supplementary data. References must be limited to few essential ones and cited at the end of the note, using the same format as in full papers. A brief summary and three key words must be provided.

Short communications: should communicate rapidly single results or techniques. They should occupy no more than three printed pages including figures and/or tables. They should not contain excessive references. References should be cited at the end of the paper using the same format as in full papers. A brief summary and three key words must be provided.

Genome Announcement and Highlights: this section is dedicated to publish new genome information from eukaryote parasites, virus, bacteria and their respective vectors. Authors who wants a fast peer review and publication cycle for their research results covering new genome sequences, re-sequencing and comparative genome analysis as well as the expression pattern of genomes are invited to submitted papers under the short communication format.

Alternative format: manuscripts may be submitted following the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" produced by the International Committee of Medical Journal Editors also known as the Vancouver Style. In this case, authors should follow the guidelines in the fifth edition (Annals of Internal Medicine 1997; 126: 36-47, or at the website <http://www.acponline.org/journals/resource/unifreqr/htm>) and will be responsible for modifying the manuscript where it differs from the instructions given here, if the manuscript is accepted for publication. Authors should also follow the Uniform Requirements for any guidelines that are omitted in these Instructions.

In case of clinical trials it's mandatory to inform the registration number of the REBEC platform.

A statement that the data/results of the manuscript are not plagiarism and have not been published elsewhere.