



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

AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
ANTITUMORAL DE RXTRATOS DE *Hymenaea stigonocarpa*

Mart. ex. Hayne (JATOBÁ DO CERRADO)

CARLA MICHELLA LEAL SOARES

Recife
2010

Carla Michella Leal Soares

**Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana e antitumoral de
extratos de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex. Hayne (Jatobá do
Cerrado)**

**Recife
2010**

Carla Michella Leal Soares

**Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana e antitumoral de
extratos de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex. Hayne (Jatobá do
Cerrado)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes.

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Teresinha Gonçalves da Silva.

Recife
2010

Soares, Carla Michella Leal

Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana e antitumoral de extratos de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. Ex. Hayne (Jatobá do Cerrado) / Carla Michella Leal Soares. – Recife: O Autor, 2010.

88 folhas: il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Patologia, 2010.

Inclui bibliografia e anexos.

Leguminosae. 2. *Hymenaea stigonocarpa*. 3. Plantas medicinais. 4. Antimicrobianos. 5. Atividade antitumoral. I. Título.

633.88	CDU (2.ed.)	UFPE
615.321	CDD (20.ed.)	CCS2010-069

Carla Michella Leal Soares

Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos de
Hymenaea stigonocarpa Mart. ex. Hayne (Jatobá do Cerrado)

Dissertação aprovada em: 12 de Fevereiro de 2010

Banca examinadora:

Dr^a. Maria Bernadete de Souza Maia.
Departamento de Fisiologia e Farmacologia – CCB/UFPE.

Dr^a. Liriane Baratella Evêncio.
Departamento de Histologia e Embriologia – CCB/UFPE.

Dr^a. Márcia Silva do Nascimento.
Departamento de Antibióticos – CCB/UFPE.

Recife
2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Prof. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS – GRADUAÇÃO

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. José Thadeu Pinheiro

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

Prof^a. Adriana Maria da Silva Telles

COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof. Hilton Justino da Silva

*Ao meu filho Diego, sempre
presente em meu coração.
A minha família, pelo carinho,
paciência e incentivo a minha
formação profissional.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e pela proteção durante a condução de todo período do curso.

À minha família, pelo apoio incondicional: aos meus pais, Adelmo e Norma, pelo empenho devotado a minha formação pessoal; ao meu filho Diego, minha motivação para viver e ir à busca dos meus sonhos; ao meu marido José Nunes, pelo companheirismo e conforto nos momentos difíceis; as minhas irmãs, Ana Carolina e Emanuela, meus avós, tios e primos, que contribuíram com momentos de distração. Obrigada pelo apoio e carinho recebidos.

À minha orientadora, Eulália Ximenes, pela oportunidade de aprendizado, orientação e disposição a repassar seus conhecimentos com profissionalismo e competência.

Às prof^{as}. Teresinha Silva e Márcia Nascimento, pelo auxílio nos experimentos e contribuições valiosas ao longo da construção desse trabalho.

À prof^a Kêsia Xisto, pelo conhecimento transmitido e orientações fundamentais no Estágio em docência.

À Carlos, colega de trabalho, pelo apoio sempre que se fez necessário o meu afastamento.

Aos colegas de turma, obrigada pelas horas de descontração.

Aos colegas de laboratório, funcionários e técnicos, pelo apoio nos momentos de necessidade.

Ao Departamento de Patologia da UFPE, pela oportunidade de realização desse mestrado e aos professores, pelas aulas ministradas.

Aos meus amigos que, de alguma forma, contribuíram para que eu superasse mais uma etapa da minha vida, me transmitindo confiança e alegria. Obrigada pelos momentos de distração.

Vocês foram essenciais na minha conquista!

*“Nunca subestime o conhecimento popular sobre plantas medicinais,
mas não repasse de
volta ao povo, sem antes saber se a atividade atribuída à planta
realmente existe e se seu grau de
toxicidade não irá submeter o usuário a riscos desnecessários...”*

Prof. Dr. Francisco José de Abreu Matos.

RESUMO

As plantas medicinais têm sido uma rica fonte para obtenção de moléculas a serem exploradas terapêuticamente. *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex. Hayne pertence à família Leguminosae, e é conhecida como jatobá do cerrado, amplamente distribuída nas áreas do cerrado. É utilizada na medicina popular para o tratamento de problemas respiratórios, gastrintestinais, genito-urinários e hepáticos. Apresenta ainda propriedade cicatrizante e antimicrobiana. Este trabalho objetiva um estudo químico, antimicrobiano e de citotoxicidade *in vitro* de extratos obtidos da casca do tronco dessa espécie botânica. Foi feito uma análise fitoquímica dos principais compostos encontrados nos vegetais; preparação dos extratos ciclohexano, acetato de etila e hidro-alcóolico da casca do tronco; avaliação da atividade antimicrobiana frente a bactérias de gênero *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella* e a levedura *Candida*, determinando a concentração inibitória mínima e ação antiproliferativa em células neoplásica humanas linhagem NCI-H292 e HEP-2 desses extratos. A avaliação fitoquímica demonstrou a presença de taninos hidrolisáveis, flavonóides e terpenos na casca de *H. stigonocarpa*. A quantidade de flavonóides e fenóis totais foram superior no extrato hidro-alcóolico (17,4 mg de ER/g de extrato e 17,69 mg de EAG/g) em relação ao extrato acetato de etila (6,36 mg de ER/g de extrato e 6,25 mg de EAG/g). A planta apresentou um baixo rendimento de extrato ciclohexano (1,73%) e acetato de etila (3,21%) em relação ao hidro-alcóolico (9,84%). Os três extratos utilizados na atividade antimicrobiana foram ativos contra os microrganismos utilizados. Os estafilococos se mostraram mais sensíveis (CIM entre 7,81 – 250 µg/mL) frente aos extratos testados. O extrato ciclohexano foi o único que apresentou atividade citotóxica em células das linhagens NCI-H292 e HEP-2, apresentando uma IC₅₀ de 21,27 e 8,90 µg/mL, respectivamente. Esses resultados sugerem que a *Hymenaea stigonocarpa* é uma espécie em potencial para a elaboração de fitoterápicos, principalmente como antimicrobiano e antitumoral.

Palavras-chave: Leguminosae, *Hymenaea stigonocarpa*, plantas medicinais, antimicrobianos, atividade antitumoral.

ABSTRACT

Medicinal plants have been a rich source for obtaining the molecules to be exploited therapeutically. *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex. Hayne belongs to the family Leguminosae, commonly known as Jatoba of “cerrado”, widely distributed in areas of cerrado. It is used in folk medicine for the respiratory, gastrointestinal, genito-urinary and liver treatment. It also provides healing and antimicrobial properties. This paper aims to chemical, antimicrobial and cytotoxicity study *in vitro* of extracts from the stem bark this specie. We carried out a phytochemical analysis of the main compounds found in vegetables, preparation of extracts cyclohexane, ethyl acetate and hydro-alcoholic trunk bark; evaluation of antimicrobial activity against bacteria *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella* genus and yeast *Candida*, determining the minimum inhibitory concentration and antiproliferative action this extracts against human neoplastic cell line NCI-H292 and HEP-2. The phytochemical showed the presence of hydrolysable tannins, flavonoids and terpenes in the bark of *H. stigonocarpa*. The amount of flavonoids and total phenolics were high in the hydro-alcoholic extract (17,4 mg ER/g of extract and 17,69 mg of EAG/g) in relation to the ethyl acetate extract (6,36 mg ER/g of extract and 6,25 mg of EAG/g). The plant had a low yield of cyclohexane extract (1.73) and ethyl acetate (3.21) compared to hydro-alcoholic (9.84%). The three extracts used in antimicrobial activity were active against the microorganisms used. Staphylococci were more sensitive (MIC between 7.81 to 250 µg / mL) compared to the extracts. The cyclohexane extract was the only one with cytotoxic activity in cell lines of NCI-H292 and HEP-2, with a IC₅₀ of 21,27 and 8,90 µg/mL, respectively. These results suggest the *Hymenaea stigonocarpa* is a species with potential for the development of herbal medicines, particularly as antimicrobial and antitumoral.

Keywords: Leguminosae, *Hymenaea stigonocarpa*, medicinal plants, antimicrobial, antitumoral activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1: Obtenção do extrato bruto etanólico. 50
- FIGURA 2: Partição líquido-líquido do extrato etanólico bruto para obtenção dos 50

extratos ciclohexano e acetato de etila de *H. stigonocarpa*.

FIGURA 3: Esquema para determinação da CIM dos extratos de *H. stigonocarpa*. 54

Artigo de revisão

Fig. 1: Estruturas dos dihidroflavonóis ramnosídeos isolados de *H. parvifolia*: 31

Astilbina (1) e a neoastilbina (2).

Fig. 2: Flavonóides isolados de *H. palustris*: Luteolina (3), crisoeriol (4) e palstatina (5). 31

Fig. 3: Estruturas dos clerodanos isolados de *H. courbaril*: Ácido (5*R*,8*S*,9*S*,10*R*)-cleroda- 32

3,13*E*-dien-15-oico (6) e ácido (5*S*,8*S*,9*S*,10*R*)-cleroda-3,13*E*-dien-15-oico (7).

Fig. 4: Sesquiterpenos: α -copaeno (8), α -cubebeno (9). 32

Fig. 5: Ácido (13*R*)-13-hidroxi-1(10),14-*ent*-halimadien-18-oico (10). 32

Fig. 6: Terpenóides: Ácido labdanólico (11) e espatulenol (12). 33

Fig. 7: Árvore de *H. stigonocarpa*. 34

Fig. 8: Frutos de *H. stigonocarpa*. 35

Fig. 9: Sementes de *H. stigonocarpa*. 35

Fig. 10: Folhas de *H. stigonocarpa*. 36

Fig. 11: Flor de *H. stigonocarpa*. 36

Fig. 12: Sesquiterpenos isolados das folhas de *H. stigonocarpa*: β -cariofileno (13) e 37
e γ -muroleno (14).

Fig. 13: Diterpenos isolados da resina extraída das sementes de *H. stigonocarpa*: 37

Labdano (15) e abietano (16).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Testes utilizados para identificar classes de compostos químicos presente 46
na casca do tronco de *H. stigonocarpa*.

Tabela 2: Origem e perfil de susceptibilidade dos microrganismos utilizados na 52
determinação da Concentração Inibitória Mínima.

Artigo de revisão

Tabela 1: Propriedades química e biológica de espécies do gênero <i>Hymenaea</i> .	30
--	----

Artigo original

Table 1 – Origin and profile of susceptibilidade of the micro-organisms used in the determination of the Minimal Inhibitory Concentration (MIC).	69
Table 2: Determination of the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) for the bark extracts obtained of the <i>Hymenaea stigonocarpa</i> .	70
Table 3: Determination of CI ₅₀ for the bark extracts of <i>Hymenaea stigonocarpa</i> at the NCI-H292 and HEP-2 cells.	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt – acetato de etila

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC- American Type Culture Collection

C₆ H₁₂ – ciclohexano

CHCL₃ – triclorometano

CI₅₀ - concentração que inibe 50% do crescimento celular em relação ao controle

CIM – concentração inibitória mínima

COX II – ciclo oxigenase II

DMEM - Minimum Essencial Medium Eagle modificado Dulbecco's

DMSO – dimetil sulfóxido

DO – densidade óptica

EAE – extrato acetato de etila

EAG – equivalente de ácido gálico

EC – extrato ciclohexano

EH – extrato hidro-alcóolico

ER – equivalente de rutina

EtOH – etanol

FT – fenóis totais

H₂O – água

H₂SO₄ – ácido sulfúrico

INCA – Instituto Nacional do Câncer

MeOH – metanol

MRSA – *S. aureus* meticilina resistente

MTT - brometo 3-[5,4-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

Na₂CO₃ – carbonato de sódio

NCI – National Câncer Institute

OMS – Organização Mundial de Saúde

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

TTC - cloridrato de 2,3,5 trifenil tetrazólio

UFC – unidade formadora de colônia

UV – ultravioleta

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Plantas medicinais	18
2.2 Fitoterapia	19
2.3 Antimicrobianos vegetais	21
2.4 Agentes antitumorais vegetais	23
2.5 Artigo de revisão	25
3 OBJETIVOS	43

3.1 Objetivo geral	43
3.2 Objetivos específicos	43
4 MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1 Material botânico	45
4.2 Estudo fitoquímico	45
<i>4.2.1 Análise fitoquímica da casca do tronco</i>	45
<i>4.2.2 Determinação da concentração de fenóis totais</i>	48
<i>4.2.3 Determinação da concentração de flavonóides</i>	49
4.3 Obtenção dos extratos	49
4.4 Padronizações dos extratos para atividade antimicrobiana	51
4.5 Determinação <i>in vitro</i> da atividade antimicrobiana	51
<i>4.5.1 Microrganismos</i>	51
<i>4.5.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)</i>	53
4.6 Citotoxicidade	54
<i>4.6.1 Células neoplásicas utilizadas</i>	54
<i>4.6.2 Atividade citotóxica</i>	55
4.7 Análise estatística	56
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1 Artigo original	58
6 CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
ANEXOS	85

Apresentação

1 APRESENTAÇÃO

O conhecimento da utilização de plantas com propriedades medicinais resulta de influências culturais e de uma seleção realizada ao longo de muitos anos. É baseado nas informações da medicina tradicional, que os cientistas se direcionam quanto à escolha da planta a ser estudada e aos seus efeitos terapêuticos, sendo o uso tradicional encarado como uma pré-triagem quanto à utilidade terapêutica (ELIZABETSKY, 2003).

As plantas medicinais possuem em sua composição, substâncias químicas biologicamente ativas, denominadas de compostos ou princípios ativos. São exemplos destes

compostos os terpenos, alcalóides, taninos, flavonóides, que ao serem administradas levam à cura ou abrandamento de doenças, tais como o câncer, doenças infecciosas, inflamatórias etc. A estes compostos foram atribuídas várias funções biológicas sobre os seres vivos, como antiinflamatório, antioxidante, antitumoral, antimicrobianos, analgésicos, hipoglicemiantes, etc.

Diante da grande diversidade de estruturas químicas encontradas nas plantas, observa-se na literatura um aumento nas pesquisas na área de produtos naturais, visando à descoberta de novas drogas, principalmente com ação antimicrobiana. Visto que, apesar das indústrias farmacêuticas terem produzido uma série de antibióticos nos últimos anos, o uso indiscriminado de antimicrobianos para tratamento de doenças infecciosas aumentou consideravelmente a resistência dos microrganismos patogênicos a vários destes, tornando-se um dos principais problemas na saúde pública (NASCIMENTO *et. al.*, 2000).

A redução da eficácia dos medicamentos antimicrobianos disponíveis tem exigido o uso de fármacos cada vez mais onerosos, inacessíveis à população de baixa renda, que buscam alívio dos seus sintomas em plantas medicinais. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) 80% da população dos países em desenvolvimento dependem da medicina tradicional para atender suas necessidades de atenção primária à saúde (BRASIL, 2007).

Outro problema de grande relevância na pesquisa em saúde é o câncer, uma das principais causas de morte em todo o mundo. Desde 2003, as neoplasias malignas constituem-se na segunda causa de morte na população brasileira. O contínuo crescimento populacional e o seu envelhecimento afetarão de forma significativa o impacto do câncer no mundo. Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), no Brasil, estima-se uma ocorrência de 489.270 casos novos de câncer para os anos de 2010 e 2011, sendo os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e do colo do útero no sexo feminino os mais incidentes (BRASIL, 2009).

Diante desses relatos, a investigação antimicrobiana e de citotoxicidade em células neoplásicas humanas, de compostos extraídos de plantas, pode ser uma fonte de inúmeros agentes terapêuticos e considerada uma importante ferramenta para a descoberta de novas moléculas biologicamente ativas. Dentre as plantas já estudadas nesse aspecto destacam-se as do gênero *Hymenaea*, pertencentes à família Leguminosae. Pesquisas confirmaram a atividade antibacteriana e inibição do crescimento de células leucêmicas linfóides, linhagem P388 de extratos de *Hymenaea palustris* (PETTIT *et. al.*, 2003). *Hymenaea courbaril* L. também apresentou atividade antimicrobiana (MARSAIOLI, 1975) e citotóxica em células tumorais humanas de ovário, linhagem A2780 (ABDEL-KADER *et. al.*, 2002). A *Hymenaea*

stigonocarpa apresentou atividade antibacteriana principalmente frente à *Staphylococcus aureus* (VALENTIM, 2006).

Com base nesses dados e na raridade dos trabalhos com *H. stigonocarpa*, o que nos incentivou a utilizá-la como alvo do presente trabalho, decidiu-se fazer um estudo fitoquímico e avaliar a ação antimicrobiana e antitumoral dos extratos dessa espécie botânica, podendo ser no futuro apresentados como produtos farmacêuticos, além de permitir um repasse do conhecimento científico para a população, garantindo segurança e eficácia no seu uso.

Revisão bibliográfica

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Plantas medicinais

A utilização de produtos naturais pelo homem é tão antiga quanto sua própria história, evoluindo com ele ao longo dos anos. O uso das plantas se dava tanto para fins nutricionais

como para fins terapêuticos, garantindo a manutenção da saúde humana. Essa utilização durante a história foi fundamental para que a produção de medicamentos desse os primeiros passos. Foi por meio de tentativas e erros que o homem primitivo adquiriu conhecimentos, determinando quais plantas poderiam ser utilizadas como alimentos, medicamentos e quais eram venenosas e perigosas (DAVID; DAVID, 2002).

As primeiras informações relativas à utilização empírica de plantas com fins terapêuticos são encontradas no Código de Hamurabi (2000 a.C.) e no Papiro de Ebers (1500 a.C.). Entretanto, a pesquisa visando ao isolamento de princípios ativos de vegetais só teve início no século XIX, quando o farmacêutico alemão Friedrich W. Setumer procurava no ópio (*Papaver somniferum*), a substância responsável por sua ação hipnótica, isolando a morfina (SIANI, 2003).

A partir do século XIX aprendeu-se então a reconhecer as indicações terapêuticas de uma planta em função de seus compostos químicos. Hoje, a terapêutica mostra que alguns medicamentos com ações específicas provêm dos produtos naturais (CALIXTO, 2003). É o caso do jaborandi (*Pilocarpus spp.*), onde é extraída das folhas a pilocarpina, substância ativa usada no tratamento do glaucoma (GUERRA; NODARI, 2004).

As plantas apresentam um metabolismo primário, onde originam substâncias essenciais para a manutenção de suas células, como os lipídios, as proteínas, os carboidratos e os ácidos nucleicos. As substâncias originadas a partir de rotas biossintéticas diversas, e que estão restritas a determinados grupos de organismos, são produtos do metabolismo secundário (VICKERY; VICKERY, 1981). Esses compostos secundários não são necessariamente essenciais ao organismo produtor, mas possuem funções ecológicas importantes para a sobrevivência e continuidade da planta em seu ecossistema (SANTOS, 2000). A sua produção está associada à resistência da planta contra pragas e doenças, na atração de polinizadores, na interação com microrganismos, entre outros, sendo o metabolismo secundário o responsável pelas relações entre a planta e o ambiente (VERPOORTE *et. al.*, 2000).

Alguns metabólitos secundários como os alcalóides, terpenóides, esteróides, flavonóides, entre outros, são utilizados comercialmente como fármacos. A aspirina, a atropina, a digoxina, a morfina, a quinina e a reserpina são alguns exemplos de fármacos que foram descobertos através do estudo de plantas medicinais (GILANI; RAHMAN, 2005).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece o termo “planta medicinal” como toda e qualquer planta que, quando aplicada sob determinada forma e por alguma via ao homem, é capaz de provocar um efeito farmacológico (OMS, 1978). Nesse contexto, o Brasil apresenta um potencial econômico inestimável no campo do desenvolvimento de novos

medicamentos, pois está entre os países que possuem a maior biodiversidade vegetal do mundo, com cerca de 20% do número total de espécies do planeta. (CALIXTO, 2003).

Visto a grande importância das plantas como fonte de produtos naturais biologicamente ativos, a maior dificuldade se encontra na busca da planta correta no meio de um grupo muito vasto. Daí a importância da medicina popular, pois direcionam os pesquisadores na escolha das plantas que serão estudadas (ELISABETSKY; SOUZA, 2004).

2.2 Fitoterapia

Fitoterápicos são medicamentos obtidos por processos tecnologicamente adequados, empregando-se exclusivamente matérias primas vegetais, como princípio ativo, com finalidade profilática, curativa ou paliativa. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, bem como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (BRASIL, 2000).

Alguns fármacos de importância terapêutica foram obtidos exclusivamente de matéria-prima vegetal. De *Artemisia annua*, por exemplo, foi isolado a artemisina, utilizado como antimalárico. Os cardiotônicos digoxina e digitoxina foram isolados de *Digitalis purpúrea*. A morfina, utilizada como analgésica foi isolada de *Papaver somniferum* (SIMÕES *et. al.*, 2004).

O emprego correto de plantas para fins terapêuticos requer o uso de plantas selecionadas por sua eficácia, segurança e cientificamente validadas como medicinais. Deve-se considerar que uma planta medicinal é um produto estranho ao organismo, podendo o resultado de sua biotransformação tornar-se potencialmente tóxico em longo prazo (PERON *et. al.*, 2008). Veiga Jr.; Pinto; Maciel, (2005) relatam alguns casos de toxicidade de plantas medicinais, como por exemplo, o Boldo (*Peumus boldo*), que contém o ascaridol entre os princípios ativos. Essa substância química pode provocar irritação renal após ingestões sucessivas e prolongadas. Sendo assim, o perfil fitoquímico preliminar de uma espécie vegetal é essencial para o direcionamento das pesquisas, na elaboração de novos fitoterápicos.

As indústrias farmacêuticas vêm investindo consideravelmente na inovação e desenvolvimento de novos medicamentos a partir de vegetais (CALIXTO, 2000a e b). Para isso, seguem as normas regulamentadas pela Resolução da Diretoria Colegiada - RDC 48/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que dispõe sobre o registro

de medicamentos fitoterápicos incluindo testes farmacológicos e toxicológicos pré-clínicos, entre outros, garantindo à população brasileira o acesso seguro e uso racional de plantas medicinais (BRASIL, 2004).

É importante ressaltar que não é intenção das indústrias farmacêuticas substituir, pelas plantas medicinais, os remédios eficientes existentes para o tratamento das várias doenças. Mas deve-se reconhecer que a fitoterapia tem vantagens inegáveis em relação aos medicamentos sintéticos, como largo uso terapêutico, baixa toxicidade, baixo custo, sem contar que o desenvolvimento de um fitomedicamento requer menos recursos e tempo de pesquisa (CALIXTO, 2003).

No Brasil, observa-se um retorno do interesse pelas plantas medicinais e utilização de fitoterápicos. Isso se deve aos avanços ocorridos na área científica que permitiram o desenvolvimento de fitoterápicos mais seguros e eficazes, assim como uma forte tendência de procura, pela população, por tratamentos menos agressivos ao organismo humano (YUNES; CECHINEL FILHO; PEDROSA, 2001). Um indício do retorno de fármacos derivados de fontes vegetais é a grande quantidade e progresso de pesquisas clínicas, especialmente nas áreas dos agentes anticancerígenos, que proporcionaram a descoberta do taxol, podofilotoxina e camptotecinas, e antimicrobianos, como o antimalárico artemisina (DAVID; DAVID, 2002).

Embora várias plantas sejam utilizadas com finalidades terapêuticas, a grande maioria não possui dados científicos que comprovem a sua eficácia e seu espectro toxicológico no homem (VEIGA Jr.; PINTO; MACIEL, 2005). Somente no Brasil, aproximadamente 60% da população não tem acesso ao medicamento convencional, utilizando as plantas como único recurso terapêutico (SILVA, 2006), então, há uma necessidade de se validar cientificamente o uso das mesmas, pois, muitas plantas são utilizadas na forma de extrato bruto, infusões ou emplastos no tratamento de infecções comuns, sem qualquer evidência científica (HOLETZ *et. al.*, 2002; COELHO DE SOUZA *et. al.*, 2004).

2.3 Antimicrobianos vegetais

Um problema mundial na área de saúde é o número crescente de microrganismos multirresistentes, uma consequência genética da atividade humana, devido ao uso abusivo e muitas vezes sem necessidade de antimicrobianos. As bactérias têm a habilidade genética de adquirir e transmitir aos seus descendentes essa resistência às drogas antimicrobianas (NETO *et. al.*, 2000).

Existem relatos de alguns casos que inspiram preocupação, como o crescimento da prevalência de *Streptococcus pneumoniae* resistente à penicilina, de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina, de *Enterococcus* resistente à vancomicina e de bacilos Gram-negativos produtores de beta-lactamases. Estes são exemplos do crescente problema da resistência antimicrobiana documentado pelos sistemas de vigilância nacionais e internacionais (MIRANDA *et. al.*, 2006).

Segundo a OMS, o uso racional de antimicrobianos pode ser definido como aquele que maximiza os efeitos terapêuticos clínicos, enquanto minimiza tanto a toxicidade relacionada aos medicamentos quanto o desenvolvimento da resistência antimicrobiana. É a prescrição de um antimicrobiano benéfico para o paciente, dirigido ao microrganismo, com dose e tempo de duração do tratamento adequado. Deve obedecer aos mesmos princípios utilizados para os demais medicamentos, que buscam uma maior eficácia aliada a menor toxicidade (MEDEIROS; WEY, 2005).

A infecção, de forma geral, é uma das mais importantes desordens de saúde que acometem a humanidade e uma das maiores preocupações nos hospitais, devido ao número crescente de casos de infecções hospitalares, que muitas vezes leva o paciente a óbito. Segundo Tavares (2000), no Brasil, tanto o *Staphylococcus aureus* como o *Staphylococcus epidermidis* mostram-se resistentes à penicilina G, ampicilina e amoxicilina, não sendo mais indicado o uso desses antimicrobianos para o tratamento de infecções estafilocócicas.

Essa situação tem forçado os cientistas à busca de novas drogas antimicrobianas e os vegetais são uma excelente fonte dessa busca, tendo em vista a diversidade molecular dos produtos naturais. Das 252 drogas consideradas básicas e essenciais pela OMS, 11% são exclusivamente originadas de plantas, enquanto outras são drogas sintéticas obtidas de precursores naturais (RATES, 2001).

As drogas antimicrobianas devem ter mecanismos de ação específicos, que atuem somente nas células-alvo, quer seja inibindo a síntese da parede celular, destruindo a membrana citoplasmática, inibindo a síntese de proteínas ou agindo como antimetabólitos (MURRAY, 2002).

Dentre as doenças infecciosas mais constantes na rede de saúde encontram-se as dermatoses. Antimicrobianos tópicos são usados em tratamentos de infecções superficiais como, por exemplo, acne, onde estão presentes a *Propionibacterium acnes*, a piodermite, causada pela proliferação de *Staphylococcus aureus*, celulite e erisipela, cujos agentes causais mais comuns em adultos são *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus aureus* (WANNMACHER, 2006).

No que diz respeito à avaliação da atividade antimicrobiana de extratos brutos de plantas medicinais, vários estudos têm sido realizados a partir de levantamentos etnofarmacológicos. Dentre os compostos químicos encontrados nas plantas que apresentam ação antimicrobiana estão os taninos e terpenos. Os taninos possuem três propriedades que podem ser responsáveis pelo mecanismo de ação sobre bactérias e fungos: inibição de enzimas dos microrganismos e/ou ligação com o substrato dessa enzima, habilidade de formar complexo com outras moléculas resultando em sua ligação com a membrana celular modificando seu metabolismo e pela complexação dos taninos com íons metálicos, diminuindo a disponibilidade desses íons que são essenciais ao metabolismo dos microrganismos (LOQUERCIO *et. al.*, 2005). Os mecanismos de ação dos terpenos não estão totalmente elucidados, mas acredita-se envolver ruptura de membrana dos compostos lipofílicos (SAMY; GOPALAKRISHNAKONE, 2008).

Assim, a utilização de extratos vegetais de conhecida atividade antimicrobiana pode ter um grande significado na terapêutica das doenças infecciosas, pois poderá minimizar o problema da resistência bacteriana aos fármacos sintéticos, sendo uma alternativa de cura.

Está comprovado que muitas espécies vegetais têm sido utilizadas por suas características antimicrobianas. Estudos com vegetais superiores foram e continuam sendo desenvolvidos para comprovar sua eficácia farmacológica (VENDRUSCOLO; RATES; MENTZ, 2005).

2.4 Agentes antitumorais vegetais

O câncer está entre as três primeiras causas de morte em todo o mundo. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), as estimativas é que ocorrerão 489.270 casos novos de câncer para os anos de 2010 e 2011, somente no Brasil (BRASIL, 2009).

O câncer é uma doença caracterizada pela multiplicação e propagação descontrolada no organismo, de formas anômalas das próprias células. Uma célula normal transforma-se em

células cancerosas em decorrência de uma ou mais mutações no seu DNA, as quais podem ser congênitas ou adquiridas (RANG; DALE; RITTER, 2007). Essas células apresentam características próprias como proliferação descontrolada, perda de diferenciação e da função, poder de invasão e metástase (GOODMAN; GILMAN, 2003). O crescimento do tumor maligno ocorre quando há um desequilíbrio entre a capacidade de proliferação de suas células e a reação do organismo para detê-las.

A incidência, a distribuição geográfica e o comportamento de tipos específicos de cânceres estão relacionados com múltiplos fatores, incluindo sexo, idade, raça, predisposição genética e exposição à carcinógenos ambientais (BRASIL, 2002). Os agentes ambientais possuem um papel mais proeminente na etiologia das mutações devido à introdução indiscriminada de novos produtos químicos sintéticos (BOFFETTA; FREDRICK, 2003).

O câncer é, em grande parte, uma doença que afeta os grupos etários mais avançados, o que pode ser atribuído aos inúmeros progressos na saúde pública e na ciência médica que aumentaram consideravelmente a expectativa de vida da população, e conseqüentemente um maior número de pessoas pode atingir a idade em que ficam propensas a desenvolver câncer (RANG; DALE; RITTER, 2007).

Existem três abordagens principais para o tratamento de câncer: excisão cirúrgica, radioterapia e quimioterapia. A conveniência de cada um irá depender do tipo de tumor e do estágio de desenvolvimento (GOODMAN; HARDMAN; LIMBIRD, 2006). Muitos tumores caracterizam - se pelo desenvolvimento precoce de micrometástases e a quimioterapia torna-se a terapia de escolha devido à necessidade de uma abordagem terapêutica sistêmica, sendo considerada como o mais eficaz método de tratamento do câncer (ENGERS; GABBERT, 2000; AJITH; JANARDHANAN, 2003).

Alguns fármacos utilizados atualmente para o tratamento de câncer são originados de produtos naturais ou resultam de modificações químicas estruturais em suas moléculas. O diterpeno taxol, por exemplo, comercializado como Paclitaxel pela Bristol-Myers é isolado da casca do tronco de *Taxus brevifolia* L. Esse medicamento é utilizado no tratamento do câncer de ovário, mama e Sarcoma de Kaposi. Age ligando-se à tubulina favorecendo sua polimerização em microtúbulos, e em seguida, inibe a despolimerização dos microtúbulos em tubulina, impedindo o desaparecimento do fuso ao fim da divisão celular (SIMÕES *et al.*, 2004).

Outro exemplo é a podofilotoxina, utilizada no tratamento de condilomas humanos. Foi isolada da resina do rizoma de *Podophyllum peltatum* L. e *Podophyllum hexandrum* Royle e age inibindo a polimerização da tubulina em microtúbulos bloqueando a divisão

celular no início da metáfase. O etoposídeo, derivado semi-sintético da podofilotoxina, é utilizado no tratamento de câncer de brônquios e em tumores embrionários de testículos, agindo a nível do DNA inibindo as topoisomerasas II impedindo a replicação (SIMÕES *et al.*, 2004).

Os alcalóides da vinca, vimblastina e vincristina, e seus derivados, como a vinorelbina, foram isolados das folhas de *Catharanthus roseus* e são utilizados no tratamento do linfoma de Hodgkin, leucemias e câncer de pulmão, respectivamente. Assim como a podofilotoxina, os alcalóides da vinca agem por ligação específica com a tubulina inibindo sua polimerização (SIMÕES *et al.*, 2004).

Antes de serem lançados no mercado farmacêutico, os novos produtos devem ser obrigatoriamente analisados quanto a sua eficácia e toxicidade. A cultura *in vitro* de células humanas neoplásicas cultivadas de modo contínuo, utilizando meios artificiais, é o método mais utilizado laboratorialmente para se fazer uma triagem de drogas antitumorais, pois permite o estudo do comportamento celular em meio controlado, livre de complexas interações do organismo (FRESHNEY, 2000).

Recentes trabalhos têm investigado as atividades antitumorais de substâncias naturais oriundas de plantas visando à busca de novas drogas que tenham baixa toxicidade e, conseqüentemente, causem o mínimo de efeitos colaterais (ALVES *et. al.*, 2004; KIDD, 2000; SUFFREDINI, 2002). A grande diversidade de metabólitos secundários encontrados nos vegetais somados aos efeitos colaterais indesejáveis dos tratamentos utilizados nas neoplasias, como os radioterápicos e quimioterápicos têm estimulado à pesquisa de plantas medicinais como alternativa terapêutica, com resultados bastante satisfatórios (RATNER; BRYANT, 2004).

2.5 Artigo de revisão

***Hymenaea stigonocarpa*: Uma revisão botânica, química e etnofarmacológica.**

Carla Michella Leal Soares¹, Carlos Roberto Weber Sobrinho², Claudia de Albuquerque Maranhão³,
Márcia Silva do Nascimento⁴ & Eulália Azevedo Ximenes⁵.

1. Aluna do Mestrado em Patologia, Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos, Departamento de Antibióticos/UFPE, CEP:50740-900, Recife/ PE– Brasil.
2. Aluno do Mestrado em Patologia, Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos, Departamento de Antibióticos/UFPE, CEP:50740-900, Recife/ PE– Brasil.
3. Aluna do Doutorado do Departamento de Química Fundamental/ UFPE, CEP:50740-900, Recife/ PE– Brasil.
4. Professora do Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Antibióticos/UFPE, CEP:50740-900, Recife/ PE– Brasil.
5. Pesquisadora do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos, Departamento de Antibióticos/UFPE, CEP:50740-900, Recife/ PE– Brasil.

Autor correspondente: Carla Michella Leal Soares.

E-mail: clealsoares@yahoo.com.br

RESUMO

Hymenaea stigonocarpa Mart. Ex. Hayne pertence à família Leguminosae, e é conhecida como jatobá do cerrado. É amplamente distribuída nas áreas do cerrado e cerradão e utilizada na medicina popular para o tratamento de doenças respiratórias, gastrintestinais, ginecológicas urinárias e hepáticas. Apresenta ainda propriedades cicatrizante e antimicrobiana. Com base

Soares, C.M.L. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica...

em estudos etnofarmacológicos, este trabalho teve por objetivo realizar uma revisão bibliográfica das características botânica, química e biológica desta espécie vegetal, contribuindo para o conhecimento do potencial medicinal desta planta.

Palavras-chave: *Hymenaea stigonocarpa*, plantas medicinais, revisão bibliográfica.

Hymenaea stigonocarpa: A botanical, chemistry and ethnopharmacological review.

ABSTRACT

Hymenaea stigonocarpa Mart. ex. Hayne belongs to the family Leguminosae, commonly known as “Jatobá do cerrado”. It is widely distributed in cerrado and “cerradão” areas, and it is used in folk medicine for the treatment of respiratory, gastrointestinal, gynecological, urinary and liver diseases. It also provides healing and antimicrobial properties. Based on ethno pharmacological studies, this study aimed to provide a botanical, chemical and biological review of this plant species contributing to the knowledge on the plant potential as phytotherapeutic medicine.

Keywords: *Hymenaea stigonocarpa*, medicinal plants, review.

INTRODUÇÃO

A utilização de produtos naturais pelo homem é tão antiga quanto sua própria história. Essa utilização ao longo dos anos foi fundamental para o estudo, a obtenção e a produção de medicamentos. Uma vez que as plantas são fontes de produtos biologicamente ativos, o

Brasil, que possui uma das maiores biodiversidades do mundo, apresenta um potencial econômico inestimável no campo do desenvolvimento de novos medicamentos (SIMÕES *et al.*, 2004).

Nas plantas são encontradas inúmeros compostos químicos com propriedades físico-químicas e biológicas distintas. Esta diversidade química se traduz em dificuldade na escolha da planta correta para uma pesquisa. Daí a importância da etnofarmacologia, pois esta direciona os pesquisadores a escolherem as plantas com grande potencial farmacológico visto que a maioria dos compostos naturais puros empregados hoje na indústria farmacêutica foi isolada seguindo recomendações da medicina popular (SIMÕES *et al.*, 2004).

O gênero *Hymenaea* compreende espécies conhecidas como “madeiras de lei”, possuidoras de grande resistência física, o que impede o ataque de fungos e insetos. *Hymenaea stigonocarpa*, conhecida popularmente como jatobá-do-cerrado, tem importância econômica, pois sua resina é utilizada nas indústrias de vernizes, sua madeira na construção civil, seus frutos apresentam um alto valor nutricional, além de ser utilizada como planta medicinal pela população (ALMEIDA *et al.*, 1998).

Com base neste relato, o presente trabalho apresenta uma revisão das atuais publicações científicas sobre as características botânicas e propriedades químicas e etnofarmacológicas de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex. Hayne com o objetivo de contribuir para o conhecimento e potencial terapêutico dessa planta.

DESENVOLVIMENTO

Família Leguminosae

A família Leguminosae compreende 650 gêneros e mais de 18 mil espécies mundialmente distribuídas (POLHILL & RAVEN, 1981), representando uma das maiores famílias de angiospermas, superada apenas em número de espécies pelas famílias *Orchidaceae* e *Asteraceae* (JOLY, 1998). Esta família é uma das mais ricas na flora brasileira, encontrando-se representada nas várias formações fitogeográficas do país (RIZZINI, 1971). No bioma cerrado é a família que comporta o maior número de espécies e a primeira entre as mais importantes em termos de números de espécies lenhosas, arbustos e árvores (SILVA *et al.*, 2001).

A família Leguminosae se subdivide em três subfamílias: *Mimosaceae*, que compreende cerca de 60 gêneros e 3000 espécies, sendo a menor dentre as leguminosas;

Caesalpinaceae, com cerca de 152 gêneros e 2800 espécies; *Fabaceae*, maior subfamília das leguminosas, com aproximadamente 482 gêneros e 12000 espécies (JOLY, 1998; BARROSO *et al.* 2002).

As plantas leguminosas apresentam um grande potencial na conservação de solos, pois juntamente com a microbiota do solo fixam o nitrogênio atmosférico, através do processo de nodulação em suas raízes (POLHILL & RAVEN, 1981). Além disso, as leguminosas têm um potencial econômico muito grande, pois são fornecedores de alimentos através de seus frutos, medicamentos ou substâncias medicinais, pesticidas, combustíveis e produtos utilizados nas indústrias (SCHWANTES & WEBERLING, 1981).

Gênero *Hymenaea*

O gênero *Hymenaea* (*Caesalpinoideae*) é conhecida popularmente como jatobá, jataí ou jataí. Possui 14 espécies, 13 das quais se encontram distribuídas pela América Central, América do Sul, oeste da Índia e uma espécie de ocorrência no leste da África (LEE & LANGENHEIM, 1975). Segundo Rizzini (1971), as espécies pertencentes a este gênero são fornecedores de boa madeira, frutos comestíveis e cascas taníferas.

Houve controvérsias quanto à taxonomia, devido a denominações diferentes: *Hymenaea* e *Trachylobium*. No entanto, Lee; Langenheim (1975) realizaram uma pesquisa comparando detalhadamente a morfologia, citologia e a química da resina de exemplares catalogados nestes dois gêneros e optaram pela denominação taxonômica *Hymenaea*.

Todas as espécies deste gênero têm hábito arbóreo, que vão desde árvores com 3 metros de altura como *H. stigonocarpa*, até representantes com mais de 40 metros vegetando em mata atlântica como *H. courbaril*. Ocorrem em uma diversidade de habitats, variando desde a mata equatorial como *H. courbaril*, *H. parvifolia* e *H. stigonocarpa* no cerrado e na caatinga, *H. eriogyne* (LEE & LANGENHEIM, 1975).

As espécies do gênero *Hymenaea* são conhecidas pela produção de resinas extraídas do tronco. Esta resina é conhecida como jataicaica ou copal da América e aproveitada industrialmente na fabricação de vernizes utilizados em marcenaria e na medicina. O licor de jatobá, como é chamado, é utilizado em infecções pulmonares e infecções urinárias (ALMEIDA *et al.* 1998).

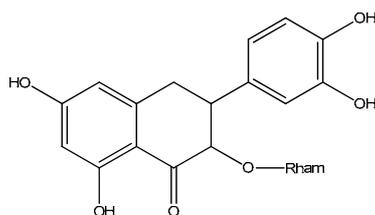
Nas espécies do gênero *Hymenaea*, conhecidas como jatobá, os terpenos e flavonóides são predominantes (Tabela 1) (ISHIBASHI *et al.*, 1999; PETTIT *et al.*, 2003). Diante da grande variedade de compostos químicos com propriedades medicinais presentes no gênero *Hymenaea* algumas espécies deste gênero são alvo de muitas pesquisas.

Tabela 1: Propriedades química e biológica de espécies do gênero *Hymenaea*.

Espécie	Parte da planta	Composto químico	Atividade biológica	Referência
<i>H. parvifolia</i>	casca	flavonóides: astilbina neoastilbina	inibição de caseína kinase II (CK II).	ISHIBASHI <i>et al.</i> , 1999.
<i>H. palustris</i>	folhas	flavonóides: luteolina crisoeriol palstatina	antibacteriana; citotóxica (células leucêmicas linfóides - P388)	PETTIT <i>et al.</i> , 2003.
<i>H. courbaril</i>	frutos	terpenos: ácido labdanólico espatulenol	inibição da enzima cicloxigenase II (COX II);	JAYAPRAKASAM <i>et al.</i> , 2007.
	casca	clerodanos	antibacteriana;	NOGUEIRA <i>et al.</i> , 2001.
	folhas e casca	halimadieno	citotoxicidade (células tumorais humanas de ovário - A2780).	ABDEL-KADER <i>et al.</i> , 2002.

Nas várias espécies de *Hymenaea* é comum a presença de diterpenóides com esqueletos do tipo labdano, abietano e pimarano (FARIAS *et al.*, 2004).

Ishibashi *et al.*, (1999), isolaram da casca do tronco de *Hymenaea parvifolia* dihidroflavonoides α , β ramnosídeos, astilbina (**1**) e a neoastilbina (**2**) (Fig.1), ambos com atividade biológica direcionada a inibição da caseína kinase (CK II).



$2\alpha - H, 3\beta - H$ (2S, 3S) **1**

$2\beta - H, 3\alpha - H$ (2R, 3R) **2**

Fig. 1: Estruturas dos dihidroflavonóis ramnosídeos isolados de *H. parvifolia*:
Astilbina (1) e a neoastilbina (2)

Das folhas de *Hymenaea palustris* foram isolados os flavonóides luteolina (3), crisoeriol (4) e palstatina (5) (Fig. 2). Esses compostos inibiram o crescimento de *Neisseria gonorrhoeae* em concentrações que variaram de 0,5 -1,0 µg/mL e de 16 – 32 µg/mL para palstatina e luteolina respectivamente. Luteolina mostrou-se ativa também frente à *Enterococcus faecalis* cuja CIM foi de 64 µg/mL. A palstatina apresentou atividade citotóxica sobre células leucêmicas linfóides de ratos da linhagem P388 (PETTIT *et al.*, 2003).

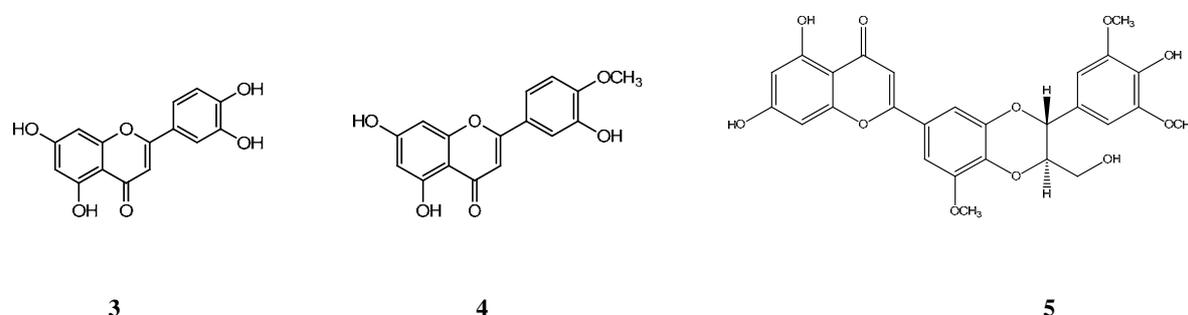
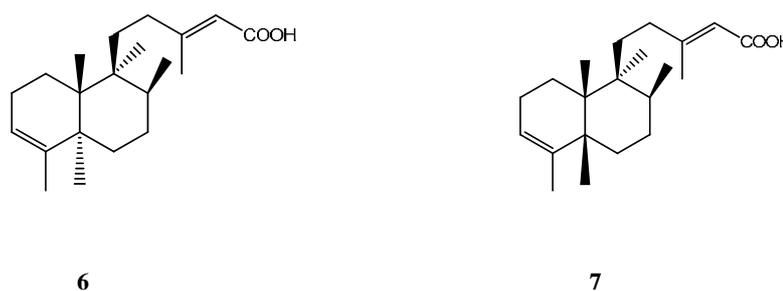


Fig. 2: Flavonóides isolados de *H. palustris*: Luteolina (3), crisoeriol (4) e palstatina (5).

Hymenaea courbaril L. é a espécie mais estudada até o momento. Das suas sementes foram isolados diterpenos, dentre os quais dois novos clerodanos: ácido (5*R*,8*S*,9*S*,10*R*)-cleroda-3,13*E*-dien-15-oico (6) e ácido (5*S*,8*S*,9*S*,10*R*)-cleroda-3,13*E*-dien-15-oico (7) (Fig. 3). Esta espécie é conhecida por sua atividade antibacteriana, apresentando ação contra *Proteus mirabilis* e *Staphylococcus aureus* (NOGUEIRA *et al.*, 2001).



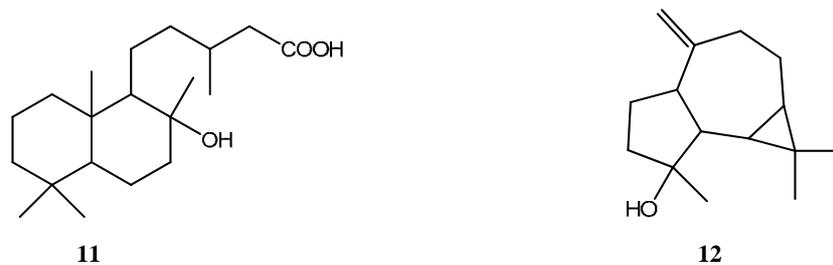


Fig. 6: Terpenóides: Ácido labdanólico (11) e espatulenol (12).

Hymenaea stigonocarpa

A subfamília *Caesalpinaceae* possui como um dos representantes, *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne, conhecida popularmente como jatobá-do-cerrado. Trata-se de uma espécie decídua, que ocorre em áreas de Cerrado e Cerradão (ALMEIDA *et al.*, 1998). Segundo Barroso (1991), *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne tem a seguinte classificação: REINO: Plantae; DIVISÃO (FITO): Magnoliophyta; CLASSE: Magnoliopsida; ORDEM: Fabales; FAMÍLIA: Fabaceae (Leguminosae); SUB-FAMÍLIA: Caesalpinaceae; GÊNERO: *Hymenaea*; ESPÉCIE: *stigonocarpa*.

H. stigonocarpa é uma espécie com grande potencial econômico. A madeira do jatobá é considerada “madeira de lei”, por ser de excelente qualidade, muito dura e resistente, cuja densidade é 0,90 g/cm³. Ela é utilizada na construção civil e naval (ALMEIDA *et al.*, 1998). (ALMEIDA *et al.*, 1998). O jatobá é considerado uma árvore ornamental, comumente empregado na arborização urbana e também na recuperação de áreas desmatadas.

A polpa dos frutos é farinácea, bastante apreciada pela população “in natura” ou na forma de geléia, licor, bolos, pães e mingaus. O fruto jatobá do cerrado possui elevado teor de fibra alimentar, aproximadamente 49g/100g, sendo a maioria composta por fibras insolúveis (SILVA; SILVA & CHANG, 1998). Sabe-se que o consumo de fibras alimentares está associado a resultados benéficos para o organismo humano, pois, os efeitos fisiológicos deste nutriente são responsáveis por alterar as funções gastrintestinais, pelo aumento da massa fecal, alteração na sensação de saciedade e redução dos níveis de colesterol (LÓPEZ *et al.*, 1997).

1.1. Botânica da *H. stigonocarpa*

A denominação *Hymenaea* deriva do grego (hymen), deus do matrimônio, e faz alusão aos dois folíolos pareados das folhas (CARVALHO, 2007).

É uma planta perenifólia, ou seja, não perde totalmente as folhas durante o ano. Cresce bem a pleno sol ou a meia sombra, com preferência por solos bem drenados. Floresce no período de outubro a abril e fornece frutos de abril a julho (ALMEIDA *et al.*, 1998).

As árvores (Fig. 7) têm uma altura que varia de 3 a 10 metros e o diâmetro do tronco pode atingir até 50 cm. A casca do tronco tem uma espessura que varia de 2 a 3 cm, é sulcada e de cor pardo-avermelhada (LEE & LANGENHEIM, 1975).



Fig.7: Árvore de *Hymenaea stigonocarpa*.

Fotos: Fernando Tatagiba (<http://www.biologo.com.br/plantas/cerrado/jatoba.html>).

O fruto (Fig. 8) é um legume seco, indeiscente, alongado, que medem entre 6 e 18cm de comprimento e diâmetro entre 3 a 6cm (RIZZINI, 1971). Eles são em forma de vagens arredondadas, de cor escura, castanho-avermelhados. Possuem epicarpo verrucoso e brilhante, mesocarpo e endocarpo creme. Possuem poucas sementes, de coloração castanho-avermelhadas. Os frutos são comestíveis e muito apreciados pelas populações rurais como recurso alimentar e medicinal (ALMEIDA *et al.*, 1998). A textura do fruto é rugosa devido à presença de pontuações, pequenas, salientes e arredondadas (CARVALHO, 2007).



Fig. 8: Frutos de *H. stigonocarpa*.

Fotos: Fernando Tatagiba (<http://www.biologo.com.br/plantas/cerrado/jatoba.html>).

A semente é globosa (Fig.9), com ápice arredondado ou levemente truncado e base arredondada ou afinada. Medem de 17,8 mm a 28,4 mm de comprimento e 9,3 mm a 19,7 mm de espessura. Envolvendo as sementes, há o arilo, amarelo-esverdeado, macio, fibroso-farináceo, com cheiro característico e sabor doce, constituindo a polpa (CARVALHO, 2007).



Fig. 9: Sementes de *H. stigonocarpa*.

Fotos: Fernando Tatagiba (<http://www.biologo.com.br/plantas/cerrado/jatoba.html>).

As folhas (Fig. 10) são alternadas, bifolioladas, pecioladas, com estípulas caducas. Os folíolos são curto-peciolulados e subsésseis. Possui limbo com 6 a 23,5 cm de comprimento e 3,5 a 7 cm de largura, elíptico, de pergaminoso a coriáceo, freqüentemente com pontuações translúcidas (CARVALHO, 2007). O ápice é obtuso, arredondado ou abruptamente acuminado. Apresenta base desigual e arredondada. Possui nervação de plana a levemente elevada na face ventral, nervura mediana às vezes sulcada na face ventral.



Fig. 10: Folhas de *H. stigonocarpa*.

Fotos: Fernando Tatagiba (<http://www.biologo.com.br/plantas/cerrado/jatoba.html>).

Apresenta inflorescência terminal com flores de coloração branca (Fig.11). Estas flores têm de 2 a 3,5 cm de comprimento, com cinco pétalas ovais, sépalas ovais e elípticas, corola alva, ovais, cerca de dez estames livres, filetes longos, anteras rimosas e naviculares. Apresenta ovário súpero, unilocular, estipitado, com poucos óvulos parietais, provido de disco nectarífero.



Fig. 11: Flor de *H. stigonocarpa*.

Fotos: Fernando Tatagiba (<http://www.biologo.com.br/plantas/cerrado/jatoba.html>).

1.2. Química de *H. stigonocarpa*

Langenheim *et al.*, (1986) identificaram os sesquiterpenos β -cariofileno (**13**) e γ -muroleno (**14**) (Fig. 12) das folhas de *H. stigonocarpa*. Enquanto que Farias *et al.*, (2004) isolaram da

resina extraída das sementes desta espécie diterpenos do tipo labdano (**15**) e abietano (**16**) (Fig.13).



Fig. 12: Sesquiterpenos isolados das folhas de *H. stigonocarpa*: β -cariofileno (**13**) e γ -muroлено (**14**).

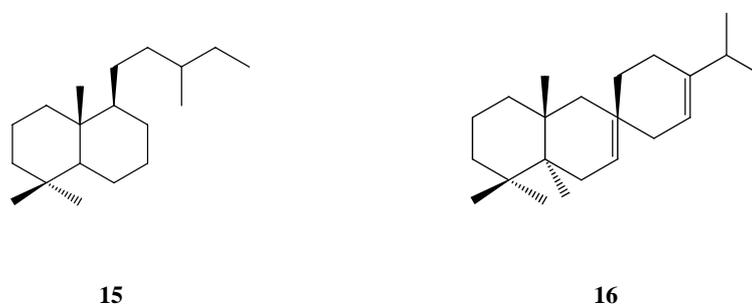


Fig. 13: Diterpenos isolados da resina extraída das sementes de *H. stigonocarpa*: Labdano (**15**) e abietano (**16**).

Valentim (2006), ao estudar o alburno de *H. stigonocarpa* observou a presença de flavonóides, terpenos e esteróides, não sendo detectado a presença de taninos. A autora identificou o ácido oléico, palmítico, esteárico, N-N-dietil-decanamida e o palmitato de metila do extrato em ciclohexano. Um dos compostos isolados, o ácido palmítico, foi responsável pela atividade antibacteriana em espécies pertencentes à família *Cruciferae* (HASHIM & SALEH, 1999).

Além dos extratos ciclohexânico, os extratos etanólico e acetato de etila mostraram-se ativos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Esta atividade foi maior frente à *Staphylococcus aureus*, o qual foi inibido por uma concentração equivalente a 32 mg/mL para o extrato acetato de etila, 64 e 128 mg/mL para o extrato etanólico e ciclohexano respectivamente.

A presença na casca do tronco de *H. stigonocarpa* de terpenos e compostos fenólicos confere a esta espécie atividade antimicrobiana, moluscicida, as quais são conhecidas popularmente e validadas cientificamente (LORENZI & MATOS, 2002).

1.3. Etnofarmacologia

A utilização popular do jatobá do cerrado é registrada na literatura para tratar problemas respiratórios, gastrintestinais, genito-urinários, hepáticos, além de ter propriedades vermífuga, cicatrizante e antipirética (VILA VERDE *et al.*, 2003; MACIEL & NETO, 2006; NETO, 2006).

A resina do tronco de *H. stigonocarpa* é utilizada pela população no tratamento de cistite e problemas respiratórios (ALMEIDA *et al.*, 1998). Segundo Martins (1989), na Amazônia, os nativos costumam retirar a seiva dessa árvore e bebê-la para tratar as afecções pulmonares. A resina pode ser aplicada em forma de emplastro sobre as partes doloridas do corpo. Emprega-se a resina aquecida, externamente, como expectorante. Esta é ainda usada como vermífugo e, quando posta de molho, alivia dores de estômago, peito e costas (LEONARDI, 2002). Com a casca do tronco, pode ser feito um decocto que serve para lavagens vaginais e de ferimentos (MARTINS, 1989).

O chá da casca é eficaz para infecções da próstata e combate a febre. O chá da entrecasca é empregado para problemas de rins, fígado, infecção intestinal e como cicatrizante (LEONARDI, 2002).

CONCLUSÃO

A obtenção dos registros farmacobotânicos, químicos e biológicos de *H. stigonocarpa* teve como premissa os relatos etnofarmacológicos da família Leguminosae. Estudos químicos de *Hymenaea stigonocarpa* demonstram a presença de metabólitos secundários com conhecida atividade biológica como flavonóides, terpenos e esteróides presentes no alburno, sesquiterpenos das folhas e diterpenos da resina extraída das sementes desta espécie. Quanto à atividade farmacológica, a espécie é utilizada na medicina tradicional no tratamento de problemas respiratórios, gastrintestinais, genito-urinários, hepáticos, além de ter propriedades vermífuga, cicatrizante e antipirética.

Apesar de ser uma planta com características farmacológicas promissoras, *H. stigonocarpa* necessita de estudos aprofundados e direcionados quanto à relação da estrutura química de seus compostos ativos e sua atividade biológica, bem como do mecanismo de ação

destes compostos que fundamentem cientificamente a sua utilização tradicional e promovam a veiculação de um novo medicamento.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Pernambuco, através do Departamento de Antibióticos; ao Programa de Pós Graduação em Patologia da UFPE, pela oportunidade da realização do Mestrado; a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro na realização da pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-KADER, M.; BERGER, J.M.; SLEBODNICK, C.; HOCH, J.; MELONE, S.; WISSE, J.H.; WERKHOVEN, M.C.M.; MAMBER, S.; KINGSTON, D.G.I. **Isolation and absolute configuration of ent-halimane diterpenoids from *Hymenaea courbaril* from the Suriname rain forest.** *J. Nat. Prod.* 65(1): 11-15, 2002.

ALMEIDA, S.P.; PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M. RIBEIRO, J.F. **Cerrado: espécies vegetais úteis.** Planaltina: EMBRAPA - CPAC, Planaltina, 1998. 464p.

BARROSO, G.M. **Sistemática de angiospermas do Brasil.** Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, v.2, 1991.

BARROSO, G.M.; PEIXOTO, A.L. & COSTA, C.G. **Sistemática de angiospermas do Brasil.** Viçosa: UFV, 2002.

CARVALHO, P.E.R. **Jatobá-do-cerrado – *Hymenaea stigonocarpa*.** 1ª ed. Colombo, PR: Circular técnica 133, EMBRAPA, 2007.

FARIAS, D.I.A.; EDWARDS, H.G.M. & AFONSO, M.C. **Raman spectroscopic analysis of a tembetá: a resin archaeological artefact in need of conservation.** *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biom. Spectrosc.*, 60 (7): 1505-1513, 2004.

HASHEM, F.A. & SALEH, M.M. **Antimicrobial components of some *Cruciferae* plants (*Diplotaxis harra* Foresk and *Erucaria microcarpa* Bioss).** *Phytother. Res.*, (13): 329–332, 1999.

ISHIBASHI, M.; ODA, H.; MITAMURA, M. OKUYAMA, E.; KOMIYAMA, K.; KAWAGUCHI, H.; WATANABE, T.; ALVES, S.M. MAEKAWA, T.; OHTSUK, K. **Casein Kinase II Inhibitors isolated from two Brazilian plants *Hymenaea parvifolia* and *Wulffia baccata*.** *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, (9): 2157-2160, 1999.

- JAYAPRAKASAM, B.; ALEXANDER-LINDO, R.L.; DEWITT, D.L. MURALEEDHARAN, N.G. **Terpenoids from Stinking toe (*Hymenae courbaril*) fruits with cyclooxygenase and lipid peroxidation inhibitory activities.** *Food. Chem.*, 2007.
- JOLY, A.B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal.** 12^a ed., São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1998. p.371-380.
- LANGENHEIM, J.H.; CONVIS, C.L.; MACEDO, C.A. STUBBLEBINE, W.H. ***Hymenaea* and *Copaifera* leaf sesquiterpenes in relation to lepidopteran herbivory in southeastern Brazil.** *Biochem. Syst. Ecol.*, 14 (1): 41-49, 1986.
- LEE, Y.T. & LANGENHEIM, J.H. **Systematics of the genus *Hymenaea* L.** *Chem. California Press*, (1):69, 1975.
- LEONARDI, C. R. **Etnofitoterapia regional utilizada pela população de Paranaíta, MT.** 2008. (Monografia de Conclusão de Curso) UEMG - Campus Universitário de Alta Floresta, Alta Floresta, MT.
- LÓPEZ, G.; ROS, G.; RINCÓN, F. PERIAG, M.J.; MARTINEZ, C.; ORTUNO, J. **Propiedades funcionales de la fibra dietética. Mecanismos de acción en el tracto gastrointestinal.** *Arch. Latinoamer. Nutric.*, 47 (3): 203- 207, 1997.
- LORENZI, H. & MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.** Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2002, 512p.
- MACIEL, M.R.A. & NETO, G.G. **Um olhar sobre as benzedadeiras de Juruena (Mato Grosso, Brasil) e as plantas usadas para benzer e curar.** *Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi Cienc. Human.* Belém, 1 (3): 61-77, 2006.
- MARTIN, S.S., LANGENHEIM, J.H. & ZAVARIN, E. **Sesquiterpenes in leaf pocket resin of *Hymenaea courbaril*.** *Phytochem.*, (11): 3049-3051, 1972.
- MARTINS, J.E.C. **Plantas medicinais de uso na Amazônia.** 2.ed. Belém – Pará: Cultural CEJUP, 1989, 107p.
- NETO, G.G.; **O saber tradicional pantaneiro: as plantas medicinais e a educação ambiental.** *Rev. Eletron. Mestr. Educ. Amb.* Fundação UFRG, (17): 71-89, 2006.
- NOGUEIRA, R.T.; SHPHERD, G.J.; LAVERDE JUNIOR, A. MARSAIOLI, A.J.; IMAMURA, P.M. **Clerodane-type diterpenes from the seed pods of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*.** *Phytochem.*, (58): 1153-1157, 2001.
- PETTIT, G. R.; MENG, Y.; STEVENSON, C.A. DOUBEK, D.L.; KNIGHT, J.C.; CICHACZ, Z.; PETTIT, R.K.; CHAPUIS, J.C.; SCHMIDT, J.M. **Isolation and structure of Palstatin from the Amazon tree *Hymenaea palustris*.** *J. Nat. Prod.*, (66): 259-262, 2003.

Soares, C.M.L. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica...

POLHILL, R.M. & RAVEN, P.H. **Advances in Legume Systematics**. *Kew, Kew Royal Botanic Gardens*, (1), 1981.

RIZZINI, C.T. **Plantas do Brasil - árvores e madeiras úteis do Brasil: manual de dendrologia brasileira**. São Paulo: Edgard Blücher, 1971. 296p.

SCHWANTS, H. O. & WEBERLING, F. **Taxionomia vegetal**. São Paulo: Ed. Pedagógica e Universitária Ltda., 1981. 72-73p.

SILVA, M.R.; SILVA, M.A.A.P. & CHANG, Y.K. **Utilização da farinha de jatobá (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.) na elaboração de biscoitos tipo cookie e avaliação de aceitação por testes sensoriais afetivos univariados e multivariados**. *Cienc. Tecnol. Alim.*, 18 (1), 1998.

SILVA, S.R.; SILVA, A.P.; MUNHOZ, C.M. SILVA JUNIOR, M.C.; MEDEIROS, M.B. **Guia de plantas do cerrado utilizadas na Chapada dos Veadeiros**. Brasília, 2001.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A. PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 2ª ed. rev amp, Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS/UFSC, 2000. 181-196p.

TATAGIBA, F. **Plantas do Cerrado: Jatobá-do-cerrado – *Hymenaea stigonocarpa***. Disponível em: <<http://www.biologo.com.br/plantas/cerrado/jatoba.html>>. Acesso 05 mai. 2009.

VALENTIM, A.P.T. **Atividade Antimicrobiana, Estudo Fitoquímico e Identificação de Constituintes Apolares do Alburno de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. Ex. Hayne (Jatobá)**. 2006. 109p. Dissertação de Mestrado (Biotecnologia de Produtos Bioativos) – Departamento de Antibióticos, UFPE, Recife. PE.

VILA VERDE, G.M.; PAULA, J.R. & CANEIRO D.M. **Levantamento etnobotânico das plantas medicinais do cerrado utilizadas pela população de Mossâmedes (GO)**. *Rev. Bras. Farmacog.*, (13): 64-66, 2003.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Realizar estudos fitoquímico, antimicrobiano e citotóxico *in vitro*, utilizando extratos da casca do tronco de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex. Hayne.

3.2 Objetivos específicos:

3.2.1 Identificar as principais classes de metabólitos secundários presentes na casca do tronco de *H. stigonocarpa*;

3.2.2 Obter os extratos ciclohexânico, acetato de etila e hidro-alcóolico a partir do extrato etanólico da casca do tronco de *H. stigonocarpa*;

3.2.3 Determinar a concentração de fenóis totais e flavonóides nos extratos hidro-alcóolico e acetato de etila da casca do tronco de *H. stigonocarpa*;

3.2.4 Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), dos extratos ciclohexânico, acetato de etila e hidro-alcóolico da casca do tronco de *H. stigonocarpa*, frente a bactérias multirresistentes e de coleção: *Staphylococcus aureus* (n=10), *Pseudomonas aeruginosa* (n=10), *Shigella sonnei* (n=5), *Salmonella enterica* (n=4) e *Escherichia coli* (n=1), e sobre 10 cepas de *Candida*;

3.2.5 Determinar *in vitro* a atividade citotóxica dos extratos da casca do tronco de *H. stigonocarpa* frente a duas linhagens celulares humanas: carcinoma de pulmão (NCI-H292) e tumor primário de laringe (HEp-2).

Materiais e métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material botânico

Hymenaea stigonocarpa Mart. ex Hayne foi coletada no município de Caxias, Maranhão, latitude 04°51'32''S longitude 43°21'22''O, em fevereiro de 2003. Identificada pelo Prof. Gonçalo Moreira Conceição, da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) e catalogada no herbário Prof. Aluizio Bittencourt (HABIT) da UEMA sob o nº 055. O material vegetal utilizado na pesquisa foi a casca do tronco.

As cascas foram moídas para a obtenção do pó. Este pó foi pesado e acondicionado em saco plástico até a preparação dos extratos.

4.2 Estudo fitoquímico

A etapa experimental para o estudo fitoquímico de *H. stigonocarpa* foi realizada no Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Antibióticos da UFPE sob a supervisão da Prof^a Márcia Silva do Nascimento.

4.2.1 Análise fitoquímica da casca do tronco

A partir do pó da casca do tronco de *H. stigonocarpa* foram analisadas as principais classes de metabólitos secundários (Tabela 1). Os ensaios fitoquímicos seguiram a metodologia descrita por Costa (1982).

Tabela 1: Testes utilizados para identificar classes de compostos químicos presentes na casca do tronco de *H. stigonocarpa*.

CLASSES	TESTES
Alcalóides	Dragendorff, Mayer
Esteróides e Terpenos	Liebermann-Burchard
Taninos	Cloreto férrico
Saponinas	Espuma
Flavonóides	Shinoda, oxalo-bórica

- ALCALÓIDES

A avaliação da presença de alcalóides seguiu a metodologia descrita por Dominguez (1973). Foram pesados 0,5g do pó do tronco de *H. stigonocarpa* e este diluído em 10mL de uma solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 1%. Esta mistura foi aquecida durante 2 minutos em banho-maria a uma temperatura de 100°C. Em seguida esta solução foi filtrada e o filtrado dividido em dois tubos de ensaio. No primeiro foram adicionadas três gotas do reagente Dragendorff e no outro, três gotas do reagente Mayer.

A metodologia está baseada na capacidade dos alcalóides em formar complexos insolúveis (precipitados) em soluções neutras ou levemente ácidas pelos reagentes específicos como Mayer e Dragendorff. A presença de alcalóides é confirmada através da formação de um precipitado laranja-avermelhado quando reage com o reagente Dragendorff e um precipitado opaco de coloração esbranquiçado para o Mayer.

- TERPENOS E ESTERÓIDES

Para a pesquisa de terpenos e esteróides 0,5g do pó da casca foram pesados e transferidos para um tubo de ensaio. A este pó foram adicionados 3 mL de clorofórmio (CHCl₃). Esta mistura foi agitada, filtrada. Ao filtrado foram adicionados 2 mL de anidrido acético seguida de uma vigorosa homogeneização. A esta mistura foram adicionadas algumas gotas de ácido sulfúrico concentrado. O teste de Liebermann-Burchard é utilizado para

verificar a presença de núcleo esteroidal ou triterpenoidal. A solução de clorofórmio tratada com anidrido acético acetila o composto terpenóide e o ácido sulfúrico (H₂SO₄) catalisa a reação de alquilação de Friedel-Crafts, adicionando clorofórmio ao anel aromático, produzindo um complexo colorido. O aparecimento sucessivo das colorações rósea ao azul e verde indica a presença de terpenos e esteróides.

- FLAVONÓIDES

A pesquisa de flavonóides foi realizada em 0,5g do pó da casca que foi solubilizado em 5 mL de metanol. Após filtração desta mistura foram adicionados 1 mL de ácido clorídrico concentrado. Com o auxílio de uma pinça, foi acrescentado à solução uma fita de magnésio de aproximadamente 3 x 0,2mm (VETEC). A presença de flavonóides é evidenciada com o aparecimento de cor rósea devido à capacidade de oxi-redução dos derivados flavônicos de cor amarela, adquirindo então coloração rósea ou, no caso dos antociânicos, azulada (SIMÕES, 2004).

- SAPONINAS

O teste para detecção da presença de saponinas seguiu uma metodologia descrita por Costa (1982) e é conhecida pelo teste da espuma. Este teste consistiu em colocar em um tubo de ensaio 0,5g do pó da casca e adicionar 5 mL de água destilada, agitar vigorosamente por 5 minutos e deixar a mistura em repouso por 30 minutos. A confirmação de saponinas é verificada pela persistência da espuma na amostra, por mais de 30 minutos. Esta propriedade das saponinas de formarem espuma decorre de sua estrutura química, na qual açúcares solúveis estão ligados a esteróides lipofílicos ou triterpênicos (SIMÕES, 2004).

- TANINOS

A metodologia utilizada é baseada na característica dos taninos de formar complexo com íons metálicos insolúvel em água. A determinação de taninos foi realizada em 0,5g do pó da casca que foram solubilizados em 10 mL de água (concentração de 500 mg/mL). Esta preparação foi vigorosamente agitada e filtrada. Após filtração foram adicionadas 3 gotas de cloreto férrico a 1%. O surgimento de uma coloração azul indica presença de taninos hidrolisáveis e uma coloração verde, taninos condensáveis.

4.2.2 Determinação da concentração de fenóis totais

A determinação do teor de fenóis totais presente nos extratos hidroalcolico e acetato de etila obtidos da casca da espécie em estudo foi realizada por meio de espectroscopia na região do visível utilizando o método de Folin–Ciocalteu (WATERMAN; SIMON, 1994).

Para este ensaio foi pesado 6,92 mg do extrato bruto hidroalcolico e 2,25 mg do extrato bruto acetato de etila, ambos obtidos de 1g da casca do caule de *H. stigonocarpa* e adicionados a 30 mL de um sistema composto por metanol/água (8:2 v/v). Esta preparação teve seu volume reduzido em evaporador rotativo até a eliminação do metanol. Em seguida, uma alíquota de 50 µL do extrato foi coletada e diluída em 25 mL de água destilada. Logo após, dessa nova solução, foi retirada uma alíquota de 500 µL para um tubo de ensaio e a este tubo foram adicionados 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu 10% e 2,0 mL de Carbonato de sódio (Na₂CO₃) 7,5%.

A solução de referência (controle) foi composta por uma mistura do reagente de Folin-Ciocalteu 10% (2,5 mL) com Na₂CO₃ a 7,5% (2,0 mL) e 500 µL de água destilada.

Todas as preparações foram aquecidas em banho-maria a 50°C por 5 minutos e em seguida analisadas em um espectrofotômetro UV/visível Hewlett Packard - HP-8453E em comprimento de onda de 760 nm. Este ensaio foi realizado em triplicata.

A concentração de fenóis totais foi determinada por interpolação da absorbância da amostra contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico monohidratado (grau de pureza 98%), nas concentrações de 0,78; 1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25 e

50 µg/mL. O resultado foi expresso em mg de EAG (equivalente de ácido gálico) por grama de extrato. A concentração de fenóis totais na amostra foi determinada através da equação da reta, obtida a partir da curva padrão do ácido gálico.

4.2.3 Determinação da concentração de flavonóides

A determinação da concentração de flavonóides foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Rio (1996) modificada, utilizando rutina (grau de pureza 100%) como padrão, em solução de cloreto de alumínio. Foram diluídos 13,84 mg do extrato bruto hidroalcolóico e 4,52 mg do extrato bruto acetato de etila, ambos obtidos de 2g do pó da casca de *H. stigonocarpa* em 150 mL de metanol (MeOH) 70 %. Em seguida estes extratos foram filtrados e os volumes completados para 250 mL com metanol. Uma alíquota de 15 mL foi transferida para um balão volumétrico de capacidade para 50 mL e adicionado 1 mL de uma solução de cloreto de alumínio [5 g de cloreto de alumínio em 100 mL de metanol (MARKHAM, 1982)] e em seguida o volume completado com metanol. Após repouso de 30 minutos, foi realizada a leitura em espectrofotômetro UV/visível Hewlett Packard – HP – 8453E em comprimento de onda de 425 nm. Este ensaio foi realizado em triplicata.

Os resultados obtidos com a leitura da absorbância das amostras foram comparados com uma curva padrão construída a partir de soluções com concentrações crescentes de rutina para isso uma solução padronizada de rutina de concentração igual a 100 µg/mL foi preparada em metanol 70%. A partir desta solução foram obtidas soluções de concentração equivalentes 10; 11; 12; 13; 14 e 15 µg/mL que foram acrescidas de 1 mL de cloreto de alumínio e completadas para 50 mL com metanol 70% para preparação da curva-padrão.

4.3 Obtenção dos extratos

A extração foi realizada partindo de 890g da casca do tronco de *H. stigonocarpa* pulverizada e adicionando-se a ela 2 litros de etanol a 95%, por um período 20 dias, sendo realizadas trocas do solvente a cada 48 horas durante esse período. A maceração foi realizada

a temperatura ambiente e sob proteção da luz (Figura 1). O extrato foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo e seu rendimento calculado.

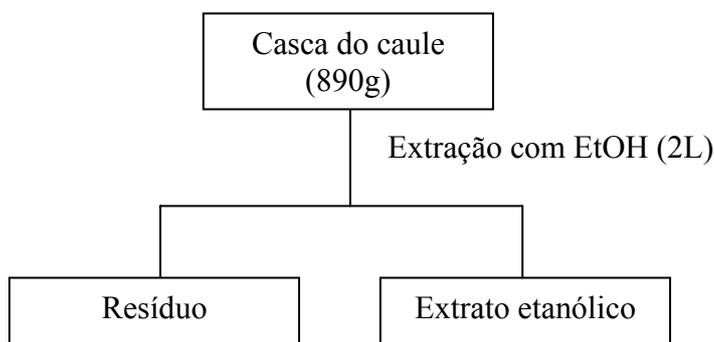


Figura 1: Obtenção do extrato bruto etanólico.

Posteriormente, o extrato etanólico foi dissolvido em 500 mL de um sistema composto por Etanol/H₂O 1:1 v/v e realizado uma extração líquido-líquido primeiramente com 500 mL de ciclohexano (C₆H₁₂), com auxílio de um funil de separação com capacidade de 2 L. Após a separação de fases, a fase orgânica foi recolhida e seca em evaporador rotativo. Este processo foi repetido até que todos os constituintes químicos solúveis em ciclohexano tenham sido extraídos. Este procedimento foi realizado também com acetato de etila (AcOEt). Os extratos obtidos foram concentrados e seus rendimentos calculados (Figura 2).

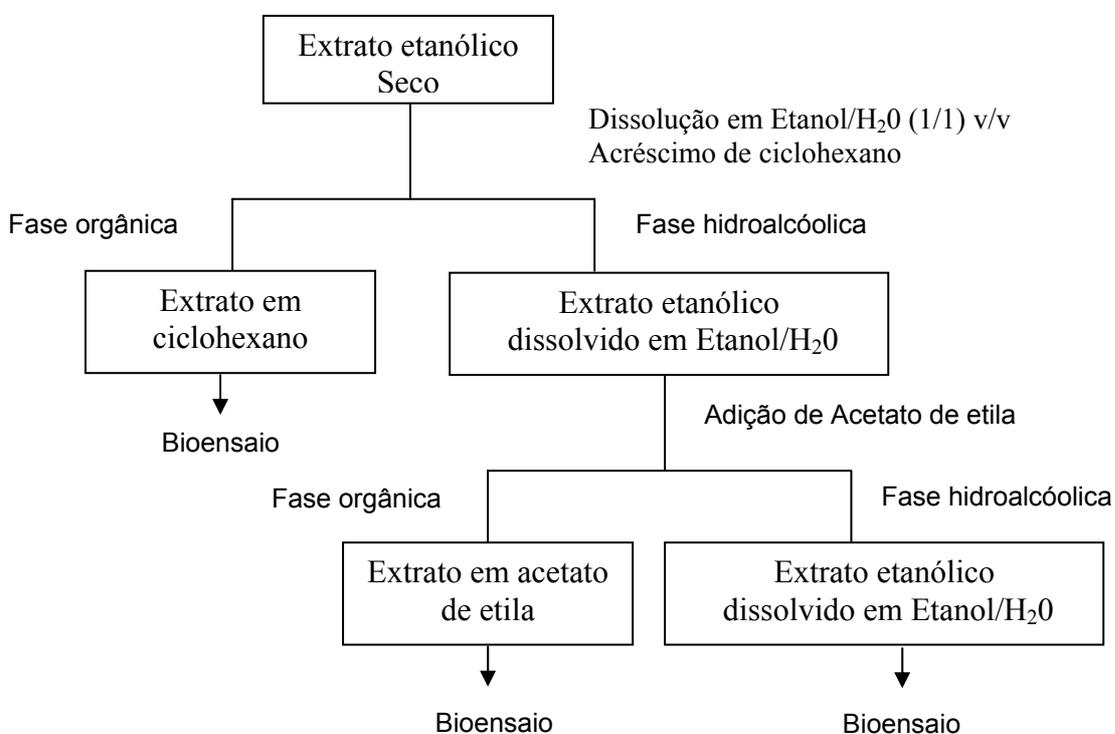


Figura 2: Esquema de partição líquido-líquido do extrato etanólico bruto para obtenção dos extratos ciclohexano e acetato de etila de *H. stigonocarpa*.

4.4 Padronizações dos extratos para atividade antimicrobiana

Os extratos hidro-alcóolico, ciclohexânico e acetato de etila foram analiticamente pesados (10 mg) e solubilizados em um sistema composto por DMSO (dimetil sulfóxido 10%)/Tween80/água (1:1:8), a fim de obter soluções padronizadas de concentração igual a 1000 µg/mL. Em seguida foram esterilizados por filtração utilizando membrana millipore de porosidade 0,45 µm de diâmetro.

4.5 Determinação *in vitro* da atividade antimicrobiana

A etapa experimental foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia dos Microrganismos – Departamento de Antibióticos da UFPE.

4.5.1 Microrganismos

Neste experimento foram utilizados 40 microrganismos alguns deles obtidos a partir de espécimes de pacientes acometidos por infecções e com um fenótipo de resistência para diversos agentes antimicrobianos: *Staphylococcus aureus* IQ 13, IQ 14, IQ 15, IQ 16, IQ 17, IC 27, IC 138, IC 311, IC 404; *Pseudomonas aeruginosa* IC 01, IC 02, IC 03, IC 04, IC 05, IC 06, IC 10, IC 12, IC 13; *Candida albicans* IC SIBELE, IC AM 1, IC AM 2, IC AM 3, IC AM 4, IC AM 5, IC AM 7, IC 03, IC 25, *Candida krusei* UFPEDA 1002; *Shigella sonnei* IC 01, IC 02, IC 03, IC 04; IC 05; *Salmonella enterica* IC 391, IC 3373 e 5 microrganismos pertencentes à coleção do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e do American Type Culture Collection (ATCC), *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella choleraesuis* ATCC 14028, *Salmonella enterica* UFPEDA 415, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (Tabela 2).

Table 1 – Origin and profile of susceptibility of the micro-organisms used in the determination of the Minimal Inhibitory Concentration (MIC).

Micro-organisms	Origin	Resistance	Sensitivity
<i>E. coli</i> ATCC 8739	ATCC	ND	CLO; AMP; CFL; CTX; MER; SZT; AMI; GEN; CIP; TET; IMP
<i>S. sonnei</i> IC 01	Faeces	ND	ND
<i>S. sonnei</i> IC 02	Faeces	ND	ND
<i>S. sonnei</i> IC 03	Faeces	ND	ND
<i>S. sonnei</i> IC 04	Faeces	ND	ND
<i>S. sonnei</i> IC 05	Faeces	ND	ND
<i>S.s aureus</i> IC 404	Secretion from the oropharynx	GEN; AMI; CFO; CTX; CLO; ERI; TET	CIP
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	ATCC	ND	NIT; LMX; VAN; NET; RIF; AZI; SUT; OFX
<i>S. aureus</i> IQ 13	ND	ND	ND
<i>S. aureus</i> IQ 14	ND	ND	ND
<i>S. aureus</i> IQ 15	ND	AMP; CFO; ERI; AMOX	IMP; SZT
<i>S. aureus</i> IC 16	ND	ND	ND
<i>S. aureus</i> IC 17	ND	ND	ND
<i>S. aureus</i> IC 27	ND	ND	ND
<i>S. aureus</i> IC 138	Vaginal secretion	AMI; GEN	CTX; ERI; CLO
<i>S.aureus</i> IC 311	Skin wound	GEN; AMI; CFO; CTX; CLO; SZT; ERI; TET; PEN	CIP
<i>P. aeruginosa</i> IC 01	Blood culture	CIP; GAT; GEN; AMI; CFL; CFO; CTX; CPM; CLO; IMP; MER	ATM
<i>P. aeruginosa</i> IC 02	Hepatic secretion	CIP; GAT; GEN; AMI; CFL; CFO; CTX; CPM; CLO; IMP; MER; SZT	ATM
<i>P. aeruginosa</i> IC 03	Tracheal secretion	CIP; GAT; GEN; AMI; CFL; CFO; CTX; CPM; CLO; IMP; MER	ATM
<i>P. aeruginosa</i> IC 04	ND	ND	ND
<i>P.aeruginosa</i> IC 05	Blood culture	CIP; GAT; GEN; AMI; CFL; CFO; CTX; CPM; CLO; ATM; MER; SZT; AMP+SUB	ND
<i>P. aeruginosa</i> IC 06	Tracheal secretion	CIP; GAT; GEN; CFL; CFO; CTX; COM; CLO; ATM; MER; SZT; AMP+SUB	ND
<i>P. aeruginosa</i> IC 10	Abdominal secretion	MAI; CFL; CFO; CTX; CPM; CIP; GEN; TOB; ATM; IMP; MER; SZT	ND
<i>P. aeruginosa</i> IC 12	Urine	AMI; CFL; CFO; CTX; CPM; CIP; GENT; TOB; ATM; IMP; MER; SZT; NIT; NAL; CLO; TET	ND
<i>P. aeruginosa</i> IC 13	Urine	CFL; CFO; CTX; CIP; GEN; TOB; SZT; NIT; NAL; CLO; TET; NOR	MER
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	ATCC	ND	ND
<i>S. choleraesuis</i> ATCC 14028	ATCC	ND	ND
<i>S. Enterica</i> UFPEDA 415	Collection UFPEDA	ND	ND
<i>S. Enterica</i> Rubislaw 3373	IC	ND	ND
<i>S. Enterica</i> Saintpaul 391	IC	ND	ND
<i>C. albicans</i> SIBELE	Vaginal secretion	ND	ND
<i>C. albicans</i> IC AM 01	Vaginal secretion	ND	ND
<i>C. albicans</i> IC AM 02	Vaginal secretion	ND	ND
<i>C. albicans</i> IC AM 03	Vaginal secretion	ND	ND
<i>C. albicans</i> IC AM 04	Vaginal secretion	ND	ND
<i>C. albicans</i> IC AM 05	Vaginal secretion	ND	ND
<i>C. albicans</i> IC AM 07	Vaginal secretion	ND	ND
<i>C. albicans</i> IC 03	Oral cavity	ND	Miconazol
<i>C. albicans</i> IC 25	Oral cavity	ND	Miconazol
<i>C. krusei</i> UFPEDA1002	ND	ND	ND

AMI: amikacin 30 µg; AMOX: Amoxicillin 10 µg; AMP: Ampicillin 10 µg; AMP+SUB: Ampicillin / Subctam 10 µg/ 10 µg; ATM: Aztreonam 30 µg; AZI: azithromycin 15 µg; CFL: Cephalothin 30 µg; CFO : Cefoxitin 30 µg; CIP: Ciprofloxacin 5 µg; CLO: Chloramphenicol 30 µg; CPM: Cefepime 30 µg; CTX: Cefotaxime 30 µg; ERI: erythromycin 15 µg; GAT: gatifloxacin 10 µg; GEN: gentamicin 10 µg; NAL: Acid nalidixic 30 µg; NIT: Nitrofurantoin 30 µg; NOR: Norfloxacin 10 µg; IPM: Imipenem 10 µg, MER: meropenem 10 µg; Teic: teicoplanin 30 µg; TET: Tetracycline 30 µg; TOB: Tobramycin 10 µg; SZT: sulfazotrim 25 µg; VAN: vancomycin 30 µg. ATCC: American Type Culture Collection. CI: Isolated clinical. ND: Not determined

4.5.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

O ensaio foi realizado em microplacas estéreis de 96 cavidades com fundo em forma de “U”. Um volume de 200 µL dos extratos vegetais foram depositados nas colunas de 1 a 10 da linha A. Os demais orifícios foram preenchidos com 100 µL de caldo Mueller-Hinton para as bactérias e o meio Roswell Park Memorial Institute - RPMI 1640 para leveduras. Em seguida, uma diluição dos extratos foi realizada pela transferência de uma alíquota de 100 µL do conteúdo de cada orifício da linha A para os orifícios da linha B, e após homogeneização, o mesmo volume foi transferido para a linha C, e assim sucessivamente, até a linha H, e desprezando-se após homogeneização o excesso da diluição. Assim foram obtidas soluções com concentrações decrescentes dos extratos equivalente à 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, 31,25 µg/mL, 15,625 µg/mL e 7,81 µg/mL. Os inóculos microbianos foram padronizados (10^8 UFC/mL) utilizando um tubo 0,5 de McFarland diluídos 1/10 em água destilada. Em seguida um volume de 5 µL (10^4 UFC/mL) dos inóculos foram depositadas em todos os orifícios das linhas A-H. Os orifícios da coluna 11 e 12 foi destinado para o testes de controle do experimento. A coluna 11 serviu como controle negativo da atividade inibitória dos diluentes (DMSO/tween 80/água), utilizado na diluição dos extratos. Os orifícios da coluna 12 receberam apenas o caldo Mueller-Hinton e o inóculo microbiano, possibilitando o controle positivo da viabilidade microbiana. As microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C por 24 horas.

A revelação do crescimento bacteriano ou da inibição foi observada pela adição de uma solução aquosa a 0,5% de cloridrato de 2,3,5 trifetil tetrazólio (TTC). As enzimas oxidativas presentes nas membranas celulares dos microrganismos vivos reagem com o TTC oxidando-o, e provocando a mudança de coloração de incolor (forma reduzida) para vermelho de formazan (forma oxidada). As microplacas foram novamente incubadas por mais três horas a 35°C. Após esse intervalo de tempo, a leitura da placa foi realizada: a presença de uma coloração vermelha nos orifícios foi interpretada como prova negativa do efeito inibitório do extrato, ou seja, houve crescimento bacteriano; enquanto que a ausência de cor foi considerada prova positiva da ação antimicrobiana dos extratos.

A CIM foi definida como a menor concentração do extrato em µg/mL capaz de impedir o crescimento microbiano (ou seja, o aparecimento da coloração vermelha) (Figura 3).

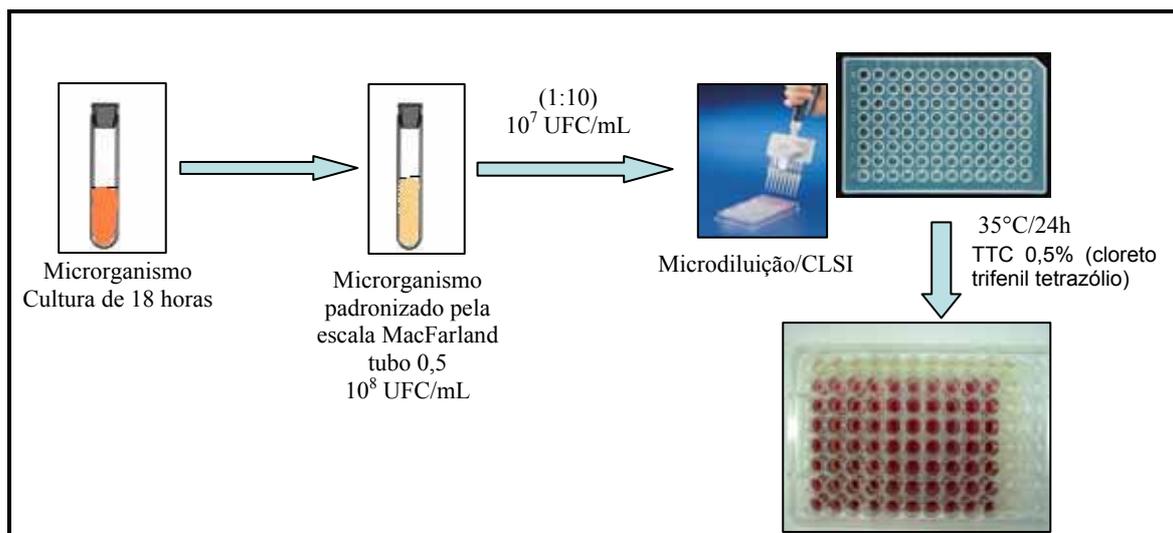


Figura 3: Esquema para determinação da CIM dos extratos de *H. stigonocarpa*.

Segundo critérios utilizados por Holetz *et. al.*, 2002 e Tanaka *et. al.*, 2005, os valores da CIM compreendidos entre 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$ são considerados como boa atividade do extrato, entre 500 e 1000 como atividade fraca e > 1000 , sem atividade.

4.6 Citotoxicidade

4.6.1 Células neoplásicas utilizadas

Os testes de citotoxicidade foram realizados frente a duas linhagens de células: células NCI-H292 e HEp-2 obtidas do Laboratório de Cultura de Células, do Departamento de Antibióticos da UFPE.

As células NCI-H292 correspondem a uma linhagem contínua de células mucoepidermóides, obtida a partir de carcinoma de pulmão humano, que tem sido utilizada para o isolamento e propagação do *Paramyxovirus humano* (MORIER *et al.*, 1996). As células HEp-2 (Human Epidermoide Câncer Cells) são derivadas de tumor primário de laringe humana.

4.6.2 Atividade citotóxica

As células foram mantidas em meio DMEM - Minimum Essencial Medium Eagle modificado Dulbecco's, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de solução de antibiótico [penicilina 1000 UI/mL + estreptomicina 250 mg/ml e 1% de L-glutamina 200mM], todos da marca Sigma (EAGLE,1995).

Uma suspensão celular de 10^5 células/mL, foi preparada em meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de solução de antibiótico (penicilina 1000 UI/mL + estreptomicina 250 mg/mL) e 1% de L-glutamina 200mM adaptado para a linhagem celular. A suspensão foi distribuída em placas de cultura com 96 poços (220 μ L em cada poço). As placas foram incubadas a 37°C em estufa (COLE PARMER), com atmosfera úmida enriquecida com 5% de CO₂. Após 24h os extratos foram adicionados (22 μ L/poço) nas concentrações equivalentes à 50, 25, 12,5 e 6,25 μ g/mL e as placas reincubadas. O ensaio foi feito em quadruplicata. Como controle foi utilizado o DMSO nas mesmas concentrações dos extratos. A droga padrão utilizada foi o Etoposídeo (Epósido®).

Após 72 h de contato das células com os extratos, foi adicionado 25 μ L de MTT (brometo (3-[5,4-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (Invitrogen), na concentração de 5 mg/mL em tampão fosfato - PBS (p/v) pH 7.0, em cada poço e as placas foram incubadas por duas horas em estufa 37 °C. Ao final desse período o meio de cultura, juntamente com o excesso de MTT foram aspirados e em seguida, 100 μ L de DMSO foi adicionado a cada poço para dissolução dos cristais de Formazan (MOSMANN,1983).

A leitura óptica foi feita em leitor automático de microplacas do tipo Termo Plate num comprimento de onda de 450 nm e a densidade óptica (DO) média de cada poço foi comparada com a DO média dos poços controles.

A CI₅₀ (concentração que inibe 50% do crescimento celular em relação ao controle) foi determinada a partir de um cálculo de regressão linear, onde foi relacionado o percentual de inibição em função do logaritmo das concentrações ensaiadas admitindo-se um intervalo de confiança de 99% ($p < 0,01$), para a reta obtida (COSTA; NASCIMENTO, 2003).

4.7 Análise estatística

Na determinação de fenóis totais e flavonóides, a curva padrão foi construída através da elaboração do gráfico utilizando a regressão linear, determinando assim a equação da reta, no programa OriginPro8SRO® produzido pela OriginLab Corporation.

Para o ensaio de citotoxicidade em células tumorais, a determinação do IC₅₀ foi realizada através da construção do gráfico Dose-resposta, usando a curva sigmóide. Todos os dados foram processados pelo Excel® produzido pela Microsoft e pelo programa Prisma 4.0 (GraphPad software).

Resultados e discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Artigo original

REVISTA: APPLIED MICROBIOLOGY

Phytochemical and *in vitro* antimicrobial and antineoplastic activities of extracts from *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex. Hayne (Jatoba cerrado)

C. M. L. Soares¹, C.R. Weber¹ and L. S. Oliveira².

¹Department of Antibiotic, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brazil.

²Department of Fundamental Chemistry, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brazil.

Correspondence

Carla Michella Leal Soares

Rua das Pernambucanas, 377 - Graças. Recife/ PE– Brasil. CEP: 52011-010.

E-mail: clealsoares@yahoo.com.br Fone: (81) 32216761

ABSTRACT

Aims: Phytochemical analysis of bark of *Hymenaea stigonocarpa*, antimicrobial and antineoplastic activity *in vitro* of the extracts.

Methods and Results: The chemical analysis was performed using methods phytochemicals. The microdilution method determined the antimicrobial activity against bacteria gender *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella* and yeast *Candida*. The antineoplastic activity was tested against human cells lung carcinoma (NCI-H292) and larynx tumor (HEp-2) by MTT method.

It was detected the presence of tannins, flavonoids and terpenes. The concentrations of total phenols were 17.69 and 6.25 mg of GAE / g and the flavonoids were 17.4 and 6.36 mg RE / g of hydroalcoholic and ethyl acetate, respectively. The three extracts presented antimicrobial activity. *S. aureus* was the most sensitive with MIC values between 7.81 to 250 µg / mL. The cyclohexane extract was the only one that presented cytotoxic activity with IC₅₀ of 21.27 and 8.90 for NCI-H292 and HEp-2 cells, respectively.

Soares, C.M.L. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica...

Conclusion: The secondary metabolites of *Hymenaea stigonocarpa* presenting antineoplastic and antimicrobial activities *in vitro*.

Significance and Impact of Study: *Hymenaea stigonocarpa* is a species in potential for the development of herbal drugs, with prospects for its use in infectious diseases and how alternative medicine in treating cancer.

Keywords: Leguminosae, *Hymenaea stigonocarpa*, medicinal plants, antimicrobial activity, antineoplastic activity.

INTRODUCTION

Two great world problems in the net of health are the cancer and the infectious diseases. The cancer is all over the world among the main mortality causes. The estimates of the National Institute of Cancer (INCA), it is that they happen about 489.270 new cases of cancer in the years of 2010 and 2011, only in Brazil (Brazil, 2009). The prevention and the cancer control are among the most important challenges scientific and of public health, of our time. Therefore, search for new alternatives for prevention and treatment of cancer is extremely important to minimize this unwanted human mortality.

Many micro-organisms, which cause damage to human health, exhibit drug resistance due to inadequate use of antibiotics. Bacterial resistance to antimicrobial agents has become a widespread medical problem, especially in hospitals. In spite of the pharmaceutical industries they have thrown new antibiotics in the last three decades, the microbial resistance to these drugs increased considerably (Nascimento *et al.*, 2000) and the pharmaceutical arsenal available to control antibiotic-resistant bacteria is limited, also representing a challenge in the treatment of infections. Hence, it is very important to detect natural products with antimicrobial activity and the medicinal

Soares, C.M.L. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica...

plants offer a significant potential for the development of antibacterial therapies (Recio *et al.*, 1989).

Since antiquity, natural resources have been extensively exploited for medicinal purposes. Currently, there is been an increasing interest in studying the biological properties of the plants and derivatives in order to discover the alternative biologically active compounds (Araújo *et al.*, 2004; Lima *et al.*, 2005).

In many countries around the world the use of medicinal plants still contributes significantly in primary health care. Brazil is well-known for the exuberance and the variety of its tropical plants. Many of these plants are used as natural medicines without any scientific base. The plants of Brazilian biomes have been used as natural medicines by local populations in the treatment of several tropical diseases, including schistosomiasis, malaria and bacterial and fungal infections (Alves *et al.*, 2000).

Hymenaea stigonocarpa Mart. ex. Hayne is a species of the legume family (Caesalpinioideae) and is found in most Brazilian regions (Barroso, 1991). Known as jatobá-do-cerrado, is widespread in *Cerrado* and used as food and for medicine purposes by native population (Lee and Langenheim, 1975). The tree produces fruits of 10-20 cm in length and 4-6 cm in diameter which contain a pulp consumed by the local rural population *in natura* or as porridge (Lorenzi, 1992). It is used in folk medicine for the respiratory, gastrointestinal, genito-urinary and liver treatment. It also provides healing and antimicrobial properties (Vila Verde *et al.*, 2003; Maciel and Neto, 2006; Neto, 2006).

With base in those data and in the rarity of the works with *H. stigonocarpa*, decided to do a phytochemical study and to evaluate the *in vitro* action antimicrobial and antineoplastic of the extracts of that botanical species, could be in the future presented as pharmaceutical products, besides allowing one to review the scientific knowledge for the population, guaranteeing safety and effectiveness in its use.

MATERIALS AND METHODS

Plant material.

Hymenaea stigonocarpa Mart. ex Hayne (Leguminosae) was collected in Caxias 04°51'32''S; 43°21'22''W, State of Maranhão, Brazil in February 2003. The plant was identified by Prof. Gonçalo Moreira Conceição. A voucher specimen was deposited under n° 055 at the Prof. Aluizio Bittencourt Herbarium of the State University of Maranhão - Brazil.

Extractive identification.

The chemical analysis of the bark of *Hymenaea stigonocarpa* was performed using standard phytochemical methods to determine the presence of tannins (ferric chloride method), alkaloids (Dragendorff-Meyer test), flavonoids (Shinoda test), saponins (test of the foam) and terpenoids and steroids (Liebermann-Buchard test) (Costa, 1982).

Preparation of plant extracts.

The bark of *H. stigonocarpa* (890g) was powdered and macerated in ethanol 95% for 20 days with stirring at ambiente temperature. The extract was filtered and concentrated on rotary evaporator.

The ethanolic extract was dissolved in distilled water 1/1 v/v and accomplished an extraction liquid-liquid with increase polarity of cyclohexane (500 mL) and ethyl acetate (500 mL). The cyclohexane, ethyl acetate and hydroalcoholic crude extracts obtained were concentrated on rotary evaporator and its calculated revenues. All the extracts were kept in tightly stoppered bottle under refrigeration until used for the biological testing.

Determination of the compositions phenols.

The ethyl acetate and hydroalcoholic extracts obtained of trunk bark of *Hymenaea stigonocarpa* were used for the determination of the concentration of total phenols and flavonoids. Total phenols content was determined using the Folin-Ciocalteu method (Waterman and Simon,

Soares, C.M.L. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica...

1994). Results were expressed as gallic acid equivalents (GAE). Flavonoid content was determined according to Rio (1996) modified. Results were expressed as rutin equivalents (RE). The analysis of total phenols and flavonoids were accomplished in triplicate.

Assay of antimicrobial activity.

Micro-organisms

Antimicrobial activity tests were carried out against the bacteria *Staphylococcus aureus* (n=10), *Pseudomonas aeruginosa* (n=10), *Shigella sonnei* (n=5), *Salmonella enterica* (n=4), *Escherichia coli* (n=1) maintained on Mueller-Hinton broth and against the yeast *Candida albicans* (n=9) and *Candida krusei* (n=1), maintained on Sabourand broth. The micro-organisms were obtained from the culture collections of the Department of Antibiotics at the Federal University of Pernambuco, Recife - Brazil, clinical isolates and American Type Culture Collection (ATCC), everybody multi-resistant micro-organisms (Table 1). In order to produce an appropriate inoculum, an overnight culture (grown at 37°C) of bacteria in Mueller-Hinton broth, or of yeast in Sabourand broth, was standardised to an opacity equivalent to 0,5 on the McFarland scale (10^8 CFU/mL) in sterilized water.

Minimum Inhibitory Concentration - (MIC)

MIC tests were carried using a tissue culture testplate (96 wells) through the broth microdilution method in liquid middle (CLSI). The stock solutions of the cyclohexane, ethyl acetate and hydroalcoholic extracts were diluted in dimethyl sulfoxide - DMSO 10%/Tween80/water (1:1:8) and transferred into the first well (200µL), and serial dilutions in Mueller-Hinton broth (bacteria) or RPMI 1640 broth (yeast) (100 µL) were performed so that concentrations in the range of 1000 - 7,81 µg/mL were obtained. The inoculum (5µL) was added to all wells and the plates were incubated at 35°C during 24 h (bacteria) or at 48 h (yeast). Antimicrobial activity was detected by adding 20 µL of 0.5% Chloride 2,3,5- triphenyl tetrazolium

Soares, C.M.L. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica...

(TTC) aqueous solution. MIC was defined as the lowest concentration of extracts that inhibited visible growth, as indicated by the TTC staining. All experiments were carried out in duplicate.

Cytotoxic activity.

Cancer cell lines

The ethyl acetate, cyclohexane and hydroalcoholic extracts were tested against cells lines of the pulmonary mucoepidermoid human carcinoma (NCI-H292) and cells lines derived from an epidermoid carcinoma of the human larynx (HEp-2) obtained from section of cellular cultures of the Institute Adolfo Lutz (SP) and maintained in agreement with the protocol established by the laboratory of culture of cells of the Department of Antibiotics of UFPE, according to the methodology described in the literature (Costa and Nascimento, 2003).

Cytotoxic activity assay

The cells were maintained in DMEN - Eagle minimum essential medium modified Dulbecco's (Sigma), supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma), 1% antibiotic solution (penicillin 1000 UI/mL + streptomycin 250 mg/ml) and 1% L-glutamine 200mM (Eagle,1995).

Cell viability was determined using the standard 3-(5,4-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Sigma) assay as described previously (Mosmann,1983). The cell suspension of 10^5 cell/mL it was prepared in half DMEM described above. The suspension was distributed in culture plates with 96-wells (220 μ L in each well). After 24 h incubation at 37°C under a humidified 5% CO₂ to allow cell attachment (COLE PARMER), the cells were treated with varying concentrations (50, 25, 12,5 e 6,25 μ g/mL) of extracts (22 μ L/well) and incubated for 72 h under the same conditions. As control was used dimethyl sulfoxide (DMSO) solvent in the same concentrations of the extracts. The used drug pattern was Etoposide. After 2 h of the MTT (5 mg/mL PBS, 25 μ L) addition, the formazan formed was extracted with DMSO (100 μ L) and the

Soares, C.M.L. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica...

optical reading was measured spectrophotometrically at 450 nm with automatic reader of the type Termo Plate and the mean optical density of each well was compared with the control wells.

The IC₅₀ (concentration that inhibits 50% cell growth compared to control) was determined from a linear regression calculation, which was related to the percentage of inhibition on the logarithm of the concentrations tested assuming a confidence interval of 99 % (p <0.01) for the straight line obtained (Costa and Nascimento, 2003).

RESULTS

Phytochemical Analysis.

The phytochemical analysis from the bark of *H. stigonocarpa* detected the presence of terpenoids and steroids, flavonoids and hydrolysable tannins. It wasn't verified the presence of saponins and alkaloids.

The quantification of total phenolic was determined being used the equation of straight $y = 0,01851 + 0,0132 x$, obtained starting from the curve pattern of the acid gallic with correlation coefficient for the curve of $R^2 = 0,96483$. The measured absorbance for the samples is represented by Y and the concentrations of the total phenolic by X. The total phenolic for extracts within the range of 17,69 (hydroalcoholic extract) and 6,25 (ethyl acetate extract) mg GAE/g.

The flavonoids quantification was determined being used the equation of straight $y = 0,0176 + 0,0318 x$, obtained starting from the curve pattern of the rutin, with correlation coefficient for the obtained curve of $R^2 = 0,98057$. It was observed a quantitative of 17,4 mg of RE/g hydroalcoholic extract and 6,36 mg of RE/g ethyl acetate extract.

Revenue of the extracts.

The revenues for the ciclohexane, ethyl acetate and hydroalcoholic extracts obtained of the bark *H. stigonocarpa* were of 1,73%, 3,21% and 9,84%, respectively.

Antimicrobial activity.

Soares, C.M.L. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica...

All the extracts, ciclohexane, ethyl acetate and hydroalcoholic of *H. stigonocarpa* was active against the micro-organisms used in this study. The extracts were tested on a panel of positive and negative gram bacteria and yeast (Table 2).

Comparing with literature, results strong activity is for MIC values between (10 – 100 µg/mL), moderate activity MIC values between (500 - 1000 µg/mL) and weak activity (> 1000 µg/mL) (Holetz *et al.*, 2002; Tanaka *et al.*, 2005), we observed an inhibition of all microorganisms. A particularly interesting activity is observed on *S. aureus* (MIC values of 250 – 7,81 µg/mL) in all the extracts. An moderate activity in relation to the other microorganisms was observed. The Gram-negative bacilli, *Shigella sonnei* and *Salmonella entérica* were the ones that they came more sensitive to the extracts (MIC values between 500 - 250 µg/mL).

Citotoxic activity.

Extracts of *H. stigonocarpa* were analyzed and the CI_{50} expressed in the Table 3. Based on the protocol of National Cancer Institute (NCI) (Alley, 1988), values of $CI_{50} \leq$ to 30 µg/mL they should be considered significant for gross extracts of vegetable origin. The results obtained in the study being compared, with the results accepted as significant for NCI it was verified that the extract ciclohexane went active front to the cells NCI-H292 and HEp-2, with CI_{50} values of 21, 27 and 8,9 µg/mL, respectively. The ethyl acetate and hydroalcoholic extracts didn't have citotoxic activity front the cell used, therefore they exhibited values above that considered significant.

DISCUSSION

The selection of *H. stigonocarpa* for this study was based on the popular use as medical and scientific studies that demonstrate biological activities of the genus *Hymenaea*. Pettit *et. al.* (2003) isolated from *H. palustris* flavonoids luteolin and crisoeriol with antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis* and *Neisseria gonorrhoeae* and palstatina, which inhibited the growth of leukemic cells of lymphoid lineage mice P388. The stem bark of *H. parvifolia* were

Soares, C.M.L. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica...

isolated dihidroflavonóis α , β rhamnoside (astilbin and neoastilbin). These compounds showed the property to inhibit the enzyme casein kinase II (Ishibashi *et al.*, 1999). The stem bark of *H. courbaril* showed antimicrobial activity against *Proteus mirabilis* and *S. aureus* (Goncalves *et al.*, 2005). Cunningham *et al.* (1974) isolated this species halimadieno type diterpenes, such as acid (13R)-13-hydroxy-1 (10),14-ent-halimadieno-18-oic acid, which showed cytotoxic activity in human tumor cells ovary, strain A2780 (Abdel-Kader *et al.*, 2002).

Valentine (2006), studying the sapwood *H. stigonocarpa* noted the presence of flavonoids, terpenes and steroids. The extracts showed antibacterial activity, especially against *S. aureus*, confirming the results found in this study. We identified five fatty acid extract cyclohexane: NN-diethyl-decanamida, hexadecanoate methyl (methyl palmitate), hexadecanoic acid (palmitic acid), 9-octadecanoic acid (oleic acid) and octadecanoic acid (stearic acid). The palmitic acid was considered responsible for the antibacterial activity in species of the family Cruciferae (Hashem and Saleh, 1999).

The phytochemical profile of the bark of *H. stigonocarpa* indicated the presence of phenolic compounds such as flavonoids and hydrolysable tannins, and terpenes and steroids. The observed results are consistent with those obtained in other species of *Hymenaea*, where there is a predominance of terpenoids and flavonoids.

The tannins, extracted with hydroalcoholic mixtures, phenolic compounds are of great economic interest, the subject of many studies. Research with biological activity of tannins showed the antimicrobial activity (Scalbert, 1991, Miller *et al.*, 2005), anti-inflammatory and healing (Slater *et al.* 2004). Some researchers suggest that the tannins have a chemopreventive effect against carcinogenesis, since they act as scavengers of free radicals, decreasing the concentrations of these intercellular.

Moreover, according to Samy and Gopalakrishnakone (2008), tannins interfere with bacterial metabolism, as have the ability to inactivate the microbial adhesins, enzymes and transport proteins in the cell envelope. Tannins bind to the membrane transport proteins, for example, inhibit

Soares, C.M.L. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica...

the transport of solutes (organic acids, amino acids and minerals), inside bacterial cells (Schaechter *et al.*, 2002). Tannins also form complexes with metal ions (iron, calcium, etc.), reducing the availability of these ions that are essential to the metabolism of microorganisms (Loquercio *et al.*, 2005).

Flavonoids, found in the ethyl acetate extract or hydroalcoholic, have the characteristic of forming a complex with the extra-cellular soluble proteins, which can bind to the bacterial cell wall. The site of attack of antimicrobial agents acting against the cell wall is the protective layer of peptidoglycan, inhibiting the synthesis of these. This results in a cell wall with structural defects, destroying the stiffness of the wall and acting on the process of cell replication, resulting in cell death (Schaechter *et al.*, 2002).

In relation to the terpenes, no one knows for sure the mechanism of action of these, but it is believed to possess the property to break through the cell membranes of lipophilic compounds (Gopalakrishnakone and Samy, 2008). The cytoplasmic membrane located just beneath the cell wall, has double lipid layer (33% lipids) and protein (66%) having selective permeability, controlling the passage of substances and nutrients into the cell (ions, phosphates, nucleic acids, purines) and the output of its catabolites (Schaechter *et al.*, 2002). Changes in the membrane can cause the output of the vital elements to the cell or entry of harmful substances to the bacterial metabolism, resulting in cell death, may be that the action of terpenes found in extracts of low polarity, such as cyclohexane.

The extracts cyclohexane, ethyl acetate and the tree bark hydroalcoholic *H. stigonocarpa* showed better activity against the *S. aureus*. The selectivity profile against Gram-positive antimicrobial is a phenomenon observed in many antimicrobial agents, not only from vegetables (Basile *et al.*, 2000). Probably is due to Gram-positive bacteria present a less complex cell envelope in relation to Gram-negative, which makes them more susceptible to the action of antimicrobials (Murray *et al.*, 2002). Moreover, the outer membrane of Gram-negative bacteria acts as a barrier to

Soares, C.M.L. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica...

penetration of different molecules and has a periplasmic space that contains several enzymes that can inactivate some antimicrobial agents (Duffy and Power, 2001; Schaechter *et al.*, 2002).

In cytotoxic activity, although they were identified and quantified total phenolics and flavonoids in hydroalcoholic and ethyl acetate *H. stigonocarpa*, and these compounds are indicated in the literature as having antitumor activity, the observed results demonstrated that these extracts had no action in neoplastic cells used. Already the cyclohexane extract showed antineoplastic activity, suggesting that any of the constituents of lower polarity, such as terpenes and steroids, fatty acids, hydrocarbons, lipids and furocoumarins present in the plant may be responsible for the antineoplastic activity. Fatty acids were isolated from the extract obtained from the sapwood of cyclohexane *H. stigonocarpa* (Valentine, 2006).

According Felipe Júnior (2004), tumor cells have an increased fluidity of cell membrane and a decrease in viscosity and stability, unlike healthy cells, whose normal fluidity promotes its stability and cellular differentiation. Thus, neoplastic cells are more susceptible to oxidants causing his death with a slight increase in cellular oxidation. Some fatty acids can also cause a decrease in membrane fluidity of tumor cells and increase the viscosity of the membrane of normal cells, therefore, its stability, this may be one explanation for the inhibition of tumor cell NCI-H292 and HEp-2 used in research.

Based on these results, this study reveals the great potential of antimicrobial and antitumor *H. stigonocarpa* in the search for new herbal medicines. However, the results relate to the antimicrobial activity of extracts whose composition is a mixture of several substances, where those responsible for the effects are diluted. Therefore, further studies are needed both to isolate the substances responsible for these biological activities and to perform toxicological tests *in vivo* viability of herbal medicines.

Table 1 – Origin and profile of susceptibility of the micro-organisms used in the determination of the Minimal Inhibitory Concentration (MIC).

Micro-organisms	Origin	Resistance	Sensibility
<i>E. coli</i> ATCC 8739	ATCC	ND	CLO; AMP; CFL; CTX; MER; SZT; AMI; GEN; CIP; TET; IMP
<i>S. sonnei</i> IC 01	Faeces	ND	ND
<i>S. sonnei</i> IC 02	Faeces	ND	ND
<i>S. sonnei</i> IC 03	Faeces	ND	ND
<i>S. sonnei</i> IC 04	Faeces	ND	ND
<i>S. sonnei</i> IC 05	Faeces	ND	ND
<i>S.s aureus</i> IC 404	Secretion from the oropharynx	GEN; AMI; CFO; CTX; CLO; ERI; TET	CIP
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	ATCC	ND	NIT; LMX; VAN; NET; RIF; AZI; SUT; OFX
<i>S. aureus</i> IQ 13	ND	ND	ND
<i>S. aureus</i> IQ 14	ND	ND	ND
<i>S. aureus</i> IQ 15	ND	AMP; CFO; ERI; AMOX	IMP; SZT
<i>S. aureus</i> IC 16	ND	ND	ND
<i>S. aureus</i> IC 17	ND	ND	ND
<i>S. aureus</i> IC 27	ND	ND	ND
<i>S. aureus</i> IC 138	Vaginal secretion	AMI; GEN	CTX; ERI; CLO
<i>S.aureus</i> IC 311	Skin wound	GEN; AMI; CFO; CTX; CLO; SZT; ERI; TET; PEN	CIP
<i>P. aeruginosa</i> IC 01	Blood culture	CIP; GAT; GEN; AMI; CFL; CFO; CTX; CPM; CLO; IMP; MER	ATM
<i>P. aeruginosa</i> IC 02	Hepatic secretion	CIP; GAT; GEN; AMI; CFL; CFO; CTX; CPM; CLO; IMP; MER; SZT	ATM
<i>P. aeruginosa</i> IC 03	Tracheal secretion	CIP; GAT; GEN; AMI; CFL; CFO; CTX; CPM; CLO; IMP; MER	ATM
<i>P. aeruginosa</i> IC 04	ND	ND	ND
<i>P.aeruginosa</i> IC 05	Blood culture	CIP; GAT; GEN; AMI; CFL; CFO; CTX; CPM; CLO; ATM; MER; SZT; AMP+SUB	ND
<i>P. aeruginosa</i> IC 06	Tracheal secretion	CIP; GAT; GEN; CFL; CFO; CTX; COM; CLO; ATM; MER; SZT; AMP+SUB	ND
<i>P. aeruginosa</i> IC 10	Abdominal secretion	MAI; CFL; CFO; CTX; CPM; CIP; GEN; TOB; ATM; IMP; MER; SZT	ND
<i>P. aeruginosa</i> IC 12	Urine	AMI; CFL; CFO; CTX; CPM; CIP; GENT; TOB; ATM; IMP; MER; SZT; NIT; NAL; CLO; TET	ND
<i>P. aeruginosa</i> IC 13	Urine	CFL; CFO; CTX; CIP; GEN; TOB; SZT; NIT; NAL; CLO; TET; NOR	MER
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	ATCC	ND	ND
<i>S. choleraesuis</i> ATCC 14028	ATCC	ND	ND
<i>S. Enterica</i> UFPEDA 415	Collection UFPEDA	ND	ND
<i>S. Enterica</i> Rubislaw 3373	IC	ND	ND
<i>S. Enterica</i> Saintpaul 391	IC	ND	ND
<i>C. albicans</i> SIBELE	Vaginal secretion	ND	ND
<i>C. albicans</i> IC AM 01	Vaginal secretion	ND	ND
<i>C. albicans</i> IC AM 02	Vaginal secretion	ND	ND
<i>C. albicans</i> IC AM 03	Vaginal secretion	ND	ND
<i>C. albicans</i> IC AM 04	Vaginal secretion	ND	ND
<i>C. albicans</i> IC AM 05	Vaginal secretion	ND	ND
<i>C. albicans</i> IC AM 07	Vaginal secretion	ND	ND
<i>C. albicans</i> IC 03	Oral cavity	ND	Miconazol
<i>C. albicans</i> IC 25	Oral cavity	ND	Miconazol
<i>C. krusei</i> UFPEDA1002	ND	ND	ND

AMI: amikacin 30 µg; AMOX: Amoxicillin 10 µg; AMP: Ampicillin 10 µg; AMP+SUB: Ampicillin / Subctam 10 µg/ 10 µg; ATM: Aztreonam 30 µg; AZI: azithromycin 15 µg; CFL: Cephalothin 30 µg; CFO : Cefoxitin 30 µg; CIP: Ciprofloxacin 5 µg; CLO: Chloramphenicol 30 µg; CPM: Cefepime 30 µg; CTX: Cefotaxime 30 µg; ERI: erythromycin 15 µg; GAT: gatifloxacin 10 µg; GEN: gentamicin 10 µg; NAL: Acid nalidixic 30 µg; NIT: Nitrofurantoin 30 µg; NOR: Norfloxacin 10 µg; IPM: Imipenem 10 µg, MER: meropenem 10 µg; Teic: teicoplanin 30 µg; TET: Tetracycline 30 µg; TOB: Tobramycin 10 µg; SZT: sulfazotrim 25 µg; VAN: vancomycin 30 µg. ATCC: American Type Culture Collection. CI: Isolated clinical. ND: Not determined.

Table 2: Determination of the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) for the bark extracts obtained of the *Hymenaea stigonocarpa*.

Micro-organisms	Tested numbers	MIC ($\mu\text{g/mL}$)					
		Cyclohexane extract		Ethyl acetate extract		Hydroalcoholic extract	
		MIC ₅₀	Intervals	MIC ₅₀	Intervals	MIC ₅₀	Intervals
<i>Staph. aureus</i>	10	7,81	7,81-125	7,81	7,8-125	7,81	7,81-250
<i>Ps. aeruginosa</i>	10	500	500-1000	1000	500-1000	500	500-1000
<i>Sh. sonnei</i>	5	250	250	250	250-500	250	250-500
<i>Salm. enterica</i>	4	250	250	500	250-500	500	250-500
<i>E. coli</i>	1	500	500	500	500	500	500
<i>Candida</i>	10	500	500	500	250-500	500	500

MIC: Minimal Inhibitory Concentration; CIM₅₀: Minimal Inhibitory Concentration that inhibits 50% of the micro-organisms.

Table 3: Determination of CI₅₀ for the bark extracts of *Hymenaea stigonocarpa* at the NCI-H292 and HEp-2 cells.

Extracts	CI ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	
	HEp-2	NCI-H292
Hydroalcoholic	> 50	> 50
Ethyl acetate	> 50	> 50
Cyclohexane	8,90	21,27
Drug standard: Etoposide	4,8	5,2

CI₅₀: Concentrations that provoked the death of approximately 50% of the cells.

Acknowledgements

The author thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the financial support, to the Pathology and Antibiotics Department by the Federal University of Pernambuco (UFPE).

REFERENCES

Abdel-Kader, M.; Berger, J.M.; Slebodnick, C.; Hoch, J.; Melone, S.; Wisse, J.H.; Werkhoven, M.C.M.; Mamber, S. and Kingston, D.G.I. (2002) Isolation and absolute configuration of enthalimane diterpenoids from *Hymenaea courbaril* from the Suriname rain forest. *J Nat Prod* **65**, 11-15.

Alley, M.C.; Scudiero, D.A.; Monks, A.; Hursey, M.L.; Czerwinski, M.J.; Fine, D.L.; Abbott, B.J.; Mayo, J.G.; Shoemaker, R.H. and Boyd, M.R. (1988) Feasibility of Drug Screening with Panels of Human Tumor Cell Lines Using a Microculture Tetrazolium Assay. *Cancer Research* **48**, 589-601.

Alves, T.M.A.; Silva, A.F.; Brandão, M.; Grandi, T.S.M.; Smânia, E.F.; Smânia, Jr. A. and Zani, C.L. (2000) Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Mem. Isnt. Oswaldo Cruz*, **95**,367-373.

Araújo, J.C.L.V.; Lima, E.O.; Ceballos, B.S.O.; Freire, K.R.L.; Souza, E.L. and Santos Filho, L. (2004) Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. *Rev Patol Trop* **33**, 55-64.

Basile, A.; Giordano, S.; Ricciardi, L.; Ferrera, S.; Montesano, D.; Cobianchi, C.R.; Vuotto, M.L. and Ferrara, L. (2000) Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves. *Fitoterapia*, **71**, 110-116.

Barroso, G.M. (1991) *Sistemática de angiospermas do Brasil*. v.II, Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, Imprensa Universitária.

Soares, C.M.L. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica...

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer (2009) *Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil*/ Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: INCA, 98p. Disponível em <http://www.inca.gov.br>. Acesso: 05 de dezembro de 2009.

Costa, A.F. (1982) *Farmacognosia*. v.III, 2^a edição. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.

Costa, M.C.C.D. and Nascimento, S.C. (2003) Atividade Citotóxica de *Plectranthus barbatus* Andr. (Lamiaceae). *Acta Farm Bonaer* **22**, 155-158.

Cunningh, A.; Martin, S.S. and Langenheim, J.H. (1974) Labd-13-en-8-ol-15-oic acid in trunk resin of Amazonian *Hymenaea courbaril*. *Phytochem* **13**, 256.

Duffy, C.F. and Power, R.F. (2001) Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plants extracts. *Int J Antimicrob Agents* **17**, 527-529.

Eagle, H. (1995) Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Scien* **122**, 501-504.

Felippe Júnior, J. (2004) *Fluidez de membrana: possivelmente o ponto mais fraco das células malignas*. Associação Brasileira de Medicina Complementar. <http://www.medicinacomplementar.com.br/temaMai04.asp>. Acesso: 10 de Janeiro de 2010.

Gonçalves, A.L.; Alves Filho, H. and Menezes, H. (2005) Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. *Arq Inst Biol*, São Paulo, **72**, 353-358.

Hashem, F.A. and Saleh, M.M. (1999) Antimicrobial components of some *Cruciferae* plants (*Diplotaxis harra* Foresk and *Erucaria microcarpa* Bioss). *Phytother Resear* **13**, 329-332.

Soares, C.M.L. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica...

Holetz, F.B.; Pessini, G.L.; Sanches, N.R.; Cortez, D.A.G.; Nakamura, C.V. and Dias-Filho, B.P. (2002) Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **97**, 1027-1031.

Ishibashi, M.; Oda, A, H.; Mitamura, M.; Okuyama, E.; Komiyama, K.; Kawaguchi, H.; Watanabe, T.; Alves, S.M.; Maekawa, T. and Ohtsuk, K. (1999) Casein Kinase II Inhibitors isolated from two Brazilian plants *Hymenaea parvifolia* and *Wulffia baccata*. *Bioorg Med Chem Letters* **9**, 2157-2160.

Lee, Y.T. and Langenheim, J.H. (1975) A systematic revision of the genus *Hymenaea* (Leguminosae; Caesalpinioideae; Detarieae). *Univ Calif Public Botany* **69**, 1-109.

Lima, I.O.; Oliveira, R.A.G.; Lima, E.O.; Souza, E.L.; Farias, N.P. and Navarro, D.F. (2005) Inhibitory effect of some phytochemicals on the growth of yeasts potentially causing of opportunistic infections. *Rev Bras Cienc Farm*, **41**, 188-203.

Loquercio, A.P.; Battistin, A; Vargas, A.C.; Henzel, A. and Witt, N.M. (2005) Antibacterial activity of hydro-alcoholic extract leaves of jambolan (*Syzygium cumini* (L.) Skells). *Cienc Rural*, Santa Maria, **35**, 371-376.

Lorenzi, H. (1992) *Árvores Brasileiras - Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil*. Plantarum, Piracicaba, Brazil.

Maciel, M.R.A. and Neto, G.G. (2006) Um olhar sobre as benzedadeiras de Juruena (Mato Grosso, Brasil) e as plantas usadas para benzer e curar. *Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi Cienc. Human.* Belém **3**, 61-77.

Soares, C.M.L. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica...

Markham, K.R. (1982) *Techniques of flavonoid identification*. London: Academic Press.

Monteiro, J.M.; Albuquerque, U.P., Araújo, E.L. and Amorim, E.L.C. (2005) Taninos: Uma abordagem da química à ecologia. *Quim Nova* **28**, 892–896.

Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**, 55-63.

Murray, P.R.; Rosenthal, K.S.; Kobayashi, G.S. and Pfaller, M.A. (2002) *Microbiologia médica*, 4.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan, 604p.

Nascimento, G.G.F.; Locatelli, J.; Freitas, P.C. and Silva, G.L. (2000) Antimicrobial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Braz J Microbiol* **31**, 247-256.

Neto, G.G. (2006) O saber tradicional pantaneiro: as plantas medicinais e a educação ambiental. *Rev. Eletron. Mestr. Educ. Amb. Fundação UFRG* **17**, 71-89.

Pettit, G. R.; Meng, Y.; Stevenson, C.A.; Doubek, D.L.; Knight, J.C.; Cichacz, Z.; Pettit, R.K.; Chapuis, J.C. and Schmidt, J.M. (2003) Isolation and structure of Palstatin from the Amazon tree *Hymenaea palustris*. *J Nat Prod* **66**, 259-262.

Recio, M.C.; Rios, J.L. and Villar, A.A. (1989) Review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature 1978-1988. *Phytother Res* **3**, 117-125.

Rio, R.G.W. (1996) *Métodos de controle químico de amostras de própolis*. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, SP.

Soares, C.M.L. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica...

Samy, R.P. and Gopalakrishnakone, P. (2008) Therapeutic Potential of Plants as Anti-microbials for Drug Discovery. *eCAM Adv Acc published*, 1-12.

Scalbert, A. (1991) Antimicrobial properties of tannins. *Phytochem* **30**, 3875-3883.

Schaechter, M.; Engleberg, N.C.; Eisenstein, B.I. and Medoff, G. (2002) *Microbiologia: Mecanismo das doenças infecciosas*. 3.ed. Rio de Janeiro:Guanabara, Koogan, 642p.

Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A. and Petrovick, P.R. (2004) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/UFSC.

Tanaka, J.C.A.; Silva, C.C.; Filho, B.P.D.; Nakamura, C.V.; Carvalho, J.E. and Foglio, M.A. (2005) Constituintes químicos de *Luechea divaricata* Mart. (*Tiliaceae*). *Quim Nova* **28**, 834-837.

Valentim, A.P.T. (2006) *Atividade Antimicrobiana, Estudo Fitoquímico e Identificação de Constituintes Apolares do Alburno de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. Ex. Hayne (Jatobá)*. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos) – Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 109p.

Vila Verde, G.M.; Paula, J.R. and Caneiro D.M. (2003) Levantamento etnobotânico das plantas medicinais do cerrado utilizadas pela população de Mossâmedes (GO). *Rev. Bras. Farmacog.*, **13**, 64-66.

Waterman, P.G. and Simon, M. (1994) *Analysis of phenolic plant metabolites*. London: Oxford, Blackwell Scientific Publications, 17-20p.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, podemos concluir que:

- A avaliação fitoquímica da casca do tronco de *Hymenaea stigonocarpa* revelou a presença de taninos hidrolisáveis, flavonóides, terpenos e esteróides, compostos estes com atividades antimicrobianas e antitumorais.
- O extrato hidro-alcóolico apresentou maiores concentrações de flavonóides e de fenóis totais que o extrato acetato de etila.
- Os extratos hidroalcóolico, acetato de etila e ciclohexano apresentaram atividade antimicrobiana frente às cepas utilizadas, sendo esse último o mais ativo.
- *Staphylococcus aureus* foram as mais sensíveis dentre os microrganismos estudados.
- O extrato ciclohexano foi o único que apresentou potencial antitumoral *in vitro* contra as células NCI-H292 e HEP-2, principalmente contra HEP-2.
- O presente estudo com *Hymenaea stigonocarpa* demonstrou a presença de metabólitos secundários com conhecida atividade biológica, revelando ainda o grande potencial antimicrobiano e antineoplásica dessa espécie vegetal na pesquisa de novos fitoterápicos.

*Referências
bibliográficas*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-KADER, M.; BERGER, J.M.; SLEBODNICK, C.; HOCH, J.; MELONE, S.; WISSE, J.H.; WERKHOVEN, M.C.M.; MAMBER, S.; KINGSTON, D.G.I. Isolation and absolute configuration of ent-halimane diterpenoids from *Hymenaea courbaril* from the Suriname rain forest. **Journal of Natural Products**, v.65, n.1, p.11-15, 2002.

AJITH, T.A.; JANARDHANAN, K.K. Cytotoxic and antitumor activities of a polypore macrofungus, *Hellinusrimosus* (Berk) Pilat. **Journal Ethnopharmacology**, v.84, p.157-162, 2003.

ALVES, A.P.N.N.; GUEDES, R.C.; COSTA-LOTUFO, L.V. Modelo experimental de tumor na cavidade oral de ratos com carcinossarcoma de Walker. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 19, n. 4, p. 251-258, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 17, de 24 de Fevereiro de 2000. **Dispõe sobre o registro de Medicamentos Fitoterápicos.**

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Ações de Enfermagem para o Controle do Câncer: Uma proposta para integração ensino-serviço.** Rio de Janeiro: INCA, 2002, 340p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 48, 16 de Março de 2004. **Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos.**

BRASIL. Ministério da Saúde. **Terapias aliadas à medicina convencional são regulamentadas no SUS.** Brasília. Serviço de referência. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2010: Incidência de câncer no Brasil.** Instituto Nacional do Câncer (INCA). Rio de Janeiro, 2009.

BOFFETTA, P.; FREDRICK, N. Contribution of environmental factors to cancer risk. **British Med. Bulletin**, v. 68, p. 71-94, 2003.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v.33, n.2, p.179-189, 2000a.

CALIXTO, J.B. Estudo farmacológico pré-clínico de plantas medicinais. In: YUNES, R. A; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais: sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, p.500, 2000b.

CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v.55, n.3, p.37-39, Jul./Set, 2003.

COELHO DE SOUZA, G.; HAAS, A.P.S.; VON POSER, G.L.; SCHAPOVAL, E.E.S.; ELISABETSKY, S. Ethnopharmacological studies antimicrobial remedies in the South of Brazil. **Journal Ethnopharmacology**, v.90, p.135-143, 2004.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**. v.III, 2^a edição. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1982.

COSTA, M.C.C.D.; NASCIMENTO, S.C. Atividade Citotóxica de *Plectranthus barbatus* Andr. (Lamiaceae). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.22. n.2, p.155-158, 2003.

DAVID, J.P.L.; DAVID, J.M. Plantas medicinais. Fármacos derivados de plantas. In: Silva, P. **Farmacologia**. Ed.Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ; p.134-145, 2002.

EAGLE, H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. **Science**, v. 122, n. 3168, p. 501-504, 1995.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In:SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 5. ed. rev. atual. Porto Alegre / Florianópolis: UFRGS / UFSC, p. 87-99, 2003.

ELISABETSKY, E.; SOUZA, G.C. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: SIMÕES,, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5^a ed., ver. amp. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2004.

ENGERS, R.; GABBERT, H. E. Mechanisms of tumor metastasis: cell biological aspects and clinical implications. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v.126, p.682-692, 2000.

FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**, 4.ed. Indianapolis, In: Wiley Liss, 2000.

GILANI, A. U. H.; RAHMAN, A. Trends in ethnopharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 43-49, 2005.

GOODMAN, L.S; GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10ª ed., Rio de Janeiro:McGraw Hill, 2003.

GOODMAN, A.G.; HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006. 1821p.

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES,, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5ª ed., Revista e ampliada, Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/UFSC, 2004.

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. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, n.7, p.1027-1031, 2002.

KIDD, P. M. The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment. **Alternative Medicine Review**, v. 5, p. 4-27, 2000.

LOQUERCIO, A.P.; BATTISTIN, A.; VARGAS, A.C.; HENZEL, A.; WITT, N.M. Antibacterial activity of hydro-alcoholic extract leaves of jambolan (*Syzygium cumini* (L.) *Skells*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.2, p.371-376, 2005.

MARKHAM, K.R. **Techniques of flavonoid identification**. Academic Press, London, 1982.

MARSAIOLI, A.J. Diterpenes in the bark of *Hymenaea courbaril*. **Phytochemistry**, v.14, p.1882-1883, 1975.

MEDEIROS, E.A.S.; WEY, S.B. Diretrizes para a prevenção e o controle de infecções relacionadas à assistência à saúde. **Comissão de Epidemiologia Hospitalar**, Hospital São Paulo. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, p.120, 2005.

MIRANDA, M.C.; PÉREZ, F.; ZULUAGA, T.; OLIVERA, M.R.; CORREA, A.; REYES, S.L.; VILLEGAS, M.V. Resistência a antimicrobianos de bacilos Gram negativos em unidades de cuidado intensivo nos hospitais de Colômbia. **Biomédica**. Bogotá, v.26, n.3, p.424-433, 2006.

MORIER, L.; PÉREZ, L.; CANCIO, R.; SAVÓN, C.; GONZÁLEZ, Z.; GOYENECHEA, A. Comparación de la línea NCI-H292 com otras líneas continuas para la multiplicación de virus respiratorios. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v.48, n.3, 1996.

MOSMANN, 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.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; KOBAYASHI, G.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia médica**, 4ª ed., Rio de Janeiro, Editora Guanabara-Koogan, p.604, 2002.

NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C.; SILVA, G.L. Antimicrobial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**. São Paulo, v.31, n.4, p.247-256, 2000.

NETO, V.A.; LEVI, G.C.; LOPES, H.V.; MENDONÇA, J.S.; BALDY, J.L.S. **Antibióticos na prática médica**. 5ª ed. Revista e Ampliada. São Paulo, Editora Roca, 2000.

OMS – **Basic document for the selection and characterization of medicinal plants (vegetable drugs)**, 1978.

PERON, A.P.; FELIPES, J.MATTGE, G.I.; CANTAGALLI, L.B.; MARIUCCI, R.G.; VICENTINI, V.E.P. Avaliação mutagênica das plantas medicinais *Baccharis trimera* Less. E *Solanum melongena* L. em células de medula óssea de ratos *Wistar*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 6, n. 2, p. 127-130, 2008.

PETTIT, G. R.; MENG, Y.; STEVENSON, C.A.; DOUBEK, D.L.; KNIGHT, J.C.; CICHACZ, Z.; PETTIT, R.K.; CHAPUIS, J.C.; SCHMIDT, J.M. Isolation and structure of Palstatin from the Amazon tree *Hymenaea palustris*. **Journal of Natural Product**, v.66, p.259-262, 2003.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2007.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v.39, p.603-613, 2001.

RATNER, B.D.; BRYANT, S.J. Biomaterials: where we have been and where we are going. Annual. **Review Biomedical Engineering**, v. 6, p. 41-75, 2004.

RIO, R.G.W. **Métodos de controle químico de amostras de própolis**. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

SAMY, R.P.; GOPALAKRISHNAKONE. Therapeutic Potential of Plants as Anti-microbials for Drug Discovery. **eCAM Advance Access published**, p.1-12, 2008.

SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PALAZZO DE MELLO, J.C.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Eds.). **Farmacognosia - da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS/Ed.da UFSC, p.323-354, 2000.

SANTOS, S.C.; MELLO, J.C.P. Taninos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PALAZZO DE MELLO, J.C.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Eds.). **Farmacognosia - da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS/Ed.da UFSC, p.614-656, 2004.

SIANI, C. **Desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos: plataforma metodológica**. Scriptorio: Rio de Janeiro, 2003.

SILVA, R.C. Projeto de Lei nº 174, 2005. **Instituto Brasileiro de Plantas Mediciniais**, ano1, n.2, 2006. Disponível em: <http://www.ibpm.org.br/fitoterapia.shtml> acessado em 29/05/2008.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5ª ed., Revista e ampliada, Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/UFSC, 2004.

SUFFREDINI, I.B. As bases fisiológicas do cancer e a pesquisa de novos antineoplásicos: a importância da biodiversidade brasileira. **Revista do Instituto de Ciência da Saúde**, v.20, n.2, p.103-115, 2002.

TANAKA, J.C.A.; SILVA, C.C.; FILHO, B.P.D.; NAKAMURA, C.V.; CARVALHO, J.E.; FOGLIO, M.A. Constituintes químicos de *Luechea divaricata* Mart. (*Tiliaceae*). **Química Nova**, v.28, n.5, p.834-837, 2005.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.33, n.3, p.43-46, 2000.

VEIGA JÚNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Química nova**, v.28, n.3, p.519-528, 2005.

VENDRUSCOLO, G.S.; RATES, S.M.K.; MENTZ, L.A. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.4, p. 361-372, 2005.

VERPOORTE, R.; VAN DER HEIJDEN, R.; MEMELINK, J. Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. **Transgenic Research**, v.9, p.323-343, 2000.

VICKERY, M. L.; VICKERY, B. **Secondary Plant Metabolism**. The Macmillan Press Ltd., Hong Kong, 1981.

YUNES, A.R.; CECHINEL FILHO, V.; PEDROSA, R.C. Fármacos e Fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química nova**, v.24, n.1, p.147-152, 2001.

WANNMACHER, L. Antimicrobianos em dermatologia. In: **Uso racional de medicamentos: temas relacionados**, Brasília, v.3, n.12, 2006.

WATERMAN, P.G.; SIMON, M. **Analysis of phenolic plant metabolites**. Oxford, Blackwell Scientific Publications, London, 1994, p.17-20.

WIKIPÉDIA. A enciclopédia livre. Paclitaxel. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Plactaxel>. Acesso em: 05 de dezembro de 2009.

Anexos

ANEXO A: Certificado de apresentação de trabalho no 25º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA.



XIII SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICOBACTÉRIAS
III SIMPÓSIO DE COLEÇÕES DE CULTURAS
II SIMPÓSIO DE ESCHERICHIA COLI "LUIZ RACHID TRABULSI"

Certificado

Certificamos que o trabalho "ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE HYMENAEA STIGONOCARPA FRENTE A MICRORGANISMOS MULTIDROGA RESISTENTES" com a autoria de: SOARES C., NASCIMENTO, M., AZEVEDO-XIMENES, E. foi apresentado na forma de pôster durante o "25º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA" em 10 de Novembro de 2009, em Porto de Galinhas-PE.

Porto de Galinhas, 12 de novembro de 2009.

Marina Baquerizo Martinez
Presidente da SBM

Carlos Pelleschi Taborda
1º Secretário da SBM

ANEXO B: Recebimento do artigo de revisão pela Revista Brasileira de Farmácia para avaliação e publicação.



**REVISTA
BRASILEIRA DE
FARMÁCIA**

Órgão Oficial da Associação Brasileira de Farmacêuticos

ISSN 0370-372x e ISSN 2176-0667

Rio de Janeiro, 12 de fevereiro de 2010

Prezada Professora Carla Michella Leal Soares, comunicamos o recebimento do trabalho intitulado: “*Hymenaea stigonocarpa*: Uma revisão botânica, química e etnofarmacológica”, do qual a senhora é a autora correspondente. O trabalho recebeu o N° 289/2010 e foi encaminhado para os revisores da *Revista Brasileira de Farmácia*, que farão uma análise a fim de orientar o parecer do corpo editorial. Tão logo tenhamos uma resposta, entraremos em contato.

Atenciosamente,

Comissão Editorial

Revista Brasileira de Farmácia

ANEXO C: Recebimento do artigo de revisão pela Revista Applied Microbiology para avaliação e publicação.

Manuscript submitted - Applied Microbiology LAM-2010-0678

From: "kbrister@wiley.com" <kbrister@wiley.com>

To: clealsoares@yahoo.com.br

Date Sent: 23-Apr-2010

Dear Dr^a Soares

Your manuscript has been successfully submitted.

As submitting author, you will receive future communications via email. Please make a note of your manuscript number: LAM-2010-0678

If you provided details of co-authors during your manuscript submission, they will also receive an email containing this manuscript reference number as confirmation that you have successfully submitted the manuscript online.

You can keep track of your manuscript by logging on periodically to Applied Microbiology ScholarOne Manuscripts at:

<http://mc.manuscriptcentral.com/appliedmicrobiology>

The summary status of your manuscript will be displayed in your Author Centre. Should you have any queries please contact:

jam@wiley.com (JAM)

or

lam@wiley.com (LAM)

Thank you for your submission.

Regards

Kathy Brister
Managing Editor