



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



NAIR SILVA MACÊDO

**AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DE BOMBA DE EFLUXO PELOS EXTRATOS
ETANÓLICO DE *Libidibia ferrea* (MART. EX TUL.) L.P.QUEIROZ SOBRE
Staphylococcus aureus E SUA TOXICIDADE EM *Drosophila melanogaster***

Recife

2022

NAIR SILVA MACÊDO

AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DE BOMBA DE EFLUXO PELOS EXTRATOS ETANÓLICO DE *Libidibia ferrea* (MART. EX TUL.) L.P.QUEIROZ SOBRE *Staphylococcus aureus* E SUA TOXICIDADE EM *Drosophila melanogaster*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas

Área de concentração: Biotecnologia e Bionfórmática

Orientador (a): Dr^a. Marcia Vanusa da Silva

Coorientador (a): Dr. Francisco Assis Bezerra da Cunha

Recife

2022

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Macêdo, Nair Silva

Avaliação da inibição de bomba de efluxo pelos extratos etanólico de *Libidibia ferrea* (Mart. Ex. Tul) LP. Queiroz sobre *Staphylococcus aureus* e sua toxicidade em *Drosophila melanogaster* / Nair Silva Macêdo. - 2022.

113 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Marcia Vanusa da Silva.

Coorientador: Prof. Dr. Francisco Assis Bezerra da Cunha.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2022.

Inclui referências.

1. Plantas medicinais. 2. Agentes anti-infecciosos. 3. Toxicologia. I. Silva, Marcia Vanusa da (orientadora). II Cunha, Francisco Assis Bezerra da (coorientador). III. Título.

581.634

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-068-2022

NAIR SILVA MACÊDO

AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DE BOMBA DE EFLUXO PELOS EXTRATOS ETANÓLICO DE *Libidibia ferrea* (MART. EX TUL.) L.P.QUEIROZ SOBRE *Staphylococcus aureus* E SUA TOXICIDADE EM *Drosophila melanogaster*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 02/02/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Marcia Vanusa da Silva (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof^o. Dr. Thiago Henrique Napoleao (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof^o. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho (Examinador Externo)
Universidade Regional do Cariri - URCA

Dedico à minha mãe, Antônia, *in memorian*.

Luz da minha vida!

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) que apoiou e financiou a realização do presente trabalho.

Gratidão a Deus por me conceder saúde, força, coragem e perseverança para enfrentar os dias difíceis, principalmente durante a pandemia do novo Coronavírus, por ouvir as minhas orações e iluminar os meus caminhos. Agradeço a minha família, especialmente as minhas irmãs, Fabiana, Samara e Sandra que sempre me apoiaram e me forneceram suporte para que eu chegasse nessa fase de conclusão de mestrado. Ao meu pai, José pela companhia de todas as noites, e ao meu cunhado, Ricardo por sempre está disposto a ajudar.

Sou grata a minha orientadora, Prof. Dra. Marcia Vanusa da Silva por todo o acompanhamento durante o mestrado e a realização das atividades, dando todo auxílio necessário para realização do projeto de pesquisa e pela confiança a me dada para que eu pudesse realizar a minha pesquisa em parceria com Universidade Regional do Cariri – URCA. A URCA eu agradeço por toda a estrutura física fornecida para a realização dos ensaios microbiológicos e toxicológicos. Sou grata ao meu co-orientador, Prof. Dr. Francisco Assis Bezerra da Cunha por ter me proporcionado assistência para realização das pesquisas e pelos conhecimentos científicos compartilhados.

Gratidão a toda equipe do Laboratório de Bioprospecção do Semiárido e Métodos Alternativos – LABSEMA da URCA que me auxiliaram durante o desenvolvimento do projeto de pesquisa. A Cristina, Joycy, Henrique, Suieny e Raimundo Luiz pela amizade, pelo incentivo e por sempre estarem dispostos a ajudar.

Gratidão ao meu namorado e melhor amigo, Cícero por me fornecer apoio e pelo companheirismo construído durante essa trajetória, pelas palavras de conforto e incentivo em meio a situações difíceis e por todo seu amor. Aos meus amigos, Karolina e Lucas pelo apoio durante esses dois anos de mestrado e por todas as nossas histórias compartilhadas desde a graduação. A minha grande amiga Zildene, que foi minha companheira de graduação e de mestrado, que me proporcionou muito ensinamentos e momentos de alegria.

RESUMO

Libidibia ferrea (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz é uma espécie arbórea, encontrada no domínio fitogeográfico Caatinga que tem sido relatada na literatura como anti-inflamatória, cicatrizante, analgésica, antioxidante e antibacteriana. Diante disso, o objetivo do presente estudo foi avaliar a composição química dos extratos etanólicos das folhas e entrecascas de *Libidibia ferrea*, bem como, verificar a sua atividade antibacteriana e como potencial inibidor da bomba de efluxo TetK em cepas de *Staphylococcus aureus*, além de investigar a toxicidade dos extratos em modelo de *Drosophila melanogaster*. Foi realizada a análise e quantificação dos marcadores dos extratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram realizados ensaios de microdiluição em caldo. A avaliação da inibição da bomba de efluxo foi realizada através da modificação da CIM dos antibióticos e do brometo de etídio. Enquanto que ensaios de mortalidade e geotaxia negativa foram utilizados para verificar a toxicidade dos extratos em *D. melanogaster*. Foram encontrados nas análises por CLAE taninos hidrolisáveis (ácido gálico e ácido elágico) e flavonóides. Os extratos não apresentaram atividade antibacteriana, demonstrando uma CIM $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$, entretanto o extrato etanólico das folhas diminuiu a CIM do antibiótico de $64 \mu\text{g/mL}$ para $16 \mu\text{g/mL}$, porém esse efeito não está associado à inibição de bomba de efluxo. Os extratos não demonstraram toxicidade em modelo de *D. melanogaster*. Esse é o primeiro estudo que avalia a atividade antibacteriana de extratos de *L. ferrea* sobre a cepa IS-58 de *S. aureus*, como também é o primeiro a investigar sua toxicidade utilizando *D. melanogaster*. Em face dos resultados, são necessários novos estudos para determinar os mecanismos de ação do extrato com outros antibióticos.

Palavras-chave: Fabaceae; Compostos fenólicos; Atividade antimicrobiana; Toxicidade;

ABSTRACT

Libidibia ferrea (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz is a tree species, found in the phytogeographic domain Caatinga that has been reported in the literature as anti-inflammatory, healing, analgesic, antioxidant and antibacterial. Therefore, the objective of this study was to evaluate the chemical composition of ethanolic extracts from the leaves and between the bark of *L. ferrea*, as well as to verify its antibacterial activity and as a potential inhibitor of the TetK efflux pump in strains of *Staphylococcus aureus*, and to investigate the toxicity of the extracts in a *Drosophila melanogaster* model. The analysis and quantification of the extracts' markers by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was performed. To determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), broth microdilution assays were performed. Evaluation of efflux pump inhibition was performed by modifying the MIC of antibiotics and ethidium bromide. While mortality and negative geotaxis assays were used to verify the toxicity of the extracts in *D. melanogaster*. Hydrolysable tannins (gallic acid and ellagic acid) and flavonoids were found in the CLAE analyses. The extracts showed no antibacterial activity, demonstrating an MIC \geq 1024 μ g/mL, however the ethanolic extract of the leaves decreased the MIC of the antibiotic from 64 μ g/mL to 16 μ g/mL, however this effect is not associated with efflux pump inhibition. The extracts showed no toxicity in a *D. melanogaster* model. This is the first study to evaluate the antibacterial activity of *L. ferrea* extracts on the IS-58 strain of *S. aureus*, as well as the first to investigate its toxicity using *D. melanogaster*. In view of the results, further studies are needed to determine the mechanisms of action of the extract with other antibiotics.

Keywords: Fabaceae; Phenolic compounds; Antimicrobial activity; Toxicity;

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Introdução

- Figura 1 – (A) Planta inteira de *L. ferrea* e (B) Folha composta com folíolos alternados 14

Referencial Teórico

- Figura 2 – Representação dos mecanismos de resistência bacteriana 20

Artigo 1

- Figura 1 – Estruturas químicas dos principais fitoconstituintes de *C. ferrea* 42

Artigo 2

- Figura 1 – Cromatograma da amostra EEELF e espectro de varredura dos picos observados em 270 nm 92

- Figura 2 – Cromatograma da amostra EEFLF e espectro de varredura dos picos observados em 270 nm 93

- Figura 3 – Efeito da combinação do EEFLF e do EEELF com o antibiótico tetraciclina sobre a cepa IS-58 de *S. aureus* portadora da bomba de efluxo TetK. O cianeto de carbonilo *m*-clorofenilidrazona (CCCP) e a Clorpromazina são inibidores padrão 94

- Figura 4 – Efeito da combinação do EEFLF e do EEELF com o brometo de etídio sobre a cepa IS-58 de *S. aureus* portadora da bomba de efluxo TetK. O cianeto de carbonilo *m*-clorofenilidrazona (CCCP) é um inibidor padrão 95

- Figura 5 – Ensaio de geotaxia negativa utilizando o modelo *D. melanogaster* 96

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Tabela 1 –	Resumo das características botânicas de <i>Libidibia ferrea</i>	31
Tabela 2 –	Usos tradicionais de <i>C. ferrea</i> para a cura de doenças	33
Tabela 3 –	Classes químicas ou constituintes encontrados nos extratos de <i>C. ferrea</i>	38
Tabela 4 –	Bioatividades avaliadas com diversos extratos de <i>C. ferrea</i>	47
Tabela 5 –	Atividades biológicas de compostos isolados a partir de extratos de <i>C. ferrea</i>	55

Artigo 2

Tabela 1 –	Teores de ácido gálico e ácido elágico dos extratos de <i>L. ferrea</i>	94
------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	ATP <i>Binding Cassette</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BHIA	<i>Brain Heart Infusion Agar</i>
BOD	<i>Biochemical Oxygen Demand</i>
CAQs	Compostos de Amônio Quaternário
CCCP	Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CPMZ	Clorpromazina
CT	Colesterol Total (CT)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EEELF	Extrato Etanólico das Entrecascas de <i>Libidibia ferrea</i>
EEFLF	Extrato Etanólico das Folhas de <i>Libidibia ferrea</i>
EtBr	<i>Etidium bromide</i>
GC-MS	Thin-layer Chromatography and Gas Chromatography - Mass Spectrometry
HCDAL	Herbário Cariense Dárdano de Andrade Lima
HDL-C	<i>High Density Lipoprotein Cholesterol</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HPLC-DAD	<i>High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection</i>
HPLC-MS	<i>High-Performance Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry</i>
HPTLC	<i>High-Performance Thin Layer Chromatography</i>
IBEs	Inibidores de Bombas de Efluxo
IL-1 β	Interleucina 1 beta
LC-HRMS/MS	<i>Liquid Chromatography-High Resolution Tandem Mass Spectrometry</i>
LC-MS/MS	Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry
LDL-C	Colesterol lipoproteína de baixa densidade
MATE	<i>Multidrug and Toxic Compound Extrusion</i>

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MDA	Malondialdeído
MDR	<i>Multidrug-resistant Microorganisms</i>
MFS	<i>Major Facilitator Superfamily</i>
NaOH	Hidróxido de Sódio
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
PACE	<i>Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux</i>
RAM	Resistência Antimicrobiana
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RND	<i>Resistance Nodulation Division</i>
RP-HPLC	<i>Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography</i>
SMR	<i>Small Multidrug Resistance</i>
TG	Triglicerídeos
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente à Meticilina
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UV	Ultravioleta
ABTS	2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline)
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazílico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	16
2.1	GERAL	16
2.2	ESPECÍFICOS	16
3	REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	17
3.1.1	Resistência Bacteriana aos Antibióticos	18
3.1.2	Bombas de Efluxo	21
3.1.3	Bomba de Efluxo TetK	24
3.2	PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DOS PRODUTOS NATURAIS COMO MODIFICADORES DA RESISTÊNCIA BACTERIANA	25
3.3	TOXIDADE DE PRODUTOS NATURAIS E OS MODELOS ALTERNATIVOS UTILIZADOS NOS ENSAIOS DE TOXIDADE	26
2.3.1	<i>Drosophila melanogaster</i>	26
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1	ARTIGO 1	28
4.2	ARTIGO 2	83
5	CONCLUSÃO	104
4	SÚMULA CURRICULAR	104
	REFERÊNCIAS	106

1 INTRODUÇÃO

O aumento do surgimento de cepas bacterianas resistentes a antibióticos existentes no mercado se deve ao uso inadequado e excessivo dessas drogas. Além disso, outro fator que colabora para o aumento da Resistência Antimicrobiana (RAM) é a contaminação do meio ambiente através do descarte inadequado de antibióticos, contribuindo efetivamente para disseminação da resistência bacteriana a antibióticos largamente utilizados na clínica, como os aminoglicosídeos, clorofenicol e β -lactâmicos (BOTTERY; PITCHFORD; FRIMAN, 2021).

Associado a esses fatores, outro contribuinte para o aumento da RAM foi o surgimento da pandemia de Covid-19, devido ao aumento do uso de antibióticos em decorrência de dois fatores: primeiro, pacientes infectados com COVID-19 podem apresentar sintomas equivalentes a uma pneumonia bacteriana; segundo, podem surgir co-infecções secundárias em pacientes infectados com o SARS-CoV-2 que necessitam de antibióticos para o tratamento, além dos tratamentos inadequados (KNIGHT et al., 2021; TOMCZYK et al., 2021).

As bombas de efluxo são caracterizadas como proteínas transmembrana que estão presentes em bactérias Gram-positivas e em Gram-negativas, são um importante mecanismo de resistência existentes nos microorganismos, promovendo o efluxo ativo de substâncias tóxicas para o exterior da célula bacteriana, incluindo os antibióticos, além de desempenharem um papel importante na manutenção da fisiologia desses microorganismos (BAMBEKE et al., 2003; HERNANDO-AMADO et al., 2016).

Dentre os microorganismos que possuem bombas de efluxo está *Staphylococcus aureus*, inserido na família Micrococcaceae e pertencente aos grupos dos cocos Gram-positivos, podendo causar infecções como furúnculos, celulite, síndrome da pele escaldada e osteomielite quando está presente em desequilíbrio nos seres humanos, principalmente em pessoas imunocomprometidas (MALAK et al., 2020; SPAULDING et al., 2013).

S. aureus possui bombas de efluxo que estão distribuídas em seis famílias, a saber: (1) Família de Extrusão de Compostos Tóxicos e Multidrogas (*Multidrug and Toxic Compound Extrusion* - MATE), (2) Superfamília Facilitadora (*Major Facilitator Superfamily* - MFS), (3) Família de Resistência a Multidrogas (*Small Multidrug Resistance* - SMR), (4) Superfamília de Divisão de Nodulação de Resistência

(*Resistance Nodulation Division* - RND), (5) Superfamília de Cassete de Ligação de Adenosina Trifosfato (ATP) (*ATP Binding Cassette* - ABC) e (6) Família de Efluxo de Compostos Antimicrobianos Proteobacteriano (*Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux* - PACE) (HASSAN et al., 2013, 2018; PIDDOCK, 2006).

A bomba de efluxo TetK está inserida na família MFS, a qual utiliza a força do gradiente de prótons para o seu funcionamento. Essa bomba de efluxo é codificada pelo pT181 e confere resistência à tetraciclina, onde o efluxo ativo desse antibiótico promove a diminuição da sua concentração no interior da célula bacteriana, fazendo com que a sua concentração seja insuficiente para inibir a atividade dos ribossomos (CHOPRA; ROBERTS, 2001; GUAY; KHAN; ROTHSTEIN, 1993).

Para o enfretamento da RAM é necessária a investigação de novas substâncias com potencial antimicrobiano. Dentre essas substâncias, estão os produtos naturais provenientes das plantas, a exemplos, os extratos vegetais, óleos essenciais e os fitoquímicos presentes nas diversas partes das plantas, como as folhas, flores, cascas, caules e sementes (BALTA et al., 2021).

Libidibia ferrea (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz (Figura 1), também conhecida pela sua sinonímia *Caesalpinia ferrea* e pelos nomes populares de Jucá e Pau-ferro, está distribuída nos domínios fitogeográficos Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica e pertence à família Fabaceae, sendo uma espécie leguminosa e arbórea nativa e endêmica do Brasil (FLORA DO BRASIL, 2020).

Figura 1: (A) Planta inteira de *L. ferrea* e (B) Folha composta com folíolos alternados



Fonte: Autora

Na medicina popular, as folhas, frutos, sementes, raízes, cascas e entrecasca de *L. ferrea* são bastante utilizadas como: anti-inflamatório, cicatrizante, como também para o tratamento de distúrbios causados no sistema respiratório, como por exemplo, tosse, dor de garganta, asma, bronquite, sinusite, além de ser utilizada como antimalárico, analgésico, vermífugo, dentre outros (DE DAVID; PASA, 2015;

GONÇALVES; PASA, 2015; KFFURI et al., 2016; PALHETA et al., 2017).

Diante desse vasto uso na medicina popular, na literatura existem diversos estudos que avaliam as potenciais propriedades biológicas e análise química dessa espécie. Dentre as propriedades biológicas de *L. ferrea* documentadas na literatura estão atividade antibacteriana contra cepas patogênicas de *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus* e espécies do gênero *Streptococcus*, como também, atividade antifúngica sobre espécies do gênero *Candida* (CONDE et al., 2015; LUNA et al., 2020; SOARES et al., 2018a).

Análises fitoquímicas de extratos aquosos, etanólicos, alcoólicos, metanólicos e hexânico das folhas, cascas, frutos e vagens de Pau-ferro demonstraram a presença de ácidos fenólicos como os ácidos elágico e o gálico como os constituintes majoritários, além da presença de kaempferol, catequina, epicatequina, quercetina, Rutina, entre outros (FALCÃO et al., 2019a; GUERRA et al., 2017; LEANDRO et al., 2019; PEDROSA et al., 2016).

Esses compostos fenólicos presentes nos extratos de *L. ferrea* estão inseridos em uma classe química caracterizada por possuir um ou mais anéis aromáticos associados a um ou mais grupos hidroxila (OZCAN et al., 2014). A composição fitoquímica dos produtos naturais provenientes das plantas está associada diretamente aos seus efeitos terapêuticos, incluindo os antimicrobianos (BALTA et al., 2021).

A investigação da toxicidade desses produtos naturais que apresentam atividade antibacteriana é de suma importância para determinar o seu perfil toxicológico, visto que algumas possuem toxicidade sobre células eucarióticas (LI et al., 2021). Dentre os modelos alternativos utilizados para investigar a toxicidade de substâncias, como também para a avaliação do potencial genotóxico, está o artrópode-modelo *Drosophila melanogaster* (CALAP-QUINTANA et al., 2017).

Na literatura não existem estudos que avaliem a atividade antimicrobiana de extratos de *L. ferrea* sobre cepas de *S. aureus* portadoras de bombas de efluxo, bem como, são escassos os estudos sobre a toxicidade de formulações a base de *L. ferrea* sobre o artrópode-modelo *D. melanogaster*.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar os extratos etanólicos da entrecasca (EEELF) e folha (EEFLF) de *Libidibia ferra* quanto à capacidade de inibir a ação da bomba de efluxo presente em *Staphylococcus aureus*, e sua toxicidade sobre *Drosophila melanogaster*.

2.2 ESPECÍFICOS

- Extrair o Extrato Etanólico das Entrecascas (EEELF) e das Folhas (EEFLF) de *Libidibia ferrea*;
- Traçar o perfil fitoquímico do EEELF e EEFLF através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de EEELF e EEFLF sobre a cepa IS-58 de *S. aureus*;
- Analisar a inibição da bomba de efluxo TetK de *S. aureus* dos extratos;
- Avaliar a toxicidade de EEELF e EEFLF sobre o artrópode-modelo *D. melanogaster*;

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus pertence à família Micrococcaceae, mede cerca de 1 µm e é caracterizado como cocos Gram-positivo, bem como é positivo para catalase e coagulase (LOWY, 1998; PLATA; ROSATO; WEGRZYN, 2009; SPAULDING et al., 2013). As bactérias do gênero *Staphylococcus* são anaeróbias facultativas e através da respiração aeróbica produzem energia para manter seu metabolismo, como também realizam processo de fermentação, no qual tem como produto o ácido láctico (PLATA; ROSATO; WEGRZYN, 2009).

Quanto à morfologia de *S. aureus*, a parede celular é caracterizada por apresentar uma estrutura dinâmica e semirrígida, tendo na sua composição uma quantidade maior de peptidoglicano além de ácidos teicóicos e proteínas de superfície. Já o seu genoma é constituído por um cromossomo circular, com transposons, profagos e plasmídeos, sendo esses últimos importantes elementos nos processos de propagação da resistência bacteriana (LOWY, 1998; PLATA; ROSATO; WEGRZYN, 2009).

S. aureus está presente naturalmente nos seres humanos, mas quando ocorre um desequilíbrio pode se tornar um importante patógeno, desencadeando principalmente infecções em pessoas imunocomprometidas (FOSTER, 2005). Esse patógeno pode acometer diversas partes do corpo humano, dentre eles, estão: tecidos moles, ossos, pulmão, coração, trato urinário, intestino e sangue, gerando infecções como furúnculos, celulite, síndrome da pele escaldada, osteomelite, bacteremia, síndrome do choque tóxico, pneumonia, endocardite, infecção do trato urinário, além de intoxicação alimentar através de alimentos contaminados (MALAK et al., 2020; TONG et al., 2015).

Após a infecção por *S. aureus*, o sistema imunológico do hospedeiro irá iniciar um processo de fagocitose através dos neutrófilos e macrófagos, sendo que existem neutrófilos especializados com receptores de complemento e receptores Fcγ que podem reconhecer e fagocitar essa bactéria (LI, 2018; POLLITT et al., 2018).

Essas infecções são decorrentes da presença de fatores de virulência em *S. aureus*, a qual é dependente de alguns fatores, a saber: (1) as proteínas de superfície, responsáveis pelos processos de adesão da bactéria as superfícies das

células do organismo hospedeiro; (2) a capacidade de sintetizar toxinas; (3) a formação de biofilmes que possibilita que as bactérias acessem componentes da matriz extracelular dos tecidos do hospedeiro para produzir a infecção; (4) a proteína A que está presente na parede celular de *S. aureus*; (5) o fator de aglutinação A (ClfA) que está disposto na superfície da célula bacteriana (BIEN; SOKOLOVA; BOZKO, 2011; MALAK et al., 2020; SMITH et al., 2010).

Outro determinante de virulência de *S. aureus* são as bombas de efluxo, utilizadas para eliminar substâncias nocivas à célula bacteriana e contribuem para a formação de biofilmes e participam da resposta ao estresse celular (LAMUT et al., 2019). *S. aureus* apresenta inúmeras bombas de efluxo, dentre elas, estão: MrsA, NorA, QacA/B e TetK (KÖHLER; PECHÈRE; PLÉSIAT, 1999).

Além disso, o surgimento de infecções causadas por cepas de *S. aureus* Resistente a Meticilina (MRSA) dificulta o tratamento com antibióticos existentes no mercado devido apresentar clones multirresistentes e elementos genéticos móveis que codificam os genes *mecA* ou *mecC*, que são responsáveis pela resistência à meticilina, como também, à maioria dos antibióticos β -lactâmicos.

3.1.1 Resistência Bacteriana aos Antibióticos

Em aspectos bioquímicos, o fenômeno de resistência das células bacterianas aos fármacos já existentes no mercado é definido como a inaptidão de uma classe de drogas ou de uma determinada droga específica em inibir o crescimento bacteriano com uma concentração que anteriormente era eficaz (BLANCO et al., 2016).

O aumento da resistência antibacteriana está intimamente associado à utilização de antibióticos não prescritos por um profissional da saúde, ocasionando o uso desmedido e inadequado desses fármacos. Entre os motivos mais frequentes para a aquisição dessas drogas estão: o conhecimento superficial, a busca pelo bem-estar físico, ou seja, o uso de antibióticos para atenuar sintomas causados por infecções bacterianas, além dos determinantes sociais da saúde, os quais estão associados às condições em que um indivíduo está inserido (TORRES et al., 2021). Em decorrência disso, a resistência antibacteriana na era pós-antibiótica consiste em um importante problema de saúde pública, não sendo mais considerada apenas uma

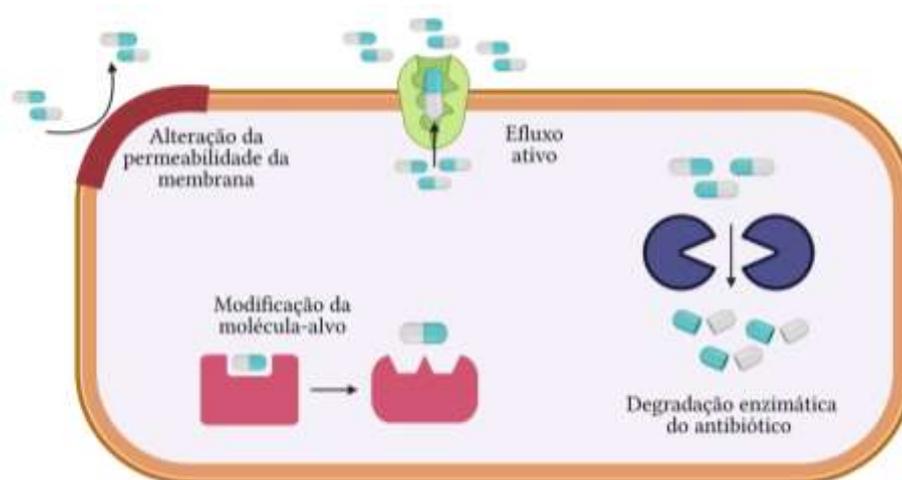
ameaça (TORRES et al., 2021).

Dentre as classes de antibióticos aos quais as bactérias têm apresentado resistência estão os β -lactâmicos, dentre eles destacam-se as penicilinas, cefalosporinas, monobactamas e carbapenêmicos, além de classes como as fluoroquinolonas e aminoglicosídeos, sendo esses fármacos os mais utilizados devido a sua eficácia e segurança (WACHINO; DOI; ARAKAWA, 2020; WATKINS; BONOMO, 2020).

A atividade de elementos genéticos móveis é responsável pela manutenção e dispersão de genes que codificam a resistência antibacteriana a fármacos, como também pela movimentação intracelular do DNA, tanto entre os cromossomos-plasmídeos quanto entre plasmídeos-plasmídeos, além de promover o deslocamento do DNA intercelular (GAMA; ZILHÃO; DIONISIO, 2018; PARTRIDGE et al., 2018). Dentre os processos intercelulares que possibilitam esse deslocamento estão conjugação, transdução e transformação, os quais são realizados através dos plasmídeos e elementos conjugativos integrativos, bacteriófagos e incorporação de DNA extracelular, respectivamente (PARTRIDGE et al., 2018).

Dentre os mecanismos de resistência desenvolvidos pelas bactérias estão: degradação ou alteração enzimática do antibiótico, modificação molecular ou proteção do alvo bacteriano do antibiótico e diminuição da concentração intracelular do antibiótico na célula bacteriana, através da impermeabilidade da membrana externa ou por meio do efluxo ativo de drogas para o exterior na célula (Figura 2) (COSTA et al., 2013; SHRIRAM et al., 2018). Essas alterações enzimáticas e moleculares nas células bacterianas são responsáveis por promover a resposta e neutralização dos antibióticos, sendo adquiridas através da transferência horizontal de genes que codificam a resistência (SHRIRAM et al., 2018).

Figura 2: Representação dos mecanismos de resistência bacteriana



Fonte: elaborada pela autora

Mecanismos como a impermeabilidade da membrana celular bacteriana, a inexistência de alvos moleculares para a ação de uma determinada família de drogas e a atividade do efluxo ativos são exemplos de resistência intrínseca, ou seja, aquela que é produzida por microrganismos que anteriormente não foram expostos a nenhum tipo de fármaco (AYAZ et al., 2019; OLIVARES et al., 2013).

A membrana celular das bactérias é composta por duas camadas, sendo que a camada interna é formada por fosfolipídios, enquanto que a composição da camada externa é principalmente glicolipídeo, sendo mais abundante a presença de lipopolissacarídeos, os quais são responsáveis pelo controle da permeabilidade da membrana, sendo isso atribuído a proteínas denominadas como porinas que formam canais seletivos a moléculas, contribuindo para a elevada resistência da membrana a substâncias desconhecidas, como os antibióticos (HANCOCK, 1997).

Quando o antibiótico consegue entrar na célula bacteriana, outro mecanismo de resistência poder ser acionado, a exemplo, a degradação dos antibióticos, produzindo modificações estruturais e rupturas no seu centro de ação, impossibilitando a sua interação com seu alvo. Esse mecanismo pode estar associado à adição de grupos químicos através dos processos de O-fosforilação, O-ribosilação, O-glicosilação, O-nucleotidililação, O- e N-acetilação (PASCALE; WRIGHT, 2010).

Já a alteração do alvo molecular do antibiótico pode ser desenvolvida através de mutações em importantes elementos de ligação, como por exemplo, o RNA ribossômico, como também pode acontecer por meio da reorganização do

funcionamento das vias metabólicas (WRIGHT, 2005). Tendo em vista que a associação entre um antibiótico e um alvo molecular é muito restrita, modificações em pequenas escalas no alvo podem ser suficientes para impedir a ligação entre o fármaco e o alvo (GIEDRAITIENĖ et al., 2011).

Uma vez que a substância passa pela membrana plasmática da célula bacteriana e entra no citoplasma, o efluxo ativo é o responsável pela expulsão dos antibióticos ou substâncias tóxicas, fazendo com que a concentração intracelular seja insuficiente para impedir a sobrevivência bacteriana (LAMUT et al., 2019). Esse efluxo ativo é promovido pelas bombas de efluxo, as quais serão explicadas na próxima seção.

3.1.2 Bombas de Efluxo

As bombas de efluxo são proteínas que estão presentes em bactérias Gram-positivas e em Gram-negativas, localizadas na membrana citoplasmática e são importantes para manutenção da fisiologia desses organismos, além de promover a função de expelir substâncias tóxicas para o meio extracelular, a exemplo, os antibióticos (BAMBEKE et al., 2003; HERNANDO-AMADO et al., 2016). Isso diminui a concentração do antibiótico no interior da célula necessária para inibir o crescimento bacteriano (TINTINO et al., 2017).

O efluxo ativo está presente em organismos em que a expressão da proteína da bomba de efluxo está elevada ou a proteína sofreu modificações na sequência de aminoácidos, tornando-a mais competente para exportar substâncias. Esses fatores estão fortemente associados aos mecanismos de resistência bacteriana a múltiplas drogas (PIDDOCK, 2006; ZGURSKAYA; NIKAIDO, 2000).

As bombas de efluxo podem ser codificadas por plasmídeos ou cromossomos, apresentar resistência a um tipo de fármaco ou a uma gama de substâncias de diferentes classes, contribuindo assim para o surgimento de cepas Múltidrogas-Resistentes (MDR) (EBBENGAARD; LØBNER-OLESEN; FRIMODT-MØLLER, 2020).

Quanto à classificação das bombas de efluxo são utilizados alguns critérios, como por exemplo, a sua composição, as fontes de energia utilizadas para o seu funcionamento e o número de regiões transmembrana. Dito isso, existem seis famílias de bombas, a saber: (1) Família de Extrusão de Compostos Tóxicos e

Multidroga (*Multidrug and Toxic Compound Extrusion* - MATE), (2) Superfamília Facilitadora (*Major Facilitator Superfamily* - MFS), (3) Família de Resistência a Multidroga (*Small Multidrug Resistance* - SMR), (4) Superfamília de Divisão de Nodulação de Resistência (*Resistance Nodulation Division* - RND), (5) Superfamília de Cassete de Ligação de Adenosina Trifosfato (ATP) (*ATP Binding Cassette* - ABC) e (6) Família de Efluxo de Compostos Antimicrobianos Proteobacteriano (*Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux* - PACE) (HASSAN et al., 2013, 2018; PIDDOCK, 2006).

As bombas de efluxo podem funcionar como transportadores (1) uniporte, onde apenas um soluto é conduzido; (2) simporte, ocorre quando o íon da força motriz e a substância são expelidos pela mesma direção e (3) antiporte é quando o íon e a substância são exportados em direções contrárias (KUMAR et al., 2020; LEKSHMI et al., 2018).

As bombas de efluxo que estão inseridas na família MATE estão presentes em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e utilizam a energia de gradientes de H^+ ou Na^+ por meio da membrana plasmática para expelir substâncias nocivas à célula bacteriana (HE et al., 2010; SCHINDLER; KAATZ, 2016). Uma das bombas mais estudadas dessa família é a MepA de *Staphylococcus aureus*, a qual tem uma ampla capacidade de expulsar Pentamidina, EtBr e biocidas, como também, antibióticos da classe das Fluoroquinolonas, em menor espectro, mas que associado com outros mecanismos de resistência pode acarretar prejuízos nos tratamentos clínicos (KAATZ; MCALEESE; SEO, 2005).

Diferentemente da família MATE, a família MFS utiliza apenas a força do gradiente de prótons para o seu funcionamento, podendo agir como uniportadores, simportadores ou antiportadores, estando presente em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, transportando para o meio extracelular substratos como açúcares, antibióticos, metabólitos, aminoácidos, vitaminas, dentre outros (HOLDSWORTH; LAW, 2012; KUMAR et al., 2016; PAO; PAULSEN; SAIER, 1998). As bombas de efluxo NorA e TetK de *S. aureus* estão inseridas nessa família e conferem resistência às quinolonas e tetraciclina, respectivamente (YOSHIDA et al., 1990).

As proteínas de efluxo da família SMR estão distribuídas entre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, sendo caracterizadas pela presença de homologia e por possuir um tamanho pequeno, visto que há uma variação de 104 a 115 resíduos de aminoácidos (NIKAIDO, 1998). Para realizar o transporte de

compostos de amônio quaternário (QAC) utilizam a força de um gradiente de prótons (BAY; ROMMENS; TURNER, 2008). A primeira proteína da família SMR descoberta em bactérias Gram-positivas foi Sau-Smr de *S. aureus*, conhecida também como Ebr e QacC/D, enquanto que para as bactérias Gram-negativas, tem-se o exemplo do transportador EmrE presente em *Escherichia coli* (YERUSHALMI; LEBENDIKER; SCHULDINER, 1995).

As bombas de efluxo inseridas na família RND estão presentes somente em bactérias Gram-negativas e utilizam a força do gradiente de prótons para expelir antibióticos e fármacos quimioterápicos, sendo caracterizadas por sua morfologia de aspecto tripartido, a qual está presente desde a membrana externa até a membrana interna (NIKAIDO, 2011; NIKAIDO; TAKATSUKA, 2009). Essa estrutura tripartida permite que os compostos sejam expulsos diretamente para o meio extracelular, sem a necessidade de passar pelo periplasma (NIKAIDO; TAKATSUKA, 2009). Proteínas de efluxo da família RND estão presente em *Vibrio cholerae* e são essenciais para expressar fatores de virulência, como a toxina da cólera e o *pilus* co-regulado por toxina (ALVAREZ-ORTEGA; OLIVARES; MARTÍNEZ, 2013).

A estrutura das proteínas de efluxo da família ABC é composta por quatro domínios, sendo que são dois domínios transmembrana responsáveis pela via de movimentação e dois domínios de ligação a nucleotídeos citoplasmáticos que têm como função fazer a hidrólise de ATP, estando associada a fatores de virulência e patogenicidade de bactérias como *Salmonella enterica* e *E. coli* (DAVIDSON et al., 2008; DAWSON; LOCHER, 2006). As bombas de efluxo da família ABC podem importar diversos tipos de compostos, dentre eles, podemos citar: oligossacarídeos, íons orgânicos e inorgânicos, aminoácidos, peptídeos, metais, cátions poliamina e vitaminas, como também podem expulsar substâncias como peptídeos, lipídios, drogas hidrofóbicas, polissacarídeos e proteínas (DAVIDSON et al., 2008).

Estudos indicam que a família PACE foi descoberta em bactérias Gram-negativas através de pesquisas utilizando análises de transcriptômica em *Acinetobacter baumannii*, onde caracterizaram uma proteína de efluxo chamada de Acel, que confere resistência a biocidas, a exemplo da clorexidina e acriflavina (HASSAN et al., 2013, 2018).

3.1.3 Bomba de Efluxo TetK

Os antibióticos do grupo das tetraciclinas foram descobertos na década de 1940 e foram caracterizados como drogas bacteriostáticas de amplo espectro que atuam impossibilitando a ligação do aminoacil-tRNA ao sítio receptor localizado no ribossomo, impedindo, dessa forma, a produção de proteínas (CHOPRA; ROBERTS, 2001). Esse grupo de antibióticos é utilizado até hoje para o tratamento de infecções causadas por microorganismos, principalmente *S. aureus* em animais, incluindo os humanos (ONG et al., 2017).

Com a utilização das tetraciclinas no tratamento de infecções, surgiram cepas resistentes a esse grupo de antibióticos, através da obtenção de elementos de resistência geneticamente móveis, os quais são responsáveis por codificar proteínas de efluxo a tetraciclinas ou proteínas que promovem a proteção do ribossomo, organela alvo da tetraciclina (CHOPRA; ROBERTS, 2001).

São exemplos as cepas de *S. aureus* portadoras da bomba de efluxo TetK, que está inserida na Superfamília Facilitadora (*Major Facilitator Superfamily* - MFS), sendo codificada pelo plasmídeo pT181 e confere resistência as tetraciclinas (GUAY; KHAN; ROTHSTEIN, 1993; KÖHLER; PECHÈRE; PLÉSIAT, 1999).

Na literatura, existem estudos que avaliam a atividade antibacteriana de produtos naturais sobre cepas de *S. aureus* portadoras da proteína de efluxo TetK. Dentre eles está o de Cruz e colaboradores (2020), em que foi avaliado o potencial de dois compostos naturais, α -Bisabolol e β -Ciclodextrina, e observaram que esses compostos não apresentaram atividade antibacteriana direta sobre a cepa IS-58 de *S. aureus* que possuiu a Bomba de efluxo TetK, mas quando os compostos foram associados ao antibiótico tetraciclina houve sinergismo, ou seja, reduziram a CIM da Tetraciclina.

Já Tintino e colaboradores (2018) demonstraram o efeito antibacteriano da menadiona (Vitamina K) sobre essa mesma cepa (IS-58) de *S. aureus* com um valor de CIM de 64 μ g/mL. E quando a menadiona foi associada ao brometo de etídio houve uma redução da CIM do BrEt, indicando inibição do mecanismo de bomba de efluxo, visto que o BrEt é utilizado como um marcador de bomba de efluxo. O óleo essencial das folhas de *Chenopodium ambrosioides* L. também reduziu a CIM do brometo de etídio, demonstrando inibição sobre a TetK (LIMAVERDE et al., 2017).

3.2 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DOS PRODUTOS NATURAIS COMO MODIFICADORES DA RESISTÊNCIA BACTERIANA

Em decorrência do aumento da resistência de microorganismos a antibióticos já utilizados na clínica, têm-se buscado a descoberta de novas substâncias que possuam efeito antibacteriano, dentre elas, estão os produtos naturais oriundos de plantas, como por exemplo, os extratos vegetais, óleos essenciais e os constituintes isolados, além de substâncias provenientes do metabolismo animal e de organismos marinhos (BALTA et al., 2021).

As plantas produzem uma diversidade de compostos químicos que estão envolvidos nos processos de defesa contra agressores ambientais, como insetos, vírus, fungos e bactérias (CHUNG; NAVARATNAM; CHUNG, 2011). Esses compostos podem estar presentes em frutos, folhas, flores, casca, entrecasca e sementes, sendo responsáveis pela cor, sabor, aroma e textura das plantas e estão distribuídos dentro de grupos químicos, como por exemplo, os alcaloides, terpenóides, polifenóis e taninos (BARBIERI et al., 2017).

A composição fitoquímica dos produtos naturais provenientes das plantas está associada diretamente aos seus efeitos terapêuticos, incluindo os antimicrobianos (BALTA et al., 2021). Esses produtos naturais podem ser classificados em três categorias, a saber: (1) produtos naturais originais, (2) produtos oriundos ou fabricados quimicamente de produtos naturais e (3) produtos sintéticos embasados em estruturas de produtos naturais (DEMAIN; SANCHEZ, 2009).

Alguns compostos químicos não apresentam atividade antibacteriana direta, entretanto quando em associação com antibióticos já utilizados na clínica podem apresentar efeito sinérgico sobre bactérias resistentes, ou seja, diminuindo a CIM do antibiótico (AYAZ et al., 2019; SHIN; PRABHAKARAN; KIM, 2018). Os mecanismos de ação utilizados pelos fitoquímicos são: causar danos na membrana bacteriana para interromper o seu funcionamento, inibindo ou prejudicando a produção ou funcionamento de fatores de virulência, como por exemplo, enzimas, proteínas de efluxo e toxinas, além de impedir a formação de biofilmes (BARBIERI et al., 2017).

Os produtos naturais também podem atuar como Inibidores de Bombas de Efluxo (IBEs) e estão presentes em abundância nas plantas terrestres, principalmente nas angiospermas (BROWN et al., 2021). Os IBEs tem ação de bloquear a produção de energia utilizada para o funcionamento das bombas de efluxo por meio da alteração da força motriz utilizada pelo efluxo ativo, perturbação

na hidrólise de ATP ou inibição competitiva ou não competitiva com o substrato de ligação dos gradientes eletroquímicos (SEUKEP et al., 2020).

Dessa forma, os IBEs são moléculas capazes de reestabelecer a sensibilidade de bactérias a determinados antibióticos, pois são capazes de diminuir a resistência de cepas bacterianas aos antibióticos (TINTINO et al., 2017). Além disso, essas substâncias podem ser utilizadas em associação com antibióticos já usados na clínica para desencadear uma ação sinérgica (BAIOMY; SHAKER; ABBAS, 2020).

3.3 TOXICIDADE DE PRODUTOS NATURAIS E MODELOS ALTERNATIVOS UTILIZADOS NOS ENSAIOS DE TOXICIDADE

Algumas substâncias naturais apresentam atividade antibacteriana, mas possuem toxicidade sobre células eucarióticas, sendo necessários estudos que investiguem o seu o perfil toxicológico (LI et al., 2021). A atividade terapêutica de um produto natural, como um extrato ou um composto isolado é caracterizada como ideal quando não há presença de toxicidade sobre células animais.

Ensaio toxicológicos de substâncias que são candidatas a potenciais IBEs são de suma importância. Esses estudos podem ser realizados *in vitro*, utilizando linhagens de células ou *in vivo*, os quais utilizam modelos animais, sendo necessária a utilização de concentrações ou doses variadas dos extratos ou compostos isolados (ALMUBAYEDH; AHMAD, 2020).

A utilização modelos animais alternativos permite adquirir um conjunto de informações sobre um organismo inteiro, além da similaridade de características com os mamíferos, como exemplo, a complexidade do metabolismo, homeostase e os processos de sinalização (LANZERSTORFER et al., 2020). Modelos alternativos como *Caenorhabditis elegans*, *Artemia salina*, *Danio rerio* e *Drosophila melanogaster* se destacam na utilização em ensaios para a triagem do perfil toxicológico de substâncias (GARCÍA-ESPIÑEIRA; TEJEDA-BENÍTEZ; OLIVERO-VERBEL, 2018; RAJABI et al., 2015; SCHERF et al., 2020; XAVIER; KRIPASANA, 2020).

3.3.1 *Drosophila melanogaster*

A mosca-da-fruta, *D. melanogaster*, pertence ao filo Arthropoda, Classe Insecta, ordem Diptera, sendo caracterizada por possuir um pequeno tamanho,

cerca de 3 mm de comprimento e por se alimentar de frutas em processo de decomposição, além disso, ocupam pouco espaço e para sua manutenção são necessários baixos custos (TIWARI et al., 2011; VA; SA; PAUL, 2009).

O ciclo reprodutivo de *D. melanogaster* é caracterizado como holometábolo, sendo dividido em quatro fases: ovo, larvas, pupas e adultos com um período de duração de 12 dias, apresentando no final do ciclo um elevado número de descendentes (PANCHAL; TIWARI, 2017). Muitas características biológicas, fisiológicas e neurológicas básicas são conservadas entre os humanos e o modelo *D. melanogaster*, sendo que cerca de 77 % dos genes que são responsáveis por causar doenças humanas tenham um homólogo funcional na mosca-da-fruta (REITER et al., 2001).

Por apresentar essas características, a mosca-da-fruta é importante modelo para o estudo de doenças que tem como fator dependente a idade, como as doenças neurodegenerativas, além disso, é possível realizar estudos para verificar o efeito de substâncias sobre o fenótipo, mudanças de desenvolvimento e alterações comportamentais (PANCHAL; TIWARI, 2017). Além disso, *D. melanogaster* é um modelo eucariótico que tem sido amplamente utilizado em estudos de toxicidade, como também para a avaliação do potencial genotóxico de muitas substâncias (CALAP-QUINTANA et al., 2017; ONG et al., 2015; SUNDARARAJAN et al., 2019).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ARTIGO 1

Parte dos resultados dessa dissertação estão publicados no artigo “*Caesalpinia ferrea* C. Mart. (Fabaceae) Phytochemistry, Ethnobotany, and Bioactivities: A Review” foi publicado no periódico *Molecules*, volume 25, artigo 3831, 2020, link para acesso: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/17/3831>.



Review

Caesalpinia ferrea C. Mart. (Fabaceae) Phytochemistry, Ethnobotany, and Bioactivities: A Review

Nair Silva Macêdo ^{1,2}, Zildene de Sousa Silveira ^{1,2}, Antonio Henrique Bezerra ¹, José Galberto Martins da Costa ³, Henrique Douglas Melo Coutinho ⁴, Barbara Romano ⁵, Raffaele Capasso ^{6,*}, Francisco Assis Bezerra da Cunha ^{1,*} and Márcia Vanusa da Silva ²

¹ Laboratory of Semi-Arid Bioprospecting (LABSEMA), Regional University of Cariri—URCA, Crato 63105-000, CE, Brazil; nairmacedo@gmail.com (N.S.M.); zildenesousa15@gmail.com (Z.d.S.S.); henriquebezerra.urca@gmail.com (A.H.B.)

² Graduate Program in Biological Sciences—PPGCB; Federal University of Pernambuco—UFPE, Recife 50670-901, PE, Brazil; marcia.vanusa@ufpe.br

³ Natural Products Research Laboratory, Regional University of Cariri—URCA, Crato 63105-000, CE, Brazil; galberto.martins@gmail.com

⁴ Laboratory of Microbiology and Molecular Biology (LMBM), Regional University of Cariri—URCA, Crato 63105-000, CE, Brazil; hdmcoutinho@gmail.com

⁵ Department of Pharmacy, University of Naples Federico II, 80100 Naples, Italy; barbara.romano@unina.it

⁶ Department of Agricultural Sciences, University of Naples Federico II, 80055 Portici, Italy

* Correspondence: rafcapas@unina.it (R.C.); cunha.urca@gmail.com (F.A.B.d.C.)

Academic Editor: Filomena Comforti

Received: 20 July 2020; Accepted: 21 August 2020; Published: 23 August 2020



Abstract: *Caesalpinia ferrea* C. Mart. popularly known as “Iucá” or “Pau-ferro” belongs to the Fabaceae

Introdução

Caesalpinia ferrea C.Mart é uma espécie nativa e endêmica do Brasil, pertencente à família Fabaceae, conhecida popularmente como Jucá ou Pau-ferro e tem como distribuição diversos domínios fitogeográficos, dentre eles o Cerrado, Caatinga e Mata Atlântica (Ferreira et al., 2019).

Diversas partes dessa espécie, como cascas, folhas, frutos e sementes têm sido largamente utilizadas pelos seres humanos na medicina popular através de chás, decocção, infusão, lambedor e maceração para inúmeros fins terapêuticos, a saber: como cicatrizante, anti-inflamatório, homeostático, antisséptico, distúrbios respiratórios, reumatismo, gastrite, entre outras finalidades (BUENO et al., 2019; LEAL et al., 2019; SACRAMENTO; MARTINS FILHO; DOS REIS, 2019; SANTOS et al., 2019).

Diante disso, diversas pesquisas investigaram os fitoconstituintes e bioatividades atribuídas a *L. ferrea*. No que se refere a sua composição química, estudos têm demonstrado a diversidade de classes químicas e compostos em extratos de diferentes órgãos de Pau-ferro. Dentre as classes químicas de metabólitos secundários encontrados nos extratos estão: flavonóides, ácidos orgânicos, saponinas, cumarinas, fenóis e taninos, enquanto que os ácidos fenólicos: ácido elágico e o ácido gálico são os compostos majoritários encontrados com mais frequência (ANDRADE et al., 2019; FALCÃO et al., 2019b; LUNA et al., 2020).

As folhas, frutos, vagens e cascas de *L. ferrea* foram relatadas na literatura por possuírem propriedades antibacterianas, antifúngicas, anti-inflamatórias, antioxidantes, antidiabéticas, antiulcerogênica (FALCÃO et al., 2019a; HASSAN et al., 2015; NASCIMENTO et al., 2017; PRAZERES et al., 2019; SOARES et al., 2018a; VELOSO et al., 2020). Na literatura já há uma revisão sobre as propriedades biológicas de *C. ferrea* (FERREIRA; SOARES, 2015), no entanto, essa revisão teve como objetivo realizar um levantamento da produção científica disponível ao longo dos últimos cinco anos para oferecer informações atualizadas sobre os aspectos botânicos, usos tradicionais, fitoquímica, bioatividades e a toxicidade de *C. ferrea*, bem como discutir as perspectivas futuras para o desenvolvimento de novas pesquisas sobre esta planta.

Materiais e Métodos

O nome da planta foi consultado no site www.theplantlist.org/ (*The List Plant*) para verificação da sua sinonímia. Para coleta de dados foi realizada uma pesquisa abrangente de artigos nos seguintes bancos de dados: Scopus, Periódicos Capes, PubMed, Google Scholar e ScienceDirect, utilizando os seguintes descritores: *Caesalpinia ferrea* e a sinonímia *Libidibia ferrea*. Foram revisados estudos publicados do ano de 2015 a março de 2020. Artigos em texto completo foram selecionados se o título, o resumo ou as palavras-chave incluíssem os descritores acima citados.

Os artigos duplicados entre as plataformas de busca, assim como os de revisão foram removidos na primeira etapa. Em seguida, os demais artigos foram selecionados com base em seu título, resumo e palavras-chave. Por fim, artigos completos foram analisados de acordo com os seguintes critérios [1]: Aspectos botânicos; [2]: Fitoquímica; [3]: Usos etnobotânicos; [4]: Bioatividades; [5]: Bioatividades de compostos isolados de *C. ferrea*. As estruturas químicas dos metabólitos secundários isolados desta planta foram desenhadas usando o software ChemDraw Ultra 7.0.

Resultados e Discussão

Após as buscas nas bases de dados foram contabilizados o número de 4069 trabalhos. Ao final de todas as etapas de inclusão e exclusão estabelecidas, foram selecionados 87 artigos, os quais foram analisados para extração de dados e interpretação dos resultados. É importante ressaltar que algumas publicações analisavam tanto a composição química do extrato, como também investigavam os seus efeitos biológicos.

Caracterização botânica

Libidibia ferrea é caracterizada por apresentar hábito arbóreo com altura que varia de 10-15 m, folhas alternadas e compostas com folíolos alternos em forma oval com caráter hidrofóbico (ANDRADE; SILVA, 2017; DE MATOS; DE MELO; SANTOS-SILVA, 2019; MEDEIROS et al., 2015). As inflorescências

possuem flores com pétalas amarelas, formato oboval e manchas avermelhadas (BRAGANTE et al., 2018; DE MATOS; DE MELO; SANTOS-SILVA, 2019). O período de florescimento inicia-se no final do mês de novembro estendendo-se ao mês de janeiro, já o período de amadurecimento dos frutos compreende os meses de julho a agosto (SANTOS et al., 2018).

Os frutos são vagens achatadas, quando imaturas possuem a coloração verde e quando maduras possuem a coloração marrom, esse comportamento se repete com as sementes (BRAGANTE et al., 2018). A Tabela 1 representa o resumo das características botânicas de *L. ferrea*. Suas sementes são determinantes para difusão da espécie, entretanto apresentam dormência ocasionada pela impermeabilidade do tegumento dos tecidos (Matos et al., 2015).

Tabela 1: Resumo das características botânicas de *Libidibia ferrea*

Característica	Atributos	Citações
Hábito	Arbóreo	(De Matos et al., 2019)
Altura	10-15 m	(MEDEIROS et al., 2015)
Folhas	Alternadas e compostas	(ANDRADE; SILVA, 2017)
Flores	Inflorescências com pétalas amarelas e manchas marrons	(BRAGANTE et al., 2018; DE MATOS et al., 2019)
Frutos	Vagens achatadas	(BRAGANTE et al., 2018)
Sementes	Marrons quando maduras	(BRAGANTE et al., 2018)

De acordo com um estudo realizado para avaliar a viabilidade das sementes de *L. ferrea* através do teste de tetrazólio, foi possível observar que as sementes viáveis apresentaram as seguintes características: coloração rosa claro brilhante, tecidos com aparência normal e firme, eixo embrionário de cor vermelha intensa sem atingir o cilindro central, menos de 50 % dos cotilédones descoloridos e cotilédones com regiões necróticas, mas sem interferir na área de fixação ao eixo embrionário (Carvalho et al., 2017).

L. ferrea é uma espécie exigente em água para o seu crescimento, visto que ao ser submetida a condições de estresse hídrico demonstrou reduções relevantes em sua altura e número de folhas, indicando que a limitação do suprimento de água prejudicou o desenvolvimento de características morfológicas e fisiológicas da espécie (Ferreira et al., 2015).

Etnobotânica

Os estudos etnobotânicos foram selecionados de acordo com os dados que forneciam como parte da planta utilizada, modo de preparo ou uso e indicações terapêuticas de *C. ferrea* ou da sinonímia *L. ferrea*. Na Tabela 2 estão resumidos os 19 artigos sobre o uso medicinal de Pau-ferro. As pesquisas etnobotânicas são importantes para conhecer como as comunidades tradicionais e as populações em geral utilizam a flora local para fins medicinais, como também é de grande relevância para manutenção da cultura popular. Os resultados de estudos de etnobotânica contribuem também para uma associação entre os conhecimentos tradicionais e modernos, constituindo dessa forma, uma importante ferramenta que auxilia na investigação das propriedades biológicas das plantas medicinais.

Tabela 2: Usos tradicionais de *C. ferrea* para a cura de doenças

Partes utilizadas	Modo de preparo ou de uso	Indicação terapêutica	Citação
Folhas	Chá	Vermífugo	(DE DAVID; PASA, 2015)
Folhas, cascas e frutos	Decocção, lambedor, maceração, vinho medicinal	Asma, dor nos ossos, gripe, dor nos rins, tosse, tremedeira	(ALMEIDA-NETO; BARROS; SILVA, 2015)
Cascas	Decocção	Fígado e sangramento	(FERREIRA et al., 2015a)
Vargens, frutos, sementes e cascas	Curtido no vinho, chá, banho, macerado, cozido ou batido com água	Anti-inflamatório e cicatrizante	(GONÇALVES; PASA, 2015)
Cascas e frutos	Chá, lambedor e xarope	Gripe, béquico, inflamações nos rins e calmante	(SILVA et al., 2015a)
Frutos	Lambedor	Gripe	(SILVA; BARROS; MOITA NETO, 2015)
Casca e sementes	Machucar a semente e pôr de molho na água	Pneumonia, anemia, diarreia, cólica e gastrite	(CAJAIBA et al., 2016)
Cascas do caule, frutos e sementes	Maceração	Anti-inflamatório, rins, hematomas, dor nas costas e analgésico	(CASTRO et al., 2016)

Casca	Decocção	Malária	(KFFURI et al., 2016)
Casca e raiz	Chá e garrafada	Reumatismo e diabetes	(LIMA; NASCIMENTO; SILVA, 2016)
Cascas e frutos	Garrafada	Anti-inflamatório	(DE MORAES REGO et al., 2016)
Frutos	Chá	Diarreias, fígado e cicatrização	(OLIVEIRA et al., 2016)
Caule	Chá	Anti-inflamatório	(DA SILVA; SILVEIRA; GOMES, 2016)
Raízes	Decocção	Hemorroidas, inflamações dos olhos e ferimentos	(SOUZA et al., 2016)
Cascas internas	Imerso em água	Hemorragia, anti-inflamatório, infecção e dor	(SARAIVA et al., 2015)
Cascas secas	Decocção	Dor na coluna	(RIBEIRO; MELO; BARROS, 2016)
Cascas do tronco e frutos	Maceração e cozimento	Dor na coluna, problemas de visão, anti-inflamatório e cicatrização	(CORDEIRO; BOTREL; HOLANDA, 2017)
Frutos	Decocção e maceração (Chá) e maceração para banho	Dor de garganta, rouquidão, dor nas pernas, dor de dente, inflamação uterina, feridas, anemia e gastrite	(PALHETA et al., 2017)
Frutos, cascas, raízes e sementes	Chá e tintura	Asma, bronquite, gripe, febre, dor de garganta, sinusite, diarreia, reumatismo,	(LEANDRO; JARDIM; GAVILANES, 2017)

depuração do sangue, rins e calmante			
Frutos	Chá	Infecção urinária	(PEREIRA; COELHO-FERREIRA, 2017)
Frutos	Garrafada	Infecção	(SILVA; RORIZ; SCARELI-SANTOS, 2018)
Casca do caule, entrecasca, frutos e sementes	Chá, lambedor, <i>in natura</i> e em pó	Doenças infecciosas, parasitárias, do sistema hematopoiético, imunológico, cardiovascular, digestivo, respiratório, geniturinário, osteomuscular, conjuntivo, lesões e envenenamento	(ALBERGARIA; SILVA; SILVA, 2019)
Sementes	Chá e imersas na água	Cortes na pele, tosse, gripe e depressão	(LEAL et al., 2019)
Cascas, frutos e sementes	Decocção, infusão, maceração e xarope	Sífilis, câncer, depurativo, diabetes, asma, gastrite, bronquite, sinusite, dor de estômago, reumatismo, impotência sexual, cicatrização, fratura óssea, dor de cabeça, febre e infecção na garganta	(RIBEIRO et al., 2017)
Planta inteira e frutos	Infusão e maceração	Coluna, pancada, inflamação e rins	(LIMA; FERNANDES, 2020)
Folhas	Chá	Todos os tipos de infecção e inflamação	(SANTOS et al., 2019)

Tradicionalmente, *Caesalpinia ferrea* é usada por comunidades tradicionais quilombolas, indígenas, raizeiros e rurais do norte e nordeste do Brasil para fins medicinais (ALBERGARIA; SILVA; SILVA, 2019; GONÇALVES; PASA, 2015; KFFURI et al., 2016; LIMA; FERNANDES, 2020; PEREIRA; COELHO-FERREIRA, 2017; RIBEIRO et al., 2017; SOUZA; SOUZA; LUCENA, 2016). As cascas de *C. ferrea* são utilizadas por as comunidades indígenas Cunuri, Tapira Ponta, Ilha das Flores, Curicuriari e São Jorge, localizados na região amazônica, para combater sintomas da malária (KFFURI et al., 2016). As comunidades de ribeirinhos e seringueiros, que vivem em uma região endêmica de malária na região amazônica brasileira, usam as cascas de *C. ferrea* na forma de decocção para tratar sintomas desencadeados pela malária (ALMEIDA-NETO; BARROS; SILVA, 2015). Diante da análise dos artigos, as folhas foram indicadas como vermífugo e para o tratamento de infecções e inflamações em geral, ambos tendo como modo de preparo chás (DE DAVID; PASA, 2015; SANTOS et al., 2019).

As cascas de *L. ferrea* são um dos órgãos mais utilizados na medicina tradicional através do processo de decocção, preparação de chás, lambedor, xarope e garrafada para o tratamento de diversas afecções, dentre elas destacam-se, gripe, tosse, inflamações nos rins e fígado, calmante, reumatismo, diabetes, hemorragia, inflamação, infecções e dores em geral, como também para amenizar os sintomas provocados pela malária (FERREIRA et al., 2015a; KFFURI et al., 2016; LIMA; NASCIMENTO; SILVA, 2016; RIBEIRO; MELO; BARROS, 2016; SARAIVA et al., 2015; SILVA et al., 2015a).

O uso tradicional das cascas também tem sido relatado na literatura juntamente com outras partes da planta como a entrecasca, raízes, folhas e principalmente com frutos e sementes para diversas indicações terapêuticas, a saber: sífilis, câncer, depurativo, diabetes, gastrite, dor de estômago, reumatismo, impotência sexual, cicatrização, fratura óssea, dor de cabeça, distúrbios do sistema respiratório, febre, diarreia, problemas nos rins, calmante, problemas de visão, anti-inflamatório, analgésico, hematomas, anemia, cólica e tremedeira (ALBERGARIA; SILVA; SILVA, 2019; CASTRO et al., 2016; CORDEIRO; BOTREL; HOLANDA, 2017; DE MORAES REGO et al., 2016; GONÇALVES; PASA, 2015; LEANDRO; JARDIM; GAVILANES, 2017;

RIBEIRO et al., 2017).

Depois das cascas, os frutos são os mais utilizados na forma de chás, garrafada e maceração contra diarreia, problemas no fígado e rins, dor (garganta, pernas, coluna e dente), inflamação uterina, anemia, gastrite, infecção urinária e também como cicatrizante (LIMA; FERNANDES, 2020; OLIVEIRA et al., 2016; PALHETA et al., 2017; PEREIRA; COELHO-FERREIRA, 2017; SILVA; BARROS; MOITA NETO, 2015; SILVA; RORIZ; SCARELI-SANTOS, 2018). O chá das sementes é utilizado para o tratamento de gripe e tosse e quando imersas na água é usada como cicatrizante (LEAL et al., 2019).

Aspectos fitoquímicos

Extratos das folhas, sementes, vagens e entrecasca de Pau-ferro têm sido amplamente estudados por possuírem diversos metabólitos secundários como flavonóides, polifenóis, terpenóides, taninos, saponinas, esteroides e outros compostos fenólicos que apresentam uma variedade de bioatividades. Nesta revisão foram encontrados 23 artigos que investigaram os fitoconstituintes de extratos de Pau-ferro (Tabela 3). A Figura 1 representa os principais compostos químicos de *C. ferrea*.

Tabela 3: Classes químicas ou constituintes encontrados nos extratos de *C. ferrea*

Parte utilizada	Solvente	Técnica analítica	Classes químicas	Constituintes	Citações
Folhas	Ciclohexano	CG/MS	Flavonóides e terpenos	Heptacosano, octacosano e docosano	(LUNA et al., 2020)
Folhas	Clorofórmio Acetato de etila Metanol	---	Taninos, flavonóides, alcalóides, carboidratos, derivados cinâmicos e terpenos	---	(LUNA et al., 2020)
Folhas	Água	HPLC	---	Ácido elágico e gálico	(FALCÃO et al., 2019b)
Folhas	Água a 25 e 100 °C	HPLC-DAD	---	Ácido gálico, cafeico e elágico, catequina, epicatequina, quercetina e luteolina	(LEANDRO et al., 2019)
Folhas	Etanol 70 %	HPLC	---	Ácido gálico e elágico, orientin e isovitexin	(HUSSEIN et al., 2016)
Folhas	Etanol 70 %	NMR 1D e 2D	---	Ácido gálico, ácido brevifolin carboxílico e brevifolin	(NAWWAR et al., 2015)
Folhas	Propilenoglicol 80 %	---	Saponinas, ácidos orgânicos, açúcares redutores, esteróides, triterpenóides, fenóis e taninos	---	(MAGALHÃES et al., 2015)
Folhas secas	Etanol 70 %	---	Carboidratos, glicosídeos,	---	(HASSAN et al.,

taninos e compostos fenólicos					2015)
Cascas e sementes	Etanol 70 %	HPLC	---	Ácido elágico	(PICKLER et al., 2019)
Cascas	Água a 25 e 100 °C	HPLC-DAD	---	Ácido gálico, cafeico e elágico, catequina, epicatequina e quercertina	(LEANDRO et al., 2019)
Cascas	Etanol a 99,5 %	---	Taninos, flavonóides e cumarinas	---	(Andrade et al., 2019)
Cascas do caule	Metanol	---	Flavonóides, taninos, saponinas e esteróides	---	(INDRIANI; ELYA; NOVIANI, 2018)
Cascas	Água	RP-HPLC	---	Ácido elágico e gálico	(ALVES DA SILVA et al., 2018)
Cascas do caule	Acetato de etila	---	Flavonóides, taninos, saponinas, esteróides e terpenóides	---	(INDRIANI; ELYA; NOVIANI, 2018)
Cascas e galhos	Etanol 80 %	---	Taninos	---	(LINS et al., 2019)
Cascas do caule	NaOH	---	Carboidratos e proteínas	Ácido urônico	(PEREIRA et al., 2016)
Cascas do caule	Etanol e água	LC-MS/MS	---	Kaempferol, ácidos gálico e quínico	(PEDROSA et al., 2016)

Frutos	Etanol a 96 %	LC-HRMS/MS	---	Corilagin e ácido gálico e elágico	(FERREIRA et al., 2019)
Frutos	Água, etanol a 20 - 80 %	HPLC-DAD	---	Ácido elágico e gálico	(FALCÃO et al., 2019a)
Frutos	Etanol	HPLC	---	Ácido elágico e gálico	(GUERRA et al., 2017)
Frutos	Água	HPTLC e HPLC	---	Ácido gálico e elágico	(FERREIRA et al., 2016b)
Frutos	Álcool 96 %	---	Saponinas, ácidos orgânicos, fenóis e taninos	---	(KOBAYASHI et al., 2015)
Vagens	Metanol a 80 %	---	Polifenóis	Ácido gálico	(VELOSO et al., 2020)
Vagens	N-hexano	GC-MS	---	N-dodecanol, ácido mirístico, metila palmitato e ácido palmítico	(DE AZEVEDO et al., 2020)
Vagens	Clorofórmio	GC-MS	---	Ácido n-valérico, ácido caproico, ácido heptanico e ácido octanóico	(DE AZEVEDO et al., 2020)
Vagens	Acetato de etila	GC-MS	---	Ácido oxálico, ácido butanedioico, ácido pirotartárico, ácido	(DE AZEVEDO et al., 2020)

pentanóico					
Vagens	Álcool a 70 %	GC-MS	---	Glicerol, D-frutose, Mio- inositol e Glucopirranose	(DE AZEVEDO et al., 2020)
Vagens	Álcool 40 %	HPLC-MS	---	Dilactona do ácido valônico, derivado do ácido gálico e ácido elágico	(PRAZERES et al., 2019)
Vagens	Etanol e água	LC-MS/MS	---	Ácido elágico, ácido clorogênico e rutina	(PEDROSA et al., 2016)
Sementes	Água	TLC	Ácidos graxos, cumarinas, taninos totais e hidrolisáveis	---	(DE MOURA et al., 2015)
Raízes	Água a 25 e 100 °C	HPLC-DAD	---	Ácido gálico e elágico, catequina, epicatequina, quercetina e luteolina	(LEANDRO et al., 2019)

GC-MS = *Thin-layer chromatography and gas chromatography - mass spectrometry*; HPLC-DAD = *High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection*; RP-HPLC = *Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography*; HPLC = *High Performance Liquid Chromatography*; LC-HRMS/MS = *Liquid Chromatography-High Resolution Tandem Mass Spectrometry*; NaOH = *Sodium hydroxide*; LC-MS/MS = *Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry (LC-MS)*; HPTLC = *High-Performance Thin Layer Chromatography*; NMR = *Nuclear Magnetic Resonance*

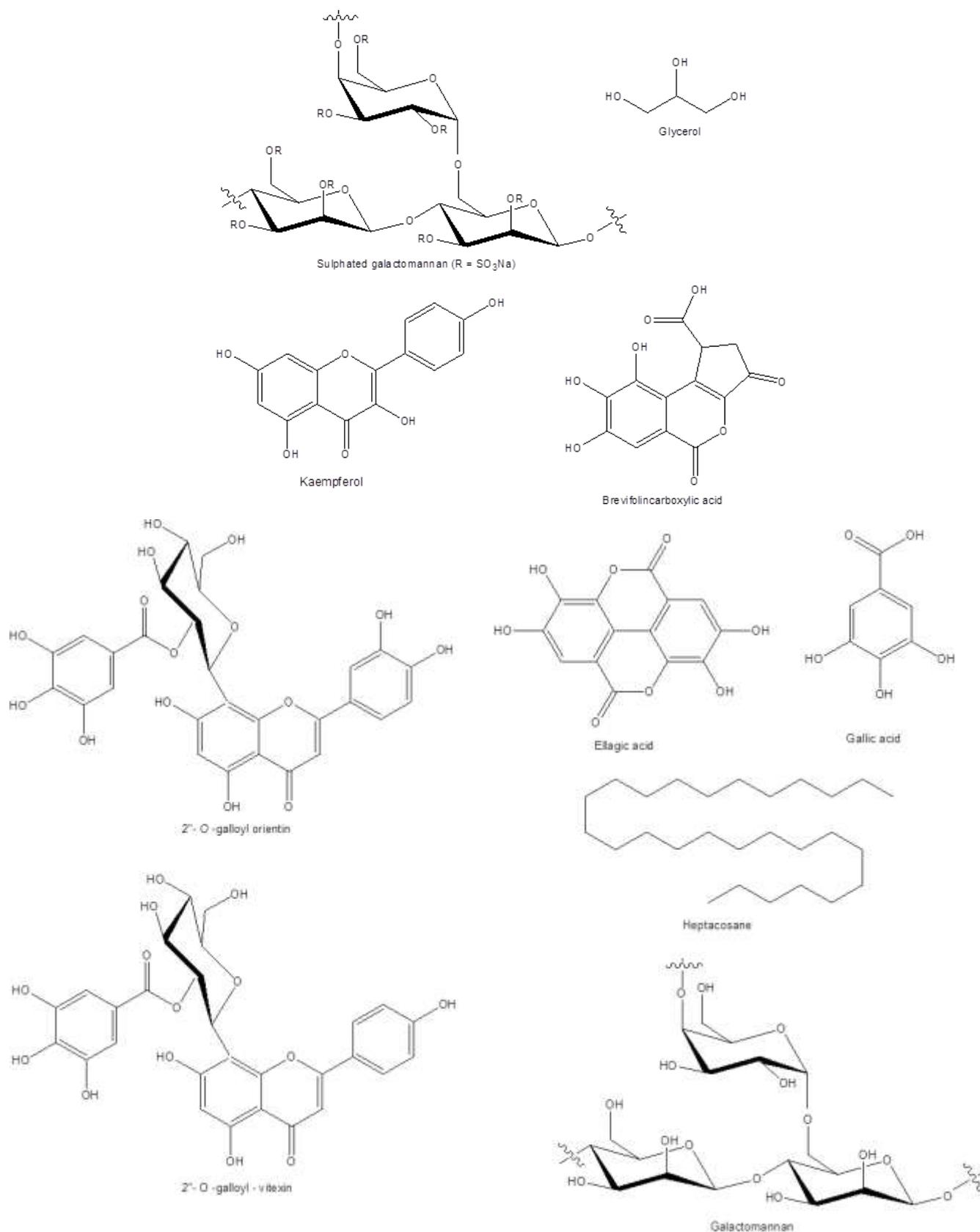


Figura 1. Estruturas químicas dos principais fitoconstituintes de *C. ferrea*. *Ellagic acid*: C₁₄H₆O₈ e MW: 302.19 g/mol; *Gallic acid*: C₇H₆O₅ e MW: 170.12 g/mol; *Heptacosan*: C₂₇H₅₆O e MW: 396.7 g/mol; *Galactomannan*: C₁₈H₃₂O₁₆ e MW: 504.4g/mol; *Kaempferol*: C₁₅H₁₀O₆ e MW: 286.24 g/mol; *2''-O-Galloylorientin*: C₂₈H₂₄O₁₅ e MW: 600.5 g/mol; *2''-O-Galloylvitexin*: C₂₈H₂₄O₁₄ e MW: 584.5 g/mol; *Glycerol*: C₃H₈O₃ e MW: 92.09g/mol.

Folhas

A investigação qualitativa de fitoconstituintes de extratos das folhas demonstrou a presença de diversas classes químicas como flavonóides, taninos, alcalóides, derivados cinâmicos, terpenos, saponinas, ácidos orgânicos, açúcares redutores, esteróides, triterpenóides, fenóis, glicosídeos, compostos fenólicos e carboidratos (HASSAN et al., 2015; LUNA et al., 2020; MAGALHÃES et al., 2015).

Através das técnicas de HPLC e RMN 1 e 2D foi possível identificar ácido gálico, brevifolin carboxylic acid, ácido elágico, brevifolin, tellimagrandin-I, 2"-O-galloylvitexin, vitexin, 2"-O-galloylorientin, orientin, isovitexin 2"-O-β-[xylopyranosyl-(1"" --- 2")-O-β- xylopyranosyl], Isovitexin, orientin 2"-O-β-[xylopyranosyl-(1"" --- 2") -O-β- xylopyranosyl] na constituição fitoquímica do extrato hidroetanólico das folhas (HUSSEIN et al., 2016; NAWWAR et al., 2015).

Folhas foram submetidas a dois tratamentos, um com água a 100 °C e outro com água a 25 °C, após uma análise fitoquímica por HPLC desses extratos foi verificada a presença de ácido gálico, ácido cafeico, epicatequina, quercetina e luteolina em ambos os extratos, além da presença de ácido elágico e catequina no extrato a quente (100 °C) (LEANDRO et al., 2019). Enquanto que análises por GC-MS do extrato ciclohexânico exibiu n-dodecanal, octacosane, docosane, pentadecano e heptacosano (LUNA et al., 2020).

Cascas

A análise por HPLC-DAD do extrato aquoso demonstrou a presença dos ácidos gálico, cafeico e elágico, catequina, epicatequina e quercetina (LEANDRO et al., 2019). Enquanto que análises fitoquímicas qualitativas de extratos a base de diferentes solventes (Etanol, metanol, acetato de etila e NaOH) exibiram diferentes classes químicas como flavonóides, taninos, saponinas, esteróides, terpenóides, cumarinas, carboidratos e proteínas (ANDRADE et al., 2019; INDRIANI; ELYA; NOVIANI, 2018; LINS et al., 2019; PEREIRA et al., 2016).

O perfil fitoquímico do extrato hidrometanólico das cascas do caule foi

traçado através da técnica LC-MS/MS, detectando a presença de 15 compostos: ácido quinolínico, ácido gálico, ácido 2- (2-etil-3-hidroxi-6-propionilciclo-hexil) acético, ácido elágico, ácido 12-oxo-fitodienoico, catequina, epicatequina, ácido clorogênico, rutina, taxifolina, miricetina, quercetina, kaempferol, apigenina e isorhamnetina (PEDROSA et al., 2016). Os compostos químicos, ácido elágico e gálico também foram encontrados no extrato aquoso e hidrometanólico através de HPLC (ALVES DA SILVA et al., 2018; PICKLER et al., 2019).

Frutos ou Vagens

Análises fitoquímicas de extratos aquosos e hidroalcoólicos dos frutos através da técnica de HPLC identificaram a presença de ácido elágico e ácido gálico (FALCÃO et al., 2019a; FERREIRA et al., 2016b; GUERRA et al., 2017). Enquanto que análises químicas qualitativas do extrato hidroalcoólico dos frutos demonstraram a presença de sete classes químicas: saponinas, ácidos orgânicos, açúcares redutores, fenóis, taninos, sesquiterpenolactonas e antraquinonas (KOBAYASHI et al., 2015).

Análise por LC-HRMS/MS do extrato hidrometanólico dos frutos revelou a presença de fitoconstituintes como ácido gálico, éster de galoyl-glicose, metoxi glicósido do ácido gálico, hexose, di-O-galoil-d-hexose, corilagin, ácido elágico, eriodictyol-O-hexoside e naringenina-O-hexósido (FERREIRA et al., 2019). Caracterização dos constituintes químicos do extrato hidroalcoólico das vagens demonstrou a presença de 7,3 % de polifenóis e análises cromatográficas por HPLC-MS revelaram a presença de nove compostos: ácido galiliquinóico, galoil-HHDP-hex, ácido brevifolin carboxílico, dilactona do ácido valônico, derivado do ácido gálico, derivado do ácido elágico (ácidoelágico hex-), ácido elágico, derivado do ácido elágico e dihidroisovaltrato (PRAZERES et al., 2019; VELOSO et al., 2020).

A investigação da composição fenólica pela técnica LC-MS/MS do extrato hidroetanólico das vagens mostrou a presença de ácido glucônico, ácido gálico, ácido cafeico, Ácido 2- (2-etil-3-hidroxi-6-propionilciclo-hexil) acético, ácido elágico, ácido 12-oxo-fitodienoico, catequina, epicatequina, ácido clorogênico, rutina, taxifolina, miricetina, quercetina, kaempferol, apigenina e

isorhamnetina (PEDROSA et al., 2016).

Estudos fitoquímicos dos extratos hidroalcoólico, clorofórmico, n-hexânico e acetato de etila das vagens exibiu a presença de inúmeros compostos como glicerol, D-frutose, Mio-inositol, ácido químico, glucopiranoose, glicose, ácido 1,2-benzenedicarboxílico, ácido oxálico, ácido butanedioico, ácido pirotartárico, ácido pentanóico, ácido málico, ácido pentanodioico, ácido arabinoico, ácido octanedioico, ácido azelaico, D-galactopiranosil, ácido benzoico, Alfa-D-glicopiranoose, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido 2-bromosbacico, ácido tetracosanónico, ácido n-valérico, isobutiricacia de ácido alfa-hidroxiol, ácido caproico, ácido heptanico, ácido octanóico, ácido maleico, ácido pirotartárico, ácido pelargônico, ácido pimélico, ácido tetradecanónico, ácido suberico, ácido mirístico, D-manose, ácido n-pentadecanónico, ácido palmítico, tes colesterol, ácido 2-bromosbacico, monopalmitina, ácido docosanóico, N-dodecanol, ácido mirístico, metila palmitato, ácido palmítico, metila oil, metila estearate, ácido de vapor, metila araquidoate, ácido araquido, metila beenoate, metila lignocerate, ácido tetracosanónico, nonacosan, octacosanol e campesterol (PRAZERES et al., 2019).

Sementes e raízes

O extrato hidroalcoólico das sementes apresentou como principal fitoconstituente o ácido elágico e análises químicas qualitativas por TLC evidenciaram a presença de ácidos graxos, cumarinas, taninos totais e hidrolisáveis (PICKLER et al., 2019; DE MOURA et al., 2015). Já o extrato aquoso das raízes feito com a água em temperaturas diferentes (100 e 25 °C) exibiram os seguintes constituintes em comum: ácido gálico e elágico, epicatequina, quercetina e luteolina, com exceção do extrato a quente (100 °C) que também exibiu na sua composição catequina (LEANDRO et al., 2019).

Compostos de valor quimiotaxônomico

As espécies da subfamília Caesalpinaceae apresentam polissacarídeos hidrofílicos como as galactomananas na razão manose/galactose variando de 2,5: 1 a 4,3: 1 (BUCKERIDGE et al., 2000). Em *C. ferrea* a presença desses

polissacarídeos foram atestados por diferentes autores, sendo essas biomoléculas marcadores quimiotaxonômicos úteis para análise e indentificação dessa espécie (GALÃO et al., 2013; CUNHA et al., 2017). Outros compostos químicos que podem fornecer caracteres úteis para a classificação das espécies do gênero *Caesalpinia*, são compostos da classe dos flavonóides, terpenoides e isoflavonóides (HEGNAUER et al., 1993). Em *C. ferrea* foram identificados a partir do extrato aquoso a presença dos ácidos gálico, cafeico e elágico, catequina, epicatequina e quercertina (LEANDRO et al., 2019; PRAZERES et al., 2019; VELOSO et al., 2020).

Bioatividades

Foram encontrados 57 artigos que investigaram as bioatividades dos extratos e compostos isolados de *L. ferrea*. A Tabela 4 representa o resumo das bioatividades dos extratos e Tabela 5 corresponde às dos compostos isolados.

Tabela 4: Bioatividades avaliadas com diversos extratos de *C. ferrea*

Partes utilizadas/Solventes	Alvo ou Modelo	Bioatividades avaliadas	Resultados	Citações
Vagens/Metanol	<i>Parvimonas micra</i> <i>Porphyromonas gingivalis</i>	Antibacteriana e anti-halitose	MIC: 50 e 120 µg/mL, respectivamente MBC: > 50 e 130 µg/mL, respectivamente	(VELOSO et al., 2020)
Folhas/Ciclohexano	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	Antibacteriana	MIC: 0,039; 0,039; 0,039; 0,39; 0,078 mg/mL, respectivamente	(LUNA et al., 2020)
Folhas/clorofórmio	<i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. aureus</i>	Antibacteriana	MIC: 1,56; 6,25; 12,5; 3,12; 0,78 mg/mL, respectivamente	(LUNA et al., 2020)
Folhas/acetato de etila	<i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. aureus</i>	Antibacteriana	MIC: 0,78; 6,25; 12,5; 3,12; 1,56 mg/mL, respectivamente	(LUNA et al., 2020)
Folhas/Metanol	<i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. aureus</i>	Antibacteriana	MIC: 6,25; 12,5; 25; 3,12; 3,12 mg/mL, respectivamente	(LUNA et al., 2020)
Cascas/Álcool	<i>S. aureus</i> ATCC 10390, <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9721 e <i>E. coli</i> ATCC 25922; Ratos Wistar	Antibacteriana e atividade cicatrizante	MIC: 0, 39; 0,79 e 0,19 mg.mL ⁻¹ , respectivamente	(JOZALA et al., 2020)
Fruto/Álcool	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>P. aeruginosa</i>	Antibacteriana	Halos de inibição: 18; 12; 10 e 11 mm, respectivamente	(Sousa et al., 2019)

Folhas e frutos/Água	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Antibacteriana	70 % de inibição na concentração de 0,4 mg/mL	(MALAFAIA et al., 2018)
Vagens e entrecasca/Etanol	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i>	Antibacteriana	MIC: 1024 µg/mL para todas as cepas	(Ferreira et al., 2016)
Cascas/Álcool	<i>Staphylococcus</i> spp.	Antibacteriana	Halos de inibição: 61,1; 27,78 e 5,56 % para o extrato bruto e concentrações de 70 e 50 %, respectivamente	(Paiva et al., 2015)
Folhas/ Propilenoglicol	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	Antibacteriana	Média de halo de inibição: 0,97 cm	(MAGALHÃES et al., 2015)
Vagens/Etanol	<i>Streptococcus mutans</i> , <i>Streptococcus mitis</i> , <i>Streptococcus sanguis</i> , <i>Streptococcus sobrinus</i> e <i>Lactobacillus casei</i>	Antibacteriana	MIC: 15; 14; 14; 15; 15 mg/mL, respectivamente e MICA: 31,2 mg/mL para todas as cepas	(CONDE et al., 2015)
Vagens/Etanol	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> e <i>P. aeruginosa</i>	Antibacteriana e antioxidante	MIC: 125; 50; 50; 50; 125; 50 µg/mL, respectivamente; DPPH: EC ₅₀ 4,4 µg/mL e ABTS: EC ₅₀ 2,5 µg/mL	(NASCIMENTO et al., 2015)
Vagens/Álcool	<i>Helicobacter pylori</i> Ratos Wistar	Antibacteriana, antioxidante,	MIC: 512 µg/mL; DPPH e ABTS: IC ₅₀ de 28,96 e 145,10 µg/mL,	(PRAZERES et al., 2019)

		antiulcerogênica e toxicidade	respectivamente; ED:113 e 185,7 mg/kg; LD superior a 2000 mg/kg	
Vagens	Proteobactérias e Bacteroidetes	Antibiofilme	Inibiu o crescimento em 82 % na concentração de 4 mg.mL ⁻¹	(AGOSTINI et al., 2020)
Sementes/ Etanol	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231, <i>Candida glabrata</i> CCT 0728, <i>Candida krusei</i> CCT 1517 e <i>Candida guilliermondii</i> CCT 1890	Antifúngica	MIC: 9,7; 19,53; 78 e 39,06 µg/mL, respectivamente	(SOARES et al., 2018b)
Sementes/Etanol	<i>C. albicans</i> ATCC 10231, <i>C. glabrata</i> CCT 0728, <i>C. krusei</i> CCT 1517, <i>C. guilliermondii</i> CCT 1890; Células de fibroblastos (L929)	Antifúngica e Citotoxicidade	MIC: 9,7; 19; 78 e 4,8 µg/mL, respectivamente; Toxicidade nas concentrações de 1000; 500 e 250 µg/mL	(SOARES et al., 2018a)
Folhas/Água	<i>Colletotrichum</i> sp.	Antifúngica	Inibição de até 96 % na concentração de 0,075 mg.mL ⁻¹	(MELO et al., 2017)
Folhas/Álcool	<i>Colletotrichum</i> sp.	Antifúngica	Inibição de 100 % de sintomas em sementes tratadas	(MELO et al., 2016)
Cascas do caule/Água, etanol e acetona	<i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28189 e <i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 11481	Antifúngica	MIC: 62,5 e 31,3 µg/mL, respectivamente	(BIASI-GARBIN et al., 2016)
---	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Antifúngica	Inibiu em 85,6 % o crescimento	(PEIXINHO et

			micelial na concentração de 30 %	al., 2017)
Folhas/Água	Ratos Wistar	Anti-inflamatória e antioxidante	Doses efetivas: 100, 200 e 300 mg/kg;	(FALCÃO et al., 2019b)
Sementes/Água ou etanol (20 - 80 %)	Camundongos suínos e linhagem celular de fibroblastos embrionários (3T3)	Anti-inflamatórios, antioxidantes, antinociceptivos e citotoxicidade	Doses efetivas: 50, 100 e 200 mg/kg;	(FALCÃO et al., 2019a)
Vagens/Álcool e acetato de etila	Linha celular de adenocarcinoma gástrico (ACP02)	Antioxidante e antimetastático	DPPH: IC ₅₀ 74,36 e 116,10 µg/mL ABTS: IC ₅₀ 9,76 e 29,13 µg/mL Diminuiu a migração de células nas concentrações de 50 µg/mL	(DE AZEVEDO et al., 2020)
Folhas/Etanol	HaCaT e ratos Wistar	Antioxidantes, citotóxicos e atividade hipolipidêmica	DE ₅₀ : 12,5 µg/mL; IC ₅₀ : 114,4 µg/mL	(NAWWAR et al., 2015)
Folhas secas/Etanol	Ratos machos Sprague-Dawley	Antioxidante, anti-hiperglicêmica e toxicidade	DE ₅₀ : 12,45 µg/mL; Reduziu os níveis de função hepática, glicose sérica e a-amilase; Perfil não tóxico;	(HASSAN et al., 2015)
Folhas/Etanol	---	Antioxidante	DPPH: IC ₅₀ 10,57 µg/mL e ABTS: IC ₅₀ 2,77 µg/mL	(Nascimento et al., 2017)
Folhas, galhos e frutos/Etanol e hexano	<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> e <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>	Antileishmania	Extrato metanólico dos frutos e o hexânico das folhas: IC ₅₀ de 15,04 e 53,09 µg.mL ⁻¹ <i>L. (L.) amazonensis</i>	(COMANDOLLI-WYREPKOWSKI et al., 2017)

Frutos/Etanol	HT-29 e HEK-293	Antiproliferativa, apoptótica e antioxidante	Doses eficientes: 25 - 100 µg/mL	(GUERRA et al., 2017)
Cascas e vagens/Etanol	B16F10 e NHF	Anti-rugas, anti-clareamento e citotoxicidade	Doses eficientes: 25 e 250 µg/mL	(PEDROSA et al., 2016)
Cascas e sementes/Etanol	Ratos Wistar	Toxicidade aguda materna e fetal	Aumento dos níveis de creatinina no soro materno e alterações morfológicas nos fetos	(PICKLER et al., 2019)
Frutos/Etanol	<i>Danio rerio</i> (Zebrafish)	Toxicidade	Concentrações de 25, 50 e 125 mg/L causaram letalidade nos embriões	(Ferreira et al., 2019)
Cascas/Álcool	Larvas de <i>Artemia salina</i> L.	Toxicidade	CL ₅₀ de 822,6334 µg/mL	(LIMA et al., 2019)
Frutos/Álcool	Ratos Wistar	Toxicidade e atividade cicatrizante	Concentração de 12,5 % exibiu epiderme constituída em todos os animais	(KOBAYASHI et al., 2015)
Sementes/Etanol	<i>Astyanax</i> sp.	Genotoxicidade	Aumento de 2,5x o nível de quebras de DNA das hemácias, quando expostas as doses de 5, 10 e 20 mg/L	(SOUSA et al., 2018)
Folhas/Etanol	HepG-2, Hep2, MCF-7 e HCT-116	Citotoxicidade	IC ₅₀ de 19,3; 20; 21,8 e 24,47 µg/mL, respectivamente	(HUSSEIN et al., 2016)

Vagens/Água	Células meristemáticas de raízes de <i>Allium cepa</i>	Citotoxicidade, Genotoxicidade e efeito citoprotetor	Citotóxico nas concentrações de 1g/500 mL e 1g/1000 mL em 24 e 48 horas de exposição	(SILVA et al., 2015b)
Vagens	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Atividade cicatrizante	Pomada a 24 % inibiu a área da lesão	(BATISTA et al., 2017)
Cascas do caule/NaOH	Ratos Wistar	Atividade cicatrizante	Concentrações eficazes: 0,025, 0,05, 0,75 e 0,1 %	(PEREIRA et al., 2016)
Vagens	Ratos Wistar	Atividade cicatrizante	Reduções significativas nas áreas das lesões	(Carvalho et al., 2016)
Cascas/Etanol	---	Atividade fotoprotetora e antioxidante	FPS de 3,29 na concentração 0,100 mg/mL e IC ₅₀ 27,53 µg/mL	(Andrade et al., 2019)
Casca do Caule/Metanol	---	Atividade inibidora de arginase	Inibiu 12,81 % na concentração de 100 µg/mL	(INDRIANI; ELYA; NOVIANI, 2018)
Sementes/Água	Camundongos suíços	Inibição da atividade hemorrágica	Não apresentou atividade	(DE MOURA et al., 2015)
Vagens, cascas e folhas/Metanol	Ratos Wistar	Efeito edematogênico	Efeitos nas doses de 0,01 - 1 mg/kg	(PEREIRA et al., 2018)

Casca do caule/Água	Terceiros molares humanos	Potencial erosivo	Perda de 37,03 % do esmalte dentário	(MARTINS et al., 2018)
Casca da fruta	Moscas da família <i>Calliphoridae</i>	Ação repelente	Repelência de 97,5 e 100 % nas concentrações de 20 e 50 %	(FERNANDES et al., 2016)
Folhas e vagens/ Água e metanol	<i>Nasutitermes corniger</i> (Cupins)	Atividade inseticida	Operários: CL ₅₀ 0,255 - 1,279 mg.mL ⁻¹ Soldados: CL ₅₀ 0,146 - 8,003 mg.mL ⁻¹	(LOPES et al., 2020)
Folhas/Álcool	<i>Aphis craccivora</i> (Pulgão-preto)	Atividade inseticida	51,71 % de eficiência	(GOMES; DUTRA; ALMEIDA, 2019)
Folhas e vagens/ Água e metanol	<i>Dactylopius opuntiae</i> (Cochonilha-do-carmim)	Atividade inseticida	72,46 - 99,33 % de mortalidade	(LOPES et al., 2018a)
Folhas e vagens/ Água e metanol	<i>Dactylopius opuntiae</i> (Cochonilha-do-carmim)	Atividade inseticida	Ninfas: CL ₅₀ 20 - 150 mg/mL Adultos: CL ₅₀ 43 - 50 mg/mL	(LOPES et al., 2018b)
Folhas/Etanol	<i>Alternaria alternata</i>	Controle da mancha marrom de alternaria	Concentração de 500 µg/mL reduziu em 52,0 % a severidade da doença	(DEMARTELAERE et al., 2018)
Folhas/Água e etanol	<i>Alternaria alternata</i>	Controle da mancha marrom de alternaria	Concentração de 1 mg/mL reduziu em 96,49 e 99,12 % a severidade	(PINTO et al., 2018)

da doença				
Folhas	<i>Sorghum bicolor</i> L. (Sorgo)	Fertilizante	Elevou os teores de Potássio, Cálcio e Magnésio no solo	(PRIMO et al., 2018)
Folhas e sementes/Etano I	Sementes de <i>Cucumis melo</i> L.	Potencial alelopático	30 % de mudas anormais na concentração de 1 %	(Oliveira et al., 2016)
Folhas, cascas e raízes/Água	<i>Calotropis procera</i> e <i>Cenchrus echinatus</i>	Potencial alelopático	Inibição da germinação de ambas as espécies	(LEANDRO et al., 2019)
Folhas secas	<i>Vigna unguiculata</i>	Potencial alelopático	Anormalidades nas plântulas	(ALVES et al., 2019)
Frutos	Meio aquoso contendo MB	Biossorvente	Cinética rápida e boa adsorção na remoção do MB	(Carvalho et al., 2018)
Resíduos de vagens	Soluções aquosas contendo captopril	Biossorvente	97,67 % de remoção	(KASPERISKI et al., 2018)

CIM= Concentração Inibitória Mínima; CBM Concentração Bactericida Mínima; MB = methylene blue; HT-29 = linha celular de câncer colorretal humano; HEK-293= linha celular renal embrionária; NaOH = Hidróxido de sódio; B16F10 = linhagens celulares de melanoma de murino; NHF = fibroblastos humanos normais; HaCaT = linha celular de queratinócitos

Tabela 5: Atividades biológicas de compostos isolados a partir de extratos de *C. ferrea*

Composto	Alvo ou Modelo	Propriedade biológica avaliada	Resultados	Referências
Galactomanano	Ratos Wistar	Anti-hiperglicêmica e toxicidade	Dose eficiente de 10 mg/kg; Não apresentou toxicidade	(CUNHA et al., 2017)
Galactomanano sulfatado	Vírus DENV-2 em células Vero	Antivirais, antioxidante e citotoxicidade	96 % de inibição contra o DENV-2 na concentração de 25 g/mL; IC ₅₀ de 0,94 µg/mL	(MARQUES et al., 2015)
Revifolin carboxylic acid,	HaCaT	Antioxidantes e citotoxicidade	DE ₅₀ 5 µg/mL e IC ₅₀ 124,9 µg/mL	(NAWWAR et al., 2015)
2"-O-Galloylorientin	HaCaT	Antioxidantes e citotoxicidade	DE ₅₀ 1,9 µg/mL e IC ₅₀ 67,5 µg/mL	(NAWWAR et al., 2015)
2"-O-Galloylvitexin	HaCaT	Antioxidantes e citotoxicidade	DE ₅₀ 3,8 µg/mL e IC ₅₀ 59,7 µg/mL	(NAWWAR et al., 2015)
2 "-O-galloyl vitexin	HepG-2, HCT-116, Hep2 e MCF-7	Citotoxicidade	IC ₅₀ : 18,5; 22,6; 24,2 e 28,4 µg/mL, respectivamente	(HUSSEIN et al., 2016)

HaCaT = linha celular de queratinócitos

Atividade Antimicrobiana

A atividade antibacteriana do extrato hidrometanólico das vagens de Pau-ferro foi avaliada em bactérias orais que estão comumente associadas ao mau hálito, tendo como resultados principais uma Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 50 µg/mL e uma Concentração Bactericida Mínima (CBM) de > 50 µg/mL para *Parvimonas micra*, já para o microrganismo *Porphyromonas gingivalis* apresentou MIC de 120 µg/mL e MBC de 130 µg/mL (VELOSO et al., 2020). Enquanto que o extrato hidroalcoólico das vagens apresentou atividade antibacteriana sobre *Helicobacter pylori* com CIM e CBM de 512 µg/mL (PRAZERES et al., 2019).

Extratos etanólicos da entrecasca e da vagem de *L. ferrea* foram avaliados quanto a sua atividade antimicrobiana e moduladora da atividade antibiótica sobre cepas bacterianas padrões de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25293), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e cepas multirresistentes de *S. aureus* (SA10), *E. coli* (EC06) e *P. aeruginosa* (PA 32), apresentando o valor de MIC de 1024 µg/mL para todas as cepas testadas, demonstrando que o extrato não apresentou atividade antibacteriana direta. Em relação à atividade moduladora, o extrato etanólico da vagem potencializou o efeito do fármaco Clindamicina e Amicacina contra SA10, Amicacina contra EC06 e Gentamicina contra PA32, enquanto que o extrato etanólico da entrecasca demonstrou sinergismo quando associado à Amicacina contra a linhagem SA10 e Gentamicina contra as contra as linhagens PA32 e EC06 (Ferreira et al., 2016).

O extrato hidroalcoólico das cascas de Pau-ferro apresentou potencial antimicrobiano em espécies do gênero *Staphylococcus* spp. isoladas do leite de cabras com mastite através da técnica de difusão em discos, exibindo tamanhos de halos de inibição com porcentagens de 61,1; 27,78 e 5,56 % para o extrato bruto e nas concentrações de 70 e 50 %, respectivamente (Paiva et al., 2015). Esse mesmo tipo de extrato também apresentou atividade antimicrobiana sobre cepas de *S. aureus* ATCC 10390, *P. aeruginosa* ATCC 9721 e *E. coli* ATCC 25922 com valores de MIC: 0, 39; 0,79 e 0,19 mg.mL⁻¹, respectivamente (JOZALA et al., 2020).

A atividade antibacteriana de extratos das folhas de *L. ferrea* foi avaliada em diversas cepas bacterianas: *Bacillus subtilis* (UFPEDA86), *E. coli* (UFPEDA 224), *Proteus vulgaris* (UFPEDA740), *P. aeruginosa* (UFPEDA416), *S. aureus* (UFPEDA02) e isolados clínicos (UFPEDA 660 - corrimento vaginal; UFPEDA 663 -

ponta do cateter; UFPEDA 676 - secreção de prótese; UFPEDA 712 - transplante de secreção de ferida). O extrato metanólico apresentou MIC de 6,25; 12,5; 25; 3,12; 3,12; 12,5; 0,78; 3,12; 12,5 mg/mL, respectivamente. O extrato de ciclohexano com MIC de 0,039; 0,039; 0,039; 0,39; 0,078; 0,312; 0,039; 0,078; 0,039 mg/mL, respectivamente. O extrato de clorofórmio exibiu MIC de 1,56; 6,25; 12,5; 3,12; 0,78; 6,25; 0,78; 12,5; 12,5 mg/mL, respectivamente. O extrato de acetato de etila apresentou MIC de 0,78; 6,25; 12,5; 3,12; 1,56; 6,25; 0,39; 3,12; 3,12 mg/mL, respectivamente (LUNA et al., 2020).

O extrato aquoso das folhas e dos frutos de *L. ferrea* apresentaram potencial de 70 % de inibição do crescimento de *Ralstonia solanacearum* a uma concentração de 0,4 mg/mL (MALAFAIA et al., 2018). Enquanto que o extrato glicólico das folhas apresentou potencial antimicrobiano contra as seguintes cepas: *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus mitis* ATCC 9811, *Streptococcus sanguis* ATCC10556, *Streptococcus sobrinus* ATCC 27609 e *Lactobacillus casei* ATCC 7469 com valores de MIC que variaram de 14 a 15 mg/mL e MICA de 31,2 mg/mL para todas as cepas (CONDE et al., 2015).

O extrato hidroalcoólico dos frutos exibiu potencial antimicrobiano sobre as seguintes cepas: *S. aureus*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *P. aeruginosa* com médias de halos de inibição de 18; 12; 10 e 11 mm, respectivamente (Sousa et al., 2019). O extrato etanólico das vagens de *L. ferrea* também apresentou atividade antimicrobiana contra cepas Gram-positivas (*S. aureus*, *Enterococcus faecalis* e *B. subtilis*) e Gram-negativas (*E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*) com valores de MIC que variaram de 50 - 125 µg/mL (NASCIMENTO et al., 2015). Já o extrato glicólico das folhas exibiu uma média de halo de 0,97 cm sobre *S. aureus* ATCC 6538 (MAGALHÃES et al., 2015).

O extrato aquoso dos frutos exibiu atividade antibiofilme em biofilme formado por bactérias do filo Proteobacteria e Bacteroidetes, inibindo o seu crescimento em 82 % na concentração de 4 mg.mL⁻¹. O extrato também apresentou um percentual de inibição na densidade de bactérias planctônicas marinhas variando de 96 - 99 % em todas as concentrações testadas (0,5; 1; 2; 4; 8 mg.mL⁻¹) (AGOSTINI et al., 2020).

Atividade anti-halitose

Compostos voláteis de enxofre são produzidos por bactérias que estão presentes na cavidade bucal, sendo responsáveis pelo odor desagradável do hálito, ensaios em um modelo de sedimento salivar demonstraram que o extrato hidrometanólico das vagens de Pau-ferro inibiu a formação desses odores, reduzindo compostos voláteis de enxofre associadas à halitose (VELOSO et al., 2020).

Atividade antifúngica

O extrato hidroetanólico das sementes de *L. ferrea* apresentou atividade antifúngica frente às cepas de *Candida albicans* ATCC 10231, *C. glabrata* CCT 0728, *C. krusei* CCT 1517 e *C. guilliermondii* CCT 1890 com valores de MIC que variaram entre 4,8 - 78 µg/mL (SOARES et al., 2018b) (SOARES et al., 2018a).

Extratos da casca do caule de *L. ferrea* utilizando três solventes diferentes (Água, etanol e acetona) exibiram atividade antifúngica sobre espécies de fungos dermatófitos, apresentando o mesmo valor de MIC de 62,5 µg/mL para *Trichophyton rubrum* ATCC 28189 e 31,3 µg/mL para *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 11481, sendo que o autor classificou o valor de MIC ≤ 75,0 µg/mL como atividade antifúngica eficaz. O extrato aquoso da casca do caule também apresentou atividade antifúngica em isolados clínicos (*T. rubrum* e *T. mentagrophytes*) com um valor de MIC₅₀ de 31,3 µg/mL e MIC₉₀ de 62,5 µg/mL para ambas as espécies, MIC₅₀ e MIC₉₀ referem-se à concentração (µg/mL) do extrato que inibiu o crescimento em 50 e 90 % de todos os isolados, respectivamente (BIASI-GARBIN et al., 2016).

Ensaio utilizando o extrato etanólico das folhas de *C. ferrea* como controle alternativo da mancha marrom de alternaria, causada pelo fungo *Alternaria alternata* em frutos de tangerineira 'Dancy', evidenciaram que a concentração de 500 µg/mL apresentou uma redução de 52,0 % na severidade da doença (DEMARTELAERE et al., 2018). Enquanto que em folhas de mudas de tangerina 'Ponkan', o extrato aquoso e etanólico apresentaram 96,49 e 99,12 %, respectivamente na redução da severidade da doença na concentração de 1 mg/mL (PINTO et al., 2018).

O extrato alcoólico das folhas demonstrou potencial antifúngico sobre *Colletotrichum* sp. em sementes de *Sideroxylon obtusifolium* (Quixaba), visto que

todas as sementes tratadas com o extrato não apresentaram porcentagens de plântulas sintomáticas e taxas de transmissão do patógeno (MELO et al., 2016). O extrato aquoso também demonstrou atividade antifúngica sobre *Colletotrichum* sp. em sementes de quixaba, visto que a incidência de patógenos diminuiu em até 96 % na concentração de 0,075 mg.mL⁻¹ (MELO et al., 2017). Extratos de Pau-ferro também apresentaram atividade antifúngica sobre *Lasiodiplodia theobromae*, inibindo em 85,6 e 78,9 % o crescimento micelial nas concentrações de 30 e 20 %, respectivamente (PEIXINHO et al., 2017).

Atividade anti-inflamatória

O extrato aquoso das folhas de *L. ferrea* diminui o acúmulo de leucócitos (76 ± 2 %) e os níveis de Mieloperoxidase (85 ± 7 %) no líquido articular dos ratos nas doses de 100, 200 e 300 mg/kg quando comparado ao grupo controle de zymosan, substância utilizada para estimular a inflamação intra-articular. Além disso, o extrato reduziu significativamente os níveis de citocinas inflamatórias como interleucinas beta (IL-1β) e fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) nos tecidos articulares de ratos tratados com doses de 200 e 300 mg/kg (FALCÃO et al., 2019b). O extrato aquoso e hidroalcoólico (20 - 80 %) dos frutos também apresentou atividade anti-inflamatória em todas as doses testadas (50, 100 e 200 mg/kg), diminuindo a migração de células inflamatórias e os níveis de atividade da Mieloperoxidase (FALCÃO et al., 2019a).

Atividade antioxidante

Geralmente são utilizados dois parâmetros para avaliar a integridade da defesa antioxidante do corpo: o primeiro é a quantidade de glutathiona, a qual é responsável por promover a desintoxicação e eliminação de radicais livres, o segundo é o teor de malondialdeído (MDA), caracterizado como marcador da peroxidação lipídica. Os extratos aquoso e hidroalcoólico dos frutos e folhas de Pau-ferro demonstraram potencial antioxidante em todas as doses avaliadas (50, 100 e 200 mg/kg), elevando os níveis totais de glutathiona e diminuindo os níveis de MDA (FALCÃO et al., 2019a) (FALCÃO et al., 2019b) (GUERRA et al., 2017).

O extrato hidroetanólico das folhas de Pau-ferro e compostos isolados desse

extrato (revifolin carboxylic acid, 2"-O-Galloylvitexin e 2"-O-Galloylorientin) apresentaram atividade antioxidante através da capacidade de absorção de radicais de oxigênio em queratinócitos HaCaT, apresentando valores de dose efetiva (DE_{50}) de 12,5; 5; 3,8 e 1,9 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (NAWWAR et al., 2015).

O extrato etanólico das folhas de *C. ferrea* demonstrou potencial antioxidante, onde a DE_{50} foi de $12,45 \pm 2,86 \mu\text{g/mL}$, exibindo uma acentuada atividade na eliminação de radicais no ensaio de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) utilizando ratos machos Sprague-Dawley como modelos experimentais (HASSAN et al., 2015). Outros resultados positivos também foram encontrados utilizando o mesmo tipo de extrato com EC_{50} de 4,4 $\mu\text{g/mL}$ (DPPH) e 2,5 $\mu\text{g/mL}$ 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline) (ABTS) e IC_{50} de 10,57 $\mu\text{g/mL}$ (DPPH) e 2,77 $\mu\text{g/mL}$ (ABTS), demonstrando elevada atividade de eliminação de radicais livres. Além disso, a atividade antioxidante também foi determinada pelo teste de branqueamento com β -caroteno, exibindo 46,63 % de eficácia (Nascimento et al., 2015) (Nascimento et al., 2017).

O extrato hidroalcoólico das folhas também apresentou potencial antioxidante com atividade elevada na eliminação dos radicais livres DPPH e ABTS com valores de IC_{50} de 28,96 e 145,10 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. O extrato também elevou os níveis de Glutathiona em 60,62 % e 63,11 %) nas doses de 100 e 200 mg/kg, além de reduzir os níveis de peroxidação lipídica em todas as doses testadas (100, 200 e 400 mg/kg) (PRAZERES et al., 2019) .

Quatro extratos das vagens foram avaliados quanto a sua atividade antioxidante, clorofórmico, n-hexânico, hidroalcoólico e acetato de etila, porém apenas dois extratos apresentaram atividade na eliminação de radicais livres, o hidroalcoólico com valores de IC_{50} de 74,36 $\mu\text{g/mL}$ para DPPH e IC_{50} 9,76 $\mu\text{g/mL}$ para ABTS e o extrato de acetato de etila com valores de IC_{50} de 116,10 e 29,13 $\mu\text{g/mL}$ para DPPH e ABTS, respectivamente (DE AZEVEDO et al., 2020).

Atividade antileishmania

O extrato metanólico dos frutos e o extrato hexânico das folhas apresentaram atividade antileishmania, exibindo valores de IC_{50} de 15,04 e 53,09 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ contra promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*. Enquanto que os extratos metanólicos das folhas e frutos apresentaram atividade com IC_{50} de 129,42 e 173,11

$\mu\text{g.mL}^{-1}$ sobre promastigotas de *Leishmania (V.) guyanensis*. O extrato metanólico dos frutos apresentou baixa toxicidade sobre macrófagos infectados *in vitro*, por esse motivo foi selecionado para os ensaios da atividade antileishmania em formas intracelulares em macrófagos infectados, os resultados evidenciaram que a concentração de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentou inibição de 62 e 54 % na sobrevivência de amastigotas *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*, respectivamente (COMANDOLLI-WYREPKOWSKI et al., 2017).

Efeitos Antiproliferativos e apoptóticos

Extratos etanólicos dos frutos de Pau-ferro foram avaliados quanto aos seus efeitos antiproliferativos em células de câncer colorretal de humanos (HT-29), apresentação potencial de inibição de proliferação das células cancerígenas nos extratos dos frutos que utilizaram etanol a 40, 60 e 80 %, podendo destacar os seguintes resultados: 15-25 % de inibição da proliferação entre as doses 25 - 100 $\mu\text{g/mL}$ do extrato etanólico a 40 %, já o extrato etanólico a 60 % apresentou uma taxa de 50 % de inibição da proliferação na dose 25 $\mu\text{g/mL}$ e o extrato etanólico a 80 % demonstrou 43,7 % de inibição na dose de 12,5 $\mu\text{g/mL}$, todos esses resultados foram observados nas primeiras 24 horas do experimento, nesse mesmo período, os extratos não exibiram toxicidade na linhagem de células renais embrionárias (HEK-293), sendo essas livres de tumores (GUERRA et al., 2017).

Quanto aos efeitos apoptóticos, o extrato dos frutos utilizando etanol a 40 % na dose de 25 $\mu\text{g/mL}$ expressou um elevado percentual de células em apoptose (38,7 %) na linhagem tumoral HT-29, enquanto que para a linhagem de células não tumorais HEK-293, os valores de células em processo de apoptose não diferiram estatisticamente do controle (GUERRA et al., 2017).

Atividade anti-rugas e anti-clareamento

Os extratos etanólico das vagens e cascas de *L. ferrea* apresentaram elevada atividade inibidora de elastase, com inibição de 35,99 % a 250 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato das cascas e 19,6 % para o extrato das vagens. Em relação à colegendase, os extratos não exibiram potenciais de inibição significativos, já para a hialuronidase, os dois extratos tiveram melhor potencial de inibição em comparação ao controle

(PEDROSA et al., 2016).

Os efeitos anti-melanogênicos dos dois extratos foram analisados em células B16F10 (melanoma de murino), antes de receber o tratamento com a concentração de 25 µg/mL dos extratos por 48 horas, as células foram pré-tratadas com IBMX e apresentaram um aumento na atividade da tirosinase, após o tratamento com os extratos houve reduções significativas de 99,0 e 96,4 % na atividade da tirosinase quando tratadas com o extrato da casca e da vagem, respectivamente (PEDROSA et al., 2016). Ensaio analisando a atividade fotoprotetora do extrato etanólico das cascas demonstrou um fator de proteção solar (FPS) de 3.29 na concentração 0,100 mg/mL (ANDRADE et al., 2019).

Atividade Anti-hiperglicêmica

Um Galactomanano extraído a partir das sementes de jucá demonstrou atividade anti-hiperglicêmica, quando administrado por sonda oral na dose de 10 mg/kg em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina. Nos primeiros dias de tratamento houve a redução da glicemia e dos níveis sanguíneos de triacilgliceróis, além de impulsionar a recuperação à sensibilidade para a insulina no tecido adiposo, contribuindo para recuperação funcional do mesmo (CUNHA et al., 2017).

A administração oral do extrato etanólico das folhas de *C. ferrea* também apresentou atividade anti-hiperglicêmica em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, reduzindo níveis de função hepática, glicose sérica elevada e amilase, e em contra partida aumentou os níveis de insulina sérica, as proteínas totais e o peso corporal (HASSAN et al., 2015).

Atividade antiviral

Galactomanano sulfatado extraído de *L. ferrea* exibiram 96 % de inibição na concentração de 25 g/mL contra o vírus da dengue DENV-2, como também apresentaram forte atividade antioxidante em células Vero infectadas com o vírus da dengue (DENV-2), com IC₅₀ de 0,94 µg/mL (MARQUES et al., 2015).

Atividade Antinociceptiva

O extrato aquoso dos frutos de *L. ferrea* exibiu atividade analgésica através do teste de placa quente em ratos nas doses de 100 e 200 mg/kg no tempo de 90 e 60 - 90 minutos, respectivamente (FALCÃO et al., 2019a).

Atividade antiulcerogênica

O extrato seco de Pau-ferro exibiu atividade antiulcerogênica em ratos Wistar com lesões induzidas por etanol absoluto, apresentando inibição de 46,36, 87,56, e 95,99 % nas doses de 100, 200, e 400 mg/kg, respectivamente. Já em úlceras desenvolvidas com administração de etanol-acidificado, o extrato demonstrou proteção de 59,12 e 96,61 % no grupo tratado com as doses de (200 e 400 mg/kg). Ao final dos ensaios para avaliação do potencial gastroprotetor do extrato, os valores de ED foram de 113 e 185,7 mg/kg para o grupo que possuíam úlceras induzidas por etanol absoluto e etanol-acidificado, respectivamente. Além disso, a dose de 200 mg/kg diminuiu a área de úlceras crônicas induzidas por ácido acético em 77,44 % (PRAZERES et al., 2019).

Efeitos hipolipidêmicos

O extrato hidroetanólico das folhas de *L. ferrea* foi avaliado quanto ao seu efeito hipolipidêmico *in vitro* na atividade da HMG CoA-redutase, enzima responsável pela biossíntese do colesterol. O extrato apresentou atividade de inibição enzimática de 86 %, resultado semelhante ao do medicamento (Lipantil) utilizado no controle positivo. Nos ensaios *in vivo*, utilizando ratos Wistar, o grupo tratado com o extrato apresentou reduções significativas de 53,08; 25,03; 48,84 e 23,28 % nos níveis de colesterol total (CT), colesterol lipoproteína de baixa densidade (LDL-C), triglicerídeos (TG) e lipídios totais, respectivamente, ao passo que o HDL-C exibiu aumento significativo de 158,71 % em comparação ao grupo não tratado, ou seja, o grupo hipercolesterolêmico. As análises histopatológicas demonstraram que os ratos tratados com o extrato possuíam o fígado com aspecto normal e com a presença de congestão e alterações degenerativas muito leves (NAWWAR et al., 2015).

Toxicidade

Ratas prenhas tratadas com os extratos de cascas e sementes de Pau-ferro apresentaram modificações em alguns parâmetros bioquímicos, dentre eles pode-se destacar o aumento dos níveis de creatinina no soro materno quando comparados ao controle, somado a isso o grupo de ratas expostas ao extrato da semente possuíam líquido amniótico rico em glicose e aspartato aminotransferase e níveis baixos de cálcio, em decorrência disso os fetos apresentaram menores comprimentos das seções da cabeça e do corpo quando comparados com o controle, como também, exibiram anomalias viscerais e esqueléticas (PICKLER et al., 2019).

Através de ensaios toxicológicos utilizando adultos do peixe zebrafish (*Danio rerio*) como organismo modelo foi possível observar que não houve alterações comportamentais quando exposto ao extrato etanólico dos frutos de *L. ferrea*, entretanto as análises histopatológicas de diferentes tecidos demonstraram alterações nas brânquias, intestino e fígado. Já ensaios utilizando as concentrações de 25, 50 e 125 mg/L do extrato demonstraram taxas de letalidade em embriões de 30, 33,3 e 10 %, respectivamente, enquanto que concentrações maiores (250 e 500 mg/L) desencadearam edema no coração, saco vitelino e escoliose (Ferreira et al., 2019). Enquanto que o extrato hidroalcoólico das cascas apresentou CL₅₀ de 822,6334 µg/mL na avaliação da toxicidade sobre *Artemia salina* L., sendo considerada toxicidade baixa (LIMA et al., 2019).

A avaliação da toxicidade do extrato etanólico das folhas de *C. ferrea* demonstrou perfil não tóxico, pois os ratos submetidos às concentrações do extrato não exibiram mudanças comportamentais ou respostas neurológicas significativas, não havendo taxas de mortalidade em nenhuma das doses até o final dos ensaios (HASSAN et al., 2015). Resultados semelhantes foram encontrados na avaliação da toxicidade aguda do extrato etanólico dos frutos e o extrato hidroalcoólico das vagens em ratos Wistar, com uma dose letal (LD) superior a 2000 mg/kg para o extrato das vagens (KOBAYASHI et al., 2015) (PRAZERES et al., 2019).

Genotoxicidade

A atividade genotóxica do extrato etanólico das sementes de Pau-ferro sobre

os eritrócitos de *Astyanax* sp. foi medida através do ensaio cometa, onde foi possível observar que o comprimento da cauda aumentou em 2,5x o nível de quebras de DNA das hemácias, quando expostas as doses de 5, 10 e 20 mg /L em comparação ao controle negativo, demonstrando potencial genotóxico nos eritrócitos de *Astyanax* sp., além disso também foi verificada uma resposta clastogênica à exposição na dose de 20 mg/L, evidenciada por uma diminuição no comprimento da cauda (SOUSA et al., 2018).

Citotoxicidade

O potencial de citotoxicidade do extrato hidroetanólico das folhas de *L. ferrea* sobre linhagens celulares de canceres humanos (fígado HepG2, mama MCF-7, cólon HCT-116, laringe Hep2 e próstata PC3) foi analisado através do ensaio de sulforodamina B (SRB). Os resultados demonstraram que o extrato apresentou atividade citotóxica sobre as cinco linhagens de células tumorais analisadas com IC₅₀ de 19,3 µg/mL para a linhagem celular do fígado HepG-2, sendo considerada a atividade citotóxica mais eficiente, já para as demais linhagens, laringe Hep2, mama MCF-7 e cólon HCT-116, os valores de IC₅₀ foram de 20, 21,8 e 24,47 µg/mL, respectivamente e em relação a linhagem celular da próstata PC3, a atividade citotóxica foi negativa (HUSSEIN et al., 2016).

O composto 2 "-O-galloylvitexin foi isolado a partir do extrato hidroetanólico das folhas de *L. ferrea* e também foi analisado quanto ao seu potencial de citotoxicidade sobre as linhagens e através de método já citados anteriormente, apresentando resultados semelhantes, com atividade citotóxica mais eficaz sobre a linhagem celular do fígado HepG-2 com IC₅₀ de 18,5 µg/mL, seguida pela linhagem celular do cólon HCT-116, laringe Hep2 e mama MCF-7 com valores de IC₅₀ de 22,6; 24,2 e 28,4 µg/mL, respectivamente (HUSSEIN et al., 2016). A citotoxicidade dos extratos etanólicos das cascas e das vagens de *L. ferrea* foi avaliada em células B16F10 (melanoma de murino) e em fibroblastos humanos normais (NHF), o extrato da vagem apresentou como resultado uma IC₅₀ de 50,1 µg/mL para as células B16F10 após o período de 48 horas de tratamento, já o extrato das cascas apresentou um percentual de 47 % de viabilidade das células B16F10. Ambos os extratos não apresentaram citotoxicidade significativa no NHF (PEDROSA et al., 2016).

Os extratos aquosos e hidroalcoólico (20 - 80 %) dos frutos não apresentaram efeito citotóxico sobre linhagens de células de fibroblastos embrionários de camundongos (3T3) em todos os períodos analisados, 24; 48 e 72 horas (FALCÃO et al., 2019a). Já ensaios com o extrato hidrometanólico das sementes de *L. ferrea* demonstrou toxicidade em células de fibroblastos (L929) quando utilizado em concentrações de 1000; 500 e 250 µg/mL, já as concentrações abaixo de 250 µg/mL não apresentaram citotoxicidade (SOARES et al., 2018a).

O potencial de citotoxicidade de um Galactomanano extraído a partir das sementes de jucá foi avaliado *in vitro* em neutrófilos humanos através do ensaio da lactato desidrogenase (LDH), pelo qual é possível detectar a morte celular, como necrose. Os resultados demonstraram que o Galactomanano em todas as concentrações analisadas (10–200 µg/mL) não elevou a atividade da LDH quando comparado aos dados do controle negativo (CUNHA et al., 2017). Ensaios com galactomananos sulfatados nas concentrações de 25, 50, e 100 g/mL também não apresentaram citotoxicidade em células Vero (MARQUES et al., 2015).

O potencial de citotoxicidade do extrato hidroetanólico das folhas de *L. ferrea* e de compostos isolados desse extrato como Brevifolin carboxylic acid, 2''-O-Galloylvitexin e 2''-O-Galloylorientin foi investigado em queratinócitos HaCaT pelo método de ensaio vermelho neutro (NRU). Os resultados da atividade citotóxica exibiram valores de IC₅₀ de 114,4; 124,9; 59,7 e 67,5 µg/mL para o extrato, Brevifolin carboxylic acid, 2''-O-Galloylvitexin e 2''-O-Galloylorientin, respectivamente (NAWWAR et al., 2015).

O extrato aquoso das vagens de *L. ferrea* exibiu citotoxicidade sobre células meristemáticas de raízes de *Allium cepa*, inibindo a divisão celular nas concentrações de 1g/500 mL e 1g/1000 mL em 24 e 48 horas de exposição. Já nos ensaios para avaliação do potencial citoprotetor nas células tratadas com paracetamol na concentração de 0,008 mg/mL, o extrato apresentou efeito citoprotetor em ambas as concentrações. Além disso, o extrato não contribuiu para a atividade antiproliferativa causada por um composto mutagênico nas células meristemáticas de raízes de *A. cepa* (SILVA et al., 2015b).

Atividade cicatrizante

Formulações em pó e pomada desenvolvidas a partir das vagens de Pau-ferro

foram avaliadas quanto ao seu potencial cicatrizante em feridas limpas de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), sendo administradas três vezes ao dia. Os resultados demonstraram que os animais tratados com a pomada a 24 % apresentaram um melhor percentual de inibição da área da lesão, já em relação aos demais tratamentos observou-se ineficiência na redução do período final de cicatrização (BATISTA et al., 2017).

Extrato das cascas de *L. ferrea* rico em polissacarídeos nas concentrações de 0,025, 0,05, 0,75 e 0,1 % apresentou potencial para diminuir a área e o aumento da contração de feridas em ratos Wistar, além disso, o extrato reduziu a infiltração de mediadores inflamatórios, como TNF- α e IL-1 β , contribuindo para a aceleração do processo de cicatrização das feridas, evidenciada pela presença de sinais clínicos (edema, hiperemia, exsudato) atenuados, associado a isso as úlceras tratadas com o extrato apresentaram formação de tecido conjuntivo organizado e deposição de colágeno, como também, uma camada de tecido epitelial formada protegendo o tecido de granulação (PEREIRA et al., 2016).

Resultados positivos foram encontrados utilizando o pó das vagens de Pau-ferro para o processo de cicatrização de feridas em ratos Wistar, havendo redução significativa da área das lesões e a partir do terceiro dia de tratamento, as feridas haviam secado e não possuíam exsudatos, além de exibir uma crosta regular e espessa com a presença de glóbulos vermelhos mononucleares e fibrina, sob a forma de coágulo sanguíneo nas bordas da ferida (Carvalho et al., 2016).

O tratamento de feridas cutânea em ratos Wistar com extrato etanólico dos frutos de jucá proporcionou a formação de crostas de coloração marrom-escura a preto sobre as feridas nos animais tratados nas concentrações de 50 e 12,5 %, foi possível também observar o desprendimento da crosta no decorrer dos dias de tratamento tópico com o extrato, o grupo tratado com o extrato na concentração de 12,5 % exibiu epiderme constituída em todos os animais e quando comparada a concentração de 50 % mostrou-se mais eficiente no tratamento de feridas cutâneas em ratos (KOBAYASHI et al., 2015).

Ratos Wistar diabéticos e não diabéticos com lesões induzidas por contato térmico foram tratados com extrato hidroalcoólico das cascas de *L. ferrea* incorporado com membranas de nanocelulose bacteriana, diante disso o grupo com ratos não diabéticos exibiram epitelização após 14 dias de tratamento, enquanto que o demais animais apresentaram epitelização após 21 dias de tratamento (JOZALA et

al., 2020).

Ação repelente

A ação de repelência do pó da casca da fruta de Pau-ferro contra espécies de moscas da família *Calliphoridae* foi analisada utilizando armadilhas que continham fígado bovino em processo de deterioração como atrativo para as moscas, diante disso, os tratamentos que possuíam a presença do pó nas concentrações testadas de 20 e 50 %, apresentaram uma maior porcentagem de repelência, 97,5 e 100 %, respectivamente (FERNANDES et al., 2016).

Atividade inseticida

A atividade inseticida do extrato hidroalcoólico das folhas de *L. ferrea* foi avaliada sobre as ninfas do *Aphis craccivora* (pulgão-preto), demonstrando que a concentração de 5 % apresentou atividade inseticida com 51,71 % de eficiência (GOMES; DUTRA; ALMEIDA, 2019). Também foi verificada atividade inseticida dos extratos aquosos e metanólicos das vagens e das folhas contra *Dactylopius opuntiae* (Cochonilha-do-carmin), exibindo percentual de 72,46 - 99,33 % de mortalidade de fêmeas adultas (LOPES et al., 2018a). Resultados utilizando o mesmo tipo de extrato e a mesma espécie de cochonilha demonstraram CL_{50} variando de 20 - 150 mg/mL para as ninfas e 43 - 50 mg/mL para os adultos, enquanto que outros ensaios utilizando cupins como modelo de estudo (*Nasutitermes corniger*) exibiram CL_{50} variando de 0,255 - 1,279 mg.mL⁻¹ para os operários e 0,146 - 8,003 mg.mL⁻¹ para os soldados (LOPES et al., 2018b) (LOPES et al., 2020).

Fertilizante

A serapilheira de folhas de Pau-ferro foi utilizada para avaliar seu potencial fertilizante frente à cultura do *Sorghum bicolor* L. (Sorgo) e após o período de 75 dias foi constatado que a serapilheira de Pau-ferro elevou os teores de Potássio, Cálcio e Magnésio no solo, porém não aumentou a produção de matéria seca da parte aérea das plantas de sorgo (PRIMO et al., 2018).

Potencial Alelopático

Extrato hidroalcoólico das sementes de *L. ferrea* exibiu uma porcentagem de 30 % de mudas anormais de melão (*Cucumis melo* L.) na maior concentração (1 %), onde as mudas apresentaram raízes com imperfeições, dentre elas, a ausência de pelos absorventes, ápice necrótico, escuro e duro, além de gravitropismo negativo, já o extrato hidroalcoólico das folhas contribuiu para o crescimento da parte aérea de plântulas de meloeiro na maior concentração testada (1 %), ao passo que interferiu negativamente para crescimento da raiz em relação ao controle (Oliveira et al., 2016).

Folhas de Pau-ferro em processo de decomposição exibiram potencial alelopático sobre plântulas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L.), afetando o comprimento da parte aérea e do sistema radicular e massa seca total das plântulas (ALVES et al., 2019). O extrato a quente das folhas, cascas e raízes exibiram potencial alelopático sobre *Calotropis procera*, impedindo a sua germinação, enquanto que a germinação de *Cenchrus echinatus* foi inibida pelo extrato a quente das folhas (LEANDRO et al., 2019).

Biossorvente

Ensaio com um biossorvente produzido a partir dos frutos de *L. ferrea* para remoção do azul de metileno de meios aquosos evidenciaram uma cinética rápida agregada a uma boa adsorção, demonstrando que os frutos podem tornar-se uma excelente alternativa às de custo mais elevado utilizadas para remoção de poluentes existentes em águas residuais (Carvalho et al., 2018). Carvões ativados preparados a partir de resíduos das vagens apresentaram um percentual de até 97,67 % de remoção de captopril farmacêutico de meios aquosos (KASPERISKI et al., 2018).

Outras bioatividades

O chá das cascas do caule de *L. ferrea* exibiu potencial erosivo sobre os terceiros molares humanos, tendo como valor de pH $0,28 \pm 0,05$, considerado próximo ao valor de pH que promove a desmineralização de esmalte dentário, apresentando uma perda de 37,03 % do mesmo (MARTINS et al., 2018).

O extrato hidroalcoólico das vagens demonstrou potencial antimetastático,

pois diminuiu a migração de células ACP02 (Adenocarcinoma gástrico) a partir das 24 horas de tratamento, apresentando efeito dose-resposta que se elevou em concentrações de 50 µg/mL (DE AZEVEDO et al., 2020). O extrato aquoso das sementes de Pau-ferro não apresentou potencial para inibir hemorragia induzida pelo veneno de *Bothrops jararaca* em camundongos suíços (DE MOURA et al., 2015).

Extratos polissacarídicos das folhas, vagens e cascas de Pau-ferro apresentaram efeito edematogênico em ratos Wistar nas doses de 0,01-1 mg/kg, sendo esses efeitos inferiores aos desenvolvidos pelas drogas utilizadas como controle (Carragenana e dextrana).

Análise Crítica

As investigações fitoquímicas são fundamentais para o entendimento da base química da substância medicinal e explorar o princípio do tratamento de doenças através desses princípios ativos, entretanto ainda existem na literatura muitos estudos que utilizam técnicas colorimétricas para determinar a presença de fitoquímicos, então é fundamental que as pesquisas futuras adotem técnicas metabolômicas para traçar o perfil fitoquímico dos extratos. As moléculas isoladas de *C. ferrea* e seus extratos brutos com altas concentrações dos ácidos gálico, cafeico e elágico, assim como os flavonóides, catequina, epicatequina e quercetina, possuem um amplo espectro de propriedades terapêuticas, no entanto apenas alguns compostos como Galactomannan, Sulphated galactomannan, Revifolin carboxylic acid foram isolados e avaliados em ensaios *in vivo* e *in vitro*, conforme foi evidenciado nesta revisão.

É importante salientar que os estudos que avaliaram atividades farmacológicas não apresentaram resultados aprofundados sobre os mecanismos de ação molecular e celular dos extratos brutos testados, como também dos compostos isolados, dessa forma, investigações destinadas a determinar suas características toxicológicas e de segurança *in vivo* dos são necessárias para entender os mecanismos farmacocinéticos e farmacodinâmicos desses produtos, buscando evidenciar como ocorre a distribuição, absorção, biotransformação e eliminação ao longo do tempo de administração dessas drogas.

Os estudos farmacológicos se concentraram nos relatos dos efeitos

antibacterianos, antioxidantes, anti-inflamatórios, antihiperlipidêmico e cicatrizantes, o que enfatizam as utilizações etnomedicinais dessa planta. No entanto, não houve evidências experimentais e farmacológicas para comprovar os usos tradicionais desta espécie no tratamento de distúrbios relacionados à malária, anemia, além de suas propriedades calmantes.

Conclusão

Neste trabalho, relatamos os aspectos etnobotânicos, fitoquímicos e farmacológicos de *C. ferrea*. Esta planta medicinal é muito utilizada nas práticas tradicionais para tratar certas doenças e apresentou interessantes propriedades biológicas em várias investigações científicas. No campo farmacológico, demonstrou atividades antibacteriana, antioxidante, anti-inflamatória, antidiabética e cicatrizante. No entanto, as investigações farmacológicas anteriores se concentraram principalmente nas frações orgânicas dos extratos brutos, com pouca atenção nos extratos aquosos; sendo necessário dar mais atenção ao seu uso tradicional, visto que esse uso se dá principalmente através de formulações a base de água. Da mesma forma, são imprescindíveis ensaios clínicos mais abrangentes. Em relação à análise fitoquímica dessa espécie foi relatada a presença de diferentes compostos que representam várias classes químicas como flavonóides, polifenóis, terpenóides, taninos, saponinas, esteroides e outros compostos fenólicos, porém, os relatos das propriedades farmacológicas citados nesta revisão não demonstraram os mecanismos moleculares pelos quais os extratos de *C. ferrea* atuam. Diante disso, se faz necessário o desenvolvimento de novas pesquisas para estabelecer uma ligação entre os usos tradicionais, compostos ativos e atividades farmacológicas relacionadas, bem como estudos detalhados para determinar o perfil toxicológico de *C. ferrea*.

Referências

- AGOSTINI, V. O. et al. Non-toxic antifouling potential of Caatinga plant extracts: effective inhibition of marine initial biofouling. *Hydrobiologia*, v. 847, p. 45–60, 2020.
- ALBERGARIA, E. T. DE; SILVA, M. V. DA; SILVA, A. G. DA. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais em comunidades rurais do município de Lagoa Grande, Pernambuco, Brasil. *Revista Fitos*, v. 13, n. 2, p. 137–154, 2019.
- ALMEIDA-NETO, J. R. DE; BARROS, R. F. M. DE; SILVA, P. R. R. Uso de plantas medicinais em comunidades rurais da Serra do Passa-Tempo , estado do Piauí , Nordeste do Brasil. *Brazilian Journal of Biosciences*, v. 13, n. 3, p. 165–175, 2015.
- ALVES DA SILVA, F. et al. Bark of the Stem of *Libidibia ferrea* Associated with Mycorrhizal Fungi: An Alternative to Produce High Levels of Phenolic Acids. *The Open Microbiology Journal*, v. 12, n. 1, p. 412–418, 2018.
- ALVES, R. M. et al. Efeito alelopático de *Libidibia ferrea* Mart. sobre o vigor das sementes de feijão-caupi. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, v. 14, n. 3, p. 476–479, 2019.
- ANDRADE, B. DE A. et al. Photoprotective Activity of Medicinal Plants From the Caatinga Used as Anti-inflammatories. *Pharmacognosy Magazine*, v. 15, n. 61, p. 356–361, 2019.
- ANDRADE, G. C.; SILVA, L. C. Responses of tropical legumes from the Brazilian Atlantic Rainforest to simulated acid rain. *Protoplasma*, v. 254, n. 4, p. 1639–1649, 2017.
- BATISTA, E. K. F. et al. Avaliação da Atividade Cicatrizante de Preparados à base de Jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart.). *Archives of Veterinary Science*, v. 22, n. 3, p. 30–39, 2017.
- BIASI-GARBIN, R. P. et al. Antifungal potential of plant species from brazilian caatinga against dermatophytes. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, v. 58, n. 1, p. 18–22, 2016.
- BRAGANTE, R. B. et al. Physiological and metabolic responses of immature and

mature seeds of *Libidibia ferrea* ((Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz) under contrasting storage temperatures. Brazilian Journal of Botany, v. 41, p. 43–55, 2018.

BUENO, N. R. et al. Levantamento Etnofarmacológico e Farmacológico de Plantas Medicinais Comercializadas em Rondonópolis (MT). Biodiversidade, v. 2, n. 8, p. 2–20, 2019.

CAJAIBA, R. L. et al. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais comercializadas no município de Uruará, Pará, Brasil. Biotemas, v. 29, n. 1, p. 115, 2016.

CARVALHO, F. G. et al. Assessment of the healing activity of jucá pods [*Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz] in cutaneous lesions of rats. Acta Scientiarum - Technology, v. 38, n. 2, p. 137–143, 2016a.

CARVALHO, F. G. C. et al. Assessment of the healing activity of jucá pods [*Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz] in cutaneous lesions of rats. Acta Scientiarum. Technology, v. 38, n. 2, p. 137, 2016b.

CARVALHO, L. B.; CHAGAS, P. M. B.; PINTO, L. M. A. *Caesalpinia ferrea* Fruits as a Biosorbent for the Removal of Methylene Blue Dye from an Aqueous Medium. Water, Air, and Soil Pollution, v. 229, n. 9, p. 37200, 2018.

CARVALHO, S. M. C. et al. Viability of *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz var. *ferrea*) seeds by tetrazolium test. Journal of Seed Science, v. 39, n. 1, p. 7–12, 2017.

CASTRO, K. N. DE C. et al. Ethnobotanical and ethnoveterinary study of medicinal plants used in the municipality of Bom Princípio do Piauí, Piauí, Brazil. Journal of Medicinal Plants Research, v. 10, n. 23, p. 318–330, 2016.

COMANDOLLI-WYREPKOWSKI, C. D. et al. Antileishmanial activity of extracts from *Libidibia ferrea*: development of in vitro and in vivo tests. Acta Amazonica, v. 47, n. 4, p. 331–340, 2017.

CONDE, N. C. DE O. et al. In vitro antimicrobial activity of plants of the Amazon on oral biofilm micro-organisms. Journal of Dental Science Original, v. 30, n. 4, p. 179–

183, 2015.

CORDEIRO, M. C.; BOTREL, R. T.; HOLANDA, A. C. Levantamento etnobotânico de espécies arbóreas no assentamento Tabuleiro Grande, Apodi, Rio Grande do Norte. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, v. 12, n. 1, p. 122, 2017.

CUNHA, A. P. et al. Polysaccharides from *Caesalpinia ferrea* seeds – Chemical characterization and anti-diabetic effects in Wistar rats. *Food Hydrocolloids*, v. 65, p. 68–76, 2017.

DA SILVA, F. J.; SILVEIRA, A. P.; GOMES, V. DOS S. Plantas medicinais e suas indicações ginecológicas: estudo de caso com moradoras de Quixadá, CE, Brasil. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 14, n. 3, p. 193–201, 2016.

DE AZEVEDO, L. F. C. et al. Aqueous ethanol extract of *Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul) L.P. Queiroz (juca) exhibits antioxidant and migration-inhibiting activity in human gastric adenocarcinoma (ACP02) cells. *PLoS ONE*, v. 15, n. 1, p. 1–16, 2020.

DE DAVID, M.; PASA, M. C. As plantas medicinais e a etnobotânica em Várzea Grande, MT, Brasil. *Interações (Campo Grande)*, v. 16, n. 1, p. 97–108, 2015.

DE MATOS, S. S.; DE MELO, A. L.; SANTOS-SILVA, J. Caesalpinioideae e Cercidoideae (Leguminosae) no Parque Estadual Mata da Pimenteira, Semiárido de Pernambuco, Brasil. *Rodriguesia*, v. 70, 2019.

DE MORAES REGO, C. A. R. et al. Levantamento etnobotânico em comunidade tradicional do assentamento pedra suada, do município de cachoeira grande, Maranhão, Brasil. *Acta Agronomica*, v. 65, n. 3, p. 284–291, 2016.

DE MOURA, V. M. et al. Plants used to treat snakebites in Santarém, western Pará, Brazil: An assessment of their effectiveness in inhibiting hemorrhagic activity induced by *Bothrops jararaca* venom. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 161, p. 224–232, 2015.

DE OLIVEIRA, A. K. et al. Allelopathy by extracts of Caatinga species on melon seeds. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 37, n. 2, p. 557–566, 2016.

DE SOUZA PAIVA, W. et al. Atividade antibacteriana da casca do jucá (*libidibia ferrea* (mart. ex tul.) l. p. queiroz), frente a *staphylococcus* spp. isolados do leite de cabras com mastite. *Archives of Veterinary Science*, v. 20, n. 2, p. 141–146, 2015.

DEMARTELAERE, A. C. F. et al. Alternativas no controle da mancha marrom de alternaria em tangerineira 'Dancy'. *Summa Phytopathologica*, v. 44, n. 2, p. 164–169, 2018.

FALCÃO, T. R. et al. *Libidibia ferrea* Fruit Crude Extract and Fractions Show Anti-Inflammatory, Antioxidant, and Antinociceptive Effect in Vivo and Increase Cell Viability in Vitro. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2019, 2019a.

FALCÃO, T. R. et al. Crude extract from *Libidibia ferrea* (Mart. ex. Tul.) L.P. Queiroz leaves decreased intra articular inflammation induced by zymosan in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 19, n. 1, p. 1–10, 2019b.

FERNANDES, C. P. M. et al. Repellent Action of *Carapa guianensis* and *Caesalpinia ferrea* for flies species of Calliphoridae family. *Ciência Rural*, v. 46, n. 5, p. 867–870, 2016.

FERREIRA, A. B. et al. Plants Used to Treat Malaria in the Regions of Rio Branco-Acre State and Southern Amazonas State - Brazil. *International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients*, v. 2, n. 9, p. 1–5, 2015a.

FERREIRA, D. Q. et al. *Libidibia ferrea* (Jucá), a traditional anti-inflammatory: A study of acute toxicity in adult and embryos zebrafish (*danio rerio*). *Pharmaceuticals*, v. 12, n. 4, p. 1–15, 2019.

FERREIRA, J. V. DE A. et al. Evaluation of antimicrobial and modulatory activity of the ethanol extract of *Libidibia ferrea* (Mart. ex tul.) l.p. queiroz. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, v. 21, n. 1, p. 71–82, 2016a.

FERREIRA, M. R. A. et al. Chromatographic and Spectrophotometric Analysis of Phenolic Compounds from Fruits of *Libidibia ferrea* Martius. v. 12, n. 2, p. S285–S291, 2016b.

FERREIRA, W. N. et al. Effect of water stress on seedling growth in two species with different abundances: The importance of Stress Resistance Syndrome in seasonally dry tropical forest. *Acta Botanica Brasilica*, v. 29, n. 3, p. 375–382, 2015b.

GOMES, V. E. DE V.; DUTRA, J. A. C.; ALMEIDA, M. M. M. Controlling the cowpea black aphid (*Aphis craccivora* Koch) with botanical extracts. *Biotemas*, v. 32, n. 3, p. 117–121, 2019.

GONÇALVES, K. G.; PASA, M. C. O saber local e as plantas medicinais na comunidade sucuri, cuiabá, mt, brasil. *Biodiversidade*, v. 14, n. 2, p. 50–73, 2015.

GUERRA, A. C. V. DE A. et al. *Libidibia ferrea* presents antiproliferative, apoptotic and antioxidant effects in a colorectal cancer cell line. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 92, p. 696–706, 2017.

HASSAN, S. K. et al. Hypoglycemic and antioxidant activities of *Caesalpinia ferrea* Martius leaf extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 5, n. 6, p. 462–471, 2015.

HUSSEIN, S. A. M. et al. Cytotoxic activity of bioactive compound from *Caesalpinia ferrea* Martius, Fabaceae. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, v. 8, n. 12, p. 2080–2084, 2016.

INDRIANI, D.; ELYA, B.; NOVIANI, A. Arginase inhibitory activity and total flavonoid content on *caesalpinia ferrea* C. Mart stem bark extracts. *Pharmacognosy Journal*, v. 10, n. 6, p. 1180–1183, 2018.

JOZALA, A. F. et al. *Libidibia ferrea* loaded in bacterial nanocellulose: evaluation of antimicrobial activity and wound care. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 6, n. 2, p. 6212–6226, 2020.

KASPERISKI, F. M. et al. Production of porous activated carbons from *Caesalpinia ferrea* seed pod wastes: Highly efficient removal of captopril from aqueous solutions. *Journal of Cleaner Production*, v. 197, p. 919–929, 2018.

KFFURI, C. W. et al. Antimalarial plants used by indigenous people of the Upper Rio Negro in Amazonas, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 178, p. 188–198,

2016.

KOBAYASHI, Y. T. DA S. et al. Avaliação fotoquímica e potencial cicatrizante do extrato etanólico dos frutos de Jucá (*Libidibia ferrea*) em ratos Wistar. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 52, n. 1, p. 34–40, 2015.

LEAL, J. B. et al. Etnobotânica de plantas medicinais com potencial anti- inflamatório utilizadas pelos moradores de duas comunidades no município de Abaetetuba, Pará. *Biodiversidade*, v. 3, n. 18, p. 110–125, 2019.

LEANDRO, C. DOS S. et al. Phenolic Composition and Allelopathy of *Libidibia ferrea* Mart. ex Tul. in Weeds. *Journal of Agricultural Science*, v. 11, n. 2, p. 109, 2019.

LEANDRO, Y. A. DA S.; JARDIM, I. N.; GAVILANES, M. L. The use of medicinal plants in health care practices by the residents of a community settlement in Anapu, Pará, Brazil. *Biodiversidade*, v. 16, n. 2, p. 30–44, 2017.

LIMA, B. B.; FERNANDES, F. P. Uso e diversidade de plantas medicinais no município de Aracati – CE, Brasil. *Journal of Applied Pharmaceutical Sciences*, n. 7, p. 24–42, 2020.

LIMA, I. E. O.; NASCIMENTO, L. A. M.; SILVA, M. S. Comercialização de plantas medicinais no município de arapiraca-AL. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 18, n. 2, p. 462–472, 2016.

LIMA, M. F. F. et al. Avaliação toxicológica através do bioensaio com *Artemia salina* Leach de espécimes vegetais pertencentes à caatinga. *Brazilian Journal of Health Review*, v. 2, n. 6, p. 5950–5963, 2019.

LINS, T. R. DA S. et al. Tannin Content of the Bark and Branch of Caatinga Species. *Journal of Experimental Agriculture International*, v. 31, n. 1, p. 1–8, 2019.

LOPES, R. DA S. et al. Controle Biológico e Alternativo de *Dactylopius opuntiae* por Fungo Entomopatogênico e Extratos Vegetais em Plantação de Opuntia fícus-indica (Pernambuco/Brasil). *Pesquisa Agropecuária Pernambucana*, v. 23, p. 23–26, 2018a.

LOPES, R. S. et al. Efficacy of *Libidibia ferrea* var. *ferrea* and *Agave sisalana*

Extracts against *Dactylopius opuntiae* (Hemiptera: Coccoidea). *Journal of Agricultural Science*, v. 10, n. 4, p. 255, 2018b.

LOPES, R. S. et al. Termiticidal Activity of *Libidibia ferrea* var. *ferrea* and of the Association With *Isaria* spp. Against *Nasutitermes corniger*. *Journal of Agricultural Science*, v. 12, n. 1, p. 159, 2020.

LUNA, M. S. M. et al. Bioprospection of *Libidibia ferrea* var. *ferrea*: Phytochemical properties and antibacterial activity. *South African Journal of Botany*, v. 130, p. 103–108, 2020.

MAGALHÃES, L. S. et al. Avaliação da atividade antibacteriana do extrato de *Caesalpinia ferrea* Martius e desenvolvimento de uma formulação fitocosmética. *Revista Científica da Faminas*, v. 11, n. 1, p. 27–43, 2015.

MALAFAIA, C. B. et al. Effects of Caatinga Plant Extracts in Planktonic Growth and Biofilm Formation in *Ralstonia solanacearum*. *Microbial Ecology*, v. 75, n. 3, p. 555–561, 2018.

MARQUES, M. M. M. et al. Antiviral and Antioxidant Activities of Sulfated Galactomannans from Plants of Caatinga Biome. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2015, 2015.

MARTINS, I. C. F. et al. Ex vivo evaluation of the erosive effect of acid tea widely consumed in Brazil. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, v. 12, n. 3, p. ZC50–ZC53, 2018.

MATOS, A. C. B.; ATAÍDE, G. DA M.; BORGES, E. E. DE L. E. Physiological, physical, and morpho-anatomical changes in *Libidibia ferrea* ((Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz) seeds after overcoming dormancy. *Journal of Seed Science*, v. 37, n. 1, p. 26–32, 2015.

MEDEIROS, J. G. F. DE et al. Qualidade Sanitária de Semente de *Caesalpinia ferrea*: Incidência de Fungos, Controle e Efeitos na Qualidade Fisiológica com o Uso de Extratos Vegetais. *Revista Floresta*, v. 45, n. 1, p. 163–174, 2015.

MELO, P. A. F. R. DE et al. Protection of *Sideroxylon obtusifolium* seeds against

Colletotrichum sp. with *Caesalpinia ferrea* extract. African Journal of Agricultural Research, v. 12, n. 49, p. 3433–3440, 2017.

MELO, P. A. F. R. et al. Extracts of *Caesalpinia ferrea* and *Trichoderma* sp. on the control of *Colletotrichum* sp. transmission in *Sideroxylon obtusifolium* seeds. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 18, n. 2, p. 494–501, 2016.

NASCIMENTO, J. et al. Avaliação do potencial antioxidante e anti-*Helicobacter pylori* in vitro de extratos de plantas medicinais utilizadas popularmente na região amazônica. Revista Fitos, v. 11, n. 2, p. 140–152, 2017.

NASCIMENTO, P. et al. Antioxidant and antimicrobial properties of ethanolic extract of *Libidibia ferrea* pods. Revista Fitos, v. 9, n. 3, p. 207–216, 2015.

NAWWAR, M. A. et al. Phenolics from *Caesalpinia ferrea* Mart.: Antioxidant, cytotoxic and hypolipidemic activity. Pharmazie, v. 70, n. 8, p. 553–558, 2015.

OLIVEIRA, M. S. DE et al. Conhecimento e uso tradicional das espécies madeireiras e medicinais no município de Aldeias Altas, Maranhão, Brasil. Enciclopédia Biosfera, v. 13, n. 24, p. 1160, 2016.

PALHETA, I. C. et al. Ethnobotanical study of medicinal plants in urban home gardens in the city of abagetuba, Paá state, Brazil. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas, v. 16, n. 3, p. 206–262, 2017.

PEDROSA, T. DO N. et al. Anti-wrinkle and anti-whitening effects of jucá (*Libidibia ferrea* Mart.) extracts. Archives of Dermatological Research, v. 308, n. 9, p. 643–654, 2016.

PEIXINHO, G. DE S. et al. Avaliação da eficiência de extratos de plantas nativas da caatinga sobre o controle da podridão seca (*Lasiodiplodia theobromae*) em cachos da videira cv. Itália. Summa Phytopathologica, v. 43, n. 2, p. 155–157, 2017.

PEREIRA, L. D. P. et al. Modulator effect of a polysaccharide-rich extract from *Caesalpinia ferrea* stem barks in rat cutaneous wound healing: Role of TNF- α , IL-1 β , NO, TGF- β . Journal of Ethnopharmacology, v. 187, p. 213–223, 2016.

PEREIRA, L. D. P. et al. USO DE EXTRATOS DE POLISSACARÍDICOS DA

PLANTA MEDICINAL CAESALPINEA FERREA NA ESTIMULAÇÃO DO EDEMA NA PATA DE RATOS. *Ciência Animal*, v. 28, n. 1, p. 56–69, 2018.

PEREIRA, M. DAS G. DA S.; COELHO-FERREIRA, M. Uso e diversidade de plantas medicinais em uma comunidade quilombola na Amazônia Oriental, Abaetetuba, Pará. *Biota Amazônia*, v. 7, n. 3, p. 57–68, 2017.

PICKLER, T. B. et al. Effect of *Libidibia ferrea* bark and seed in maternal reproductive and biochemical outcomes and fetal anomaly in rats. *Birth Defects Research*, v. 111, n. 13, p. 863–871, 2019.

PINTO, K. M. S. et al. Plant extracts enhancers of defense response in ponkan mandarin Seedlings against *Alternaria alternate* f. spp. citri infection. *African Journal of Agricultural Research*, v. 13, n. 13, p. 650–656, 2018.

PRAZERES, L. D. K. T. et al. Antioxidant and Antiulcerogenic Activity of the Dry Extract of Pods of *Libidibia ferrea* Mart. ex Tul. (Fabaceae). *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2019, 2019.

PRIMO, A. A. et al. Potencial fertilizante da serapilheira de espécies lenhosas da Caatinga na recuperação de um solo degradado. *Revista Ceres*, v. 65, n. 1, p. 74–84, 2018.

RIBEIRO, R. V. et al. Ethnobotanical study of medicinal plants used by Ribeirinhos in the North Araguaia microregion, Mato Grosso, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 205, n. April, p. 69–102, 2017.

RIBEIRO, S. C.; MELO, N. D. P. DE; BARROS, A. B. Etnoconhecimento De Pequenos Agricultores Tradicionais Sobre Plantas Mediciniais No Tratamento De Dores Provocadas Pelo Trabalho. *Cadernos de Terapia Ocupacional da UFSCar*, v. 24, n. 3, p. 563–574, 2016.

SACRAMENTO, A. A. E; MARTINS FILHO, I. E.; DOS REIS, L. A. Estudo etnobotânico das plantas medicinais comercializadas numa feira livre num município do interior da Bahia. *Revista Enfermagem Atual in Derme*, v. 89, n. 27, 2019.

SANTOS, S. F. DOS et al. Aspectos do cultivo in vitro de *Libidibia ferrea* (Mart . Ex

Tul.) L. P. QUEIROZ (Leguminosae-Caesalpinioideae) como fonte alternativa para produção de metabólitos secundários. *Revista Espacios*, v. 39, n. 37, p. 17–24, 2018.

SANTOS, E. Q. et al. Etnobotânica da flora medicinal de quintais na comunidade Mamangal, Rio Meruú, Igarapé-Miri, Pará. *Scientia Plena*, v. 15, n. 5, p. 1–11, 2019.

SARAIVA, M. E. et al. Plant species as a therapeutic resource in areas of the savanna in the state of Pernambuco, Northeast Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 171, p. 141–153, 2015.

SILVA, C. G. et al. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais em área de Caatinga na comunidade do ítio Nazaré, município de Milagres, Ceará, Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 17, n. 1, p. 133–142, 2015a.

SILVA, M. P. DA; BARROS, R. F. M. DE; MOITA NETO, J. M. Farmacopeia natural de comunidades rurais no estado do Piauí, Nordeste do Brasil. *Desenvolvimento e Meio Ambiente*, v. 33, p. 193–207, 2015.

SILVA, F. et al. Potencial citotóxico, genotóxico e citoprotetor de extratos aquosos de *Caesalpinia pyramidalis* Tul., *Caesalpinia ferrea* Mart. e *Caesalpinia pulcherrima* Sw. *Revista Brasileira de Biociências*, p. 101–109, 2015b.

SILVA, R. DAS C.; RORIZ, B. C.; SCARELI-SANTOS, C. Etnoconhecimento sobre as espécies medicinais utilizadas pela população de Araguaína, TO. *Revista São Luís Orione*, v. 1, n. 13, p. 1–21, 2018.

SOARES, M. R. P. S. et al. in Vitro Antifungal Activity and Cytotoxicity Screening of Dry Crude Extracts From Brazilian Amazonia Plants. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, v. 15, n. 4, p. 13, 2018a.

SOARES, M. R. P. S. et al. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Caesalpinia ferrea* (Tul.) Martius extract: Physicochemical characterization, antifungal activity and cytotoxicity. *PeerJ*, v. 2018, n. 3, p. 1–16, 2018b.

SOUSA, A. C. DE J. et al. Potencial antimicrobiano de extratos vegetais frente a cepas bacterianas de interesse médico em Macapá , Amapá ,. v. 24, n. 96, p. 85–90,

2019.

SOUSA, M. J. B. et al. Genotoxicity of *brosimum gaudichaudii* (Moraceae) and *caesalpinia ferrea* (fabaceae) in *astyanax* sp. (characidae) based on a comet assay. *Genetics and Molecular Research*, v. 17, n. 4, p. 1–8, 2018.

SOUZA, L. F. et al. Plantas medicinais referenciadas por raizeiros no município de Jataí, estado de Goiás. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 18, n. 2, p. 451–461, 2016.

VELOSO, D. J. et al. Potential antibacterial and anti-halitosis activity of medicinal plants against oral bacteria. *Archives of Oral Biology*, v. 110, n. September 2019, 2020.

4.2 ARTIGO 2

Partes dos resultados dessa dissertação estão publicados no artigo “Phytochemical prospection, evaluation of antibacterial activity and toxicity of extracts of *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz” foi publicado no periódico *Arabian Journal of Chemistry*, volume 15, artigo 103632, link para acesso: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187853522100647X>.

Arabian Journal of Chemistry (2022) 15, 103632



King Saud University

Arabian Journal of Chemistry

www.ksu.edu.sa
www.sciencedirect.com



ORIGINAL ARTICLE

Phytochemical prospection, evaluation of antibacterial activity and toxicity of extracts of *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz

Nair Silva Macedo^a, Cristina Rodrigues Barbosa dos Santos^b, Raimundo Luiz Silva Pereira^c, Suieny Rodrigues Bezerra^b, Jackelyne Roberta Scherf^d, Thiago Sampaio Freitas^c, Alisson Macário de Oliveira^e, Magda Rhayanny Assunção Ferreira^f, Luiz Alberto Lira Soares^f, Valdir de Queiroz Balbino^a, Henrique Douglas Melo Coutinho^{c,*}, Abolghasem Siyadatpanah^{g,*}, Polrat Wilairatana^{h,*}, Francisco Assis Bezerra da Cunha^b, Marcia Vanusa da Silva^a



^aGraduate Program in Biological Sciences, Federal University of Pernambuco - UFPE, Recife, PE, Brazil
^bLaboratory of Semi-Arid Bioprospecting (LABSEMA), Department of Biological Chemistry - URCA, Crato, CE, Brazil
^cLaboratory of Microbiology and Molecular Biology (LMBM), Department of Biological Chemistry - URCA, Crato, CE, Brazil
^dGraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco - UFPE, Recife, PE, Brazil
^eLaboratory Protein Biochemistry, Federal University of Pernambuco - UFPE, Recife, PE, Brazil
^fLaboratory of Pharmacognosy the Federal University of Pernambuco - UFPE, Recife, PE, Brazil
^gFerdows School of Paramedical and Health, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran
^hDepartment of Clinical Tropical Medicine, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok, Thailand

Received 18 October 2021; accepted 7 December 2021
Available online 11 December 2021

Introdução

Existem uma variedade de espécies da Caatinga que têm sido relatadas na literatura devido ao seu uso na medicina popular e na implementação para formulação de fitoterápicos, entretanto ainda são escassos os estudos que comprovem as propriedades farmacológicas dessas espécies (LUNA et al., 2020). Dentre essas espécies *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz, conhecida popularmente como Jucá ou Pau-ferro, pertencente à família Fabaceae é uma espécie endêmica do Brasil (FLORA DO BRASIL, 2021).

A utilização de *L. ferrea* na medicina popular tem sido documentada na literatura, sendo relatadas propriedades biológicas importantes como atividades: anti-inflamatória, antioxidante, antiproliferativa, cicatrizante, antifúngica e antibacteriana (FALCÃO et al., 2019; GUERRA et al., 2017; JOZALA et al., 2020; KOBAYASHI et al., 2015; NASCIMENTO et al., 2017; SOARES et al., 2018). Entretanto, não existem estudos que avaliem os efeitos de extratos de *L. ferrea* sobre cepas portadoras de mecanismos específicos de resistência a antibióticos, como bombas de efluxo.

As bombas de efluxo são proteínas que estão inseridas na membrana citoplasmática das células, podendo estar presente em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo capazes de extrudir ativamente antibióticos e substâncias tóxicas para o exterior da célula (BAMBEKE et al., 2003). Além disso, sabe-se que a resistência aos fármacos mediada pelas bombas de efluxo pode ocorrer por vias de resistência intrínseca, adquirida ou fenotípica (HERNANDO-AMADO et al., 2016), sendo frequentemente expressa por cepas de *Staphylococcus aureus*.

S. aureus é uma bactéria Gram-positiva, presente na microbiota natural de seres humanos. Entretanto, este patógeno pode atuar de forma oportunista e acometer pessoas imunocomprometidas, principalmente em ambientes nosocomiais, desencadeando processos inflamatórios graves como endocardite, sepse e pneumonia necrotizante (HAABER; PENADÉS; INGMER, 2017; SPAULDING et al., 2013). Além disso, *S. aureus* têm se tornado resistente a uma ampla gama de antibióticos utilizados na clínica, devido a práticas como uso incorreto e negligente dessas drogas, ocasionando o surgimento de Microrganismos Multidroga Resistentes (MDR) (DAVIES; BEHROOZIAN, 2020; WANG et al., 2021).

Diante disso, os produtos naturais são uma importante fonte para a descoberta e o desenvolvimento de novos produtos ou substâncias ativas, que em associação com substâncias sintéticas e/ou biológicas, bem como, de forma isolada, apresentam-se como uma alternativa para formulação de fármacos eficientes sobre diversas doenças humanas (NEWMAN; CRAGG, 2020).

No processo de descoberta de novos agentes antibacterianos, a avaliação da toxicidade do produto natural é uma etapa crucial para determinar o perfil toxicológico e a segurança sobre células eucarióticas (LI et al., 2021). Um modelo bastante utilizado para traçar o perfil toxicológico de substâncias é a mosca da fruta, *Drosophila melanogaster*, devido apresentar similaridade na fisiologia em relação aos mamíferos, como também é um organismo de ciclo de vida curto, os processos de criação e manutenção são simples, além da necessidade de baixos custos para sua manutenção (NG et al., 2019; ONG et al., 2017).

Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo de avaliar a composição fitoquímica dos extratos etanólicos das folhas e entrecascas de *L. ferrea*, bem como, verificar o seu potencial antibacteriano e inibidor de bomba de efluxo sobre a cepa IS-58 de *S. aureus* portadora da bomba de efluxo TetK, além de investigar a toxicidade dos extratos em modelo de *D. melanogaster*.

Materiais e Métodos

Coleta e Preparação dos Extratos

O material vegetal das folhas foi coletado na região do Cariri, no município de Crato, Ceará, Brasil tendo como coordenadas geográficas latitude sul 7° 14' 19,36" e 39° 24' 53,71" de longitude oeste de Greenwich. As entrecascas foram coletadas no sítio Cantinho, localizado no município de Exu, Pernambuco, Brasil com as seguintes coordenadas geográficas: 7° 30' 50.2" de latitude sul e 39° 50' 42.7" de longitude oeste de Greenwich. As folhas foram coletadas em 12 de Novembro de 2021, enquanto que a casca foi coletada em 12 de Fevereiro de 2021. A espécie vegetal foi identificada pela Prof. Dra. Maria Arlene Pessoa da Silva e um exemplar de voucher foi depositado no Herbário Caririense Dárdano de Andrade Lima - HCDAL da Universidade Regional de Cariri - URCA, catalogado sob o número de registro #13905.

As partes coletadas foram trituradas e submersas em solvente etanol PA, separadamente em temperatura ambiente por 72 horas. Após esse período, a solução obtida foi filtrada e submetida à destilação do solvente no aparelho evaporador rotativo a vácuo (Fisatom Equipamentos Científicos Ltd., Brasil), onde o produto obtido foi levado ao banho-maria, para evaporação do excedente etanólico (Quimis Equipamentos Científicos Ltd., Brasil). O rendimento do extrato obtido foi de 13,69 % para as folhas, 5,33 % para a entrecasca. O Extrato Etanólico das Folhas de *L. ferrea* foi denominado de EEFLF e o Extrato Etanólico das Entrecascas de *L. ferrea* foi denominado de EEELF.

Preparo da amostra e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Foram pesados 20 mg dos extratos (EEFLF e EEELF) e posteriormente esse volume foi transferido para balão volumétrico de 10 mL e solubilizado em 10 mL de etanol. Alíquotas de 5 mL das soluções obtidas foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL e o volume foi aferido com água ultrapura (Purelab Classic UV, Elga®).

Em seguida foram filtradas para vials com auxílio de filtro PVDF (0,45 µm; Chromafil®). Condições cromatográficas: a análise por CLAE foi realizada num sistema de HPLC Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, EUA), acoplado a um detector arranjo de fotodiodo (DAD; Thermo Fisher Scientific) e equipado com bomba binária (HPG-3x00RS, Thermo Fisher Scientific), desgaseificador e

amostrador automático equipado com um loop de 20 μ L (ACC-3000, Thermo Fisher Scientific). O comprimento de onda foi fixado em 270 nm. As separações cromatográficas foram obtidas com uma coluna C₁₈ (250 mm x 4,6 mm d.i., 5 μ m) Supelco[®] equipada com pré-coluna (C₁₈ de 4 mm x 3,9 m; Phenomenex[®]). As separações foram efetuadas a temperatura de 25 \pm 1 °C. A fase móvel foi constituída por água ultrapura (A) e metanol (B), ambos acidificados com ácido trifluoroacético a 0,05%, e fluxo ajustado a 0,9 mL/min. Um programa de gradiente foi aplicado como segue: 0–10 min, 12.5–25% B; 10–15 min, 25–40% B; 15–25 min, 40–75% B; 25–30 min, 75–75% B; 30–33 min, 75–12.5% B (FERREIRA et al., 2016b). Os dados foram analisados, após a injeção em triplicata, e processados usando o software Chromeleon 6.8 (Dionex/Thermo Fisher Scientific, EUA). Os padrões de ácido elágico (95% de pureza) e ácido gálico (pureza analítica) foram utilizados para confirmar a presença de compostos nos extractos por espectros de UV e tempo de retenção, e para calcular o conteúdo de cada composto nos extractos. Ambos foram adquiridos à Sigma-Aldrich[®].

Ensaio Microbiológicos

Cepas Bacterianas

A cepa de *Staphylococcus aureus* utilizada foi a IS-58 codificada pelo plasmídeo pT181, que carrega o gene que expressa a proteína de efluxo de Tetraciclina - TetK. A cepa foi fornecida pelo Prof. S. Gibbons (*University of London*), sendo mantida em ágar sangue (Laboratórios Difco Ltda., Brazil) e, antes dos experimentos, foi cultivada durante 24 h a 37 °C em meio sólido *Brain Heart Infusion* (BHI) -Agar (BHI, Acumedia Manufacturers Inc.).

Meios de Culturas

Para realização dos testes microbiológicos foram utilizados os meios de cultura: *Brain Heart Infusion* (BHI)-Agar (BHI, Acumedia Manufacturers Inc.), preparado de acordo com o fabricante e *Brain Heart Infusion* (BHI, Acumedia Manufacturers Inc.) preparado na concentração de 10 %.

Produtos químicos e reagentes

O antibiótico (Tetraciclina), brometo de etídio (EtBr), carbonilcianeto m-clorofenilidrazona (CCCP) foram obtidos da Sigma Aldrich Co. Ltd. (St. Louis, E.U.A.), enquanto que a Clorpromazina (CPMZ) foi obtida dos Laboratórios Aché Pharmaceuticals (Pernambuco, Brasil). O antibiótico Norfloxacin, bem como EEFLF e EEELF, foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) e em água esterilizada. A proporção de DMSO utilizada foi inferior a 5%. CPMZ e EtBr foram dissolvidos em água destilada estéril, enquanto o CCCP foi dissolvido em metanol/água (1:3, v/v). Todas as substâncias foram diluídas a uma concentração padrão de 1024 µg/mL.

Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CIM)

A CIM foi determinada para os compostos EEFLF e EEELF de acordo com o Método de Microdiluição em Caldo proposto por (JAVADPOUR et al., 1996) com adaptações. As estirpes utilizadas nos testes foram semeadas 24h antes das experiências. Após este período, o inóculo bacteriano foi suspenso em solução salina, correspondendo a 0,5 da escala McFarland, aproximadamente $1,5 \times 10^8$ (CFU)/mL. Eppendorfs® foram então preenchidos com 900 µL de BHI e 100 µL do inóculo e as placas foram preenchidas com 100 µL da solução final. A microdiluição foi realizada com 100 µL em diluições em série até ao penúltimo poço da placa (1:1), sendo este último utilizado como controlo de crescimento. As concentrações dos compostos variavam de 512 µg/mL a 8,0 µg/mL. Após 24 h de incubação, foram feitas leituras adicionando 20 µL de Resazurina (7-hidroxi-10-oxidofenoxazina-10-ium-3-one) (Exodo, Brasil). A Resazurina foi oxidada na presença do meio ácido causado pelo crescimento bacteriano, promovendo a mudança de cor do azul para o rosa (ELSHIKH et al., 2016). A CIM foi definida como a concentração mais baixa em que não se pode observar crescimento (ANDREWS, 2001). Os testes foram realizados em triplicata.

Avaliação da Inibição da Bomba de Efluxo pela Modificação da CIM de Antibióticos e Brometo de Etídeo

Para observar se EEFLF e EEELF atuam como potenciais inibidores da Bomba de Efluxo TetK, foi realizado um estudo comparativo entre os efeitos dos inibidores padrão da Bomba de Efluxo, avaliando a capacidade de ambos de

diminuir a MIC de EtBr e o antibiótico Tetraciclina. Os inibidores padrão CCCP e a Clorpromazina foram utilizados para fornecer a expressão da bomba TetK pelas estirpes testadas. A inibição da bomba de Efluxo foi testada utilizando uma Concentração Sub-inibitória (MIC/8) de inibidores e EEFLF e EEELF. Nos testes, 170 μL de cada inóculo bacteriano suspenso em solução salina, correspondente a 0,5 da escala McFarland, aproximadamente $1,5 \times 10^8$ (CFU)/mL, foi adicionado juntamente com os inibidores e EEFLF e EEELF (MIC/8) e completado com BHI. Estes foram então transferidos para placas de microdiluição de 96 poços, às quais foram adicionados 100 μL de antibiótico ou EtBr em diluições em série (1:1) variando de 512 a 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24h e o crescimento bacteriano foi avaliado com resazurina (7-hidroxi-10-oxidophenoxazin-10-ium-3-one). A resazurina foi oxidada na presença de meio ácido causado pelo crescimento bacteriano, causando a mudança de cor de azul para rosa (ELSHIKH et al., 2016). A CIM foi definida como a concentração mais baixa em que não se pode observar crescimento (ANDREWS, 2001). A CIM dos controles foi avaliada utilizando apenas placas com o antibiótico Tetraciclina e com EtBr e os testes foram realizados em triplicata.

Controle Negativo

Para o controle negativo, foram utilizadas as últimas fileiras de cavidades das placas de microdiluição, onde apenas o meio de cultura e o inóculo bacteriano foram adicionados sem a adição das substâncias testadas, tendo em conta a formação máxima do número de colônias bacterianas, para além de provar que o inóculo foi devidamente adicionado ao eppendorfs®. No entanto, estes números não foram adicionados aos gráficos de resultados devido à impossibilidade de medir o número de colônias formadas num período de 24h após os testes microbiológicos. A metodologia utilizada não permite a contagem das colônias bacterianas, no entanto, utilizámos a Resazurina como corante para identificar o crescimento bacteriano através da oxidação-redução.

Ensaio de Toxicidade

Estoque de *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster (estirpe de Harwich) foi obtida do National Species Stock Center, Bowling Green, OH. As moscas foram criadas em potes de vidro de 340 mL (15 cm de altura e 6,5 de diâmetro) cultivadas com o meio contendo: (83 % de massa de milho, 4 % de açúcar, 4 % de leite liofilizado, 4 % de farelo de soja, 4 % de farelo de trigo ou aveia e 1 % de sal). Por ocasião do cozimento da mistura foi acrescentado 1 g de Nipagin (Metilparabeno). Após resfriamento nos frascos de crescimento foi adicionado 1 mL de solução contendo *Saccharomyces cerevisiae*. As moscas foram criadas em estufas BOD de fotoperíodo à temperatura de 25 °C ± 1 °C e umidade relativa do ar de 60 %.

Ensaio de sobrevivência

O método de bioensaio de ingestão proposto por Cunha *et al.* (2015) foi empregado para avaliar a toxicidade do EEFLF e EEELF. Onde moscas adultas (machos e fêmeas de idade de aproximadamente de 4 dias), em número de 20, foram dispostas em frascos de 130 mL, previamente preparados com 1 mL de solução de sacarose em água destilada, na concentração de 20 %, permitindo que as moscas se alimentassem *ad libitum*. Os demais tratamentos receberam os volumes de 25, 50 e 100 mg/mL do extrato etanólico das folhas e da entrecasca de *L. ferrea*, sendo que esses volumes foram diluídos na solução de sacarose a 20 %. Todos os bioensaios foram conduzidos em estufa do tipo BOD com ciclo de claro e escuro de 12:12 horas, temperatura controlada a 26 °C ± 1°C e umidade relativa do ar de 60 %. Os testes foram realizados em triplicatas e as leituras das taxas de mortalidade foram feitas em 3,6, 9, 12, 24 e 48 horas (CUNHA *et al.*, 2015).

Ensaio de geotaxia negativa

O dano ao aparelho locomotor foi determinado pelo ensaio de geotaxia negativa, conforme descrito por (COULOM; BIRMAN, 2004). Resumidamente, logo após a contagem da mortalidade das moscas a cada hora 3, 6, 9, 12, 24 e 48. Foi realizado, concomitantemente, com as moscas sobreviventes o teste de geotaxia negativa que consiste em contar o número de moscas que sobem na coluna do vidro do próprio experimento, acima de 5 cm, num intervalo de tempo de 5 segundos. Os ensaios foram repetidos duas vezes em intervalos de 1 min. Os resultados foram

apresentados como a média de tempo (s) \pm EP obtidos em duas experiências independentes.

Análise Estatística

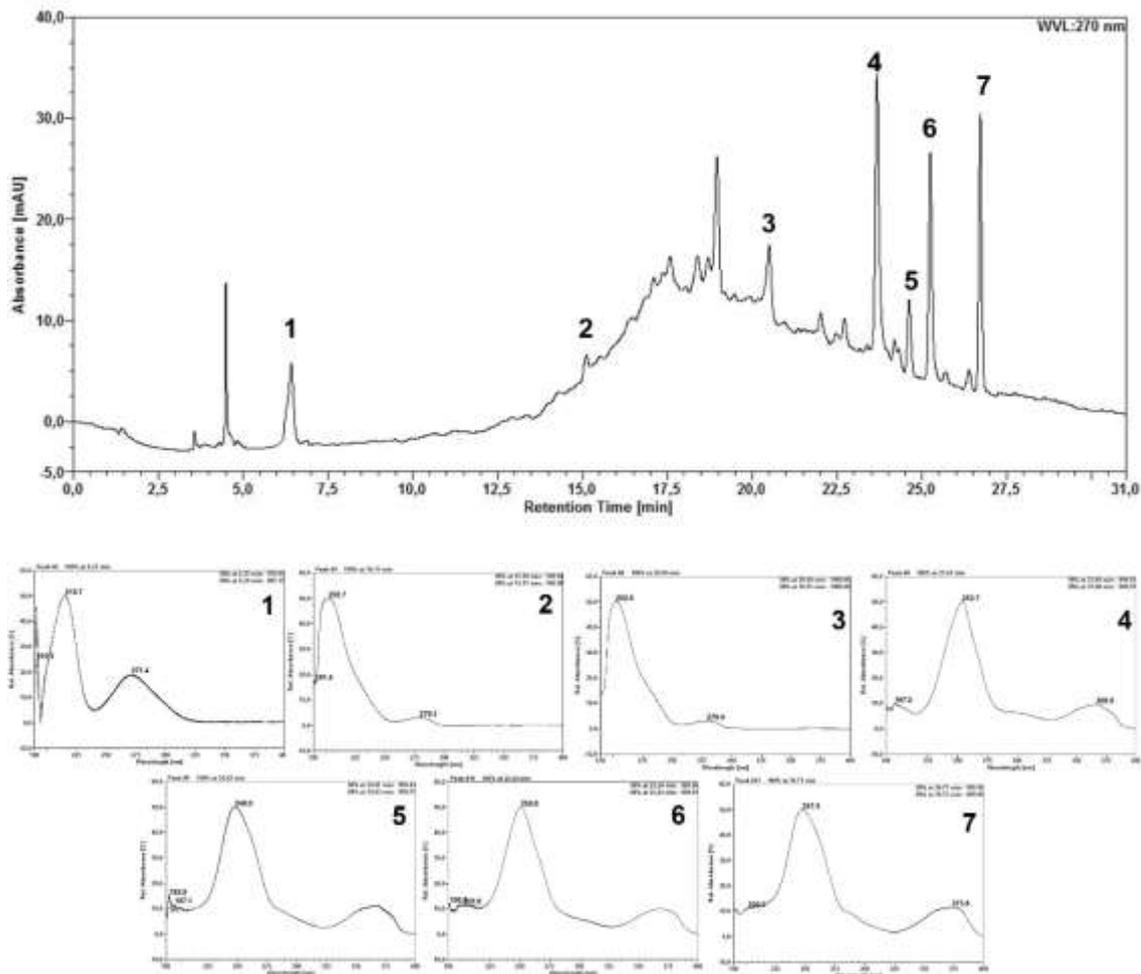
Os dados centrais e desvios padrões dos ensaios microbiológicos foram obtidos de acordo com a metodologia de Freitas et al. (2021), sobre análise microbiológica em placas de microdiluição. Os dados foram analisados através do programa estatístico GraphPad Prisma 6.01 através de um teste ANOVA de uma via. Em seguida foi feito um teste de Bonferroni post hoc (onde $p < 0,05$ foi considerado significativo e $p > 0,05$ não significativo). Para análise dos dados de toxicidade foi feito um teste ANOVA de duas vias, seguido por um teste de múltipla comparação de Tukey. Não havendo diferença estatística com uma mesma concentração em função do tempo.

RESULTADOS

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

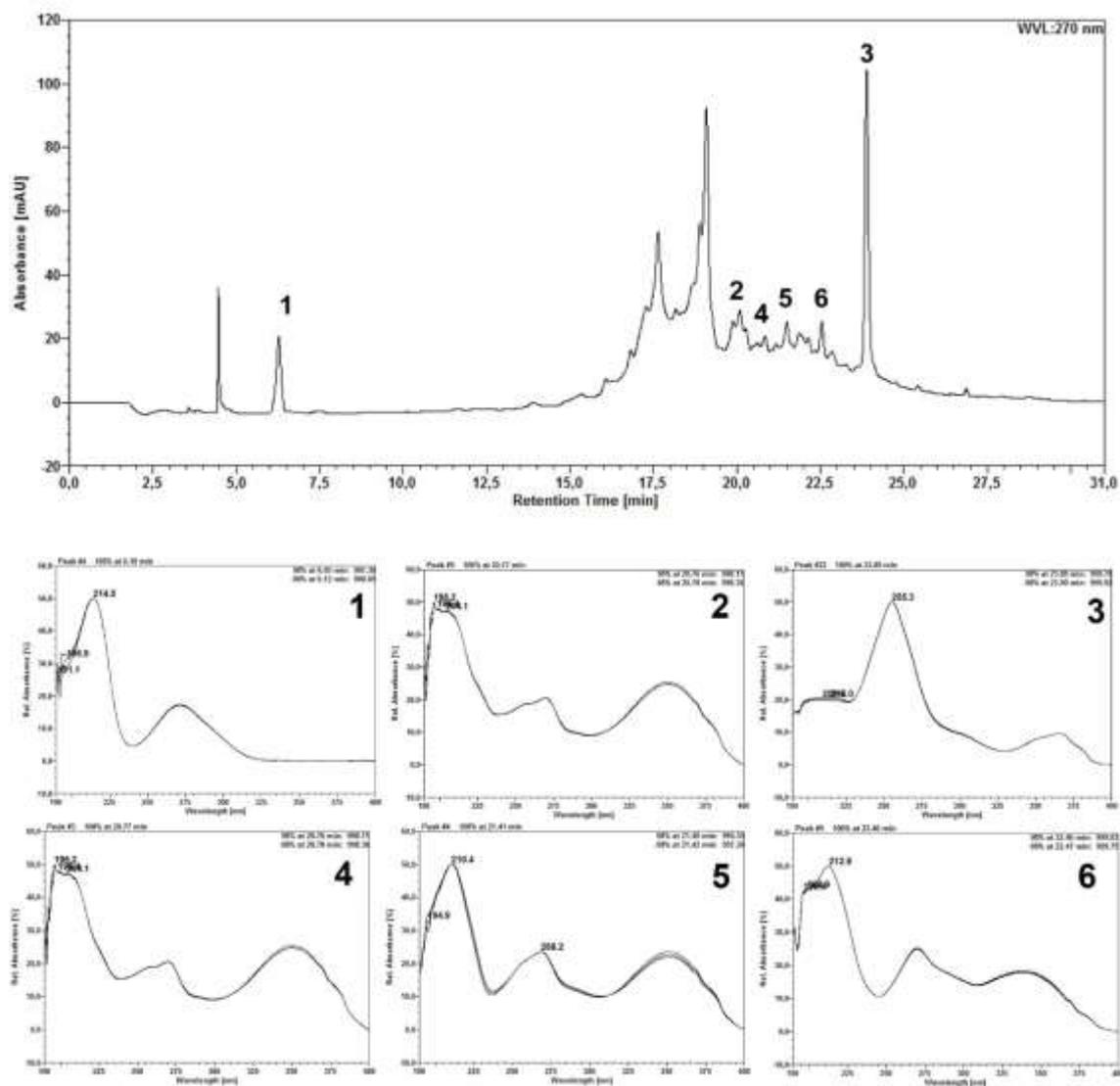
Neste estudo, foi utilizado o método por CLAE baseado em Ferreira et al., (2016b) para obter um sistema cromatográfico capaz de eluir e proporcionar resolução na separação de compostos nas amostras de *Libidibia ferrea*. Ao analisar o perfil cromatográfico da amostra EEELF (Figura 1), pode-se observar a presença de 7 compostos principais, não sendo possível identificar todas as substâncias. Entretanto, os picos observados nos tempos de retenção 6.27 min (pico 1) e 23.68 min (pico 7), indicam a presença de monômeros de taninos hidrolisáveis, ácido gálico e ácido elágico, respectivamente. Os picos 4, 5 e 6 correspondem à presença de taninos hidrolisáveis (derivados de ácido elágico) de acordo com os espectros de varredura. Os picos 2 e 3 indicam a presença de taninos condensados (derivados de catequina) de acordo com os espectros de varredura com máximos em 200 e 279 nm aproximadamente.

Figura 1. Cromatograma da amostra EEELF e espectro de varredura dos picos observados em 270 nm.



Quanto ao perfil cromatográfico da amostra EEELF (Figura 2), pode-se observar a presença de 6 compostos principais. Os picos observados nos tempos de retenção 6.10 min (pico 1) e 23.89 min (pico 3), indicam da presença de monômeros de taninos hidrolisáveis, ácido gálico e ácido elágico, respectivamente. Os picos 2, 4, 5 e 6 correspondem à presença de flavonoides, e, apesar de não ser possível identificar quais são, de acordo com os espectros de varredura é possível inferir que pertencem a classe (com máximos de absorção em 268 e 350 nm aproximadamente).

Figura 2. Cromatograma da amostra EEFLF e espectro de varredura dos picos observados em 270 nm.



Adicionalmente, a Tabela 1 contém os teores de ácido gálico e ácido elágico que foram calculados segundo a equação da reta dos padrões e os resultados foram obtidos em triplicata e expressos como média \pm desvio padrão (desvio padrão relativo).

Tabela 1. Teores de ácido gálico e ácido elágico dos extratos de *L. ferrea*

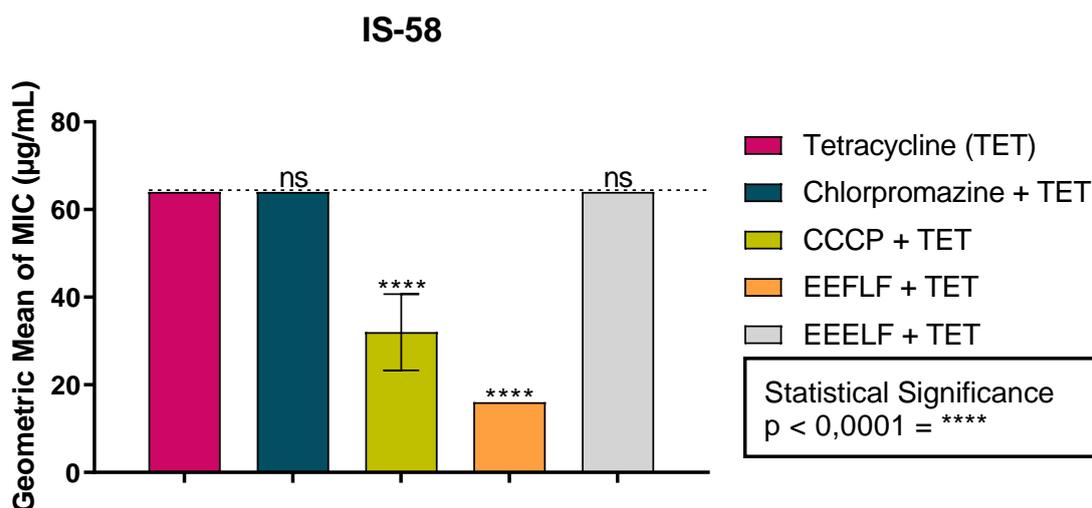
Amostra	Ácido gálico	Ácido elágico
EEFLF	0,224 ± 0,0021 g% (0,94%)	0,339 ± 0,0014 g% (0,42%)
EEELF	0,097 ± 0,0017 g% (1,75%)	0,162 ± 0,0020 g% (1,26%)

Ensaio Microbiológicos

Os ensaios para a obtenção da CIM do EEFLF e do EEELF contra a cepa de *S. aureus* portadora da bomba de efluxo TetK demonstraram uma atividade antibacteriana irrelevante, com um valor de CIM $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ para ambos os extratos. Já a CIM do antibiótico Tetraciclina foi $64 \mu\text{g/mL}$.

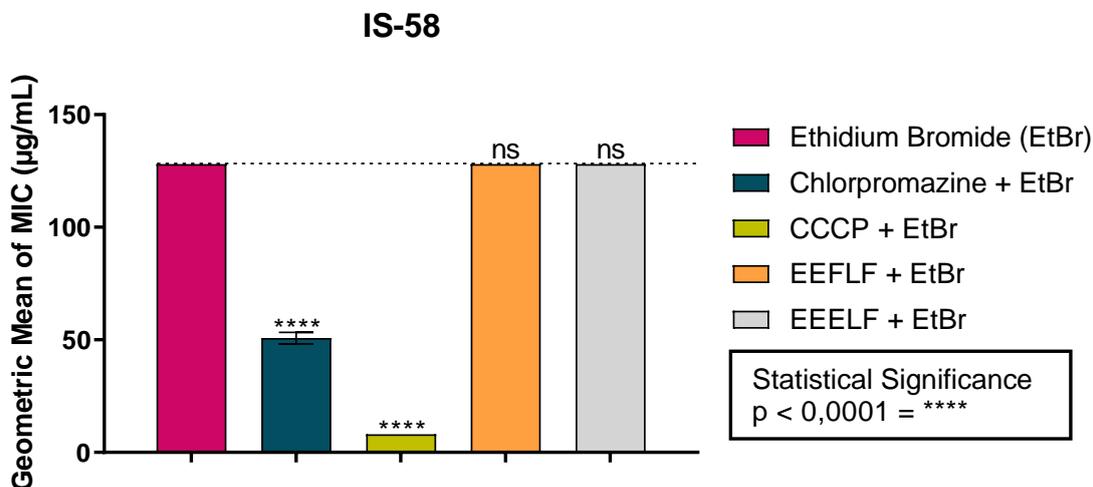
Em relação aos ensaios de associação entre a Tetraciclina e o EEFLF, houve uma redução na CIM do antibiótico de $64 \mu\text{g/mL}$ para $16 \mu\text{g/mL}$, sendo caracterizada como um efeito potencializador da eficácia do antibiótico (Figura 3). Quanto à associação da Tetraciclina com o EEELF não houve diferença estatística.

Figura 3: Efeito da combinação do EEFLF e do EEELF com o antibiótico tetraciclina sobre a cepa IS-58 de *S. aureus* portadora da bomba de efluxo TetK. O cianeto de carbonilo m-clorofenilidrazona (CCCP) e a Clorpromazina são inibidores padrão.



Na avaliação da inibição da bomba de efluxo por diminuição da CIM do brometo de etídio foi verificado que a associação de ambos os extratos não apresentaram efeito sobre o funcionamento da bomba de efluxo, visto que os valores não diferiram estatisticamente do controle (Figura 4).

Figura 4: Efeito da combinação do EEFLF e do EEELF com o brometo de etídio sobre a cepa IS-58 de *S. aureus* portadora da bomba de efluxo TetK. O cianeto de carbonilo m-clorofenilidrazona (CCCP) é um inibidor padrão.



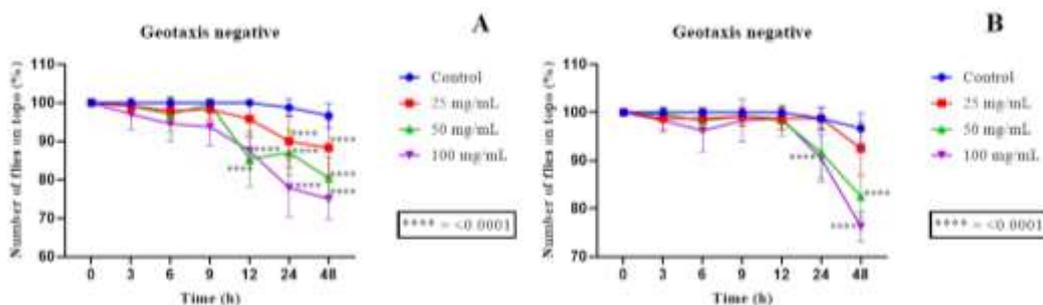
Ensaio toxicológicos

Os ensaios de toxicológicos utilizando o artrópode-modelo *D. melanogaster* demonstraram que ambos os extratos não apresentaram toxicidade em todas as concentrações testadas de 25, 50 e 100 mg/mL, visto que não houve mortalidade nos grupos de tratamento, razão pela qual, não foi calculada a EC_{50} .

Os dados de geotaxia negativa demonstram capacidade de EEFLF e EEELF de induzirem dano ao aparelho locomotor das moscas. Nesse sentido, foi possível observar que o EEFLF promoveu dano ao aparelho locomotor das moscas a partir das 12 horas de exposição nas concentrações de 50 e 100 mg/mL, havendo diferença estatística em relação controle, Figura 5A. Após o período de 24 horas de exposição ao EEFLF, a concentração de 25 mg/mL também promoveu dano ao aparelho locomotor das moscas.

Quanto ao EEELF foi demonstrado que apenas a concentração de 100 mg/mL diferiu estatisticamente do controle a partir das 24 horas de exposição, enquanto a concentração de 50 mg/mL só diferiu do controle positivo na última leitura de 48 horas de exposição ao extrato (Figura 5B).

Figura 5: Ensaios de geotaxia negativa utilizando o modelo *D. melanogaster*



(A) e (B) Dados de geotaxia negativa utilizando o modelo *D. melanogaster* frente ao EEFLF e EEELF, respectivamente; **** representa significância em relação ao controle

Discussão

Diversos estudos na literatura sobre a composição fitoquímica de extratos das cascas e folhas de *L. ferrea* evidenciam a presença de ácido elágico, gálico e cafeico, além da catequina, epicatequina, quercertina e kaempferol (ALVES DA SILVA et al., 2018; ANDRADE et al., 2019; INDRIANI; ELYA; NOVIANI, 2018; PEDROSA et al., 2016). Classes químicas como a dos taninos, flavonóides, cumarinas, saponinas, esteróides, terpenóides também foram identificados em triagens fitoquímicas de extratos das cascas e folhas de *L. ferrea* (FALCÃO et al., 2019b; LEANDRO et al., 2019; LUNA et al., 2020). Esses estudos corroboram com os nossos resultados, visto que as análises fitoquímica dos extratos etanólico das folhas e entrecasca de pau-ferro através da CLAE evidenciou a presença de taninos hidrolisáveis, flavonóides, ácido gálico e ácido elágico.

Compostos bioativos como os que estão inseridos em classes químicas como a dos flavonóides, alcalóides, terpenóides e esteróides, como também outros compostos fenólicos são utilizados para a formulação e desenvolvimentos de novos fármacos para o tratamento de distúrbios respiratórios, doenças do trato urinário e infecções cutâneas causadas por microrganismos (MAYEKAR et al., 2021).

Na literatura existem relatos sobre a atividade antibacteriana das folhas de *L. ferrea* contra *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* e *S. aureus* com CIM variando de 0,039 a 25 mg/mL (LUNA et al., 2020). Também há estudos avaliando a atividade antibacteriana da entrecasca contra

cepas padrões e multirresistentes de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*, onde verificaram que não houve inibição do crescimento bacteriano através da determinação da CIM $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ (FERREIRA et al., 2016). A MIC é definida como a menor concentração da substância capaz de inibir o crescimento bacteriano, e é necessária uma redução de três pontos no MIC para indicar a inibição do crescimento bacteriano (DAVIES AND WRIGHT, 1997; DAVIES AND BEHROOZIAN, 2020).

Os resultados do presente estudo demonstraram que o EEFLF e o EEELF não apresentaram atividade antibacteriana sobre a cepa IS-58 de *S. aureus*, portadora da bomba de efluxo TetK e não inibiram o funcionamento da bomba de efluxo quando se avaliou através do brometo de etídio. Mas, o extrato da folha de pau-ferro quando associado ao antibiótico, diminui a sua CIM em duas vezes, sendo caracterizada como uma ação potencializadora da eficácia do antibiótico, podendo estar agindo sobre outro mecanismo de resistência. Não existem estudos que avaliem a atividade antibacteriana dos extratos de *L. ferrea* sobre a cepa IS-58 de *S. aureus*, sendo o presente estudo o primeiro relato.

A Bomba de Efluxo TetK presente em *S. aureus* está inserida na *Major Facilitator Superfamily* – MFS que utiliza a força motriz do gradiente de prótons para expulsar ativamente a Tetraciclina para o exterior da célula bacteriana, diminuindo a sua concentração no meio intracelular e dificultando assim a sua ação para inibir o funcionamento dos ribossomos (CHOPRA; ROBERTS, 2001; HOBSON; CHAN; WRIGHT, 2021; KUMAR et al., 2020).

Além de investigar o potencial antibacteriano de substâncias naturais, é imprescindível analisar o seu perfil tóxico, visto que a atividade terapêutica de uma substância natural é considerada segura quando não há presença de toxicidade sobre células animais (LI et al., 2021). O presente estudo demonstrou que ambos os extratos não apresentaram toxicidade sobre o modelo alternativo *D. melanogaster*.

D. melanogaster é considerado um importante modelo alternativo para avaliar a toxicidade de produtos naturais *in vivo* devido apresentar uma rapidez na obtenção de resultados em comparação com modelos tradicionais, a exemplo, os roedores (PANDEY; NICHOLS, 2011). Além disso, *D. melanogaster* possui mais de 75% de genes de doenças homólogos aos dos humanos, como também é amplamente sensível a baixas concentrações de compostos (CHIFIRIUC et al., 2016). Aqui é o

primeiro relato sobre a toxicidade de extratos de *L. ferrea* sobre o modelo alternativo *D. melanogaster*.

Conclusão

Nesse estudo, a análise fitoquímica dos extratos das folhas e entrecascas de *L. ferrea* por CLAE demonstrou a presença de taninos hidrolisáveis, flavonóides, ácido gálico e ácido elágico. Entretanto, ambos os extratos não apresentaram atividade antibacteriana direta sobre a cepa IS-58 de *S. aureus*, como também, não atuaram como inibidores de bomba de efluxo. No entanto, a associação do extrato etanólico da folha de *L. ferrea* com a Tetraciclina resultou em uma associação sinérgica. Além disso, os extratos não apresentaram toxicidade sobre o modelo *D. melanogaster*. Conclui-se que o extrato etanólico da folha de *L. ferrea* potencializou o efeito do antibiótico tetraciclina, mas esse efeito não se deve a reversão da bomba de efluxo. Novos estudos devem ser realizados visando a identificar esse mecanismo de ação.

Referências

- ALVES DA SILVA, F. et al. Bark of the Stem of *Libidibia ferrea* Associated with Mycorrhizal Fungi: An Alternative to Produce High Levels of Phenolic Acids. **The Open Microbiology Journal**, v. 12, n. 1, p. 412–418, 2018.
- ANDRADE, B. DE A. et al. Photoprotective Activity of Medicinal Plants From the Caatinga Used as Anti-inflammatories. **Pharmacognosy Magazine**, v. 15, n. 61, p. 356–361, 2019.
- ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n. S1, p. 5–16, 2001.
- BAMBEKE, V. F. et al. Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: Occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 5, p. 1055–1065, 2003.
- CHIFIRIUC, M. C. et al. Drosophotoxicology: An emerging research area for assessing nanoparticles interaction with living organisms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 36, p. 1–14, 2016.
- CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 2, p. 232–260, 2001.
- COULOM, H.; BIRMAN, S. Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 48, p. 10993–10998, 2004.
- DA CUNHA, F. A. B. et al. *Eugenia uniflora* leaves essential oil induces toxicity in *Drosophila melanogaster*: Involvement of oxidative stress mechanisms. **Toxicology Research**, v. 4, n. 3, p. 634–644, 2015.

DAVIES, J. E.; BEHROOZIAN, S. An ancient solution to a modern problem. **Molecular Microbiology**, v. 113, n. 3, p. 546–549, 2020.

DAVIES, J.; WRIGHT, G. D. Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. **Trends in Microbiology**, v. 5, n. 6, p. 234–240, 1997.

ELSHIKH, M. et al. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. **Biotechnology Letters**, v. 38, n. 6, p. 1015–1019, 2016.

FALCÃO, T. R. et al. *Libidibia ferrea* Fruit Crude Extract and Fractions Show Anti-inflammatory, Antioxidant, and Antinociceptive Effect in Vivo and Increase Cell Viability in Vitro. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, 2019a.

FALCÃO, T. R. et al. Crude extract from *Libidibia ferrea* (Mart. ex. Tul.) L.P. Queiroz leaves decreased intra articular inflammation induced by zymosan in rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 19, n. 1, p. 1–10, 2019b.

FERREIRA, J. V. DE A. et al. Evaluation of antimicrobial and modulatory activity of the ethanol extract of *Libidibia ferrea* (Mart. ex tul.) l.p. queiroz. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 21, n. 1, p. 71–82, 2016a.

FERREIRA, M. R. A. et al. Chromatographic and Spectrophotometric Analysis of Phenolic Compounds from Fruits of *Libidibia ferrea* Martius. v. 12, n. 2, p. S285–S291, 2016b.

FLORA DO BRASIL. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em:

<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br>>. Acesso em: 20 jul. 2021.

FREITAS, T. S. et al. UPLC-QTOF-MS/MS analysis and antibacterial activity of the *Manilkara zapota* (L.) P. Royen against *Escherichia coli* and other MDR bacteria. **Cellular and Molecular Biology**, v. 67, n. 1, p. 116–124, 2021.

GUERRA, A. C. V. DE A. et al. *Libidibia ferrea* presents antiproliferative, apoptotic and antioxidant effects in a colorectal cancer cell line. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 92, p. 696–706, 2017.

HAABER, J.; PENADÉS, J. R.; INGMER, H. Transfer of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 11, p. 893–905, 2017.

HERNANDO-AMADO, S. et al. Multidrug efflux pumps as main players in intrinsic and acquired resistance to antimicrobials. **Drug Resistance Updates**, v. 28, p. 13–27, 2016.

HOBSON, C.; CHAN, A. N.; WRIGHT, G. D. The Antibiotic Resistome: A Guide for the Discovery of Natural Products as Antimicrobial Agents. **Chemical Reviews**, v. 121, n. 6, p. 3464–3494, 2021.

INDRIANI, D.; ELYA, B.; NOVIANI, A. Arginase inhibitory activity and total flavonoid content on *caesalpinia ferrea* C. Mart stem bark extracts. **Pharmacognosy Journal**, v. 10, n. 6, p. 1180–1183, 2018.

JAVADPOUR, M. M. et al. De Novo Antimicrobial Peptides with Low Mammalian Cell Toxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 16, p. 3107–3113, jan. 1996.

JOZALA, A. F. et al. *Libidibia ferrea* loaded in bacterial nanocellulose: evaluation of antimicrobial activity and wound care. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 6212–6226, 2020.

KOBAYASHI, Y. T. DA S. et al. Avaliação fotoquímica e potencial cicatrizante do extrato etanólico dos frutos de Jucá (*Libidibia ferrea*) em ratos Wistar. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 52, n. 1, p. 34–40, 2015.

KUMAR, S. et al. Functional and structural roles of the major facilitator superfamily bacterial multidrug efflux pumps. **Microorganisms**, v. 8, n. 2, 2020.

LEANDRO, C. DOS S. et al. Phenolic Composition and Allelopathy of *Libidibia ferrea* Mart. ex Tul. in Weeds. **Journal of Agricultural Science**, v. 11, n. 2, p. 109, 2019.

LI, X. et al. Matrine: A review of its pharmacology, pharmacokinetics, toxicity, clinical application and preparation researches. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 269, p. 113682, 2021.

LUNA, M. S. M. et al. Bioprospection of *Libidibia ferrea* var. *ferrea*: Phytochemical properties and antibacterial activity. **South African Journal of Botany**, v. 130, p. 103–108, 2020.

MAYEKAR, V. M. et al. A review: Antimicrobial activity of the medicinal spice plants to cure human disease. **Plant Science Today**, v. 8, n. 3, p. 629–646, 2021.

NASCIMENTO, J. et al. Avaliação do potencial antioxidante e anti-*Helicobacter pylori* in vitro de extratos de plantas medicinais utilizadas popularmente na região amazônica. **Revista Fitos**, v. 11, n. 2, p. 140–152, 2017.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020.

NG, C. T. et al. The use of *Drosophila melanogaster* as a model organism to study immune-nanotoxicity. **Nanotoxicology**, v. 13, n. 4, p. 429–446, 2019.

ONG, M. H. L. et al. High prevalence of tetM as compared to tetK amongst methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates from hospitals in Perak, Malaysia. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 10, n. 6, p. e13935, 2017.

PANDEY, U. B.; NICHOLS, C. D. Human disease models in *drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. **Pharmacological Reviews**, v. 63, n. 2, p.

411–436, 2011.

PEDROSA, T. DO N. et al. Anti-wrinkle and anti-whitening effects of jucá (*Libidibia ferrea* Mart.) extracts. **Archives of Dermatological Research**, v. 308, n. 9, p. 643–654, 2016.

SOARES, M. R. P. S. et al. in Vitro Antifungal Activity and Cytotoxicity Screening of Dry Crude Extracts From Brazilian Amazonia Plants. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 15, n. 4, p. 13, 2018.

SPAULDING, A. R. et al. Staphylococcal and streptococcal superantigen exotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 3, p. 422–447, 2013.

WANG, H. et al. Multi-target mode of action of silver against *Staphylococcus aureus* endows it with capability to combat antibiotic resistance. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, 2021.

5 CONCLUSÃO

- O presente estudo reuniu em uma revisão os conhecimentos sobre os aspectos botânicos, etnobotânica, composição fitoquímica e as propriedades biológicas de *Libidibia ferrea*. O ácido gálico e o ácido elágico são os compostos majoritários mais encontrados nos extratos de cascas, folhas e frutos de Pau-ferro. As atividades antibacteriana, antifúngica, antioxidante, anti-inflamatória e potencial cicatrizante são bem relatadas na literatura.

- Os resultados da análise fitoquímica dos extratos das folhas e entrecascas de *L. ferrea* por CLAE demonstrou a presença de taninos hidrolisáveis, flavonóides, ácido gálico e ácido elágico.

- Ambos os extratos não apresentaram atividade antibacteriana direta sobre a cepa IS-58 de *S. aureus*, como também, não atuaram como inibidores de bomba de efluxo. No entanto, a associação do extrato etanólico da folha de *L. ferrea* com a tetraciclina resultou em uma associação sinérgica.

- Os extratos não apresentaram toxicidade sobre o modelo *D. melanogaster*. Quanto aos efeitos observados nos ensaios de geotaxia negativa, o EEFLF induziu dano ao aparelho locomotor das moscas.

- São necessários novos estudos para determinar os mecanismos de ação dos extratos sobre as cepas portadoras de bombas de efluxo, além de realizar ensaios com os compostos majoritários, ácido elágico e ácido gálico, para verificar se esses possuem efeito de inibição semelhante ao que apresentou nesse estudo.

6 SÚMULA CURRICULAR

- Capítulo de livro publicado: Estudo das Propriedades Biológicas de *Jatropha mollissima* (POHL BAILL). Link de acesso: <https://www.atenaeditora.com.br/post-ebook/4487>.
- Capítulo de livro publicado: Investigação da Distribuição dos casos de Esquistossomose Mansônica no Brasil e suas Principais Formas Clínicas – uma Revisão de Literatura. Link de acesso:

<https://www.atenaeditora.com.br/post-ebook/4487>.

- Capítulo de livro publicado: A Importância da Disciplina de Biossegurança no Curso de Ciências Biológicas: Contribuições Pedagógicas para a Formação do Biólogo. Link de acesso: <https://www.atenaeditora.com.br/post-ebook/4253>.
- Artigo publicado: Effect of estragole over the RN4220 *Staphylococcus aureus* strain and its toxicity in *Drosophila melanogaster*. Link para acesso: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118675>.
- Artigo publicado: Evaluation of isoeugenol in inhibition of *Staphylococcus aureus* efflux pumps and their toxicity using *Drosophila melanogaster* model. Link para acesso: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119940>.
- Artigo publicado: Evaluation of phytochemical composition, toxicity in *Drosophila melanogaster* and effects on antibiotics modulation of *Plathymenia reticulata* Benth extract. Link para acesso: <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2021.03.020>.
- Artigo publicado: Evaluation of the Antibacterial Activity and Efflux Pump Reversal of Thymol and Carvacrol against *Staphylococcus aureus* and Their Toxicity in *Drosophila melanogaster*. Link para acesso: <https://doi.org/10.3390/molecules25092103>.
- Artigo publicado: Indirect inhibitory activity of pyrogallol against the Tet(K) efflux pump by a membrane effect: In vitro and in silico approach. Link para acesso: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.05.019>.
- Artigo publicado: Effect of terpinolene against the resistant *Staphylococcus aureus* strain, carrier of the efflux pump QacC and β -lactamase gene, and its toxicity in the *Drosophila melanogaster* model. Link para acesso: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104528>.
- Artigo publicado: Toxicity of methyl eugenol against *Drosophila melanogaster* and its myorelaxant activity in bronchioles isolated from *Sus scrofa domesticus*. Link para acesso: <https://doi.org/10.2478/s11756-020-00672-y>.

REFERÊNCIAS

- ALMUBAYEDH, H.; AHMAD, R. Ethnopharmacology, phytochemistry, biological activities, and therapeutic applications of *Cedrela serrata* Royle: A mini review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 246, p. 112206, jan. 2020.
- ALVAREZ-ORTEGA, C.; OLIVARES, J.; MARTÍNEZ, J. L. RND multidrug efflux pumps: What are they good for? **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1–11, 2013.
- AYAZ, M. et al. Synergistic interactions of phytochemicals with antimicrobial agents: Potential strategy to counteract drug resistance. **Chemico-Biological Interactions**, v. 308, p. 294–303, 2019.
- BAIOMY, A. A.; SHAKER, G. H.; ABBAS, H. A. Sensitizing multi drug resistant staphylococcus aureus isolated from surgical site infections to antimicrobials by efflux pump inhibitors. **African Health Sciences**, v. 20, n. 4, p. 1632–1645, 2020.
- BALTA, I. et al. The effect of natural antimicrobials against *Campylobacter* spp. and its similarities to *Salmonella* spp, *Listeria* spp., *Escherichia coli*, *Vibrio* spp., *Clostridium* spp. and *Staphylococcus* spp. **Food Control**, v. 121, p. 107745, 2021.
- BAMBEKE, V. F. et al. Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: Occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 5, p. 1055–1065, 2003.
- BARBIERI, R. et al. Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. **Microbiological Research**, v. 196, p. 44–68, 2017.
- BAY, D. C.; ROMMENS, K. L.; TURNER, R. J. Small multidrug resistance proteins: A multidrug transporter family that continues to grow. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1778, n. 9, p. 1814–1838, 2008.
- BIEN, J.; SOKOLOVA, O.; BOZKO, P. Characterization of Virulence Factors of *Staphylococcus aureus* : Novel Function of Known Virulence Factors That Are Implicated in Activation of Airway Epithelial Proinflammatory Response . **Journal of Pathogens**, v. 2011, p. 1–13, 2011.
- BLANCO, P. et al. Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic Resistance Determinants. **Microorganisms**, v. 4, n. 1, p. 14, 2016.
- BOTTERY, M. J.; PITCHFORD, J. W.; FRIMAN, V. P. Ecology and evolution of antimicrobial resistance in bacterial communities. **ISME Journal**, v. 15, n. 4, p. 939–948, 2021.
- BROWN, A. R. et al. Bacterial efflux inhibitors are widely distributed in land plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 267, p. 113533, 2021.

CALAP-QUINTANA, P. et al. *Drosophila melanogaster* models of metal-related human diseases and metal toxicity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 7, 2017.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 2, p. 232–260, 2001.

CHUNG, P. Y.; NAVARATNAM, P.; CHUNG, L. Y. Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antibiotics against staphylococcus aureus strains. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 10, n. 25, p. 1–6, 2011.

CONDE, N. C. DE O. et al. In vitro antimicrobial activity of plants of the Amazon on oral biofilm micro-organisms. **Journal of Dental Science Original**, v. 30, n. 4, p. 179–183, 2015.

COSTA, S. S. et al. Multidrug Efflux Pumps in Staphylococcus aureus: an Update. **The Open Microbiology Journal**, v. 7, p. 59–71, 2013.

CRUZ, R. P. et al. Effect of α -bisabolol and its β -cyclodextrin complex as TetK and NorA efflux pump inhibitors in Staphylococcus aureus strains. **Antibiotics**, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2020.

DAVIDSON, A. L. et al. Structure, Function, and Evolution of Bacterial ATP-Binding Cassette Systems. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, n. 2, p. 317–364, 2008.

DAWSON, R. J. P.; LOCHER, K. P. Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. **Nature**, v. 443, n. 7108, p. 180–185, 2006.

DE DAVID, M.; PASA, M. C. As plantas medicinais e a etnobotânica em Várzea Grande, MT, Brasil. **Interações (Campo Grande)**, v. 16, n. 1, p. 97–108, 2015.

DEMAIN, A. L.; SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 Years of progress. **Journal of Antibiotics**, v. 62, n. 1, p. 5–16, 2009.

EBBENSGAARD, A. E.; LØBNER-OLESEN, A.; FRIMODT-MØLLER, J. The role of efflux pumps in the transition from low-level to clinical antibiotic resistance. **Antibiotics**, v. 9, n. 12, p. 855, 2020.

FALCÃO, T. R. et al. *Libidibia ferrea* Fruit Crude Extract and Fractions Show Anti-Inflammatory, Antioxidant, and Antinociceptive Effect in Vivo and Increase Cell Viability in Vitro. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, 2019.

FLORA DO BRASIL. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em:

<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br>>. Acesso em: 20 jul. 2021.

FOSTER, T. J. Immune evasion by staphylococci. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 948–958, 2005.

GAMA, J. A.; ZILHÃO, R.; DIONISIO, F. Impact of plasmid interactions with the chromosome and other plasmids on the spread of antibiotic resistance. **Plasmid**, v. 99, p. 82–88, 2018.

GARCÍA-ESPIÑEIRA, M. C.; TEJEDA-BENÍTEZ, L. P.; OLIVERO-VERBEL, J. Toxic effects of bisphenol A, propyl paraben, and triclosan on *caenorhabditis elegans*. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 4, p. 684, 2018.

GIEDRAITIENĖ, A. et al. Correspondence to Antibiotic Resistance Mechanisms of Clinically Important Bacteria. **REVIEW Medicina (Kaunas)**, v. 47, n. 3, p. 137–183, 2011.

GONÇALVES, K. G.; PASA, M. C. O saber local e as plantas medicinais na comunidade sucuri, cuiabá, mt, brasil. **Biodiversidade**, v. 14, n. 2, p. 50–73, 2015.

GUAY, G. G.; KHAN, S. A.; ROTHSTEIN, D. M. The tet(K) Gene of Plasmid pT181 os *Staphylococcus aureus* Encodes an Efflux Protein That Contains 14 Transmembrane Helices. **Plasmid**, v. 30, p. 163–166, 1993.

GUERRA, A. C. V. DE A. et al. *Libidibia ferrea* presents antiproliferative, apoptotic and antioxidant effects in a colorectal cancer cell line. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 92, p. 696–706, 2017.

HANCOCK, R. E. W. As a Drug Barrier. **Science**, n. 1, p. 37–42, 1997.

HASSAN, K. A. et al. Transcriptomic and biochemical analyses identify a family of chlorhexidine efflux proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 50, p. 20254–20259, 2013.

HASSAN, K. A. et al. Pacing across the membrane: the novel PACE family of efflux pumps is widespread in Gram-negative pathogens. **Research in Microbiology**, v. 169, n. 7–8, p. 450–454, 2018.

HE, X. et al. Structure of a cation-bound multidrug and toxic compound extrusion transporter. **Nature**, v. 467, n. 7318, p. 991–994, 2010.

HERNANDO-AMADO, S. et al. Multidrug efflux pumps as main players in intrinsic and acquired resistance to antimicrobials. **Drug Resistance Updates**, v. 28, p. 13–27, 2016.

HOLDSWORTH, S. R.; LAW, C. J. Functional and biochemical characterisation of

the Escherichia coli major facilitator superfamily multidrug transporter MdtM. **Biochimie**, v. 94, n. 6, p. 1334–1346, 2012.

KAATZ, G. W.; MCALEESE, F.; SEO, S. M. Multidrug resistance in Staphylococcus aureus due to overexpression of a novel multidrug and toxin extrusion (MATE) transport protein. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 1857–1864, 2005.

KFFURI, C. W. et al. Antimalarial plants used by indigenous people of the Upper Rio Negro in Amazonas, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 178, p. 188–198, 2016.

KNIGHT, G. M. et al. Antimicrobial resistance and covid-19: Intersections and implications. **eLife**, v. 10, p. 1–27, 2021.

KÖHLER, T.; PECHÈRE, J. C.; PLÉSIAT, P. Bacterial antibiotic efflux systems of medical importance. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 56, n. 9–10, p. 771–778, 1999.

KUMAR, S. et al. Structural and functional roles of two evolutionarily conserved amino acid sequence motifs within solute transporters of the major facilitator superfamily. **Cell e Molecular Biology**, v. 11, p. 41–53, 2016.

KUMAR, S. et al. Functional and structural roles of the major facilitator superfamily bacterial multidrug efflux pumps. **Microorganisms**, v. 8, n. 2, 2020.

LAMUT, A. et al. Efflux pump inhibitors of clinically relevant multidrug resistant bacteria. **Medicinal Research Reviews**, v. 39, n. 6, p. 2460–2504, 2019.

LANZERSTORFER, P. et al. Acute, reproductive, and developmental toxicity of essential oils assessed with alternative in vitro and in vivo systems. **Archives of Toxicology**, v. 95, n. 2, p. 673–691, 2020.

LEANDRO, C. DOS S. et al. Phenolic Composition and Allelopathy of *Libidibia ferrea* Mart. ex Tul. in Weeds. **Journal of Agricultural Science**, v. 11, n. 2, p. 109, 2019.

LEKSHMI, M. et al. Modulation of antimicrobial efflux pumps of the major facilitator superfamily in Staphylococcus aureus. **AIMS Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 1–18, 2018.

LI, X. et al. Matrine: A review of its pharmacology, pharmacokinetics, toxicity, clinical application and preparation researches. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 269, p. 113682, 2021.

LI, Z. A Review of Staphylococcus aureus and the Emergence of Drug-Resistant Problem. **Advances in Microbiology**, v. 08, n. 01, p. 65–76, 2018.

LIMAVERDE, P. W. et al. Inhibition of the TetK efflux-pump by the essential oil of

Chenopodium ambrosioides L. and α -terpinene against Staphylococcus aureus IS-58. **Food and Chemical Toxicology**, v. 109, p. 957–961, 2017.

LOWY, F. D. Staphylococcus aureus infections. **New England Journal of Medicine**, v. 339, p. 520–532, 1998.

LUNA, M. S. M. et al. Bioprospection of Libidibia ferrea var. ferrea: Phytochemical properties and antibacterial activity. **South African Journal of Botany**, v. 130, p. 103–108, 2020.

MALAK, H. A. et al. Immune system evasion mechanisms in staphylococcus aureus: current understanding. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 2219–2234, 2020.

NIKAIDO, H. Antibiotic resistance caused by gram-negative multidrug efflux pumps. **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, n. SUPPL.1, p. 32–41, 1998.

NIKAIDO, H. Structure and mechanism of RND-type multidrug efflux pumps. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v. 77, n. 11, p. 1–60, 2011.

NIKAIDO, H.; TAKATSUKA, Y. Mechanisms of RND Multidrug Efflux Pumps Hiroshi. **Biochim Biophys Acta**, v. 1794, n. 5, p. 769–781, 2009.

OLIVARES, J. et al. The intrinsic resistome of bacterial pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1–15, 2013.

ONG, C. et al. Drosophila melanogaster as a model organism to study nanotoxicity. **Nanotoxicology**, v. 9, n. 3, p. 396–403, 2015.

ONG, M. H. L. et al. High prevalence of tetM as compared to tetK amongst methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolates from hospitals in Perak, Malaysia. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 10, n. 6, p. e13935, 2017.

OZCAN, T. et al. Phenolics in Human Health. **International Journal of Chemical Engineering and Applications**, v. 5, n. 5, p. 393–396, 2014.

PALHETA, I. C. et al. Ethnobotanical study of medicinal plants in urban home gardens in the city of abagetuba, Paá state, Brazil. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, v. 16, n. 3, p. 206–262, 2017.

PANCHAL, K.; TIWARI, A. K. Drosophila melanogaster “a potential model organism” for identification of pharmacological properties of plants/plant-derived components. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 89, p. 1331–1345, 2017.

PAO, S. S.; PAULSEN, I. T.; SAIER, M. H. Major Facilitator Superfamily (MFS). **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 1, p. 1–34, 1998.

PARTRIDGE, S. R. et al. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 1–61, 2018.

PASCALE, G.; WRIGHT, G. D. Antibiotic resistance by enzyme inactivation: From mechanisms to solutions. **ChemBioChem**, v. 11, n. 10, p. 1325–1334, 2010.

PEDROSA, T. DO N. et al. Anti-wrinkle and anti-whitening effects of jucá (*Libidibia ferrea* Mart.) extracts. **Archives of Dermatological Research**, v. 308, n. 9, p. 643–654, 2016.

PIDDOCK, L. J. V. Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 2, p. 382–402, 2006.

PLATA, K.; ROSATO, A. E.; WEGRZYN, G. Staphylococcus aureus as an infectious agent: Overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. **Acta Biochimica Polonica**, v. 56, n. 4, p. 597–612, 2009.

POLLITT, E. J. G. et al. Staphylococcus aureus infection dynamics. **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 6, p. 1–27, 2018.

RAJABI, S. et al. Artemia salina as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. **DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 23, n. 20, p. 1–6, 2015.

REITER, L. T. et al. A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in Drosophila melanogaster. **Genome Research**, v. 11, n. 6, p. 1114–1125, 2001.

SCHERF, J. R. et al. Effect of terpinolene against the resistant Staphylococcus aureus strain, carrier of the efflux pump QacC and β -lactamase gene, and its toxicity in the Drosophila melanogaster model. **Microbial Pathogenesis**, v. 149, p. 104528, 2020.

SCHINDLER, B. D.; KAATZ, G. W. Multidrug efflux pumps of Gram-positive bacteria. **Drug Resistance Updates**, v. 27, p. 1–13, 2016.

SEUKEP, A. J. et al. Plant-derived secondary metabolites as the main source of efflux pump inhibitors and methods for identification. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 10, n. 4, p. 277–290, 2020.

SHIN, J.; PRABHAKARAN, V. S.; KIM, K. SUN. The multi-faceted potential of plant-derived metabolites as antimicrobial agents against multidrug-resistant pathogens. **Microbial Pathogenesis**, v. 116, p. 209–214, 2018.

SHRIRAM, V. et al. Inhibiting bacterial drug efflux pumps via phyto-therapeutics to combat threatening antimicrobial resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n.

DEC, p. 1–18, 2018.

SMITH, K. et al. Influence of tigecycline on expression of virulence factors in biofilm-associated cells of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 380–387, 2010.

SOARES, M. R. P. S. et al. in Vitro Antifungal Activity and Cytotoxicity Screening of Dry Crude Extracts From Brazilian Amazonia Plants. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 15, n. 4, p. 13, 2018.

SPAULDING, A. R. et al. Staphylococcal and streptococcal superantigen exotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 3, p. 422–447, 2013.

SUNDARARAJAN, V. et al. *Drosophila melanogaster* as an in vivo model to study the potential toxicity of cerium oxide nanoparticles. **Applied Surface Science**, v. 490, n. May, p. 70–80, 2019.

TINTINO, S. R. et al. Cholesterol and ergosterol affect the activity of *Staphylococcus aureus* antibiotic efflux pumps. **Microbial Pathogenesis**, v. 104, p. 133–136, 2017.

TINTINO, S. R. et al. Vitamin K enhances the effect of antibiotics inhibiting the efflux pumps of *Staphylococcus aureus* strains. **Medicinal Chemistry Research**, v. 27, n. 1, p. 261–267, 2018.

TIWARI, A. K. et al. Environmental chemical mediated male reproductive toxicity: *Drosophila melanogaster* as an alternate animal model. **Theriogenology**, v. 76, n. 2, p. 197–216, 2011.

TOMCZYK, S. et al. Impact of the COVID-19 pandemic on the surveillance, prevention and control of antimicrobial resistance: A global survey. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 76, n. 11, p. 3045–3058, 2021.

TONG, S. Y. C. et al. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 603–661, jul. 2015.

TORRES, N. F. et al. The use of non-prescribed antibiotics; prevalence estimates in low-and-middle-income countries. A systematic review and meta-analysis. **Archives of Public Health**, v. 79, n. 1, p. 1–15, 2021.

VA, D. P.; SA, A. A.; PAUL, S. F. WONDER ANIMAL MODEL FOR GENETIC STUDIES-*Drosophila melanogaster*—ITS LIFE CYCLE AND BREEDING METHODS—A REVIEW. **Sri Ramachandra Journal of Medicine**, v. II, n. 2, p. 33–44, 2009.

WACHINO, J. I.; DOI, Y.; ARAKAWA, Y. Aminoglycoside Resistance: Updates with a Focus on Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 34, n. 4, p. 887–902, 2020.

WATKINS, R. R.; BONOMO, R. A. The Ongoing Threat of Antimicrobial Resistance. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 34, n. 4, p. 649–658, 2020.

WRIGHT, G. D. Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 10, p. 1451–1470, 2005.

XAVIER, J.; KRIPASANA, K. Acute Toxicity of Leaf Extracts of *Enydra fluctuans* Lour in Zebrafish (*Danio rerio* Hamilton). **Scientifica**, v. 2020, p. 1–6, 2020.

YERUSHALMI, H.; LEBENDIKER, M.; SCHULDINER, S. EmrE, an *Escherichia coli* 12-kDa multidrug transporter, exchanges toxic cations and H⁺ and is soluble in organic solvents. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 12, p. 6856–6863, 1995.

YOSHIDA, H. et al. Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus* norA gene, which confers resistance to quinolones. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 12, p. 6942–6949, 1990.

ZGURSKAYA, H. I.; NIKAIDO, H. Multidrug resistance mechanisms: Drug efflux across two membranes. **Molecular Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 219–225, 2000.