



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

FRANCINETE CARLA NUNES CAVALCANTI-VIANA

**ATIVIDADES ANTIBACTERIANA, ANTIOXIDANTE E ANTIPARASITÁRIA DE
PLANTAS MEDICINAIS DA FLORA BRASILEIRA**

RECIFE

2017

FRANCINETE CARLA NUNES CAVALCANTI-VIANA

**ATIVIDADES ANTIBACTERIANA, ANTIOXIDANTE E
ANTIPARASITÁRIA DE PLANTAS MEDICINAIS DA FLORA
BRASILEIRA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Biotecnologia, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof.a. Dra. Márcia Vanusa da Silva

Coorientador: Prof.a. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia

RECIFE

2017

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB4/1788

Cavaltanti-Viana, Francinete Carla Nunes

Atividades antibacteriana, antioxidante e antiparasitária de plantas medicinais da flora brasileira / Francinete Carla Nunes Cavalcanti-Viana. – 2017.

134 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Vanusa da Silva.

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2017.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Plantas medicinais. 2. Agentes anti-infecciosos. 3. Doenças parasitárias. I. Silva, Márcia Vanusa da (orientadora). II. Correia, Maria Tereza dos Santos (coorientadora). III. Título.

581.638

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022-189

FRANCINETE CARLA NUNES CAVALCANTI-VIANA

**ATIVIDADES ANTIBACTERIANA, ANTIOXIDANTE E ANTIPARASITÁRIA DE
PLANTAS MEDICINAIS DA FLORABRASILEIRA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Biotecnologia, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof.a. Dra. Márcia Vanusa da Silva

Coorientador: Prof.a. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia

Aprovada: 20 de fevereiro de 2017.

Banca examinadora:

Prof.a. Dra. Márcia Vanusa da Silva
Departamento de Bioquímica - UFPE

Prof.a. Dra. Maria Tereza dos Santos
Departamento de Bioquímica - UFPE

Prof.a. Dr. Alexandre Gomes da Silva
Departamento de Bioquímica - UFPE

Prof. Dr. Luis Cláudio Nascimento da Silva
CEUMA

Prof.a. Dr. Tiago Henrique Napoleão
Departamento de Bioquímica - UFPE

Dedico este trabalho aos meus pais João Carlos e Vanilda Maria, que sempre me incentivaram a seguir em frente, à minha amada filha Millena Maria e ao meu esposo e companheiro John Wanderson, que tanto amo!

Com vocês minha vida tem mais sentido!

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus por me proporcionar a vida, a força e a coragem de persistir;

Ao meu esposo John Wanderson pelo amor, carinho, apoio e incentivo nos momentos difíceis e à minha filha Millena Maria pelo amor incondicional, e por ser minha maior força em caminhar nessa jornada;

À toda minha família, pais João Carlos e Vanilda Maria, sogros José Otávio e Valdeci, irmãs Flávia e Fabiana, cunhadas Kele e Karina, cunhados Gilson Pereira, Gustavo Beltão e José Otávio Filho, ao concunhado Wagner e aos sobrinhos: João Gustavo, Ana Beatriz, Carlos Vinícius, Gabriel, Clara, Laura e Vinícius Otávio pelo amor, incentivo e apoio nesses anos de estudo;

À minha amiga irmã Maria do Livramento (Lili), pelos anos de amizade sincera e companheirismo e a sua família esposo Josildo e filha Jasmine. Amiga você está sempre presente em minha vida!

Aos amigos do condomínio Vila Jardins, pelos momentos de descontração, em especial Denise, Pérola, Thaís, Vanessa, Simone e Ana Cristina por estarem sempre dispostas a me ajudar;

Às professoras Márcia Vanusa e Maria Tereza Santos Correia pela orientação, carinho e amizade;

Ao querido amigo Dr Antônio Félix da Costa, por ter acreditado que eu era capaz e me incentivado a conquistar mais uma etapa em minha vida. Quem tem o privilégio de passar por suas mãos, em uma caminhada científica, nunca será esquecido, e eu fui uma privilegiada. Parabéns por ser um profissional exemplar!

À banca examinadora Alexandre G. da Silva, Luis Cláudio N. da Silva, Thiago Henrique Napoleão, Antônio F. da Costa e Patrícia Maria G. Paiva, pela participação e contribuição;

Ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas pela oportunidade concedida, bem como à Universidade Federal de Pernambuco pela acolhida;

À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado;

Aos amigos da turma de doutorado Claudia Crasto, Carla Regine e Maria do Carmo, pelos momentos de descontração;

Às amigas Amanda Dias, Aline Carvalho, Bruna Cordeiro e Joelma Pessoa, pelo companheirismo e cumplicidade, em todos os momentos compartilhados, sem vocês não teria

conseguido!

Aos amigos do laboratório de Produtos Naturais e Biologia Molecular Mônica, Aninha, Thiago Fonseca, Felipe, Alessandra, Cibele, Paula, Rosy, Bruno, Fernanda Pacífico, Deizi Carolina, Bruno, Hortência, Livia e Amanda.

Ao Professor Dr Nicássio e ao Sr João Vigínio, por todo apoio no laboratório de Produtos Naturais;

A Antonio Perera Neves e Danilo Cavalcanti por terem me recebido no Ageeu Magalhães, à Dra Regina Bressan e a todos do laboratório de Biologia Celular, em especial a Karina, Mari e Thuany por toda prestabilidade;

A Fernanda Granja, Joelma Pessoa, Lili e Clóvis Macêdo pela imensurável ajuda, no momento mais difícil do doutorado, a escrita da tese! Em especial a Fernanda Granja que, sem ao menos me conhecer pessoalmente, se dispôs a ajudar sempre que precisei. Vocês têm um coração de ouro!

Ao Professor Dr Josean Fachine Tavares, por ter cedido o material vegetal para realização dos experimentos, como também, por estar sempre disponível;

Aos Professores Rafael M. Ximenes e Alexandre Macêdo pelo apoio nos experimentos;

A Carol Malafaia pelo treinamento oferecido ao quarteto fantástico (eu, joelminha, Aline e Bruninha);

Em fim, quero agradecer a todos que contribuíram para a realização desse sonho!

“Não é sobre ter todas as pessoas do mundo pra si, é sobre saber que em algum lugar alguém zela por ti.

É sobre cantar e poder escutar mais do que a própria voz, é sobre dançar na chuva de vida, que cai sobre nós.

É saber se sentir infinito, num universo tão vasto e bonito.

É saber sonhar.

Então, fazer valer a pena, cada verso daquele poema sobre acreditar.

Não é sobre chegar ao topo do mundo e saber que venceu, é sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu.

É sobre ser abrigo e também ter morado em outros corações, e assim ter amigos contigo em todas as situações.

A gente não pode ter tudo, qual seria a graça do mundo se fosse assim?

Por isso eu prefiro sorrisos e os presentes que a vida trouxe pra perto de mim.

Não é sobre tudo o que seu dinheiro é capaz de comprar, e sim sobre cada momento sorriso a se compartilhar.

Também não é sobre correr contra o tempo pra ter sempre mais, porque quanto menos se espera a vida já ficou pra traz.

Segura teu filho no colo,

sorria e abraça seus pais enquanto estão aqui.

Que a vida é trem bala parceiro, e a gente é só passageiro prestes a partir”.

Ana Vilela

RESUMO

O Brasil é detentor de uma vasta biodiversidade de plantas, distribuídas por distintos biomas e ecossistemas. As plantas medicinais tornaram-se uma das fontes mais importantes de medicamentos, aquirindo respeito na farmacologia. Desta forma, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade biológica de plantas medicinais da flora brasileira. Extratos etanólicos foram preparados das partes aéreas de *Dalbergia ecastaphyllum*, *Byrsonima gardineriana*, *Erythroxylum revolutum*, *Zanthoxylum rhoifolium*, *Pilocarpus spicatus*, *Lippia microphylla*, *Phyllanthus acuminatus* e *Krameria tomentosa* e a molécula Justicidim B foi isolada de *P. acuminatus*. A abordagem fitoquímica dos extratos por cromatografia em camada delgada (CCD) revelou a presença de flavonóides, triterpenos, esteróides, derivados cinâmicos, saponinas, monoterpênos e sesquiterpenos, proantocianidinas, curaminas, enquanto que nenhum extrato apresentou quinonas. Na análise da atividade antibacteriana dos extratos, verificou-se que estes apresentaram atividade inibitória para as bactérias estudadas, variando CMI entre 390 a 6250 µg/ml. Todos os extratos testados apresentaram um potencial bactericida com a relação CMB/CMI com valores entre 1 e 4, com exceção do extrato de *K. tomentosa* para *E. coli* que apresentou potencial bacteriostático. Dois extratos foram selecionados para o estudo de Checkerboard, *B. gardineriana* e *K. tomentosa*, os resultados foram promissores uma vez que, quando testados em combinação, o extrato da planta e a clidamicina, a CMI foi inferior a quando testadas isoladamente. Na avaliação da citotoxicidade dos extratos sobre eritrócitos humanos do tipo O, observou-se que os extratos não apresentam citotoxicidade. Para os compostos fenólicos totais os extratos *K. tomentosa* e *L. microphylla* destacaram-se, apresentando valores de 416,20 e 373,48 (GAE mg)/g, respectivamente. Para o ensaio utilizando o radical ABTS⁺ evidenciamos valores respectivos de TEAC de 2.206,66 mM, 2.203,66 mM e 2.133,33 mM e de inibição de 99,84%, 99,68% e 96,42% para *D. ecastaphyllum*, *B. gardineriana* e *K. tomentosa*. Para a análise de Fotoproteção, os extratos de *D. ecastaphyllum*, *B. gardineriana*, *E. revolutum*, *L. microphylla* e *Z. rhoifolium*, apresentaram absorvância máxima na região de radiação UVB, e os demais apresentaram absorvância máxima na região UVC. Todos os extratos apresentaram potencial para FPS. Na atividade anti-*T. vaginalis* a IC₅₀ foi de 7,2µg/mL e a inibição de crescimento nas concentrações de 10µg/mL e 20µg/mL foi mais significativa após 24 horas, conseguindo inibir o crescimento dos trofozoítos em mais de 68% e 85%, respectivamente. Na viabilidade celular para HeLa, os resultados mostraram que a molécula apresentou atividade anticancerígena promissora, uma vez que, nas concentrações de 20, 100 e 500 µg/mL os percentuais foram de 57,17; 15,76 e 1,95

respectivamente. A IC₅₀ da Justicidin B em células HeLa foi de 17,49 µg/mL. Para fibroblastos os resultados evidenciaram ausência de toxicidade nas concentrações 20 e 100 µg/mL, pois os percentuais foram de 90,65 e 75,36, respectivamente. Não observamos morte ou injúria *G. mellonella* e as taxas de sobrevivência foram de 100% para as concentrações estudadas (10 e 50 mg/kg da larva). Nos eritrócitos a molécula não foi considerada ativa, pois após uma hora de incubação em temperatura ambiente e constante agitação, a taxa de hemólise foi negativa para todas as concentrações. Dessa forma, diante dos resultados obtidos, conclui-se que os produtos de plantas medicinais possuem potencial bioativo, sendo promissores e servindo de base para estudos futuros.

Palavras-chave: Plantas medicinais; Atividade biológica; Flora Brasileira.

ABSTRACT

Brazil is the owner of a vast biodiversity of plants, distributed by different biomes and ecosystems. Medicinal plants have become one of the most important sources of medicines, gaining respect in pharmacology. Thus, our study aimed to evaluate the biological activity of medicinal plants of Brazilian flora. Ethanolic extracts were prepared from the aerial parts of *Dalbergia ecastaphyllum*, *Byrsonima gardineriana*, *Erythroxylum revolutum*, *Zanthoxylum rhoifolium*, *Pilocarpus spicatus*, *Lippia microphylla*, *Phyllanthus acuminatus* and *Krameria tomentosa*, and the isolated molecule Justicidin B from *P. acuminatus*. The phytochemical approach of extracts by Thin Layer Chromatography (TLC) revealed the presence of flavonoids, triterpenes, steroids, cinnamic derivatives, saponins, monoterpenes and sesquiterpenes, proanthocyanidins, curaminas and no extract presented quinones. In the analysis of the antibacterial activity of the extracts, it was verified that the extracts showed inhibitory activity for the studied bacteria, varying MIC between 390 and 6250 µg/ml. All extracts tested had a bactericidal potential with the CMB / MIC ratio between 1 and 4, except for the extract of *K. tomentosa* for *E. coli* that presented bacteriostatic potential. Two extracts were selected for the study of Checkerboard, *B. gardineriana* and *K. tomentosa*, the results were promising, since when tested in combination plant extract and clidamycin, MIC was lower than when tested alone. In the evaluation of the cytotoxicity of the extracts on human type O erythrocytes, it was observed that the extracts did not present cytotoxicity. For the total phenolic compounds, the extracts *K. tomentosa* and *L. microphylla* stood out presenting values of 416,20 and 373,48 GAE mg/g, respectively. For the assay using the ABTS+ radical, it was observed respective TEAC values of 2,206.66 mM, 2,203.66 mM and 2,133.33 mM and inhibition of 99.84%, 99.68% and 96.42% for *D. ecastaphyllum*, *B. gardneriana* and *K. tomentosa*. For the photoprotection analysis, the extracts of *D. ecastaphyllum*, *B. gardneriana*, *E. revolutum*, *L. microphylla* and *Z. rhoifolium* presented maximum absorbance in the region of UVB radiation, and the others presented maximum absorbance in the UVC region. All extracts showed potential for FPS. In anti-*T. vaginalis* activity at IC₅₀ was 7.2 µg/mL and inhibition of growth at concentrations of 10 µg/mL and 20 µg/mL was more significant after 24 h, and inhibited the growth of trophozoites by more than 68% and 85%, respectively. In cell viability for HeLa, the results showed that the molecule showed promising anticancer activity, since at the concentrations of 20, 100 and 500 µg / mL the percentages were 57.17; 15.76 and 1.95 respectively. The IC₅₀ of Justicidin B in HeLa cells was 17.49 µg/mL. For fibroblasts, the results showed no toxicity at concentrations of 20 and 100 µg / mL, as the percentages were

90.65 and 75.36, respectively. It was not observed death or injury *G. mellonella* and the survival rates were 100%, for the concentrations studied (10, and 50 mg/kg of the larva). In the erythrocytes, the molecule was not considered active, because after one hour of incubation at room temperature and constant agitation, the hemolysis rate was negative at all concentrations. Thus, in view of the results obtained, it can be concluded that medicinal products have bioactive potential, being promising and serving as a basis for future studies.

Keywords: Medicinal plants; Biological activity; Brazilian flora.

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

Figura 1 - <i>Dalbergia ecastaphyllum</i>	20
Figura 2 - <i>Byrsonima gardineriana</i>	22
Figura 3 - <i>Erythroxylum revolutum</i>	23
Figura 4 - <i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	24
Figura 5 - <i>Lippia microphylla</i>	27
Figura 6 - <i>Krameria tomentosa</i>	32

Artigo I

Figura 1- Curva de Morte de extratos etanólicos de <i>B. gardineriana</i> (A) e <i>K. Tomentosa</i> (B) contra <i>S. aureus</i>	063
---	-----

Artigo II

Figura 1 - Perfil de absorbância dos extratos nos comprimentos de onda de 260 a 400nm. A (<i>D. ecastaphyllum</i>), B (<i>B. gardineriana</i>), C (<i>E. revolutum</i>), D (<i>Z. rhoifolium</i>), E (<i>P. spicatus</i>), F (<i>L.microphylla</i>), G (<i>P. acuminatus</i>), H (<i>K.tomentosa</i>).....	57
--	----

Artigo III

Figura 1- Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> da Justicidin B, frente a células de HeLa, pelo método MTT.....	79
Figura 2- Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> da Justicidin B, frente a células de fibroblastos.....	80

LISTA DE TABELAS

Revisão Bibliográfica

Tabela 1- Atividades farmacológicas de Justicidin B.....	32
--	----

Artigo 1

Tabela 1- Espécies, local e época de coleta do material botânico.....	52
Tabela 2- Padrões, sistemas de eluição e reveladores utilizados para Cromatografia em Camada Delgada.....	52
Tabela 3- Valores de ICIF correspondente às diferentes interações.....	53
Tabela 4- Resultados de análise fitoquímica dos extratos de plantas medicinais.....	54
Tabela 5- Atividade antimicrobiana dos extratos de plantas contra bactérias	55
Tabela 6- Relação entre CMB/CMI de extratos de plantas.....	56
Tabela 7- Perfil de resistência das bactéria.....	58
Tabela 8- Índice de concentração inibitória fracionada para espécies bacterianas.....	58
Tabela 9- Percentual de hemólise dos em diferentes concentrações dos extratos seccional....	59

Artigo II

Tabela1- Espécies, local e época de coleta do material botânico.....	64
Tabela 2- Teor de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e FPS para os extratos etanólicos das espécies estudadas.....	66
Tabela 3- Comprimentos de onda máximos (λ_{Max}) apresentados pelos extratos analisados.....	67

Artigo III

Tabela 1- Percentual de inibição de <i>T. vaginalis</i> , frente à Justicidin B.....	78
Tabela 2- Taxa de sobrevivência de <i>Galleria mellonella</i> , frente à Justicidin B.....	80
Tabela 3- Percentual de hemólise em diferentes concentrações dos extratos selecionados.....	81

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	OBJETIVOS	18
1.1.1	Objetivo geral	18
1.1.2	Objetivos específicos	18
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	PLANTAS MEDICINAIS	19
2.2	GÊNERO <i>DALBERGIA</i>	20
2.3	GÊNERO <i>BYRSONIMA</i>	21
2.2.1	Gênero <i>Erythoxylum</i>	23
2.2.2	Gênero <i>Zanthoxylum</i>	24
2.2.3	Gênero <i>Pilocarpus</i>	25
2.2.4	Gênero <i>Lippia</i>	26
2.2.5	Gênero <i>Phyllanthus</i>	28
2.2.6	Gênero <i>Krameria</i>	31
2.2.7	Atividade biológica de produtos de origem vegetal.....	32
2.2.7.1	Atividade antimicrobiana.....	32
2.2.7.2	Atividade antioxidante.....	33
2.2.7.3	Atividade Fotoprotetora.....	34
2.8	ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA - <i>TRICHOMONAS VAGINALIS</i>	36
2.9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
3	RESULTADOS	50
3.1	PHYTOCHEMICAL PROFILE, EVALUATION OF THE CYTOTOXIC AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ETHANOLIC EXTRACTS OF MEDICINAL PLANTS.....	50
3.2	ANTIOXIDANT AND PHOTOPROTECTIVE ACTIVITY OF ETHANOLIC EXTRACTS OF MEDICINAL PLANTS.....	62

3.3 JUSTICIDIN B: ATIVIDADE ANTI- <i>TRICHOMONAS VAGINALIS</i> E PERFIL CITOTÓXICO.....	72
CONCLUSÕES.....	84
REFERÊNCIAS.....	85
APÊNDICE A – ARTIGO ORIGINAL I.....	106
APÊNDICE B – ARTIGO ORIGINAL II.....	119
ANEXO C – NORMAS DO PERIÓDICO I.....	130
ANEXO D – NORMAS DO PERIÓDICO II.....	133

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é detentor de uma vasta biodiversidade de plantas, distribuídas por distintos biomas e ecossistemas (BRANDON *et al.*, 2005). Além da biodiversidade, o país apresenta rica heterogeneidade cultural e tradição de uso de plantas com potencial bioativo (FERREIRA *et al.*, 2016). As plantas medicinais foram adquirindo espaço e tornaram-se uma das fontes mais importantes de medicamentos, aquirindo respeito na farmacologia (TULP; BOHLIN, 2004; HEINRICH, 2003; LEONTI *et al.*, 2017).

A maioria dos compostos presentes nas plantas fazem parte do metabolismo primário, substâncias essenciais à sobrevivência e desenvolvimento das plantas (VERPOORTE; MEMELINK, 2002; SIMÕES *et al.*, 2010). Porém, as plantas produzem uma grande variedade de metabólitos secundários e estes têm um importante papel na sobrevivência da planta em seu ecossistema. As vias metabólicas secundárias vegetais dão origem a diversas classes de compostos, tais como, alcalóides, terpenóides, antocianinas, esteróides, flavonóides, quinonas, cumarinas que, por vezes, estão presentes em aplicações comerciais como: fármacos, corantes, aromas e inseticidas (KAUR *et al.*, 2009; FABRI *et al.*, 2009; LAI *et al.*, 2010).

Desde a introdução do mais antigo antimicrobiano até o mais recente, vem se registrando uma pressão seletiva dos microrganismos causada, principalmente, pelo uso indiscriminado de antibióticos e quimioterápicos, resultando no desenvolvimento de espécies resistentes e aumentando significativamente o risco de infecção (PERES-BOTA, 2003; PITTET, 2005). A resistência a um determinado fármaco está diretamente associada à sua má utilização. Diante desta situação, as infecções hospitalares são reconhecidamente umas das principais causas de morbidade, mortalidade e aumento nos custos hospitalares, principalmente em países em desenvolvimento. Desta forma, a resistência a agentes antibacterianos tem-se tornado um importante problema de saúde pública. (NICOLINI *et al.*, 2013; MIMICA MATANOVIC *et al.*, 2010).

Tricomoníase é a doença sexualmente transmitida, não viral mais prevalente no mundo (ZORATI; MELO, 2009; BOTEGA *et al.*, 2016). Causada pelo parasito extracelular *Trichomonas vaginalis* (Donné, 1836), apresenta manifestações clínicas diferentemente em homens e mulheres. Os fármacos de escolha na terapia anti-*T. vaginalis* causam efeitos carcinogênicos, teratogênicos e reações adversas e o aumento no surgimento de isolados clínicos ou laboratoriais de *T. vaginalis* resistentes a fármacos torna-se um agravante para o sucesso do tratamento da doença (GOLDMAN *et al.*, 2009). Além disso, não existe um sistema de vigilância para a tricomoníase, não sendo uma doença de notificação compulsória,

o que a torna uma infecção negligenciada (SECOR *et al.*, 2014).

Na tentativa de um controle mais eficaz de patógenos, pesquisadores têm testado produtos naturais isolados e em associação com os medicamentos originais (SOUSA *et al.*, 2010), almejando uma potencialização na ação dos mesmos e minimização dos efeitos indesejáveis (GIBBONS, 2004; GURIB-FAKIM, 2006).

Os mecanismos de oxidação concentram grandes esforços na pesquisa, pois são os grandes responsáveis pelo envelhecimento dos organismos vivos, como também, a principal causa da diminuição da vida útil dos alimentos e matérias-primas em geral (NOVAES *et al.*, 2013). Compostos antioxidantes são substâncias que, quando presentes em pequenas concentrações em relação ao substrato oxidável, são capazes de retardar ou mesmo inibir a oxidação do substrato (NIKI, 2010). Dentre os métodos que determinam a habilidade dos antioxidantes em sequestrar radicais livres, destacam-se o teste de determinação dos fenóis totais e o Teste do ABTS (BORGES *et al.*, 2011).

A incidência de câncer de pele tem aumentado a cada ano e a causa, na maioria das vezes, é a exposição excessiva ao sol. O sol gera uma grande quantidade de energia radiante e esta radiação se propaga na forma de ondas, onde quanto mais curto o comprimento da onda mais alta é a quantidade de energia. A maior parte da radiação solar (99%) que atinge a terra é composta de energia não ionizante (infravermelho, visível e ultravioleta). A radiação ultravioleta é dividida em UVC, UVB e UVA. O UVC é filtrado pelo ozônio da atmosfera e, portanto, a radiação UV que alcança a superfície terrestre contém apenas UVB e UVA correspondendo a 5% e 95% respectivamente (MAIER *et al.*, 2005; KULLAVANIJAYA *et al.*, 2005). Estas radiações ultravioletas apresentam diferentes atividades sobre os organismos, sendo que algumas destas atividades são benéficas e outras, não. A fim de evitar os malefícios causados por estas radiações, existem produtos denominados fotoprotetores e alguns estudos concentram esforços em avaliar atividades fotoprotetoras que as plantas podem apresentar (OLIVEIRA; JÚNIOR, 2012).

Diante do potencial biotecnológico das plantas medicinais da flora brasileira, o estudo da ação de seus metabólitos representa um passo fundamental para o uso desses produtos. E neste contexto, pesquisas direcionadas a investigar a ação dos compostos químicos, atividade antimicrobiana, Trichomicida, antioxidante, citotóxica, bem como, avaliar o potencial bioativo, de uma forma geral, de plantas torna-se oportuno de forma que os resultados possam contribuir para o aumento da qualidade e produtividade no mercado, como também trazer conhecimento do ponto de vista científico e social.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar as atividades antibacteriana, antioxidante e antiparasitária de plantas medicinais da florabrasileira.

1.1.2 Objetivos específicos:

- Realizar o screen fitoquímico de oito extratos de *Dalbergia ecastaphyllum*, *Byrsonima gardineriana*, *Erythroxylum revolutum*, *Zanthoxylum rhaifolium*, *Pilocarpus spicatus*, *Lippia microphylla*, *Phyllanthus acuminatus*, *Krameria tomentosa*.
- Determinar a Concentração Mínima Inibitória (CMI) e a Concentração Mínima Bactericida (CMB) de oito extratos de plantas medicinais, frente a bactérias padrão;
- Realizar antibiograma, para determinar a susceptibilidade das espécies bacterianas frente a diferentes antimicrobianos;
- Avaliar o efeito sinérgico dos extratos selecionados, associado a um antimicrobiano;
- Determinar a curva de morte dos extratos e bactérias selecionadas;
- Avaliar *in vitro* a atividade citotóxica dos extratos selecionados;
- Realizar a atividade antioxidante de oito extratos etanólicos de plantas medicinais;
- Conhecer a atividade fotoprotetora *in vitro* de oito extratos etanólicos de plantas medicinais;
- Avaliar a atividade anti-*Trichomonas vaginalis* da molécula Justicidin B;
- Determinar o potencial citotóxico da Justicidin B, em culturas de células tumorais e nãotumorais;
- Avaliar o potencial citotóxico da Justicidin B em eritrócitos;
- Determinar o potencial citotóxico da Justicidin B em *Galleria mellonella*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PLANTAS MEDICINAIS

A utilização de plantas com fins medicinais para tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. Sendo uma das primeiras formas de cuidado à saúde utilizada pelo homem, e está relacionada aos primórdios da medicina. Registros fósseis datam o uso humano de plantas como medicamentos a, pelo menos, 60.000 anos (FABRICANT; FARNSWORTH *et al.*, 2001). Ao longo dos séculos, os produtos de origem vegetal constituíram as bases para tratamento de diversas doenças, quer de forma tradicional, devido ao conhecimento das propriedades de determinada planta que é passado de geração para geração, quer pela utilização de espécies vegetais como fonte de moléculas ativas (BRANDÃO *et al.*, 2008; FUNARI *et al.*, 2005).

As plantas medicinais foram adquirindo espaço e tornaram-se uma das fontes mais importantes de medicamentos, comprovando-se a sua enorme qualidade medicinal para a conservação da saúde humana e, ao mesmo tempo, adquirindo respeito na farmacologia (TULP; BOHLIN, 2004; HEINRICH, 2003).

Nas plantas, além dos produtos do metabolismo primário, há, também, uma grande variedade de metabólitos secundários, ou seja, produtos naturais. Na maioria dos casos, não se sabe o seu papel biológico, mas apenas que eles representam uma enorme fonte de investigação, utilizada como modelos para modificações estruturais e otimização das propriedades farmacológicas e bioquímicas, servindo como inspiração para estudiosos na área, estimulando-os para enfrentar desafios na construção sintética de novas estruturas moleculares (BRAZ-FILHO, 2010). Assim, estes produtos naturais, incluindo os metabólitos de plantas, são conhecidos por sua importância no desenvolvimento de remédios (LEONTI *et al.*, 2017).

Apesar da riqueza da flora brasileira e da ampla utilização de plantas medicinais pela população, os estudos científicos sobre o assunto são insuficientes. Poucos programas estabelecem estudos para a segurança e eficácia de fitoterápicos, como proposto pela Organização Mundial de Saúde. Entretanto, o interesse por fitoterápicos aumentou expressivamente, não só nos países em desenvolvimento, mas também nos países industrializados. (PACHÚ, 2007).

Neste contexto, produtos naturais e moléculas isoladas de plantas medicinais vêm sendo alvo de estudo com objetivo de investigar sua ação biológica, no que diz respeito à atividade antimicrobiana, antiprotzoária, antioxidante, fotoprotetora e até mesmo citotóxica,

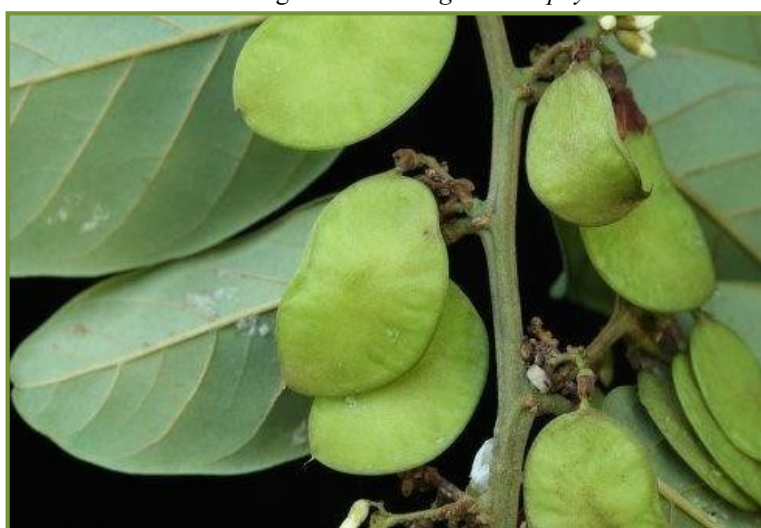
avaliando seu potencial bioativo, de uma forma geral.

2.2 GÊNERO *DALBERGIA*

O gênero *Dalbergia* pertence à família Fabaceae (DI STASI *et al.*, 2002). Consiste de 300 espécies sendo aproximadamente 39 destas de ocorrência no Brasil. As espécies desse gênero caracterizam-se como árvores, arbustos e trepadeiras lenhosas amplamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais (VASUDEVA *et al.*, 2009). Muitas espécies do gênero *Dalbergia* possuem sua madeira valorizada por ser decorativa e perfumada, rica muitas vezes em óleos essenciais. Possuem ampla aplicação tradicional, sendo utilizada na medicina popular como analgésica, antiinflamatória, antimicrobiana, antidiarrêica, antihelmíntica, antiulcerogênica, entre outras (VASUDEVA *et al.*, 2009).

Dalbergia ecastaphyllum (Figura 1) é uma espécie que se distribui ao longo da costa do continente americano, desde o sul da Florida (EUA) ao sul do Brasil, assim como na costa ocidental da África, embora neste continente se distribua apenas em áreas próximas ao mar. É uma espécie de crescimento escandente ou semi-prostrada, encontrada associada a estuários. Sua ocorrência é quase sempre associada a leitos de rios e manguezais, reunindo um emaranhado de ramos e caules que auxiliam na fixação da areia. Pode ocorrer também em vegetação da costa seca e solos arenosos como um arbusto ou arvoreta (SILVA; SANTOS, 2009; SOUZA, 2010).

Figura 1 - *Dalbergia ecastaphyllum*



Fonte: <http://www.tropicos.org>

Popularmente esta espécie é conhecida como rabo-de-bugio, rabo-de-macaco (SILVA

et al., 2008), marmelo-do-mangue, marmeleiro-da-praia (CARVALHO, 1997) moeda-de-videira, entre outros (FRANCIS, 2004).

As cascas e raízes trituradas foram utilizadas por índios americanos na pesca, por possuírem substâncias químicas capazes de entorpecer e ajudar na captura de peixes. No Senegal, suas folhas são colocadas em inalações e banhos para o tratamento de varias debilidades. Na medicina tradicional, extratos são usados como: diurético, emético e vermífugo, apesar de poderem apresentar toxicidade para alguns tecidos (FRANCIS, 2004).

Correia *et al.* (2008) realizaram a atividade antibacteriana, por meio do método de difusão em disco frente a cepas padrão ATCC *Proteus mirabilis* (7022), *Klebsiella pneumoniae* (27858), *P. aeruginosa* (27853), *E. coli* (25922), *S. aureus* (29213), *E. faecalis* (29212) e *Streptococcus pneumoniae* (46619), e cepas multirresistentes obtidas de isolados clínicos. O extrato etanólico da casca de *D. subcymosa* apresentou atividade para a cepa multirresistente de *S. aureus*, na concentracao de 20 µg/mL.

Okwute *et al.* (2009) estudaram a atividade antimicrobiana de extrato etanólico de folhas e cascas de *D. saxatilis* frente a cinco microorganismos patogênicos padrão ATCC, *S. aureus* (13709), *E. coli* (9637), *C. albicans* (10231), *P. aeruginosa* (27853), *K. pneumoniae* (10031) e a um isolado clinico de *Bacillus subtilis*. Constataram que o extrato das folhas apresentou atividade somente frente a *S. aureus*, na concentração inibitória mínima (CIM) de 1000 µg/mL, enquanto que o extrato da casca apresentou amplo espectro antimicrobiano com CIM de 1000 µg/mL frente às bactérias de *E. coli* e *P. aeruginosa* e CIM de 250 µg/mL e 125 µg/mL para *S. aureus* e *B. subtilis*, respectivamente.

Aresi (2011) avaliou 22 extratos contra cepas padrão ATCC de *S. aureus* (25923), *E. faecalis* (29212), *P. aeruginosa* (27853), *E. coli* (25922) e *C. albicans* (10231), pelo método de difusão em disco, na concentração de 100 mg/ml, sendo o extrato etanólico das folhas de *D. ecastaphyllum* o único que apresentou halo de inibição para *S. aureus* e *E. faecalis* igual ou superior a 10mm. O extratoetanólico foi particionado com solventes de polaridade crescente e, por meio dos ensaios de difusão em disco e microdiluição, observou que a fração acetato de etila (AcOEt) apresentou potente atividadecontra *S. aureus*, com halos de inibição de 14 mm e concentração bactericida mínima (CMB) de 6,25mg/mL.

2.3 GÊNERO *BYRSONIMA*

O gênero *Byrsonima* é o maior da família Malpighiaceae com cerca de 150 espécies

(JUDD *et al.*, 2009; AGUIAR, 2005). Possui ampla distribuição na América Central e do Sul, México e Florida. Ocorre em diferentes ambientes como restingas, florestas e cerrados (FILGUEIRAS; PEREIRA, 1990; OLIVEIRA FILHO; MACHADO, 1993).

No Brasil, está representado por 93 espécies que ocorrem em todos os Estados nos domínios fitogeográficos da Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica. São popularmente conhecidos como “murici”, “murici-cascudo” ou “murici-vermelho”, e empregados não apenas na medicina tradicional, mas também no preparo de alimentos (SANNOMYIA *et al.*, 2005).

Byrsonima gardineriana apresenta porte arbustivo, suas flores são zigomorfas, hermafroditase dispostas em ráceros terminais (Figura 2). As folhas são simples, opostas e obovadas. Os frutos são comestíveis, podendo ser consumidos “in natura”, como também utilizados na fabricação de sucos, picolés, licores, geléias, doces, conserva e em forma de farinha. Possuem propriedades medicinais, sendo usados na medicina popular como antitérmico, desinflamante, antibacteriano e antifúngico (CACERES *et al.*, 1993).

Figura 2-*Byrsonima gardineriana*



Fonte: <http://www.flickrriver.com>

Rolim *et al.* (2013), estudando o perfil fitoquímico de *Byrsonima gardneriana*, isolaram cinco triterpenos e um flavonóide. Bem como, estudando a atividade antioxidante do EEB e das fases hexânica, clorofórmica, acetato de etila e n-butanólica, a fase AcOEt apresentou a melhor atividade para o radical DPPH ($3,45 \pm 0,043$ mg/mL), como também para compostos fenólicos totais ($509,947 \pm 7,387$), e para o ABTS CE₅₀ a fase n-BuOH ($3,15 \pm 0,055$ mg/mL) foi quem se destacou.

2.2.1 Gênero *Erythroxylum*

O gênero *Erythroxylum*, com cerca de 230 espécies, é o único gênero representado na região Neotropical, onde aproximadamente 187 espécies são exclusivas (PLOWMAN; HENSOLD, 2004). No Brasil, o gênero possui cerca de 74 espécies, encontradas em diversos tipos de vegetação, ocorrendo desde as florestas úmidas da Amazônia e Atlântica, até as matas secas do Cerrado e da Caatinga (PLOWMAN; HENSOLD, 2004).

De acordo com Zuanazzi *et al.* (2001), o interesse pelo gênero intensificou-se no século XIX, após a descoberta das atividades farmacológicas apresentadas pelas folhas de *Erythroxylum coca*, que secularmente eram empregadas pelos indígenas da América do Sul. Quimicamente, o gênero caracteriza-se pela presença de alcalóides do grupo tropano, dentre os quais, destaca-se a cocaína, um alcalóide natural produzido por *E. coca*, que foi empregado como anestésico local em pequenas cirurgias (BOHM *et al.*, 1982; GRIFFIN; LIN, 2000). Entretanto, a cocaína ganhou notoriedade por sua atividade psicoativa no Sistema Nervoso Central (SNC), tornando-se um dos grandes problemas de saúde pública da atualidade (ALAGILLE *et al.*, 2005).

Erythroxylum revolutum pode ser encontrado como arbusto ou arvoreta, medindo aproximadamente 0,8 a três metros de altura. Possui ramos não patentados, estriados longitudinalmente, densamente revestidos por lenticelas amareladas ou alvas, elípticas, folhas levemente discolor, flores subsésseis com pétalas amareladas a branca (Figura 3) (LOIOLA *et al.*, 2007). Espécie exclusiva do Brasil, com distribuição restrita à região Nordeste, encontrada em áreas do semi-árido (caatinga) nos Estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Pernambuco, Piauí e Sergipe (LOIOLA *et al.*, 2007).

Figura 3- *Erythroxylum revolutum*



Fonte: <https://fm2.fieldmuseum.org>

Oliveira (2012) realizou estudo fitoquímico das espécies *Erythroxylum caatingae*, *Erythroxylum subrotundum* e *Erythroxylum revolutum*. Da fase clorofórmica de *E. caatingae* foram isolados, quatro alcaloides tropânicos. Da fase acetato de etila de *Erythroxylum subrotundum* foram isolados dois flavonoides e da fase hexânica de *Erythroxylum revolutum* foram isolados seis diterpenos. As espécies tiveram seus constituintes químicos identificados por meio da análise por métodos espectroscópicos como Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C uni- bidimensional.

2.2.2 Gênero *Zanthoxylum*

Zanthoxylum L. é um gênero de Rutaceae, com cerca de 200 espécies tropicais, poucas alcançando áreas temperadas, são árvores ou arbustos, geralmente com acúleos (estrutura com aparência de espinho) no tronco e ramos (GROPPO; PIRANI, 2007).

Zanthoxylum rhoifolium (Rutacea) é popularmente conhecido como mamica-de-porca, mamica-de-cadela, laranjeira-brava e espinho-cheiroso. São arbustos apoiantes, às vezes atingindo o porte de arvoreto, geralmente com acúleos (estrutura com aparência de espinho) no tronco e ramos (Figura 4). Distribui-se principalmente em regiões de cerrado (SALGADO et al., 1998) e florestas Atlântica e Amazônica (PIRANI, 2005).

Figura 4: *Zanthoxylum rhoifolium*



Fonte: http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php

Alguns estudos apontam o potencial medicinal dessa espécie. Silva et al (2007) avaliaram o óleo volátil das folhas de *Zanthoxylum rhoifolium* e verificaram que ele é

citotóxico contra células tumorais, sugerindo, assim, uma possível ação terapêutica contra essas células. De acordo com Peneluc *et al* (2009), o extrato aquoso das folhas apresenta atividade anti- helmíntica em ovinos. Pereira *et al* (2010) relataram que essa planta é utilizada popularmente contra dores de dente e ouvido e, após investigação científica, comprovaram o efeito analgésico da casca.

Na Bolívia, a casca e as folhas de *Z. rhoifolium* são usadas como antipirético. No Peru, são utilizadas devido ao seu efeito digestivo e por suas propriedades tônicas. Enquanto que no Brasil é utilizada para o tratamento de inflamações e infecções microbianas, câncer e malária (JULLIAN *et al.*, 2006, Da SILVA *et al.*, 2007). Nesta espécie os metabolitos secundários, principalmente lignanos, Alcalóides, terpenóides e flavonóides têm sido encontrados e estudos mostraram que esses alcalóides exibem propriedades antimicrobianas (GONZAGA *et al*, 2003, TAVARES *et al.*, 2014; LIZ-NETO *et al.*, 2016).

Tavares e colaboradores (2014), estudaram a atividade antimicrobiana de extratos metanólicos, frações e alcaloides puros de *Z. Rhoifolium*, frente aos microrganismos padrões *B. subtilis* (633), *B. cereus* (33019), *S. aureus* (25923), *S. epidermidis* (12228), *S. pyogenes* (19615), *Enterobacter aerogenes* (13048), *Enterococcus spp.* (6589), *E. coli* (25922), *K. pneumonia* (13883), *P. aeruginosa* (27853), *Enterobacter cloacae* (1304), *Shigella sonnei* (25931), *Salmonella typhimurium* (14028), *Burkholderia cepacia* (17759), *Morganella morganii* (25829), *Candida albicans* (10231), *Candida tropicalis* (18803), *Candida krusei* (6258), *Candida parapslosis* (22018), *S. cerevisiae* (2601), *Cryptococcus neoformans* (28952) e *Cryptococcus gatti* (2601). Os extratos da casca do caule exibiram um amplo espectro de atividade antimicrobiana, variando de 12,5 a 100 µg / mL, usando o método bioautográfico e de 125 a 500 µg / mL para o bioensaio de microdiluição. Foram isolados três alcalóides de furoquinolina e nove alcalóides de benzofenantridina a partir da fração básica de diclorometano. O alcalóide com maior espectro de atividade foi a queleritrina, seguida de avicina e dihidrocheleritrina. As concentrações inibitórias mínimas de queleritrina foi de 1,50 µg / mL para todas as bactérias testadas e entre 3,12 e 6,25 µg / mL para as leveduras testadas. O estudo não detectou efeitos hemolíticos da queleritrina em eritrócitos, encontrou apenas efeito protetor.

2.2.3 Gênero *Pilocarpus*

Pilocarpus Vahl é um gênero neotropical de plantas arbustivas e arbóreas, com distribuição geográfica que se estende desde o sul do México e América Central, incluindo as

Pequenas e Grandes Antilhas, até o sul da América do Sul. É composto por 17 espécies e 14 são encontradas exclusivamente no território brasileiro (SKORUPA, 1996; SAWAYA *et al.*, 2011). Algumas espécies de *Pilocarpus* são chamadas popularmente como jaborandi, nome derivado da língua tupi-guarani, que significa planta que causa saliva.

Este gênero é constantemente estudado devido às propriedades farmacológicas como potente estimulante de secreção e diurético (CORRÊA, 1969). As folhas de *Pilocarpus* são usadas em infusões para o tratamento de febre, estomatite, bronquite e psoríase (HOLMSTED *et al.*, 1979; BENIGNI, 1964). Embora várias espécies tivessem sido utilizadas outrora para fins terapêuticos (como sudorífero), a partir dos anos 90, a espécie *P. microphyllus* Stapf tornou-se a única fonte industrial de pilocarpina, alcalóide utilizado no tratamento de glaucoma (ROBIM *et al.*, 1996; TANIGUCHI *et al.*, 1994; ZADOK *et al.*, 1994). É utilizada, também, para relaxamento intestinal após laparotomia e em xerostomia pós-irradiação em pacientes com câncer de cabeça e pescoço.

Neste gênero, destaca-se *Pilocarpus spicatus*, espécie encontrada apenas no Brasil. Estudos fitoquímicos da espécie demonstraram a presença da cumarina chalepina, a qual apresentou atividade tripanomicida, além de vários terpenos, tais como: α e β -pineno, canfeno, ZZ-farnesol, E-nerolidol e allo-aromadendreno (ANDRADE-NETO *et al.*, 2002; PAVÃO *et al.*, 2002; SANTOS; MORENO, 2004). As atividades antibacterianas e imunomodulatórias do extrato de folhas desta espécie foram estudadas, bem como a atividade dos extratos brutos do caule de *P. spicatus* e suas frações, frente à forma tripomastigota de *T. cruzi* com resultados superiores a 80% de inibição do parasita (COSTA *et al.*, 2010; MAFEZOLI *et al.*, 2000).

Silva *et al.* (2014) estudaram o perfil fitoquímico de *P. spicatus* e a atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. Identificaram nove substâncias, tais como: tridecanona, 2-heptadecanona, espatulenol, aromadendreno, β -cariofileno, ácido 3 α -hidroxitirucala-7,24-dien-21-óico, (+)-isoangenomalina, episesamina e sesamina. Os testes de atividade anti-*T. cruzi* cepa Y foram realizados com extrato hexânico e metanólico das folhas, e com o extrato metanólico das raízes. Todos os extratos apresentaram inibição maior que 50%, sendo que o extrato hexânico das folhas inibiu 79%, o extrato metanólico das folhas inibiu 56% e o extrato metanólico das raízes inibiu 62% do crescimento do parasito.

2.2.4 Gênero *Lippia*

O gênero *Lippia* Linn. (Verbenaceae) inclui aproximadamente 200 espécies de ervas, arbustose árvores de pequeno porte, distribuídas principalmente na América Central, regiões

tropicais da África, América do Norte, América do Sul e Austrália (PASCUAL *et al.*, 2001; GOMES; NOGUEIRA; MORAIS *et al.*, 2011). Os principais centros de diversidade específica das espécies de *Lippia* estão localizados no México e no Brasil. No Brasil, encontram-se na Cadeia do Espinhaço, localizada nos estados de Minas Gerais, Bahia e Goiás, de forma que, aproximadamente, 120 espécies estão distribuídas em dois importantes biomas brasileiros, o Cerrado e a Caatinga (GOMES *et al.*, 2011). A maioria das espécies distribuídas no Brasil são utilizadas na medicina popular, devido a suas propriedades: analgésica, anti-inflamatória, antipirética, sedativa, antifúngica, anti-hipertensiva, diurética, larvívica, antimicrobiana, antiviral, moluscívica, antimalárica, antiespasmódica, anticonvulsivante e estimulante (ABENA *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 2010).

Lippia microphylla Cham, conhecida popularmente como alecrim-de-tabuleiro, alecrim-do-mato, alecrim-pimenta ou alecrim-da-chapada (Figura 5) é utilizada popularmente no tratamento de doenças respiratórias ou como antiséptico (AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007).

Figura 5: *Lippia microphylla*



Fonte: <http://ufvjmbeelab.wixsite.com/beelab/verbenacea>

g

Simões *et al.* (2015) revisaram bases de dados de 1948 até 2015, utilizando um software (vantage point 7.1) associado ao Derwent Innovation Index para identificar os indicadores do gênero *Lippia* e as atividades e compostos biológicos presentes em *L.*

microphylla. As espécies de *Lippia* demonstraram uma grande variedade de uso na medicina popular, para várias doenças, particularmente para o tratamento da tosse, bronquite, indigestão, fígado, hipertensão, disenteria (CHANNH *et al.*, 1988; PASCUAL *et al.*, 2001), vermes e doenças da pele (MATOS; OLIVEIRA, 1998). Muitas espécies possuem atividades biológicas promissoras, incluindo antiviral (ABAD *et al.*, 1997), antimalárica (VALENTIN *et al.*, 1995), antiinflamatória, analgésica, antipirética (FORESTIERI *et al.*, 1996), moluscicida contra *Biomphalaria glabrata* (MATOS; OLIVEIRA, 1998), antimicrobiana (LEMOS *et al.*, 1990; VERAS *et al.*, 2012), inseticida (De LIMA *et al.*, 2013) e Anticonvulsivante (ABENA *et al.*, 1998). Os compostos isolados de *Lippia* também revelaram atividade antitumoral *in vitro* sobre leucemia (K-562, HL-60, CEM), cólon (HCT-116), mama (MCF-7), glioblastoma (U-251) e próstata (PC-3) (COSTA *et al.*, 2001; GONZALEZ- GUËRECA *et al.*, 2010). Além de suas propriedades medicinais, as folhas da maioria das espécies de *Lippia* são usadas para a preparação de alimentos. Os registros etnofarmacológicos relatam o uso de folhas de *L. microphylla* para tratar distúrbios gastrointestinais e influenza, bronquite e sinusite durante a vaporização resultante de água fervente. Estudos fitoquímicos revelaram a presença de quinonas e flavonóides de extratos de etanol de raízes (SANTOS *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2003). Enquanto isso, seus óleos voláteis aromáticos, extraídos por vapor de água, são ricos em monoterpenos, especialmente cineol, e terpineol.

2.2.5 Gênero *Phyllanthus*

Phyllanthus destaca-se por sua complexidade taxonômica e pelo elevado número de espécies, aproximadamente 800, dispersas por todas as regiões do mundo (WEBSTER 1956; 2002ab). Nos neotrópicos está representado por mais de 200 espécies (WEBSTER, 2002b). No Brasil, ocorrem aproximadamente 107 espécies, das quais, cerca de um quarto apresentam-se principalmente nos campos rupestres, cerrados e caatingas. Este gênero subordina plantas de hábito variado, principalmente herbáceo (70%), com ramificação filantoide ou não filantoide, flores gamossépala em inflorescências cimosas, disco usualmente presente em ambas as flores, comumente inteiro nas pistiladas e segmentado nas estaminadas, frutos capsulares, mais raramente bacáceos, e sementes usualmente trígonas e ornamentada.

Segundo Silva e Sales (2007), *Phyllanthus acuminatus* é uma planta arbórea ou arbustiva- arbórea, com 3-6m de altura, ramifica filantoide, flor pistilada solitária na região central e estaminada. Exclusiva das Américas, ocorrendo desde o México até o Norte da

Argentina. Cresce em florestas secundárias e em matas de galeria do cerrado. No Brasil, ocorrem nas regiões Norte, Centro-Oeste, Nordeste e Sudeste. Distribui-se na Zona da Caatinga, porém em áreas mais úmidas e elevadas (800 a 1000m), com vegetação de floresta semidecídua ou perenifólia como também na Zona da Mata Atlântica e Litoral (SILVA; SALES, 2004).

Algumas espécies no Brasil são reconhecidas tradicionalmente por possuírem propriedades diuréticas utilizadas para eliminar cálculos renais, dentre elas *P. niruri*, *P. amarus* e *P. tenellus*, também conhecidas como quebra pedra (TORRES *et al.*, 2003). Atividade antiviral foi associada a algumas espécies de *Phyllanthus* para tratamento de hepatite B e câncer (LORENZI; MATOS, 2002). Domingues e colaboradores (2015) avaliaram a atividade antimicrobiana de diferentes extratos de *Phyllanthus* sp, frente a microrganismos causadores de infecções no trato urinário, e observaram ação antimicrobiana para *E. coli* com valor de CMI 6,67 mg/mL e para *C. albicans* com valor de CMI $4,8.10^{-10}$ mg/mL e para a técnica difusão em disco a *E. coli* mostrou-se sensível com halos de inibição variando entre 6 e 8mm e *C. albicans* entre 13 e 19,5mm.

Os extratos de *Phyllanthus* têm compostos secundários como alcalóides, flavonóides, fenóis de lignina, tanino e terpeno. Muitos dos constituintes ativos são atribuídos biologicamente à lignina, glicosídeos, flavonóides e propanol de fenila que são encontrados nas folhas, caule e raízes de plantas desse gênero (KOMURAIH *et al.*, 2009). Análises realizadas por Cárdenas López e seus colaboradores (2002) mostraram a presença de flavonóides, taninos, saponinas, esteróides, triterpenóides, cumarinas e outros terpenóides em *P. acuminatus* Vahl.

A lignana Justicidin B pertence ao subgrupo arilnaftaleno e ocorre em diferentes gêneros de plantas. Como: *Justicia* (Acanthaceae), *Phyllanthus* (Euphorbiaceae), *Haplophyllum* (Rutaceae) e *Linum* (Linaceae) e na espécie *P. acuminatus* é encontrada na raiz e na parte aérea (PETTIT *et al.*, 1984; PETTIT; SCHAUFELBERGER, 1988).

As lignanas são uma classe de substâncias isoladas de plantas. Esse termo foi criado por Haworth em 1936 para descrever uma classe de micromoléculas formadas exclusivamente ou adicionalmente a outros grupos, pelo grupo fenilpropânico (C6-C3)_n, onde n é restrito a poucas unidades (DAR; ARUMUGAM, 2013). Com base na forma em que o oxigênio está incorporado no esqueleto e o padrão de ciclização, as lignanas são classificadas em oito subgrupos, que são: furofurano, furano, dibenzilbutano, dibenzilbutirolactona, ariltetralina, arilnaftaleno, dibenzociclooctadieno e dibenzilbutirolactol (DAR; ARUMUGAM, 2013).

Esses metabólitos generalizados e especializados são, não só importantes para a defesa

da plantas, mas também são valiosos para a saúde humana. Pois, desempenham função aleloquímica nas plantas e ação farmacológica no homem (LEE; XIAO, 2003; GOTTLIEB; YOSHIDA, 1984).

Importantes atividades farmacológicas têm sido relatadas para Justicidin B, como por exemplo, efeitos citotóxicos em diferentes linhagens neoplásicas, inibição da absorção óssea e propriedades antiplaquetárias e antitumorais (ASANO *et al.*, 1996; GERTSCH *et al.*, 2003; LUO *et al.*, 2014). Ação antifúngica inibindo *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* e *Aspergillus flavus*, com concentração inibitória mínima (MIC) ≥ 1 , 4 e 12 $\mu\text{g} / \text{mL}$, respectivamente (GERTSCH *et al.*, 2003). Windayani e colaboradores (2014) identificaram uma forte atividade de Justicidin B, contra *A.niger* e *A. flavus* em comparação ao matairesinol (lignano do tipo dibenzilbutirolactona). Justicidin B apresentou forte atividade antiviral contra o vírus da estomatite vesiculosa (VSV) com um valor de MIC de 0,06 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (ASANO *et al.*, 1996).

Duzentos e setenta e quatro nanomolar (274 nM) de justicidin B mostrou 74% e 14% de inibição contra Sindbis vírus e murino citomegalovírus (MCMV), crescido em células de rato 3T3 -L1, respectivamente (MACRAE *et al.*, 1989; CHARLTON, 1998). E não exibiu atividade antiviral substancial contra o citomegalovírus humano COW *et al.*, 2000).

Em estudo conduzido por El-Gendy (2008), o valor de CIM para a justicidin B contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. aureus*, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium smegmatis* e *Corynebacterium xerosis* foi de 0,5, 0,2, 2,0, 2,5, 1,0, 0,5, 5,5 e 7 mg / mL, respectivamente. Enquanto que Gertsch e colaboradores (2003) não detectaram nenhuma atividade antibacteriana da justicidin B contra *B. cereus*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*.

Gertsch *et al.* (2003) analisaram a atividade antiprotozoária da Justicidin B e observaram atividade moderada para *T. cruzi* com IC₅₀ de 2,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em comparação ao benidazol como controle positivo, atividade forte contra a forma tripomastigota de *T. brucei rhodesiense*, com IC₅₀ de 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e como agente antimalárico moderado, uma vez que este composto teve um IC₅₀ > 5 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Momekov *et al.* (2014) avaliaram características oncológicas da justicidin B na linhagem celular derivada da leucemia mielóide aguda HL-60, a esta molécula apresentou IC

₅₀ de $3,6 \pm 0,07 \mu\text{M}$ após 24 h de tratamento com um aumento significativo na fragmentação do DNA apoptótico. A justicidin B também mostrou potencial citotóxico contra o carcinoma colo retal L0V0 humano e à linhagem celular (BGC-823) do cancro

gástrico humano (JIN et al., 2014). Ilieva *et al.* (2014) avaliaram o efeito da justicidin B em oito linhas celulares derivadas de diferentes linfomas B após 72 h de incubação as linhas celulares de mieloma múltiplo (MM), MM(RPMI-8226) e MM (OPM2) foram as linhagens celulares mais sensíveis na presença da molécula. A linha celular de linfoma de Hodgkin (HD-MY-Z) não mostrou qualquer sensibilidade relativamente à justicidin B. Também foi determinada a citotoxicidade da justicidin B contra as linhas celulares de carcinoma de mama MDA-MB-231 e MCF-7. A justicidin B exibiu uma atividade mais forte contra o MCF-7 do que o MDA-MB-231 (MOMEKOV, 2011).

Uma vasta gama de atividades biológicas foi atribuída à justicidin B (HEMMATI; SERADJ, 2016). Os efeitos citotóxicos, antimicrobianos e antiprotozoários demonstram que esta molécula desempenha um importante papel no mecanismo de defesa química das espécies correspondentes. As características terapêuticas valiosas da justicidina B resultam num interesse considerável em relação à sua produção. Outras atividades relacionadas à Justicidin B, estão citadas na tabela 1.

Tabela 1- Atividades farmacológicas de Justicidin B.

ATIVIDADE	RESULTADO	REFERÊNCIA
Avaliação da toxicidade animal <i>in vivo</i> ;	Não foi relatada toxicidade <i>in vivo</i> em ratos;	ILIEVA et al., 2014
Inibidor da reabsorção óssea;	25 µM da molécula inibiu a liberação de Ca do osso até 47%;	BABA et al., 1996
Propriedades antioxidantes– DPPH;	Atividade antioxidante moderada de IC ₅₀ 65,0;	RAO et al., 2007
Inibidores da BaP hidroxilase;	10 µM da molécula diminuiu a hidroxilase de BaP em 21%;	UENG et al., 2000
Atividade piscicida contra <i>Oryzias latipes</i> ;	Nenhum peixe sobreviveu a uma concentração de 0,032 ppm após 24h;	OHTA et al., 1969
Atividade inseticida contra <i>Musca domestica</i> , <i>Periplaneta americana</i> , <i>Prodenia litura</i> e <i>Panonychus citri</i> ;	Não foi observada toxicidade significativa da justicidina B contra insetos.	OHTA et al., 1969

Fonte: Autora

2.2.6 Gênero *Krameria*

O gênero *Krameria* é composto por 18 espécies herbáceas ou arbustivas, que estão predominantemente representadas em regiões neotropicais e ecologicamente restritas a regiões áridas ou secas das Américas (SIMPSON *et al.*, 2004; GIMENES *et al.*, 2006; GIANNINI *et al.*, 2011).

Existem duas características importantes desse gênero: a primeira consiste no hábito hemiparasita pouco seletivo com relação ao hospedeiro (Plantas herbáceas ou arbustivas) (POZHIDAEV, 2002) e a segunda consiste em um sistema reprodutor que envolve a relação obrigatória com abelhas do gênero *Centris*. As *Kramerias* apresentam glândulas especializadas na produção de óleo floral atrativo para essas abelhas que, ao coletá-lo, poliniza as flores (GIANNINI *et al.*, 2009).

Krameria tomentosa apresenta-se como um arbusto de caule liso, estriado, glabro na parte inferior e pubescente na superior; folhas longas pecioladas e elípticas, flores dispostas em racimos bracteados, fruto de vagem globosa, unisperma com numerosos espinhos e sedas rígidas (Figura 6) (SIMPSON, 1989). Conhecida popularmente como “ratanha de nova granada”, “carrapicho decavalo” ou “ratana de salvanille”. A raiz de *K. tomentosa* tem largo emprego na medicina popular no combate a disenterias, estomatites, diarreia, corrimentos vaginais, hemorragias, hemorróidas e afecções de boca (SIMPSON, 1989; 1991).

Silva *et al.* (2001) isolaram uma trinorneolignana inédita e outras quatro neolignanas já descritas para outras espécies. Madeiro (2012) a partir das técnicas de Espectroscopia no infravermelho, Espectrometria de Massas e Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais, conseguiu identificar duas neolignanas inéditas, ottomentosa e sobralina, também foram isoladas as neolignanas eupomateoide 6, 2-(2',4'-diidroxifenil-5-(E)-propenilbenzofurano e diidrocarinatidina, relatadas pela primeira vez na família.

Figura 6- *Krameria tomentosa*



Fonte: <https://www.commons.wikimedia.org>

2.2.7 Atividade biológica de produtos de origem vegetal

2.2.7.1 Atividade antimicrobiana

A ocorrência de substâncias com potencial antimicrobiano em produtos naturais não é

um fato recente, pois a busca pelas mesmas teve grande impulso após a descoberta da penicilina a partir do fungo filamentoso *Penicillium notatum*, por Alexander Fleming, em 1929, seguido de muitos outros estudos que induziram a descoberta de novas substâncias com atividade antimicrobiana, tais como, a eritromicina, nistatina, vancomicina, artemisinina, frente a diversos microorganismos, como bactérias, fungos e parasitas (CRAGG; NEWMANN, 2007; LIMA, 2001).

Durante a última década, observou-se o desenvolvimento de patógenos resistentes e os antibióticos tiveram sua eficácia reduzida, este problema vem se agravando pelo fato de que novos fármacos raramente chegam ao mercado (SALEEM *et al.*, 2010). A resistência a um determinado fármaco, sobretudo aos antimicrobianos, está associada a sua má utilização, pois mais de 60% destes medicamentos são prescritos de forma errada (MIMICA MATANOVIC *et al.*, 2010).

Neste contexto, novas estratégias vêm sendo adotadas na pesquisa de produtos naturais com a finalidade de acelerar o processo na descoberta de novos antimicrobianos, assim, inúmeras pesquisas vêm sendo desenvolvidas na busca de novos fitoconstituintes com alto valor terapêutico, que possam servir como fontes valiosas para a potencial produção de novos medicamentos úteis para diversas doenças (ABEYSINGHE, 2010; BETONI *et al.*, 2006, LEE, 2010; PERUMALSAMY; GOPALAKRISHNAONE, 2010).

2.2.7.2 Atividade antioxidante

Nas últimas décadas foram realizadas inúmeras pesquisas para esclarecer o papel dos radicais livres em processos fisiopatológicos como envelhecimento e também doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, como câncer, aterosclerose, inflamação, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (ATOUI *et al.*, 2005).

Os radicais livres são átomos ou grupos de átomos, com um elétron desemparelhado ($R\bullet$), sendo altamente reativos e cujos produtos de suas reações geram outros radicais livres (reação em cadeia). Os radicais são gerados normalmente no metabolismo e intensificados após exposição a vários fatores como estresse, luz solar, poluição e cigarro (YOUNG; LOVE, 2001). O estresse oxidativo é o resultado do desequilíbrio entre a peroxidação e a antioxidação, com maior produção de espécies reativas de oxigênio e menor produção de antioxidantes, caracterizando-se, principalmente, pelo desequilíbrio homeostático, e

consequentemente dano oxidativo potencial contra células e tecidos (AW et al., 1991; BARBOSA et al, 2010).

A formação de radicais livres pelo organismo em condições normais é inevitável, pois são necessários no processo de respiração celular nas mitocôndrias, que são nossas “usinas energéticas”, que geram a energia na forma de ATP (adenosina trifosfato). Os radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular está associado com o seu sítio de formação (CASTROGIOVAN et al, 2012; COTIGUIBA et al, 2013).

Segundo Sun e colaboradores (2011), a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) e reações que levam à produção de radicais livres podem levar ao estresse oxidativo celular, podendo causar doenças degenerativas ou patologias.

Compostos antioxidantes são substâncias que, quando presentes em pequenas concentrações em relação ao substrato oxidável, são capazes de retardar ou mesmo inibir a oxidação do substrato (NIKI, 2010). Encontramos duas categorias desses compostos, os de origem natural e os sintéticos. Os naturais dividem-se em dois grandes grupos, os enzimáticos e os não enzimáticos, são encontrados em recursos vegetais e destacam-se com relação aos sintéticos, que se acumulam no organismo favorecendo os efeitos mutagênicos e carcinogênicos (BIRCH et al., 2001), além de causarem outros males como aumento do peso do fígado e proliferação do retículo endoplasmático (NOVAES et al., 2013).

Dentre os métodos que determinam a habilidade dos antioxidantes em sequestrar radicais livres, destacam-se o teste de determinação dos fenóis totais, O TEAC (“Trolox Equivalent Antioxidant Capacity”) ou Teste do ABTS 2,2-Azino-Bis-(3-Ethylbenzothiazoline)-6-Sulfonic Acid)(BORGES et al., 2011).

Os extratos de plantas com propriedades antioxidantes despertam grande interesse na área dos fitocosméticos, pois representam moléculas que poderiam inativar o ROS restaurando a homeostasia da pele, evitando assim, eritemas e envelhecimento prematuro (CALDERON- MONTANO *et al.*, 2011; MANSUR *et al.*, 2016).

2.2.7.3 Atividade Fotoprotetora

A pele é o órgão mais extenso do corpo humano e constantemente é exposta à radiação solar, quer seja por padrões estéticos, profissionais ou por deslocamento diário (GUARATINI *et al.*, 2009). A luz solar consiste em um espectro eletromagnético de vários

comprimentos de onda, que se estende entre os raios gama até as ondas de rádio, compreendendo os raios X, ultravioleta (UV), visível (VIS) e infravermelho (IV). Entre estas radiações emitidas pelo sol, há radiações não ionizantes, que são a radiação ultravioleta num comprimento de onda (λ) entre 100 a 400 nm, a luz visível entre 400 a 750 nm, e a radiação infravermelha num (λ) de 750 a 2000 nm. A radiação na porção visível corresponde a aproximadamente 43% das radiações eletromagnéticas provenientes do sol que alcançam a superfície terrestre, sendo que a porção infravermelha corresponde a 49 % e a ultravioleta compreende apenas cerca de 5 % dessa energia. Estas exercem efeitos significativos sobre a pele (NEVES, 2008).

A exposição crônica à radiação UV leva a muitos efeitos colaterais na pele, como envelhecimento prematuro, câncer de pele e redução da capacidade de resposta imunológica. Esses problemas de saúde estão diretamente relacionados à formação de espécies oxigênicas reativas (ROS) por radiação UV (JAIN; JAIN, 2010; GILBERT *et al.*, 2013; SCOTTI; VELASCO, 2003).

A fotoproteção consiste no bloqueio da radiação ultravioleta à qual a pele está exposta. Produtos capazes de bloquear estas radiações podem efetivamente minimizar fotolesões e prevenir o desenvolvimento de câncer de pele e envelhecimento cutâneo precoce (MAW *et al.*, 2011). Os protetores solares são formados pela mistura de filtros físicos e/ou químicos e sua classificação está baseada no mecanismo de ação destes compostos. Os filtros físicos (substâncias inorgânicas) agem por reflexão da radiação, sendo os mais utilizados: dióxido de titânio (que atua sobre a radiação UVB) e óxido de zinco (que atua sobre a radiação UVA). O inconveniente destes agentes é o aspecto estético desagradável provocado na pele dos pacientes (WANG *et al.*, 2011). Os filtros químicos (substâncias orgânicas) absorvem a radiação e a liberam na forma de energia térmica ou fluorescência, através do mecanismo denominado ressonância (SCHALKA; REIS, 2011). Os ativos mais comuns desta classe são o ácido *p*-aminobenzóico (PABA), os cinamatos, salicilatos e as benzofenonas. Merece destaque a utilização das benzofenonas devido à sua absorção na região do UVA/UVB e a tolerância cutânea (WANG *et al.*, 2011).

Produtos vegetais que apresentam atividade fotoprotetora têm sido estudados com o intuito de incrementar benefícios a produtos cosméticos. Entretanto, o desenvolvimento de formulações multifuncionais empregando substâncias que possuam diferentes mecanismos de ação e proporcionem um resultado satisfatório na prevenção ao envelhecimento, combate aos danos e embelezamento da pele constitui-se o principal alvo da Cosmetologia (SCOTTI & VELASCO, 2003). Neste contexto, o Brasil é um país de ampla biodiversidade em seu

território, e plantas medicinais têm sido bastante exploradas, pois apresentam ampla diversidade de metabólitos secundários com diferentes atividades biológicas, existindo a necessidade de um aprofundamento no conhecimento das propriedades farmacológicas das espécies vegetais e suas possíveis utilizações no desenvolvimento de novos produtos.

2.8 ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA - *TRICHOMONAS VAGINALIS*

Tricomoníase é a doença sexualmente transmitida, não viral mais prevalente no mundo (WHO, 2001). É causada pelo parasita extracelular *Trichomonas vaginalis* (Donné, 1836), protista que pertence ao Filo Parabasala e família Trichomonadidea. Os tricomonadídeos são organismos que se caracterizam pela presença de quatro a seis flagelos e *T. vaginalis* apresenta quatro flagelos anterior (HONIGBERG & BRUGEROLLE, 1990; BENCHIMOL, 2004). As manifestações clínicas da tricomoníase ocorrem diferentemente em homens e mulheres. Nos homens, na maioria dos casos relatados, a doença é assintomática e autolimitada. Quando sintomática, as queixas são de corrimentos mucopurulentos, disúria e pouco prurido ou ardência imediatamente após relações sexuais (PETRIN *et al.*, 1998). Nas mulheres, as manifestações clínicas iniciam-se com prurido local com corrimento vaginal espumoso, amarelo ou esverdeado e mucopurulento, dor abdominal baixa e disúria, podendo atingir um estado severo de vaginite (FICHOROVA, 2009). A tricomoníase pode ainda causar sérias consequências na saúde, como complicações na gravidez (KLEBANOFF *et al.*, 2001), aumento da predisposição ao câncer cervical (VIIKKI *et al.*, 2000) e de doença inflamatória pélvica (CHERPES *et al.*, 2006).

Os fármacos de escolha na terapia anti *T. vaginalis* pertencem ao grupo dos 5-nitroimidazóis (HELMS *et al.*, 2008), esses causam efeitos carcinogênicos, teratogênicos e reações adversas. Além disso, o aumento do surgimento de isolados clínicos ou laboratoriais de *T. vaginalis* resistentes a esses fármacos torna-se um agravante para o sucesso do tratamento da doença (GOLDMAN *et al.*, 2009). Diante dessa situação a investigação do uso de moléculas e produtos naturais bioativos, para fins terapêuticos vem se intensificando e pesquisas utilizando compostos isolados de plantas como fontes alternativas para terapia estão em evidência. Frasson e colaboradores (2012) avaliaram a atividade anti-*Trichomonas vaginalis* do extrato aquoso da raiz de *Polygala decumbens*, que apresentou uma redução de 50% do trofozoíto do *T. vaginalis* com Concentração Mínima Inibitória (CMI) de 1,56 mg/mL.

2.9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD, M. J.; BERMEJO P.; VILLAR, A.; PALOMINO, S. S.; CARRASO L. Antiviral activity of medicinal plant extracts. **Phytother Res.** v. 11, p.198–202, 1997.
- ABENA, A. A.; NGONDZO-KOMBETI, G. R.; BIOKA, D. Psychopharmacologic properties of *Lippia multiflora*. **Encephale**, v. 24, p.449–54, 1998.
- ABEYSINGHE, P. D. Antibacterial activity of some medicinal mangroves against antibiotic resistant pathogenic bacteria. **Indian Journal of Pharmaceutical Science**, v.72, p.167-172, 2010.
- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants know as Medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.
- AGUIAR, R. M.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Unusual naphthoquinones, catechin and triterpene from *Byrsonima microphylla*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2388-2392, 2005.
- ALAGILLE, D.; BALDWIN, R.M.; ROTH, B.L.; WROBLEWSKI, J.T.; GRAJKOWSKA, E.; TAMAGNAN, G.D. Functionalization at position 3 of the phenyl ring of the potent mGluR5 noncompetitive antagonists MPEP. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.15, p. 945–949, 2005.
- ANDRADE NETO, J.M. et al. Volatile constituents of different populations of *Pilocarpus spicatus* Saint Hill. (Rutaceae) from the Northeast of Brazil. **The Journal of Essential Oil Research**, v.14, p.319-24, 2002.
- ARESI, C. **Avaliação da Potencial Atividade Antimicrobiana de Produtos de Origem Natural: Estudo Bioguiado de *Dalbergia ecastaphyllum* L. Taub.(77 p.) 2011.** Dissertação (Mestrado em farmácia). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.
- ASANO, J.; CHIBA, K.; TADA, M.; YOSHII, T. Antiviral activity of lignans and their glycosides from *Justicia procumbens*. **Phytochemistry**, v.42, p. 713-717, 1996.
- ATOUI, A. K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chem.**, v. 89, p. 27-36, 2005.
- AW, T.Y.; WIERZICKA, G.; JONES, D.P. Oral glutathione increases tissue glutathione in vivo. **Chem. Biol. Interac**, v.80, p.89-97, 1991.
- BABA, A.; KAWAMURA, N.; MAKINO, H.; OHTA, Y.; TAKETOMI, S.; SOHDA, T. Estudos sobre fármacos anti-reumáticos modificadores de doenças: Síntese de novos derivados de quinolina e quinazolina e seu efeito anti-inflamatório. **J. Med. Chem.** v.39, 5176-5182, 1996.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; De PAULA, S. O.; MINIM, V. P.R.; BRESSAN, J.. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**, vol.23, n.4, 2010.

BENCHIMOL, M. Trichomonads under Microscopy. **Microsc.Microanal.**, v. 10, p. 528-550, 2004.

BENIGNI, R.; CAPRA, C.; CATTORINI, P.E. Jaborandi. Pianti Medicinali. **Chimica Farmacologia e Terapia**, v.2, p.781- 787, 1964.

BETONI, J. E. C.; MANTOVANI, R. P.; BARBOSA, L. N.; DI STASI, L. C.; FERNANDES JR., A. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, n.4, p.387-390, 2006.

BIRCH, A.E., FENNER, G.P.; WATKINS, R.; BOYD, L.C. Antioxidant proprieties of evening primrose seed extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p. 4502-4507, 2001.

BOHM, B. A.; GANDERS, F. R.; PLOWMAN, T. Biosystematics and evolution of cultivated coca(Erythroxylaceae). **Systematic Botany**, v. 7, p. 121-133, 1982.

BORGES, L. L.; LÚCIO, T. C.; GIL, E. de S.; BARBOSA, E. F. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. **Enciclopedia biosfera**, v. 7; p. 1-20, 2011.

BOTTEGA, A.; CANESTRINI, T.; RODRIGUES, M. A.; RAMPELOTTO, R. F.; DOS SANTOS, S. O.; SILVA, D. C.; HÖRNER, R. Abordagem das doenças sexualmente transmissíveis na adolescência: revisão de literatura. **Saúde (Santa Maria)**, Suplemento - Artigos derevisão, p. 91-104, 2016.

BRANDÃO, M. G. L.; ZANETTI, N. N. S.; OLIVEIRA, G. R. R.; GOULART, L. O.; MONTE- MOR, R. L. M. Other medicinal plants and botanical products from the first edition of the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n. 1, p. 127-34, 2008.

BRANDON, K.; FONSECA, G. A. B.; RYLANDS, A. B.; SILVA, J. M. C. Conservação brasileira: desafios e oportunidades. **Megadiversidade**; v.1, p. 7-13, 2005.

BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v.33, p. 229-239, 2010.

CACERES, A.; LÓPEZ, B.; JUÁREZ, X.. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. II Evaluation of antifungal activity of 7 American plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 40, p. 207-213, 1993.

CALDERON-MONTANO, J. M.; BURGOS-MORON, E.; PEREZ-GUERRERO, C.; LOPEZ- LAZARO, M.A.Review on the dietary flavonoid kaempferol. **Mini. Rev. Med. Chem.**v.11, p. 298–344, 2011.

CASTROGIOVANNI, P.; IMBESI, R. Oxidative stress and skeletal muscle in exercise. **Ital J AnatEmbryol**, v.117, n. 2, p.107-17, 2012.

CÁRDENAS-LÓPEZ, D.; MARÍN CORBA, C. A.; SUÁREZ SUÁREZ, L. S., [et.al.]. **Plantas útiles de Lagarto Cocha y Serranía de Churumbelo en el departamento de Putumayo**. Bogotá, D.C., Colombia: Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas, SINCHI, 40 p.2002.

CARVALHO, A. M. A.Synopsis of the genus *Dalbergia* (Fabaceae: Dalbergiae) in Brazil. **Brittonia**, v. 49, n. 1, p. 87-109, 1997.

CHANH, P. H.; KOFFI, Y.; CHANH A, P. H. Comparative hypotensive effects of compounds extracted from *Lippia multiflora* leaves. **Planta Med.**, v.54, p. 294–6, 1988.

CHARLTON, J. L. Actividade antiviral de lignanas. **J. Nat.Prod.** v. 61, p. 1447-1451, 1998.

CHERPES, T. L.; WIESENFELD, H. C.; MELAN, M. A.; KANT, J. A.; COSENTINO, L. A.; MEYN, L. A.; HILLIER, S. L. The associations between pelvic inflammatory disease, *Trichomonas vaginalis* infection, and positive Herpes simplex virus type 2 serology. **Sexually Transmitted Disease**, v. 33, p. 747-752, 2006.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v.4, p. 374, 1969.

CORREIA, A. F.; SEGOVIA, J. F. O.; GONÇALVES, M. C. A.; DE OLIVEIRA, V. L.; SILVEIRA, D.; CARVALHO, J. C. T.; KANZAKI, L. I. B. Amazonian plant crude extract screening for activity against multidrug-resistant bacteria. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v.12, p.369-380, 2008.

COSTA, S. M.; LEMOS, T.L.; PESSOA, O. D.; PESSOA, C.; MONTENEGRO, R. C.; BRAZ- FILHO, R. Chemical constituents from *Lippia sidoides* and cytotoxic activity. **J Nat. Prod.** v. 64, p.792–5, 2001.

COSTA, J.F.O. Immunomodulatory and antibacterial activities of extracts from Rutaceae species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.4, p.502-505, 2010.

COTINGUIBA, G. G.; SILVA, J. R. N.; AZEVEDO, R. R. S.; ROCHAB, T. J. M.; SANTOS, A. F. Método de Avaliação da Defesa Antioxidante: Uma Revisão de Literatura. **UNOPAR CientCiênc Biol Saúde**, v. 15, n. 3, p. 231-7, 2013.

COW, C.;LEUNG, C.;CHARLTON, J. L. Atividade antiviral de arilnaftaleno e lignanas de arildihidronaftaleno. **Lata.J. Chem.Rev. Can.Chim.**,v.78, p.553-561, 2000.

CRAGG, G. M; NEWMANN, D. J. Biodiversidade: um componente essencial na descoberta de novos fármacos In: YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de Produtos Naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 1ed. Itajaí:UNIVALLI, 2007.

Da SILVA, S. L.; FIGUEREDO, P. M. S.; YANO, T. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. leaves. **Acta Amazonica**, v. 37, n. 2, p. 281-286, 2007.

DAR, A.A.; ARUMUGAM, N. Lignans of Sesame: Purification Methods, Biological Activities and Biosynthesis – a Review. **Bioorganic Chemistry**, v.50c, p.1-10, 2013.

De LIMA, G. P.; De SOUZA, T. M.; De PAULA FREIRE, G.; FARIAS, D. F.; CUNHA, A. P.; RICARDO, N. M. Further insecticidal activities of essential oils from *Lippia*

sidoides and *Croton* species against *Aedes aegypti* L. **Parasitol Res.** v.112, p.1953–8, 2013.

Di STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. 2ed. São Paulo: ed. UNESP, 604p.2002.

DOMINGUES, K.; GONÇALVES, A.; OLIVEIRA, C.P.; PERIM, C.M.; GONÇALVES, F.B. Avaliação de extratos de quebra- pedra (*Phyllanthus* sp) frente à patógenos causadores de infecções no trato urinário. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.17, n.3, 2015.

EL-GENDY M.M.A.; HAWAS U.W.; JASPARS, M. Novel bioactive metabolites from a marine derived bacterium *Nocardia* sp. ALAA 2000. **J Antibiot.**, v. 61, p.379–386, 2008.

FABRI, R.L.; NOGUEIRA, M.S.; BRAGA, F.G.; COIMBRA, E.S.; SCIO, E. *Mitracarpus frigidus* aerial parts exhibited potent antimicrobial, antileishmanial, and antioxidant effects. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 428–433, 2009.

FABRICANT, T. S.; FARNSWORTH, N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environ. Health Perspect.**, v.109, p. 69 – 75, 2001.

FERREIRA, P. I.; GOMES, J. P.; STEDILLE, L. I.; DA COSTA, R. L.; MANTOVANI, B. A. Potencial Terapêutico de Espécies Arbóreas em Fragmentos de Floresta Ombrófila Mista. **Floresta Ambient.**, vol.23, n.1, 2016. Epub 02-Fev-2016.

FICHOROVA, R. N. Impact of *Trichomonas vaginalis* infection on innate immune responses and reproductive outcome. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 83, n. 1-2, p. 185-189, 2009.

FILGUEIRAS, T. S.; PEREIRA, B. A. S. Flora do Distrito Federal. In: PINTO, M. N. (Org.). **Cerrado: caracterização, ocupação e perspectivas**. Brasília, DF: Ed. UNB, p. 331-388, 1990.

FORESTIERI, A. M.; MONFORTE, M. T.; RAGUSA, S.; TROVATO, A. Antiinflammatory, analgesic and antipyretic activity in rodents of plant extracts used in African medicine. **Phytother Re.** v.10, p.100–6, 1996.

FRANCIS, J. K. **Wildland shrubs of the United States and its territories: thamnic descriptions.v.1** International Institute of Tropical Forestry: United States Department of Agriculture, Forest Service. 830p. 2004.

FRASSON, A. P.; CHARÃO, M. F.; ROSEMBERG, D. B.; SOUZA, A. P.; GARCIA, S. C.; BONORINO, C.; BOGO, M. R.; De CARLI, G. A.; TASCA, T. Analysis of the NTPDase and ecto- 5'-nucleotidase profiles in serum-limited *Trichomonas vaginalis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 170-177, 2012.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n.2, p.178-82, 2005.

GIANNINI, T.C.; TAKAHASI, A; MEDEIROS, M.C.P; SARAIVA, A.M.; ALVES, S.I. Análise de Componentes Principais (PCA) das variáveis climáticas da área de ocorrência de *Krameria* Loefl. (Krameriaceae). In: IX Congr. Ecologia do Brasil, São Lourenço, 2009.

GIANNINI, T. C.; TAKAHAS A. I.; MEDEIROS, M. C.M.P.; SARAIVA, A.M.; SANTOS, I.A. Ecological niche modeling and principal component analysis of *Krameria* Loefl. (Krameriaceae) **Journal of Arid Environments**, v.75, p.870-872, 2011.

GIMENES, M.; LOBÃO, C.S. A Polinização de *Krameria bahiana* B.B. Simpson (Krameriaceae) por Abelhas (Apidae) na restinga, BA. **Neotropical Entomology**, v. 35, n.4, p. 440-445, 2006.

GERTSCH, J.; TOBLER, R.T.; BRUN, R.; STICHER, O.; HEILMANN, J. Antifungal, antiprotozoal, cytotoxic and piscicidal properties of justicidin B and a new arynaphthalide lignan from *Phyllanthus piscatorum*. **Planta Med.** v. 69, p.420–424, 2003.

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural product reports**, v. 126, p 263-277, 2004.

GILBERT, E., PIROT, F., BERTHOLLE, V., ROUSSEL, L., FALSON, F., PADOIS, K. Commonly used UV filter toxicity on biological functions: review of last decade studies. *Int. J. Cosmet. Sci.* v. 35, p. 208–219, 2013.

GOLDMAN, L.M.; UPCROFT, J.A.; WORKOWSKI, K.; RAPKIN, A. Treatment of metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. **Sexual Health**, v. 6, p. 345-347, 2009.

GOMES, S. V. F.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. **Eclética Química**, v. 36, n. 1, p.64-77, 2011.

GONZAGA, W. Antibacterial alkaloids from *Zanthoxylum rhoifolium*. **Planta Medica**, v. 69, n. 4, p.371-374, 2003.

GONZALEZ-GUËRECA, M.C.; SOTO-HERNANDEZ, M.; MARTINEZ-VAZQUEZ, M. Isolation of (-)(2S)-5,6,7,3',5'-pentahydroxyflavanone-7-O-β-D-glucopyranoside, from *Lippia graveolens* H.B.K. var. *berlandieri* Schauer, a new anti-inflammatory and cytotoxic flavanone. **Nat Prod Res.**, v. 24, p.1528–36, 2010.

GOODMANN, R. P.; GHABRIAL, S. A.; FICHOROVA, R. N.; NIBERT, M.L. *Trichomonasvirus*: a new genus of protozoan viruses in the family Totiviridae. **Archives of Virology**, v. 156, p. 171-179, 2011.

GOTTLEB, O.R.; YOSHIDA, M. Lignóides com atenção especial à química das neolignan. **Química Nova**, p. 250-273, 1984.

GRIFFIN, W.J.; LIN, G.D. Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. **Phytochemistry**, v. 53, p. 623-637, 2000.

GROPPO, M.; PIRANI, J. R. Rutaceae. In: CAVALCANTI, T. B. (Org.). Flora do Distrito Federal, Brasil. Brasília, DF: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, v. 6, p. 63-86, 2007.

GUARATINI, T.; CALLEJON, D. R.; PIRES, D. C.; LOPES, J. N. C. Fotoprotetores derivados de produtos naturais: perspectivas de mercado e interações entre o setor produtivo e

centros de pesquisa. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 717-721, 2009.

HEINRICH, M. Ethnobotany and natural products: the search for new molecules new treatments of old diseases or a better understanding of indigenous cultures? **Curr. Top. Med. Chem.**, v.3, p. 29- 42, 2003.

HELMS, D. J.; MOSURE, D. J.; SECOR, W. E.; WORKOWSKI, K. A. Management of *Trichomonas vaginalis* in women with suspected metronidazole hypersensitivity. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 198, p. 370–377, 2008.

HEMMATI S.; SERADJ H. Justicidin B: A Promising Bioactive Lignan. **Molecules**, 2016.

HOLMSTED, B. Jaborandi: An interdisciplinary appraisal. **Journal of Ethnopharmacology**, v.1, p.3- 21, 1979.

HONIGBERG, B. M, BRUGEROLLE, G. Structure. In: HONIGBERG, BM (ed). **Trichomonads parasitic in humans**. Springer, Berlin Heidelberg New York, p 5–35, 1990.

ILIEVA, Y.; ZHELEZOVA, I.; ATANASOVA, T.; ZAHARIEVA, M. M.; SASHEVA, P.; IONKOVA, I.; KONSTANTINOV, S. Efeito citotóxico da justicidina derivada biotecnologicamente em células de linfoma humano. **Biotechnol. Lett.** v.36, p.2177-2183, 2014.

JAIN, S. K. & JAIN, N. K.; Multiparticulate carriers for sun-screening agents. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 32, p. 89-98, 2010.

JIN, H.; YIN, H. L.; LIU, S. J.; CHEN, L.; TIAN, Y.; LI, B; WANG, Q.; DONG, J. X. Actividade citotóxica dos lignanos de *Justicia procumbens*. **Fitoterapia**, v. 94, p.70-76, 2014.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. **Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 612p. 2009.

JULLIAN, V. Validation of use of a traditional antimalarial remedy from French Guiana, *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 3, p. 348-352, 2006.

KAUR, G.J.; ARORA, D.S. Antibacterial and phytochemical screening of *Anethum graveolens*, *Foeniculum vulgare* and *Trachyspermum ammi*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 9:30, 2009.

KLEBANOFF, M. A.; CAREY, J. C.; HAUTH, J. C.; HILLIER, S. L.; NUGENT, R. P.; THOM E. A.; ERNEST, J. M.; HEINE, R. P.; WAPNER, R. J.; TROUT, W.; MOAWAD, A.; LEVENO, K. J.; MIODOVNIK, M.; SIBAI, B. M.; VAN DORSTEN, J. P.; DOMBROWSKI, M. P.; O'SULLIVAN, M. J.; VARNER, M.; LANGER, O.; McNELLIS, D.; ROBERTS, J. M. National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units. Failure of metronidazole to prevent preterm delivery among pregnant women with asymptomatic *Trichomonas vaginalis* infection. **N Engl J Med.** v. 345, n. 7, p. 487-93,

2001.

KOMURAI AH, A. Antibacterial studies and phytochemical constituents of South Indian *Phyllanthus* species. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 19, p. 4991-4995, 2009.

KULLAVANIJAYA, P.; LIM, H. W. Photoprotection. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 52, p. 937-958. 2005.

LAI, H.Y.; LIM, Y. Y.; KIM, K.H. *Blechnum orientale* Linn - a fern with potential as antioxidant, anticancer and antibacterial agent. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 10:15, 2010.

LEE, K. Discovery and Development of Natural Product-Derived Chemotherapeutic Agents Based on a Medicinal Chemistry Approach. **Journal of Natural Products**, v.73, p.500-516, 2010.

LEE, K.H.; XIAO, Z. Lignans no tratamento de câncer e outras doenças. **Phytochem.Rev.**, v. 2, p. 341-362, 2003

LEMOS, T. L.; MATOS, F. J.; ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A. Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plants. **Phytother Res.**, v.4, p.:82-4, 1990.

LEONTI, M; STAFFORD, G. I.; DAL CERO, M; CABRAS, S; CASTELLANOS, M.E.; CASU, L; WECKERLE, C.S. Reverse Ethnopharmacology and Drug Discovery. **Journal of Ethnopharmacology**, v.198, p.417-431, 2017.

LIMA, E. O. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.; B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. 1 ed. Chapecó: Argos, p.482-501, 2001.

LINS-NETO, J.R.; UCHÔA, A.D. A.; MOURA, P.A.; BEZERRA-FILHO, C.M.; TENÓRIO, J.C.G.; SILVA, A.G.; XIMENES, R.M.; SILVA, M.V.; CORREIA, M.T.S. Phytochemical screening, total phenolic content and antioxidant activity of some plants from Brazilian flora. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 10, p.409-416, 2016.

LOIOLA, M. I. B.; AGRA, M. F.; BARACHO, G. S.; QUEIROZ, R. T. Flora da Paraíba, Brasil: Erythroxylaceae Kunth. **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, n.2, p. 473-487, 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. 2002. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Ed. Nova Odessa, São Paulo. Instituto Plantarum, 512 p. 2012.

LUO, J.; HU, Y.; KONG, W.; YANG, M. Evaluation and structure-activity relationship analysis of a new series of aryl naphthalene lignans as potential anti-tumor agents. **PLoS ONE** 2014, 9.

MACRAE, W. D.; HUDSON, J. B.; TOWERS, G. H. N. A ação antiviral de lignanas. **Planta Med.**, v.55, p. 531-535, 1989.

MADEIRO, S. A. L. **Novas neolignanas de *Krameria tomentosa* A. St.-Hill. (Krameriaceae).** (143 p.) 2012. Dissertação (Mestrado em produtos naturais e sintéticos

bioativos). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.

MAFEZOLI, J. In vitro activity of Rutaceae species against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.73, p. 335–340, 2000.

MAIER, T.; KORLING, H.C. Sunscreens – which and for. **Skin Pharmacol Physiol**, v. 18, p. 253- 62, 2005.

MANSUR, M. C. P. P. R.; LEITÃO, S. G.; CERQUEIRA-COUTINHO, C.; VERMELHO, A. B.; SILVA, R. S.; PRESGRAVE, O. A. F.; Leitão, A. A. C.; LEITÃO, G. G.; RICCI-JÚNIOR, E.; SANTOS, E. P. In vitro and in vivo evaluation of efficacy and safety of photoprotective formulations containing antioxidant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.26, p. 251–258, 2016.

MATOS, F. J. A.; OLIVEIRA, F. *Lippia sidoides* Cham. Pharmacognosy, chemistry and pharmacology. **Rev Bras Farmacogn.**, v. 79, p.84–7, 1998.

MAW, KL.; CATON-WILLIAMS, J.; SALON, J.; HUANG, Z. Simple ultraviolet and high-performance liquid chromatography for the evaluation of sunscreen efficacy. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 65, n. 2, p.328-335, 2011.

MIMICA MATANOVIC, S.; BERGMAN, U.; VUKOVIC, D.; WETTERMARK, B. VLAHOVIC-PALCEVSKI, V. Impact of restricted amoxicillin/clavulanic acid use on *Escherichia coli* resistance—antibiotic DU90% profiles with bacterial resistance rates: a visual presentation. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, p. 369-373, 2010.

MOMEKOV, G.; KONSTANTINOV, S.; DINEVA, I.; IONKOVA, I. Efeito da justicidina B-A potente citotóxica e pro-apoptótica arilnaftaleno lignano em linhas celulares derivadas do câncer de mama humano. **Neoplasma**, v. 58, p. 320-325, 2011.

MOMEKOV, G.; YOSSIFOV, D.; GUENOVA, M.; MICHOVA, A.; STOYANOV, N.; KONSTANTINOV, S.; IONKOV, T.; SACHEVA, P.; IONKOVA, I. Mecanismos apoptóticos do arilnaftaleno lignano produzido por biotecnologia justicidina B na linhagem celular HL-60 derivada de leucemia mieloide aguda. **Pharmacol.Rep.**, v.66, p. 1073-1076, 2014.

NEVES, K.; Espectro Solar, Sol e origem da radiação eletromagnética. Tecnopress – Edição Temática: **Proteção Solar**, n.7, Ano 3, p.10-13, 2008.

NICOLINI, P.; NASCIMENTO, J. W. L.; GRECO, K. V.; MENEZES, F. G. Fatores relacionados à prescrição médica de antibióticos em farmácia pública da região Oeste da cidade de São Paulo. **Ciênc. saúde coletiva**, v. 13, p. 689-696, 2013.

NIKI, E. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. **Free Radic Biol Med.**, v. 49, p.503-515, 2010.

NOVAES, G. M.; SILVA, M. J. D.; ACHKAR, M. T.; VILEGAS, W. Compostos antioxidantes e sua importância nos organismos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 11, n. 2, p. 535- 539, 2013.

OHTA, K.;CHEN, Y. L.;MARUMO, S.;MUNAKATA, K. Estudos sobre componentes piscicidas de *Justicia hayataivar.decumbens*.Parte I. Isolamento e actividades piscicidas de justicidina A e B.**Agric.Biol.Chem.**,v. 33,p.610-614, 1969.

OKWUTE, S.K.; ONYIA, R.; ANENE, C.; AMODU, O.P. Protectant, insecticidal and antimicrobial potentials of *Dalbergia saxatilis* Hook f. (fabaceae). **African Journal of Biotechnology**, v.8, n.23, p.6556-6560, 2009.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; MACHADO, J. N. M. Composição florística de uma floresta semidecídua montana, na serra de São José, Tiradentes, Minas Gerais. **Acta Botanica Brasília**, v. 7, n. 2, p. 71- 88. 1993.

OLIVEIRA-JÚNIOR, R.G.;ARAÚJO, C.S.;SANTANA, C.R.R.;SOUZA, G.R.;LIMA-SARAIVA, S.R.G.;GUIMARÃES, A. L.;OLIVEIRA, A.P.;SIQUEIRA-FILHO, J.A.;PACHECO, A.G.M.;ALMEIDA, J.R.G.S. Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activity of extracts from the flowers of *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae). **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 4, p.4489-4494, 2012.

OLIVEIRA Y.L.C.; SILVA, L.C.N.; ARAÚJO, J.M.; CORREIA, M.T.S.; SILVA, M.V. **Natural Product Research** (Print). 2012.

PACHÚ, C. O.**Processamento de plantas medicinais para obtenção de extratos secos e líquidos.UFCG (117p.) 2007**. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos). Universidade Federal de Campina de Grande, Campina Grande, 2007.

PASCUAL, M.E. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharrmacology: a review. **Journal of ethnopharmacology**, v. 76, n. 3, p. 201-214, 2001.

PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ MATA, D.; VILLAR, A. *Lippia*: Traditional uses, chemistry and pharmacology: A review.**J Ethnopharmacol.**, v. 76, p. 201–14, 2001.

PAVÃO F. Structure of *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase complexed with chalepin, a natural product inhibitor, at 1.95 Angstrom resolution. **Febs Letters**, v.520, p.13-7, 2002.

PENELUC, T.; DOMINGUES, L. F.; ALMEIDA, G. N. de; AYRES, M. C. C.; MOREIRA, E. L.T.; CRUZ, A. C. F. da; BITTENCOURT, T. C. B. do S. C. de; ALMEIDA, M. A. O. de; BATATINHA, M. J. M. Atividade anti-helmíntica do extrato aquoso das folhas de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, supl. 1, p. 43-48, 2009.

PEREIRA, S. S.; LOPES, L. S.; MARQUES, R. B.; FIGUEIREDO, K. A.; COSTA, D. A.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. Antinociceptive effect of *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae) in models of acute pain in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, n. 2, p. 227-231, 2010

PERES-BOTA, D.; RODRIGUEZ, H.; DIMOPOULOS, G.- Are infections due to resistant pathogens associated with a worse outcome in critically ill patients? **J Infect**, v. 47, p. 307-316, 2003.

PERUMAL SAMY, R.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Therapeutic Potential of Plants as Anti- microbials for Drug Discovery. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.7, n.3, p. 283-294, 2010.

PETRIN, D., DELGATY, K., BHATT, K., GARBER, G. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. **Clin.Microbiol.**, v. 11, p. 300-317, 1998.

PETTIT, G.R.; SCHAUFELBERGER, D.E. Isolation and structure of the cytostatic lignan glycoside phyllanthostatin. **A.J. Nat. Prod.**, v. 51, p. 1104–1112, 1988.

PETTIT, G.R.; CRAGG, G.M.; SUFFNESS, M.I.; GUST, D.; BOETTNER, F.E.; WILLIAMS, M.; SAENZ-RENAULD, J.A.; BROWN, P.; SCHMIDT, J.M.; ELLIS, P.D. Antineoplastic agents. 104. Isolation and structure of the *Phyllanthus acuminatus* vahl (Euphorbiaceae) glycosides. **J. Org.Chem.**, v. 49, p. 4258–4266, 1984.

PIRANI, J. R. Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Rutaceae. **Rodriguésia**, v. 56, n. 86, p.189-204, 2005.

PITTET, D - Infection control and quality health care in the new millennium. **AmJ Infect Control**, v. 33, p. 258-267, 2005.

PLOWMAN, T. C.; HENSOLD, N. Names, types and distribution of neotropical species of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae). **Brittonia**, v. 56, n.1, p. 1-53, 2004.

POZHIDAEV, A.E. Hypothetical way of pollen paerture patterning. 3. A family-based study of Krameriaceae. **Review of Palaeobotany and Palynology**, v. 127, p. 1-23, 2002.

RAO, Y. K.; GEETHANGILI, M.; FANG, S. H.; TZENG, Y. M. Atividades antioxidantes e citotóxicas de compostos fenólicos e compostos relacionados que ocorrem naturalmente: Um estudo comparativo. **Food Chem.Toxicol.**, v. 45, p. 1770-1776, 2007.

ROBIN, A.L. Ocular hypotensive efficacy and safety of a combined formulation of betaloxol and pilocarpine. **Trans Am Ophthalmol Soc**, v.94, p.89-101, 1996

SALEEM, M.; NAZIR, M.; ALI, M.S.; HUSSAIN, H.; LEE, Y.S.; RIAZ, N.; JABBAR, A. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. **Natural Product Reports**, v. 27, p. 238-254, 2010.

SALGADO, M. A. S. Crescimento inicial de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. em diferentes condições de sombreamento. **Boletim do Herbário Ezechias Paulo Heringer**, v. 3, p. 37-45, 1998.

SANTOS, H. S.; COSTA, S. M.; PESSOA, O. D.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; FORTIER, S. Cytotoxic naphthoquinones from roots of *Lippia microphylla*. **Z Naturforsch C**. v. 58, p. 517–20, 2003.

SANTOS, H.S.; SILVEIRA, E. R.; COSTA, S. M.; LEMOS, T. L.; PESSOA, O. D.; UCHOA, D. E. 1H AND 13C NMR application to structure elucidations of prenylated naphthoquinone dimers from *Lippia microphylla*. **An Ressonância Magn Nucl.**, v.1, p. 32–6, 2002.

SANTOS, A.P.; MORENO, P.R.H. *Pilocarpus* spp.: A survey of its chemical constituents and biological activities. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, p.115-137, 2004.

SANNOMIYA, M.; FONSECA, V.B.; SILVA, M.A. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 1-6, 2005.

SAWAYA, A.C.H.F. Screening species of *Pilocarpus* (Rutaceae) as sources of pilocarpine and other imidazole alkaloids. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 58, p.471–480, 2011.

SCOTTI, L.; VELASCO, M. V. R. **Envelhecimento cutâneo à luz da cosmetologia: estudo das alterações na pele no decorrer do tempo e da eficácia das substâncias ativas empregadas na prevenção**. São Paulo: Tecnopress, 2003.

SCHALKA, S.; DOS REIS, V. M. S. Fator de proteção solar: significado e controvérsias*. **An. Bras.Dermatol.** v.86, n. 3, p. 507-515, 2011.

SILVA, B.B.; ROSALEN, P.L.; CURY, J.A.; IKEGAKI, M.; SOUZA, V.; ESTEVES, A.; ALENCAR, S.M. Chemical Composition and Botanical Origin of Red Propolis, a New Type of Brazilian Propolis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v.5, n.3, p.313- 316, 2008.

SECOR, W. E. Neglected parasitic infections in the United States: trichomoniasis. **Am J Trop MedHyg**, v. 90, n. 5, p. 800-4, May 2014.

SILVA, S. A. S.; CASTRO, J. C. M.; SILVA, T. G.; CUNHA, E.V.L.; BARBOSA, J.M.F.; SILVA, M.S. Kramentosan, a new trinorlignan from the roots of *Krameria tomentosa*. **Natural Product Letters**, v. 15, n.5, p. 323-329, 2001.

SILVA, M.J.; SALES, M.F. O gênero *Phyllanthus* L. (Phyllanthaceae - Euphorbiaceae Juss.) no biomacaatinga do estado de Pernambuco. **Rodriguésia**, v. 55, n. 84, p. 105-130, 2004.

SILVA, M.J.; SALES, M.F. *Phyllanthus* L. (Phyllanthaceae) em Pernambuco, Brasil. **Acta Bot.Bras.**, v. 21, n.1, p.79-98, 2007.

SILVA, S. L. da; FIGUEIREDO, P. M.; YANO, T. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. leaves. **Acta Amazonica**, v. 37, n. 2, p. 281-286, 2007.

SILVA, V.A. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana do extrato da *Lippia sidoides* Cham. sobre isolados biológicos de *Staphylococcus aureus*. **Rev. bras. plantas med.** v.12, n.4, p. 452-455, 2010.

SILVA, F. H. M.; SANTOS, F.A.R. Pollen morphology of the shrub and arboreal flora of mangroves of Northeastern Brazil. **Wetlands Ecology and Management**, v. 17, p. 423-443, 2009.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Orgs). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS: Florianópolis: Editora da UFSC, 1104p. 2010.

SIMÕES, E.R.; SANTOS, E. A.; de ABREU, M. C.; SILVA, J. do N, NUNES, N. M.; da

COSTA, M. P.; PESSOA, O. D.; PESSOA, C.; FERREIRA, P. M.J. Biomedical properties and potentiality of *Lippia microphylla* Cham. and its essential oils. **Intercult Ethnopharmacol.**, v.4, n.3, p.256-63, Review. 2015

SIMPSON, B.B. Krameriaceae. Flora Neotropica Monograph. New York: **New York Botanical Garden**, v.49, p. 2-88, 1989.

SIMPSON, B. B. Krameriaceae. **Flora Neotropica. Monograph**, v. 49, p.1 – 109, 1989.

SIMPSON, B.B. The past and present uses of Rhatany (*Krameria*, Krameriaceae). **Economic Botany**, v. 43, n. 3, p. 397-409, 1991.

SIMPSON, B. B.; WEEKS, A.; HELFGOTT, D. M.; LARKIN, L. L. Species relationships in *Krameria* (Kameriaceae) based on ITS sequences and morphology: implications for character utility and biogeography. **Systematic Botany**, v. 29, p. 97 – 108, 2004.

SKORUPA, L.; A. **Revisão taxonômica de *Pilocarpus Vahl* (Rutaceae). (426p) 1996.** Tese (Doutorado – Área de concentração – Botânica) - Instituto de Biologia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 1996.

SOUSA, E. O.; SILVA, N. F.; RODRIGUES, F. F. G.; CAMPOS, A. R.; LIMA, S. G.; COSTA, J. G. M. Chemical composition and resistance modifying effect of *Lantana camara* Lin. **Pharmacognosy magazine**, v. 6, p.79-82, 2010.

SOUZA, P. Z. **Dinâmica espaço-temporal de *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. em restinga nosul do Brasil. (118 p) 2010.** Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Pós-Graduação em Ecologia, Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

SUN, L.; ZHANG, J.; LU, X.; ZKANG, L. Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p.2689–2696, 2011.

ROLIM, T. L.; WANDERLEY, F. T. de S.; Da CUNHA; E. V. L.; TAVARES, J. F.; De OLIVEIRA, A. M. F.; De ASSIS, T. S. Constituintes químicos e atividade antioxidante de *Byrsonima gardneriana* (Malpighiaceae). **Quím. Nova**, v.36, n.4, p.524-527, 2013.

TANIGUCHI, T.; KITAZAWA, Y. A risk-benefit assessment of drugs in the management of glaucoma. **Drug saf.**, v.11, n.1, p.68-74, 1994.

TORRES, D.S.C.; CORDEIRO, I.; GIULIETTI, A.M. O gênero *Phyllanthus* L. (Euphorbiaceae) na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 17, n. 2, p. 265-278, 2003.

TULP, M., BOHLIN, L. Unconventional natural sources for future drug discovery. **Drug Discov. Today**, v. 9, p.450-458, 2004.

UENG, Y. F.; CHEN, C. C.; CHEN, C. F. Inibição da hidroxilação de benzo (a) pireno por lignanas isoladas de *Justicia procumbens*. **J. Food Drug Anal.**, v. 8, p. 309-314, 2000.

VALENTIN, A.; PÉLISSIER, Y.; BENOIT, F.; MARION, C.; KONE, D.; MALLIE, M.; et al. Composition and antimalarial activity in vitro of volatile components of *Lippiamultiflora*. **Phytochemistry**, v.40, p.:1439–42, 1995.

VASUDEVA, N.; MANISHA, V.; SHARMA, S.K.; SARDANA, S. Chemistry and biological activities of the genus *Dalbergia*. **Pharmacognosy Reviews**, v. 3, p.307-319, 2009.

VERAS, H. N.; RODRIGUES, F.F.; COLARES, A. V.; MENEZES, I. R.; COUTINHO, H. D.; BOTELHO, M. A.; et al. Synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil of *Lippia sidoides* and thymol. **Fitoterapia**, v. 83, p.508–12, 2012.

VERPOORTE, R.; COLLIN, A.; MEMELINK, J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. **Biochem.Rev.**, v.1, p.13-25, 2002.

VIIKKI, M.; PUKKALA, E.; NIEMINEN, P.; HAKAMA, M. Gynaecological infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia. **Acta Oncologica**, v. 39, p. 71-75, 2000.

WANG, S. Q.; OSTERWALDER, U.; JUNG, K. Ex vivo evaluation of radical sun protection factor in popular sunscreens with antioxidants. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.25, n.6, p.525-530, 2011.

WEBSTER, G.L. 1956a. A monographic study of the West Indian species of the *Phyllanthus* L. **Journal of the Arnold Arboretum** 37: 91-122.

WEBSTER, G.L. 1956b. A monographic study of the West Indian species of the *Phyllanthus* L. **Journal of the Arnold Arboretum** 37: 341-357.

WEBSTER, G.L. Three new sections and a new subgenus of *Phyllanthus* (Euphorbiaceae). **Novon**, v. 12, p. 290-298, 2002.

WEBSTER, G.L. A synopsis of the Brazilian taxa of *Phyllanthus* section *Phyllanthus* (Euphorbiaceae). **Lundelia**, v.5, p. 1-26, 2002.

WINDAYANI, N.; RUKAYADI, Y.; HAKIM, E. H.; RUSLAN, K.; SYAH, Y. M. Antifungal activity of lignans isolated from *Phyllanthus myrtifolius* Moon. against *Fusarium oxysporum*. **Phytochemistry**, v. 12, p. 33–39, 2014.

YOUNG, A.J.; LOWE, G.M. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.385, p. 20-17, 2001.

ZADOK, D. Combined timolol and pilocarpine vs pilocarpine alone and timolol alone in the treatment of glaucoma. **Am J Ophthalmol**, v.117, n.6, p.728-731, 1994.

ZORATI G. C.; MELLO, S. A. Incidência da Tricomoníase em Mulheres atendidas pelo sistema único de saúde em Cascavel e no Oeste do Paraná. **Arquivo de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 13, n. 2, p.133-138, 2009.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O.; GUERRA, M. P. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. rev. ampl. Florianópolis: Ed. da UFSC; Porto Alegre: Ed. da UFRGS, p. 577-614, 2004.

3 RESULTADOS

3.1 PHYTOCHEMICAL PROFILE, EVALUATION OF THE CYTOTOXIC AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ETHANOLIC EXTRACTS OF MEDICINAL PLANTS

Artigo a ser submetido na revista *African Journal of Microbiology Research*
(Apêndice)

Phytochemical profile, evaluation of the cytotoxic and antibacterial activity of ethanolic extracts of medicinal plants.

Francinete Carla Nunes Cavalcanti Viana¹; Clovis Macêdo Bezerra Filho¹; Joelma Pessoa¹;
Fernanda Pacífico de Almeida Neves¹; Tiago Fonseca Silva¹; Deizi Caroline da Silva
Barbosa¹; Rafael Matos Ximenes²; Josean Fechine Tavares³; Maria Tereza dos Santos Correia¹;
Márcia Vanusa da Silva¹.

¹Biochemistry Department, Biosciences Center, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil. ² Department of Antibiotics, Biosciences Center, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil. ³ Pharmaceutical Sciences Department, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, Castelo Branco, 58051-970, João Pessoa, Paraíba, Brazil.

Perfil fitoquímico, avaliação da atividade citotóxica e antibacteriana de extratos etanólicos de plantas medicinais.

RESUMO

Produtos naturais isolados ou em associação com os medicamentos originais têm sido testados para um controle mais eficaz para microrganismos, almejando potencialização na ação dos mesmos e minimização dos efeitos indesejáveis. Diante do potencial biotecnológico de plantas medicinais, o estudo da ação antimicrobiana de seus metabólitos representa um passo fundamental para o uso desses produtos. Deste modo, o presente trabalho visou conhecer o perfil fitoquímico e a avaliação da atividade citotóxica e antibacteriana de plantas medicinais frente a bactérias multiresistentes. Extratos etanólicos foram preparados das partes aéreas de *Dalbergia ecastaphyllum*, *Byrsonima gardineriana*, *Erythroxylum revolutum*, *Zanthoxylum rhaifolium*, *Pilocarpus spicatus*, *Lippia microphylla*, *Phyllanthus acuminatus* e *Krameria tomentosa*. A abordagem fitoquímica dos extratos por cromatografia em camada delgada (CCD) revelou a presença de flavonóides, triterpenos, esteróides, derivados cinâmicos, saponinas, monoterpenos e sesquiterpenos, proantocianidinas, Curaminas enquanto nenhum extrato apresentou quinonas. Na análise da atividade antibacteriana dos extratos, verificou-se que estes apresentaram atividade inibitória para as bactérias estudadas, variando a Concentração Mínima Inibitória entre 390 a 6250 µg/ml. Todos os extratos testados apresentaram um potencial bactericida com a relação CMB/CMI com valores entre 1 e 4, com exceção do extrato de *K. tomentosa* para *E. coli* que apresentou potencial bacteriostático. Dentre os extratos em estudo dois foram selecionados para o estudo de Checkerboard, *B. gardineriana* contra *S. aureus* (CMI 390 µg/ml) e *P. aeruginosa* (CMI 3130 µg/ml), bem como, *K. tomentosa* contra *S. aureus* (CMI 390 µg/ml) e *E. coli* (CMI 6250 µg/ml). Na avaliação da citotoxicidade dos extratos sobre eritrócitos humanos do tipo O, observou-se que os extratos não apresentam citotoxicidade. Dessa forma, diante dos resultados obtidos, conclui-se que os extratos analisados possuem potencial bioativo, sendo promissores e servido de base para estudos visando à obtenção de novos antimicrobianos.

Palavra-chave: Perfil fitoquímico; Atividade antibacteriana; Atividade citotóxica e Plantas medicinais.

ABSTRACT

Natural products isolated or in association with the original medicines, have been tested for a more effective control for microorganisms aiming potentiation in their action and minimization of undesirable effects. Faced with the biotechnological potential of medicinal plants, the study of the antimicrobial action of its metabolites represents a fundamental step towards the use of these products. Thus, the present work aimed to know the phytochemical profile and the evaluation of the cytotoxic and antibacterial activity of medicinal plants against multiresistant bacteria. Ethanolic extracts were prepared from the aerial parts of *Dalbergia ecastaphyllum*, *Byrsonima gardineriana*, *Erythroxylum revolutum*, *Zanthoxylum rhaifolium*, *Pilocarpus spicatus*, *Lippia microphylla*, *Phyllanthus acuminatus*, *Krameria tomentosa*. The phytochemical approach of extracts by thin layer chromatography (TLC) revealed the presence of

Flavonoids, Triterpenes, Steroids, Cinnamic Derivatives, Saponins, Monoterpenes and Sesquiterpenes, Proanthocyanidins, Curaminas and no extract presented quinones. In the analysis of the antibacterial activity of the extracts, it was verified that these showed inhibitory activity for the studied bacteria, varying the Minimal Inhibitory Concentration between 390 and 6250 $\mu\text{g} / \text{ml}$. All extracts tested showed a bactericidal potential with the MBC / MIC ratio between 1 and 4, except for the extract of *K. tomentosa* for *E. coli* that presented bacteriostatic potential. Among the extracts studied, two were selected for the study of Checkerboard, *Byrsonima gardineriana* against *Staphylococcus aureus* (MIC 390 $\mu\text{g} / \text{ml}$) and *Pseudomonas aeruginosa* (MIC 3130 $\mu\text{g} / \text{ml}$), as well as *Krameria tomentosa* against *Staphylococcus aureus* (MIC 390 $\mu\text{g} / \text{mL}$) and *Escherichia coli* (MIC 6250 $\mu\text{g} / \text{ml}$). In evaluation of extracts cytotoxicity on human type O erythrocytes, it was observed that the extracts does not present cytotoxicity. Thus, in view of the obtained results, it is concluded that the extracts analyzed have bioactive potential, being promising and served as the basis for studies aiming at obtaining new antimicrobials.

Keywords: Phytochemical profile; Antibacterial activity; Cytotoxic activity and medicinal plants.

INTRODUÇÃO

As plantas produzem, além dos metabólitos primários, uma grande variedade de metabólitos secundários, estes, embora não sendo essencial ao organismo produtor, têm um importante papel na sobrevivência da planta em seu ecossistema. As vias metabólicas secundárias vegetais dão origem a diversas classes de compostos, tais como, alcalóides, terpenóides, antocianinas, esteróides, flavonóides, quinonas, cumarinas que, por vezes, estão presentes em aplicações comerciais como: fármacos, corantes, aromas e inseticidas. (Kaur *et al.*, 2009; Fabri *et al.*, 2009; Lai *et al.*, 2010).

Desde a introdução do mais antigo agente antimicrobiano até o mais recente, vem se registrando uma pressão seletiva dos microrganismos causada, principalmente, pelo uso indiscriminado de antibióticos e quimioterápicos, resultando no desenvolvimento de espécies resistentes e aumentando significativamente o risco de infecção. (Peres-Bota, 2003; Pittet D, 2005). A resistência a um determinado fármaco está diretamente associada à sua má utilização, pois mais de 60% destes medicamentos são prescritos de forma irracional e indiscriminada (Novaretti *et al.*, 2014). Diante desta situação, as infecções hospitalares são reconhecidamente uma das principais causas de morbidade, mortalidade e aumento nos custos hospitalares, principalmente em países em desenvolvimento. Desta forma a resistência a agentes antibacterianos tem se tornado um importante problema de saúde pública, visto que, dos dois milhões de pessoas que contraem alguma doença de origem bacteriana nos hospitais do Brasil a cada ano, cerca de 70% dos casos envolvem cepas bacterianas que são resistentes a pelo menos uma droga (Oliveira & Silva, 2008; Dias & Monteiro, 2010). Na tentativa de um controle mais eficaz para os microrganismos, algumas medidas vêm sendo tomadas, como a redução do uso de antibióticos. Arelada a isso, pesquisadores têm testado produtos naturais isolados e em associação com os medicamentos originais (Sousa *et al.*, 2010), almejando uma potencialização na ação dos mesmos e minimização dos efeitos indesejáveis (Gibbons, 2004; Gurib-Fakim, 2006). Estudos antimicrobianos mostraram que extratos de plantas têm efeitos bactericidas e que podem ser uma solução para os problemas causados pelo aumento da resistência bacteriana aos antibióticos (Malik *et al.*, 2015; Ganie & Yadav, 2015; Yazan *et al.*, 2016). A utilização de plantas na medicina popular é uma das mais antigas formas de prática medicinal na humanidade. O conhecimento das propriedades curativas destas plantas foi adquirido de forma totalmente empírica, e transmitida através do tempo. Nos últimos anos, o conhecimento sobre o potencial terapêutico de plantas com atividade antimicrobiana tem despertado o interesse científico, buscando novos caminhos para o controle e tratamento de diversas doenças (Garcia & Orlanda, 2014). As plantas medicinais fornecem substâncias químicas que são utilizadas como modelos para modificações estruturais e otimização das propriedades farmacológicas e bioquímicas, servindo como inspiração de químicos orgânicos, estimulando-os para enfrentar desafios na construção sintética de novas estruturas moleculares (BRAZ-FILHO, 2010). Os produtos naturais, incluindo os metabólitos de plantas, são conhecidos por sua importância no desenvolvimento de remédios (Leonti *et al.*, 2017).

Diante do potencial biotecnológico que as plantas medicinais possuem pesquisas direcionadas a investigar a ação dos compostos químicos, bem como, avaliar o potencial bioativo dessas plantas em estudo torna-se oportuno, de forma que os resultados possam contribuir para o aumento da qualidade de novos fármacos, como também trazer conhecimento, do ponto de vista científico. Destemodo, o presente trabalho visou conhecer o perfil fitoquímico, a atividade citotóxica e antibacteriana de extratos etanólicos de plantas medicinais.

MATERIAL E MÉTODO

Material vegetal

As partes aéreas das espécies *Dalbergia ecastaphyllum*, *Byrsonima gardneriana*, *Erythroxylum revolutum*, *Zanthoxylum rhoifolium*, *Pilocarpus spicatus*, *Lippia microphylla*, *Phyllanthus acuminatus* e

Krameria tomentosa foram coletadas em diferentes locais, no estado da Paraíba- Brasil, como citado na Tabela 1. Uma excisata de cada material foi preparada e depositada em Herbário. O material botânico fresco foi desidratado em estufa com ar circulante, durante 72 horas, em temperatura média à 40°C, sendo, em seguida, triturado em moinho mecânico.

Preparo do Extrato:

Para obtenção do extrato etanólico bruto (EEB), o pó de cada planta foi macerado em etanol (EtOH) a 95% por 72 horas, sendo tal processo repetido exaustivamente. Em seguida, a solução extrativa foi filtrada e concentrada em evaporador rotativo sob pressão reduzida a 40°C.

Microrganismos

Foram utilizados microrganismos padrões, pertencentes à coleção de culturas do Departamento de Antibióticos da UFPE (UFPEDA), *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 02), *Escherichia coli* (UFPEDA 224), *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 416).

Perfil fitoquímico

Para análise fitoquímica, os oito extratos foram suspensos em metanol para obter uma concentração final de 10 mg/mL. Aliquotas de 5 µl de cada extrato foram submetidas à cromatografia em camada delgada (CCD). Os testes consistiram em reações químicas qualitativas simples, que demonstraram a presença de compostos como: taninos, flavonóides, esteróides, saponinas e alcalóides. Utilizaram-se placas de poliamida (11 F254-merck), para análise dos metabólitos secundários, empregando diferentes fases móveis e reveladores específicos (Tabela 2). (Brasseur & Angenot, 1986; Harborne JB, 1998; Roberts EAH, 1957; Wagner H, 1996).

Tabela1: Espécies, local e época de coleta do material botânico.

Espécie	Local	Mês/Ano	Número excisata
<i>D. ecastaphyllum</i>	Rio Tinto-PB	Setembro/2010	45738 ^a
<i>B. gardneriana</i>	Serra Branca-PB	Março/2007	AGRA 947 ^b
<i>E. revolutum</i>	Serra Branca-PB	Junho/2010	AGRA 5695 ^b
<i>K. tomentosa</i>	Santa Rita- PB	Junho/2010	AGRA 3271 ^b
<i>P. spicatus</i>	Maturéia-PB	Junho/2011	AGRA 7428 ^b
<i>L. microphylla</i>	Serra Branca-PB	Junho/2010	AGRA 6118 ^b
<i>P. acuminatus</i>	Maturéia-PB	Março/2012	AGRA 7432 ^b
<i>Z. rhaifolium</i>	Maturéia-PB	Junho/2011	AGRA 5184 ^b

^a Herbário do Departamento de Sistemática e Ecologia (DSE)-UFPE;

^b Herbário Professor Lauro Pires Xavier da UFPB.

Tabela 2- Padrões, sistemas de eluição e reveladores utilizados para Cromatografia em Camada Delgada.

Metab. secundário	Padrões	Sistema de eluição	Revelador	Referências
Flavonoides, derivados cinâmicos	Quercetina, rutina e AC. clorogênico	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27 v/v)	NEU	Wagner & Bladt, 1996 Brasseur & Angenot, 1986
Triterpenos e esteroides	β-sitosterol	Tolueno:AcOEt (90:10 v/v)	Lieberman & Burchard	Harborne, 1998
Saponinas	-	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27 v/v)	Lieberman & Burchard	Harborne, 1998
Mono e sesquiterpenos cumarinas e Quinonas Alcalóides	Timol Cumarina e Lapachol Pilocarpina	Tolueno:AcOEt (97:3 v/v) CHCl ₃ -MeOH (98:2 v/v) AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27 v/v)	Anisaldeído sulfúrico KOH Dragendorf	Harborne, 1998 Wagner & Bladt, 1996 Wagner & Bladt, 1996
Proantocianidias condensadas	Catequina	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27 v/v)	Vanilina clorídica	Roberts et al. 1957

Atividade Antibacteriana

A atividade antibacteriana dos extratos foi avaliada por meio da determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e da Concentração Mínima Bactericida (CMB), de acordo com Oliveira *et al.*, (2012).

Os extratos foram diluídos em Dimetilsulfóxido (DMSO) 10% em meio de cultura Mueller-Hinton Broth. Na microplaca de 96 poços estéril foram realizadas diluições seriadas dos extratos em quadruplicatas, variando a concentração de 50.000 µg/ml a 195 µg/ml. Em seguida foram inoculados 10 µl da suspensão bacteriana ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) em cada poço. Foi utilizado como controle negativo (meio), controle do solvente (meio, DMSO e suspensão bacteriana) e controle positivo (meio e suspensão bacteriana).

Após 24h de incubação a 37°C uma solução de resazurina (0,01%) foi usada como indicador. Qualquer alteração de mudança de cor de púrpura a rosa foi registrada com o crescimento bacteriano. A menor concentração, em que não há nenhuma mudança de cor, foi tomada como CMI. As culturas foram semeadas em meio MHA (Mueller-Hinton Ágar) e incubadas por 24h a 37°C para determinar a CMB, a qual corresponde à concentração mínima de extrato que causa a eliminação do microrganismo (NCCLS, 2009).

Curva de Morte

Culturas de *S. aureus* e *P. aeruginosa* foram diluídas a 1:100 em MHB e colocadas overnight sob agitação a 37°C. Ao atingir uma DO600 de 0,1 foram distribuídas em tubos MHB frescos contendo extratos de *B. gardineriana* e *K. Tomentosa*, nas concentrações de 1/2 MIC (195 µg/ml), MIC (390 µg/ml) e 2x MIC (780 µg/ml) para *S. aureus* e 1/2 MIC (1565 µg/ml), MIC (3130 µg/ml) e 2x MIC (6260 µg/ml) para *P. aeruginosa*. O crescimento bacteriano foi monitorado a cada hora e 30 minutos, a partir de 0 hora até 6 horas, e após 24 horas, usando 4 µL de suspensão diluída em triplicata. As placas foram incubadas a 37°C durante 24 h e posteriormente foi calculada a CFU/mL.

Ensaio Checkerboard

Para avaliar o efeito sinérgico dos extratos que apresentaram melhor atividade antimicrobiana (microdiluição), foi realizada a técnica de microdiluição modificado para o ensaio Checkerboard de acordo com a metodologia descrita segundo Pillai & Moellering (2005). Para este ensaio foi escolhido o antimicrobiano com base no antibiograma. A suspensão bacteriana foi padronizada a partir de uma cultura de 24 horas, em caldo MH, para 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente $1,0 \times 10^8$ UFC/mL). Os poços das microplacas (96 poços) foram preenchidos.

com 80 µL de caldo MH. Na última coluna (nº 12) adicionaram-se 100 µL de clidamicina a 0,1 µg/mL para realização da diluição seriada, transferindo-se sequencialmente 100 µL do poço anterior para o próximo até a coluna 2. da mesma maneira, na primeira linha (A) adicionaram-se 100 µL da solução de extrato de raiz a 125 µg/mL para posterior realização da diluição seriada até a linha G. Portanto, a coluna 1 contém apenas o extrato e a linha H apenas a clidamicina. No poço H1 foi feito o controle de crescimento bacteriano. Adicionalmente, foram distribuídos 20 µL da suspensão bacteriana em cada poço. As microplacas foram incubadas por 24 horas a 37°C e após esse período foi realizada a leitura visual do crescimento bacteriano e a leitura com o revelador resazurina (100 µg/mL), utilizado como indicador de crescimento bacteriano. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Para a avaliação da interação entre os diferentes tratamentos foi calculado o índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) de acordo com a seguinte fórmula:

$$ICIF = \frac{(CIM \text{ extrato na combinação}) + (CIM \text{ clidamicina na combinação})}{(CIM \text{ extrato}) \times (CIM \text{ da clidamicina})}$$

A partir do ICIF obtido foi avaliada a interação seguindo a classificação descrita por Kumar *et al.* (2012), na Tabela 3.

Tabela 3. Valores de ICIF correspondente às diferentes interações.

INTERAÇÃO	ICIF (mg/mL)
Sinergismo	$CIF \leq 0,5$
Aditivo	$0,5 < CIF \leq 1$
Indiferente	$1 < CIF \leq 2$
Antagonismo	$CIF \leq 2$

ICIF: Índice de Concentração Inibitória Fracionada; CIF: Concentração Inibitória fracionada.

Para o ensaio da atividade hemolítica o concentrado de hemácia foi obtido coletando-se e 5ml de sangue venoso humano, de um indivíduo adulto aparentemente saudável. Os eritrócitos humanos foram lavados três vezes com 0,9% de NaCl. Os extratos foram preparados na concentração de 2000, 1000, 500, 250 e 125 µg/mL, diluídos com DMSO e NaCl 0.9%, em seguida foram adicionados eritrócitos a 4% a estes extratos. A mistura foi deixada em repouso à 37°C, por 60 minutos e posteriormente foi centrifugada por cinco minutos a 3000 rpm. Como controle positivo foi utilizado sangue com Triton X-100 a 0,1% e como controle negativo foi utilizado sangue, DMSO e NaCl 0.9%. Posteriormente, a mistura foi centrifugada por cinco minutos a 3000 rpm, 200µL do sobrenadante foram transferidos para uma placa de 96 poços. A absorvância foi medida a 570 nm. A percentagem de hemólise foi calculada usando a seguinte equação:

$$\text{Hemólise} = (A - A_0) / (A_X - A_0) \times 100;$$

Onde: A é o valor obtido pela leitura da Densidade Ótica (OD570) com a solução do extrato; A₀ é OD 570 em NaCl; e A_X é OD 570 nm, com 0,1% de Triton X-100.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise do perfil fitoquímico dos extratos

As placas cromatográficas foram analisadas de acordo com a presença (+) ou ausência (-) dos metabólitos secundários identificados pelos reveladores, conforme mostrado na tabela 4. Desta forma a abordagem fitoquímica dos extratos por cromatografia em camada delgada (CCD) revelou a presença de Flavonóides, Triterpenos, Esteróides, Derivados cinâmicos, Saponinas, Monoterpenos e Sesquiterpenos, Proantocianidinas, Curaminas. Os metabólitos secundários encontrados em maior quantidade, em todos os extratos, foram Triterpenos e Esteróides, com exceção de *K. tomentosa* que apresentou apenas traços para esses dois metabólitos. Em seguida, os compostos mais presentes foram flavonoides, Proantocianidinas, monoterpenos e sesquiterpenos. Nenhum extrato apresentou quinonas.

Tabela 4- Resultados da análise fitoquímica dos extratos de plantas medicinais.

Metabólitos secundários	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8
Flavonoides	+++ ⁽¹⁾	+++ ⁽¹⁾	+(1)	+(2)	+++ ⁽¹⁾	+++ ^(1,2)	++ ^(1,2)	+++ ^(1,2)
Derivados cinâmicos	-	-	tr	+++	+	tr	+	+
Triterpenos	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	tr
Esteróides	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	tr
Saponinas	-	-	-	++	++	-	-	-
Monoterpenos	tr	tr	tr	++	++	++	++	tr
e Sesquiterpenos								
Alcaloides	-	-	-	+	-	+	-	-
Curaminas	-	-	-	+++	+++	-	+	-
Quinonas	-	-	-	-	-	-	-	-
Proantocianidinas	+(3)	+++ ^(3,4)	+(4)	-	-	-	-	+++ ^(3,4)

Legenda: (-) ausente; (+) fraco; (++) médio; (+++) forte; (tr) traços. E1: *D. ecastophyllum*; E2: *B. gardineriana*; E3: *E. revolutum*; E4: *Z. rhaifolium*; E5: *P. spicatus*; E6: *L. microphylla*; E7: *P. acuminatus*; E8: *K. tomentosa*. Nota: ⁽¹⁾aglicona e heterosídeos de 3',4'-OH flavonoides; ⁽²⁾aglicona e heterosídeos de 3'-OH flavonoides; ⁽³⁾Proantocianidinas oligoméricas; ⁽⁴⁾Proantocianidinas poliméricas.

Segundo alguns autores, taninos e flavonóides nas plantas, desempenham atividades como proteção contra insetos, microorganismos e radiação solar, ação terapêutica pela sua ação antiinflamatória, antifúngica, antioxidante e cicatrizante (Zuananni e Montanha, 2004).

Os terpenóides formam um grande grupo com estruturas bastante diversas derivadas das unidades isoprênicas C₅. Estão subdivididos em seis classes: Iridóides, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e saponinas (Chan-Bacab; Pena Rodriguez, 2001). Os terpenos com suas intrínsecas características vêm sendo utilizados na indústria química como inseticidas (Cheng *et al.*, 2009),

desinfetantes (Hendry *et al.*, 2009), fungicida (Sanguinetti *et al.*, 2007) e bactericidas (Karpanen *et al.*, 2008). Rolin *et al.*, 2013 estudando o extrato etanólico de *Byrsonima gardineriana* por cromatografia em coluna com sílica gel, isolou cinco triterpenos, em nosso estudo também foi encontrado triterpenos em *B. gardineriana* no teste de CCD.

Atividade Antibacteriana

Na análise da atividade antibacteriana dos extratos, verificou-se que estes apresentaram atividade inibitória para as bactérias estudadas, variando a Concentração Mínima Inibitória entre 390 a 6250 µg/ml (Tabela 4). Os extratos mais promissores para *S. aureus* foram os das espécies, *Byrsonima gardineriana* e *Krameria tomentosa* com CMI de 390 µg/ml e CMB de 1560 µg/ml, para ambos os extratos. No entanto, para *P. aeruginosa* o extrato de *Byrsonima gardineriana* apresentou CMI de 6250 e CMB de 12500 µg/ml. Para *Escherichia coli* o extrato que apresentou melhor CMI foi *Krameria tomentosa* 6250 µg/ml, porém, para esse extrato o CMB foi de 50000 µg/ml. Os demais extratos apresentaram CMI que variam de 780 a 50000 µg/ml (Tabela 5).

Os resultados obtidos para *S. aureus* para todos os extratos, com exceção do extrato de *P. acuminatus* mostraram-se promissores para inibir *Staphylococcus aureus*, uma vez que, as concentrações foram inferiores as citadas na literatura também para *S. aureus* com os extratos de *Vismia guianensis* e *Symphonia globulifera* no qual apresentaram CMI de 312500 µg/ml para ambos os extratos (Araújo, 2010).

Michelin *et al.*, (2008) analisaram atividade antimicrobiana de extratos metanólicos de *Byrsonima fagifolia*, *Byrsonima basiloba* e *Byrsonima intermedia* e encontraram para o extrato de *B. basiloba* MIC de 6000 µg/ml contra *Staphylococcus epidermidis*, para o extrato de *B. intermedia* MIC de 1500 µg/mL contra *E. faecalis* e 3000 µg/mL contra *B. subtilis*. Neste estudo o extrato de *B. gardineriana* mostrou uma excelente atividade antimicrobiana para *S. Aureus*, sendo mais promissor do que o apresentado para as espécies de *Byrsonima* estudadas por Michelin *et al.*, (2008).

Não existe um consenso sobre o nível aceitável para extratos de materiais vegetais quando comparados com antibióticos padrões. Alguns autores consideram somente resultados similares aos de antibióticos conhecidos, desde que se trabalhe com uma fração já determinada (Aligianis *et al.*, 2001).

Tabela 5- Atividade antimicrobiana dos extratos de plantas contra bactérias multiressistentes.

Espécie	Bac 01		Bac 02		Bac 03	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
	µg/mL					
<i>B. gardineriana</i>	390	1560	3130	6250	12500	-
<i>D. ecastaphyllum</i>	780	3130	6250	12500	50000	-
<i>E. revolutum</i>	1560	3130	25000	-	ND	ND
<i>K. tomentosa</i>	390	1560	ND	ND	6250	50000
<i>L. microphylla</i>	1560	3130	25000	-	12500	12500
<i>P. spicatus</i>	6250	1250	ND	ND	12500	50000
<i>P. acuminatus</i>	50000	50000	25000	-	50000	50000
<i>Z. rhaifolium</i>	12500	12500	25000	-	50000	50000

CMI = Concentração Mínima Inibitória, CMB : Concentração Mínima Bactericida. Bac

01: *Staphylococcus aureus*, Bac 02: *Pseudomonas aeruginosa*, Bac 03: *Escherichia coli* - :Não houve inibição, ND: Não Determinado.

Trabalhos realizados por Bertini *et al.*, (2005) e Oliveira *et al.*, (2006) mostraram que o óleo essencial de *Lippia sidoides* inibiu a multiplicação de estirpes de *Staphylococcus aureus*. Nader (2010) estudando o extrato hexânico de *Lippia sidoides* encontrou razoável atividade antimicrobiana, com CIM de 500 µg/mL. Estes dados diferem dos encontrados em nosso estudo onde o extrato etanólico de *Lippia microphylla* apresentou CMI de 1560 µg/mL para *S. aureus*. Compostos podem ser classificados como agentes microbicidas quando a CMB/CMI ≤ 4 (Pankeye Sabbath, 2004). Todos os extratos testados para as bactérias estudados apresentaram um potencial bactericida com a relação CMB/CMI com valores entre 1 e 4, com exceção do extrato de *K. tomentosa* para *Escherichia coli* que apresentou potencial bacteriostático, pois apresentou relação de 8 entre o CMI e o CMB (Tabela 6).

Tabela 6. Relação entre CMB/CMI de extratos de plantas

Espécie de planta	Bac 01	Bac 02	Bac 03
		CMB/CMI	
<i>Byrsonima gardineriana</i>	4	2	-
<i>Dalbergia ecastaphyllum</i>	4	2	-
<i>Erythroxylum revolutum</i>	2	-	-
<i>Krameria tomentosa</i>	4	ND	8
<i>Lippia microphylla</i>	2	-	-
<i>Pilocarpus spicatus</i>	2	ND	-
<i>Plyllanthus acuminatus</i>	1	-	4
<i>Zanthoxylum rhaifolium</i>	1	-	-

CMI : Concentração Mínima Inibitória, CMB :Concentração Mínima Bactericida; Bac 01:

Staphylococcus aureus, Bac 02: *Pseudomonas aeruginosa*, Bac 03: *Escherichia coli* . - : Não houve inibição, ND : Não Determinado.

Antibiograma

Com base no antibiograma, os antimicrobianos Imipinema, Gentamicina, Amicacina, Tetraciclina, Nitrofurantoína e Meropenem apresentaram sensibilidade para as três espécies bacterianas, enquanto que, Oxacilina, Clindamicina e Ampicilina apresentaram resistência à maioria dos extratos, destacando a Clidamicina que apresentou perfil resistente para as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* e perfil intermediário de resistência para *S. aureus* (Tabela 7). A resistência bacteriana aos antimicrobianos é considerada como um problema inerente à terapia antimicrobiana, por este motivo é preciso sempre buscar novas fontes terapêuticas. Testar produtos naturais pode ser uma medida alternativa importante para ajudar a resolver esse problema de resistência (SILVA et al., 2010).

Curva de Morte

Para este estudo foram selecionados os extratos que apresentaram as melhores atividades antibacterianas para *S. aureus*, o extrato etanólico de *B. gardineriana* e *K. tomentosa* ambos com MIC de 390 µg/mL. De acordo com os resultados obtidos, para o extrato de *B. gardineriana* o crescimento de *S. aureus*, na concentração MIC/2, mostrou redução de até 2,50 log 10 CFU/mL após 3h de contato com o extrato, permanecendo até 6h. A partir de 6h o crescimento bacteriano aumentou continuamente, alcançando 8,70 log 10 CFU/mL em 24h. No entanto, ainda havia diferença significativa na viabilidade bacteriana entre o controle e a amostra bacteriana exposta ao extrato 24 horas após a inoculação (P <0,05). Nas concentrações MIC e 2xMIC não foi observado crescimento bacteriano mensurável 1h e 30min após a exposição ao extrato. Entretanto, a concentração correspondente ao MIC a partir de 6h apresentou crescimento bacteriano que aumentou constantemente ao decorrer do tempo e a contagem de células viáveis foi de 2,10 log10 CFU/mL em 24h. A concentração de 2xMIC do extrato mostrou-se bactericida para *S. aureus* até 24h, uma vez que não houve crescimento bacteriano (Figura 1A).

Para *K. tomentosa* a concentração MIC/2, após 3h, mostrou redução de até 2,85 log 10 CFU/mL. A redução foi contínua até não haver crescimento bacteriano detectável (6h). Entre 6h e 24h houve crescimento de colônias até alcançar 8,40 log 10 CFU/mL. Entretanto, ainda havia diferença significativa na viabilidade bacteriana entre o controle e a amostra bacteriana exposta ao extrato 24h após a inoculação (P <0,05). Nas concentrações correspondentes ao MIC e 2xMIC não houve crescimento bacteriano em nenhum dos períodos analisados (Figura 1B). Os resultados apresentados para ambos extratos, em termos das alterações no log10 CFU/mL de colônias viáveis, indicaram que os extratos exibiram uma atividade bactericida significativa. E de acordo com Scheetz e colaboradores (2007), a atividade bactericida foi definida como sendo ≤ 3 log10 CFU/mL na contagem de colônias viáveis em relação ao inóculo inicial.

Mandal e colaboradores (2011) avaliaram extratos etanólicos de *Cinnamomum zeylanicum* (CIN), *Syzygium aromaticum* (CLV) e *Cuminum cyminum* (CMN) contra uma cepa resistente de *S. aureus* à metilicina e constataram que na concentração de 256 µg/ML, para todos os extratos, as contagens de células viáveis foram diminuídas após 3 horas até 3,27, 3,61 e 3,97 log10 CFU/mL, respectivamente. Os extratos de CIN e CLV tiveram efeitos bactericidas às 6 h, no entanto, o extrato de CMN mostrou efeito bactericida sobre *S. aureus* após 24 horas de incubação.

Olajuyigbe e Afolayan (2012) utilizaram o extrato etanólico de *Erythrina caffra* no ensaio de curva de morte nas concentrações MIC/2 (19,5 µg/mL), MIC (39,1 µg/mL) e 2xMIC (78,2 µg/mL) contra *S. aureus* (ATCC 6538). Os resultados mostraram que após 4h as contagens de células viáveis foram diminuídas em todas as concentrações (3,51, 1,39 e 0,68 log10 CFU/mL), e após 8h houve um ligeiro

aumento na concentração do MIC/2 (4,67 log₁₀ CFU/mL), redução na concentração do MIC (0,90 log₁₀ CFU/mL), e para a concentração de 2x MIC não foi observado crescimento bacteriano mensurável.

Prabavathy Niveditha (2015) testaram o extrato etanólico de *Scoparia dulcis* contra uma cepa de *S. aureus* proveniente de isolado clínico. Os resultados demonstraram que o crescimento de *S. aureus* foi reduzido a partir das 4h até 6h na concentração do MIC (437µg/ml), e entre 6h e 24h o crescimento apresentou-se inibido. Esses resultados corroboram com os encontrados em neste estudo uma vez que os extratos etanólicos de *B. gardineriana* e *K. tomentosa*, apresentaram redução na contagem de células viáveis ou efeito bactericida.

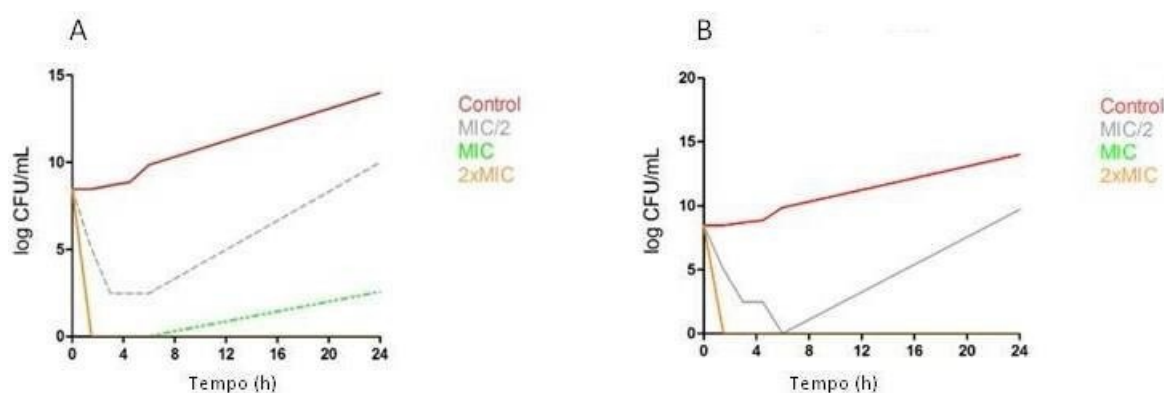


Figura 1: Curva de Morte de extratos etanólicos de *B. gardineriana* (A) e *K. tomentosa* (B) contra *S. aureus*.

Ensaio Checkerboard

Para o referido estudo um antimicrobiano foi selecionado com base em seu perfil de resistência, de acordo com o antibiograma realizado (Tabela 7). Desta forma, o antimicrobiano clindamicina apresentou resistência para todas as espécies, com exceção de *S. aureus* que apresentou resistência intermediária e por este motivo, foi o selecionado para análise. Dentre os extratos em estudo foram selecionados dois que apresentaram a melhor concentração mínima inibitória, para diferentes bactérias, para realizar o estudo de Checkerboard, os extratos escolhidos foram *Byrsonima gardineriana* contra *Staphylococcus aureus* (CMI 390 µg/ml) e *Pseudomonas aeruginosa* (CMI 3130 µg/ml), bem como, *Krameria tomentosa* contra *Staphylococcus aureus* (CMI 390 µg/ml) e *Escherichia coli* (CMI 6250 µg/ml).

Tabela 7. Perfil de resistência das bactérias.

Antimicrobiano	Espécie Bacteriana		
	BAC 01	BAC 02	BAC 03
Imipenema	S	S	S
Gentamicina	S	S	S
Oxacilina	S	R	R
Ciprofloxacina	I	S	S
Cefuroxima	S	R	S
Amicacina	S	S	S
Cefepima	S	R	S
Tetraciclina	S	S	S
Ácido Nalidíxico	I	R	S
Cefazolina	S	R	S
Nitrofurantoína	S	S	S
Meropenem	S	S	S

Cotrimoxazol	S	I	S
Clindamicina	I	R	R
Cefoxitina	S	I	S
Ampicilina	R	R	S

S= Sensível; R= Resistente; I= Intermediário; BAC 01= *Staphylococcus aureus*; BAC 02= *Pseudomonas aeruginosa*; BAC 03= *Escherichiacoli*.

O método Checkerboard é um ensaio *in vitro*, no qual analisa o efeito de combinações de agentes antimicrobianos com mecanismos de ação distintos no crescimento bacteriano (Lorian, 2005; Medeiros, 2012).

Os resultados obtidos neste estudo pelo ensaio Checkerboard foram promissores, uma vez que, quando testados em combinação, o extrato da planta e a clindamicina, a Concentração Inibitória Mínima foi inferior a quando testados isoladamente. Para *Staphylococcus aureus* a CIM *B. gardineriana* foi de 390 µg/mL, enquanto que, o ICIF foi de 0,041 mg/mL, e a CIM *K. tomentosa* foi de 390 µg/mL, enquanto que o ICIF foi de 0,052 mg/ml para *Escherichia coli* a CIM *K. tomentosa* foi de 6250 µg/mL, enquanto que o ICIF foi de 0,123 mg/ml e para *Pseudomonas aeruginosa* a CIM *B. gardineriana* foi de 3130 µg/mL, enquanto que o ICIF foi de 0,7 mg/mL. Isso significa dizer que, no tratamento para as referidas bactérias a dose terapêutica do antimicrobiano (Clindamicina) combinado com o extrato vegetal poderá ser menor, retardando assim, o desenvolvimento de resistência ao microorganismo e melhorando o resultado da terapia. Esses valores são expressos em índice de concentração inibitória fracionada, calculados por uma equação, sendo que valores ≤ 5 indicam uma interação sinérgica, onde o grau de sinergismo aumenta quando o valor tende para zero (Jackson *et al.*, 2009). Baseando-se nesta informação, o resultado obtido da associação do antimicrobiano com os extratos na proporção de 1:2 (v/v) demonstrou interação sinérgica para *S. aureus* e *P. aeruginosa*, enquanto para *E. coli* a interação foi classificada como adicionado (Tabela 8).

De acordo com relatos na literatura, a associação do óleo essencial de *E. citriodora* com antimicrobianos (ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina) apresentou sinergismo para a espécie *S. epidermidis*. (Oliveira *et al.*, 2006). Em outros estudos realizados por Zago A. (2009), óleos essenciais de capim cidreira, hortelã e gengibre apresentaram interação sinérgica com oito, sete e cinco drogas testadas, respectivamente, para espécie *Staphylococcus aureus*.

Há outros estudos que demonstram sinergismo, como a associação de estilbenos e ciprofloxacino (Kumar *et al.*, 2012), de triterpenoides pentacíclicos e os antibióticos metilicina e vancomicina (Chung *et al.*, 2011), de silibinina e ampicilina ou gentamicina (Lee *et al.*, 2012), da tomatidina e antibióticos aminoglicosídeos (gentamicina, canamicina, tobramicina, amicacina e estreptomicina) (Mitchell *et al.*, 2012), entre outros.

A combinação de antimicrobianos com produtos naturais pode ser uma estratégia terapêutica. A terapia de combinação pode ser utilizada para expandir o espectro antimicrobiano, para evitar o surgimento de organismos resistentes, para minimizar a toxicidade, bem como para se obter a atividade antimicrobiana sinérgica (Kumar *et al.*, 2012).

Tabela 8. Índice de concentração inibitória fracionada para espécies bacterianas multiressistentes e interação entre clindamicina e extratos.

Espécie bacteriana	Extrato alcoólico	ICIF (mg/mL)	Interação
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Byrsonima gardineriana</i>	0,041	Sinergismo
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Krameria tomentosa</i>	0,052	Sinergismo
<i>Escherichia coli</i>	<i>Krameria tomentosa</i>	0,123	Sinergismo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Byrsonima gardineriana</i>	0,7	Adicionado

CIF=Índice de Concentração Inibitória Fracionada.

Ensaio de citotoxicidade *in vitro* da atividade hemolítica

Para avaliação da citotoxicidade foram selecionados os extratos de *Byrsonima gardineriana* e *Krameria tomentosa*, pois estes apresentaram o melhor desempenho antimicrobiano para cada bactéria estudada.

Na avaliação da citotoxicidade dos extratos sobre eritrócitos humanos do tipo O, observou-se que

houve uma baixa atividade hemolítica (taxa de hemólise <8%) para todos os extratos em todas as concentrações analisadas (Tabela 9), quando comparados com os grupos tratados com o Triton-X (controle positivo), indicando que não está havendo danos a membrana celular dos eritrócitos humanos, ou seja, os extratos não apresentaram toxicidade para as células eucarióticas.

A estabilidade mecânica da membrana de eritrócitos é importante como indicador de citotoxicidade e o ensaio de hemólise *in vitro* é bastante empregado para a avaliação toxicológica de extratos vegetais (Mukherjee & Rajasekaran, 2010). A grande preocupação da atividade hemolítica dá-se pelo fato da hemoglobina livre no plasma ser prejudicial à saúde causando danos em órgãos vitais tais como fígado, rins e coração, daí a importância de analisar a ação tóxica dos extratos (Carvalho *et al.*, 2007).

A atividade hemolítica pode ser um resultado da formação de poros nas membranas celulares, alterando sua permeabilidade e promovendo a ruptura da célula, porém, vários mecanismos não específicos podem ser responsáveis pela hemólise dos eritrócitos. Compostos como flavonóides, podem causar oxidação de hemoglobina produzindo meta-hemoglobina e assim causar hemólise (Mukherjee & Rajasekaran, 2010), como também podem atuar como protetores de membranas biológicas contra a indução de danos oxidativos induzidos por radicais livres (Asgary *et al.*, 2005). Compostos fenólicos podem apresentar atividade hemolítica pela oxidação da hemoglobina, formando meta-hemoglobina (Pereira *et al.*, 2011).

Tabela 9. Percentual de hemólise em eritrócitos dos em diferentes concentrações dos extratos selecionados.

Extrato	Hemólise %				
	2000mg/mL	1000 mg/mL	500 mg/mL	250 mg/mL	125 mg/mL
<i>B. gardineriana</i>	6,49 ±0,018	3,79±0,017	1,54±0,003	0,59±0,008	0,17±0,004
<i>K. tomentosa</i>	3,25±0,015	1,48±0,003	0,78±0,008	0,32±0,003	0,02±0,001

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados evidenciados neste estudo, pode-se concluir que os extratos alcoólicos de *B. gardineriana* e *K. tomentosa* tem ação antimicrobiana frente a *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*. A combinação de clindamicina com extratos obteve interação sinérgica para *S. aureus*, *P. aeruginosa* e aditiva para *E. coli*, podendo ser uma opção a ser explorada, e ainda, os extratos não possuem citotoxicidade. A pesquisa de produtos naturais com potencial terapêutico é de grande importância. A possibilidade de interação, quando associadoS antimicrobianos e extratos com atividade inibitória contra o crescimento de espécies bacterianas, pode sugerir pesquisas futuras uma maior exploração dos resultados obtidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aligianis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou IB. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49: 4.168-4.170.
- Asgary S, Naderi GH, Askari N. (2005) Protective effect of flavonoids against red blood cell hemolysis by free radicals. Experimental and Clinical Cardiology. 10:88-90.
- Bertini ML. (2005) Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleo essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. Infarma.17:80-2.
- Brasseur, Angenot (1986) Un reactif de choix pour la revelation des flavonoïdes: le melange diphenylborate D'aminoethanol -Peg 400. J. Chromatogr. 351: 351-355.
- Braz-Filho R. (2010) Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. Química Nova. 33:229-239.
- Cavalcanti Filho. (2014) Avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais extraídos de *Buchenavia tetraphylla*.
- Carvalho. (2007) Efeito da bomba de infusão de soluções sobre o grau de hemólise em concentrados de hemácias. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. 29:149-152.
- Chan-Bacab MJ, Peña-Rodríguez LM. (2001) Plant natural products with leishmanicidal activity. Nat Prod Rep. Review 18:674-88.
- Cheng SS. (2009) Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two *Eucalyptus* species. Bioresource Technology.100:452-6.
- Chung PY, Navaratnam P, Chung LY. (2011) Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic

- triterpenoids and antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 10:1-6.
- Daniele CM, Miriam S, Maria EF, Daniel R, Lourdes CS, Alba RM, Souza-Brito, Wagner V, HérídaRNS. (2008) Antimicrobial activity of *Byrsonima* species (Malpighiaceae). *Rev. bras. farmacogn.* Dias M, Monteiro MS. (2010) Antibióticos e resistência bacteriana, velhas questões, novos desafios. *Cadernos Otorrinolaringologia: clínica, investigação e inovação*.
- Fabri RL, Nogueira MS, Braga FG, Coimbra ES, Scio E. (2009) *Bioresource Technology*. 100: 428–433.
- Ganie AS, Yadav SS. (2015) FT-IR spectroscopic analysis of *Holoptelea integrifolia* (Roxb.) planch seed extracts and their antibacterial activity. *Res. J. Med. Plant*. 9: 417-426.
- Garcia APM, Orlanda JFF. (2014) Evaluación de La actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto hidroalcohólico bruto *Mangifera indica* Linneu. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*.
- Gibbons S. (2004) Anti-staphylococcal plant natural products. *Natural product reports*. 126: 263-277.
- Gurib-Fakim A. (2006) Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular aspects of medicine*. 27: 91-93.
- Harborne JB. (1998) *Phytochemical Methods*. 3^a Ed. Londres: Chapman & Hall.
- Hendry ER, Worthington T, Conway BR, Lambert PA. (2009) Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1,8-cineole alone and in combination with chlorhexidine digluconate against microorganisms grown in planktonic and biofilm cultures. *J Antimicrob Chemother* 64: 1219- 1225.
- Jackson C, Agboke A, Victor Nwoke V. (2009) In vitro evaluation of antimicrobial activity of combinations of nystatin and *Euphorbia hirta* leaf extract against *Candida albicans* by the checkerboard method. *Journal of Medicinal Plants Research*. 3:666-669.
- Kaur GJ, Arora DS. (2009) *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 9:30-39.
- Karpanen TJ, Worthington T, Hendry ER, Conway BR, Lambert PA. (2008) Antimicrobial efficacy of chlorhexidine digluconate alone and in combination with eucalyptus oil, tea tree oil and thymol against planktonic and biofilm cultures of *Staphylococcus epidermidis*.
- Kumar SN, Siji JV, Nambisan B, Mohandas C. (2012). Activity and synergistic interactions of stilbenes and antibiotic combinations against bacteria in vitro. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 28:3143-3150.
- Lai HY, Lim YY, Kim KH. (2010) *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 10:15.
- Lee YS, Jang KA, Cha JD. (2010) Synergistic antibacterial effect between silibinin and antibiotics in oral bacteria. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*. 1-7.
- Lorian Victor. (2005) *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 5 ed. Williams & Wilkins.
- Malik A, S Bai, R Teneja, S. Dalal. (2015). In vitro screening of some indian medicinal plants for their activity against extended spectrum. lactamases. *Br. Biotechnol. J*. 8:1-10.
- Marco Leonti, Gary I. Stafford, Maja Dal Cero, Stefano Cabras, Maria Eugenia Castellanos, Laura Casu, Caroline S. Weckerle. *Reverse Ethnopharmacology and Drug Discovery*. *Journal of Ethnopharmacology*.
- Medeiros M. (2012) Avaliação in vitro e in vivo de Efeitos sinérgicos de Antibacterianos para o tratamento de infecções por *Acinetobacter baumannii* multirresistentes produtoras de Carbapenemases tipo OXA endêmicas no Brasil.
- Mitchell G, Lafrance M, Boulanger S, Séguin DL, Guay I, Gattuso M, Marsault E, Bouarab K, Malouin F. (2012) Tomatidine acts in synergy with aminoglycoside antibiotics against multiresistant *Staphylococcus aureus* and prevents virulence gene expression. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 67:559- 568.
- Mukherjee A, Rajasekaran C. (2010) In vitro haemolytic activity of *Allium stracheyi* Baker. *Journal of Pharmacy Research*. 3:1160-1162.
- Nader TT. (2010) Potencial de atividade antimicrobiana in vitro de extratos vegetais do cerrado frente estirpes de *Staphylococcus aureus*. (dissertação de mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Jaboticabal.
- NCCLS. (2009) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, approved standard-second edition M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, USA.
- Novaretti MCZ, Aquino S, Piscopo MR. (2014) Controle de Vendas de Antibióticos no Brasil: Análise do efeito dos atos regulatórios no uso abusivo pelos consumidores. *Revista Acadêmica São Marcos*. 4: 25-39.
- Oliveira PF, et al. (2006) Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 16:510-6.
- Oliveira AC, Silva RS. (2008) Desafios do cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. *Revista Eletrônica de Enfermagem*. 10:189-197.

- Oliveira YLC, Silva LCN, Araújo JM, Correia MTS, Silva MV. (2012) Natural Product Research.
- Pankey GA, Sabbath LD (2004). Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Grampositive bacterial infections. Clin. Infect. Dis. 38:864–870.
- Peres-Bota D, Rodriguez H, Dimopoulos G. (2003) Are infections due to resistant pathogens associated with a worse outcome in critically ill patients. J Infect. 47:307-316.
- Pereira LLS et al. (2011) Ação inibitória e estabilidade do extrato de farinha de feijão branco sobre enzimas digestivas na presença de fluido gástrico simulado. Revista Brasileira de Farmácia. 92: 367-372.
- Pittet D (2005). Infection control and quality health care in the new millennium. Am J Infect Control. 33:258-267.
- Pillai SK, RC Moellering, And GM Eliopoulos (2005). Antimicrobial combinations, 365-440. In V. Lorian (ed.), Antibiotics in laboratory medicine, 5th ed. The Lippincott Williams & Wilkins Co., Philadelphia, Pa.
- Roberts EAH, Cartwright RA, Oldschool M (1957). Phenolic substances of manufactured tea. I. Fractionation and paper chromatography of water-soluble substances. J Sci Food Agr 8: 72-80.
- Rolim TL, et al. (2013) Constituintes químicos e atividade antioxidante de *Byrsonima gardneriana* (Malpighiaceae). Quím Nova. 36: 524-527.
- Sanguinetti M, Posteraro B, Romano L, Battaglia F, Lopizzo T, De Carolis E, Fadda G. (2007) In vitro activity of Citrus bergamia (bergamot) oil against clinical isolates of dermatophytes. J Antimicrob Chemother 59: 305-308.
- Silva VA. et al. (2010) Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana do extrato da *Lippia sidoides* Cham. sobre isolados biológicos de *Staphylococcus aureus*. Rev. bras. plantas med. 12: 452-455.
- Sousa EO
- Silva NF, Rodrigues FFG, Campos AR, Lima SG, Costa JGM. (2010) Chemical composition and resistance modifying effect of *Lantana camara* Lin. Pharmacognosy magazine. 6: 79-82.
- Wagner H, Bladt S (1996). Plant drug analysis -A thin layer chromatography atlas. Springer. 2.ed. Munich.
- Zago A. (2009). Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. Brazilian Journal of Pharmacognosy. 19 (4): 828-833.
- Zuanazzi JAS, Montanha JA. (2004). Flavonóides. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento. Simões, C.M.O., Guerra, M.P. et al (orgs.) 5ª edição, revisada, ampliada, primeira reimpressão- Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC.

3.2 ANTIOXIDANT AND PHOTOPROTECTIVE ACTIVITY OF ETHANOLIC EXTRACTS OF MEDICINAL PLANTS

Artigo a ser submetido na revista **American Journal of Plant Sciences**
(Apendice)

Antioxidant and photoprotective activity of ethanolic extracts of medicinal plants.

Francinete Carla Nunes Cavalcanti-Viana¹; Amanda Dias de Araújo¹; Aline de Sousa Carvalho¹; Fernanda Granja da Silva Oliveira²; Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida²; Josean Fechine Tavares³; Maria Tereza dos Santos Correia¹; Márcia Vanusa da Silva¹.

¹ Biochemistry Department, Biosciences Center, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil.

²Center of Studies of Medicinal Plants (NEPLAME), Federal University of São Francisco Valley, Av. José de Sá Maniçoba, s/n, 56304-917, Petrolina, Pernambuco, Brazil.

³Pharmaceutical Sciences Department, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, Castelo Branco, 58051-970, João Pessoa, Paraíba, Brazil.

Atividade antioxidante e fotoprotetora de extratos etanólicos de plantas medicinais.

RESUMO

Estudos têm evidenciado o papel dos radicais livres como um dos responsáveis pelo envelhecimento e pelas doenças degenerativas. Dentre os métodos que determinam a habilidade dos antioxidantes em sequestrar radicais livres destacam-se o teste de determinação dos fenóis totais e o ABTS. Radiações ultravioletas podem apresentar malefícios para os organismos, alguns estudos concentram esforços em avaliar atividades fotoprotetoras que as plantas podem apresentar. Este trabalho propõe dosar a atividade antioxidante e fotoprotetora *in vitro* de extratos etanólicos de plantas medicinais. Extrato etanólico bruto (EEB) foi preparado de parte aérea de oito espécies *Dalbergia ecastaphyllum*, *Byrsonima gardneriana*, *Erythroxylum revolutum*, *Zanthoxylum rhoifolium*, *Pilocarpus spicatus*, *Lippia microphylla*, *Phyllanthus acuminatus* e *Krameria tomentosa*. Para os compostos fenólicos totais os extratos *K. tomentosa* e *L. microphylla* destacaram-se apresentando valores de 416,20 e 373,48 (GAE mg/g), respectivamente. Para o ensaio utilizando o radical ABTS⁺ evidenciamos valores respectivos de TEAC de 2.206,66 mM, 2.203,66 mM e 2.133,33 mM e de inibição de 99,84%, 99,68% e 96,42% para *D. ecastaphyllum*, *B. gardneriana* e *K. tomentosa*. Para a análise de Fotoproteção, os extratos de *D. ecastaphyllum*, *B. gardneriana*, *E. revolutum*, *L. microphylla* e *Z. Rhoifolium* apresentaram absorvância máxima na região de radiação UVB, e os demais apresentaram absorvância máxima na região UVC. Todos os extratos apresentaram potencial para FPS e podem ser utilizados em associação com filtros químicos ou cosméticos, proporcionando benefícios às formulações.

Palavras-chave: Plantas medicinais; Antioxidante; Fotoproteção.

ABSTRACT

Studies have shown the role of free radicals as one of those responsible for aging and degenerative diseases. Among the methods that determine the ability of antioxidants to sequester free radicals, the ABTS radical sequestration method can be highlighted. Phenolic compounds have been related to the antioxidant activity of medicinal plants. Ultraviolet radiation can be harmful to organisms, some studies focus efforts on evaluating photoprotective activities that plants may exhibit. This work proposes to evaluate the antioxidant and photoprotective activity *in vitro* of ethanolic extracts of medicinal plants. The crude ethanolic extract (EEB) was prepared from aerial parts of eight species (*Dalbergia ecastaphyllum*, *Byrsonima gardneriana*, *Erythroxylum revolutum*, *Zanthoxylum rhoifolium*, *Pilocarpus spicatus*, *Lippia microphylla*, *Phyllanthus acuminatus* and *Krameria tomentosa*). For the total phenolic compounds extracts, *K. tomentosa* and *L. microphylla* obtained the highest results with 416,20 and 373,48 GAE mg/g, respectively. For the test using the ABTS⁺ radical, we showed respective values of 2.206,66 mM, 2.203,66 mM and 2.133,33 mM TEAC and 99,84%, 99,68% and 96,42% of inhibition for *D.*

ecastaphyllum, *B. gardneriana* and *K. tomentosa*. For the photoprotection analysis, the extracts of *D. ecastaphyllum*, *B. gardneriana*, *E. revolutum*, *L. microphylla* and *Z. rhoifolium*, presented maximum absorbance in the region of UVB radiation, and the others showed maximum absorbance in the UVC region. All extracts presented potential for SPF and can be used in association with chemical or cosmetic filters, providing the formulations with benefits.

Keywords: Medicinal plants; Antioxidant activity; Photoprotection.

INTRODUÇÃO

Os processos de oxidação e redução são essenciais para a vida e representam fenômenos normais que ocorrem no metabolismo celular. Entre as substâncias envolvidas nestas reações estão os radicais livres, que são compostos orgânicos ou inorgânicos com um ou mais elétrons não emparelhados na última camada eletrônica, são quimicamente instável e muito reativos [1]. Estudos têm evidenciado o papel dos radicais livres como um dos responsáveis pelo envelhecimento e pelas doenças degenerativas, tais como: câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais [2,3]. Estes são responsáveis também pela diminuição da vida útil dos alimentos e matérias-primas em geral [4].

Compostos antioxidantes são substâncias que, quando presentes em pequenas concentrações em relação ao substrato oxidável, são capazes de retardar ou mesmo inibir a oxidação do substrato [5], podendo ser de origem natural e sintética. Os naturais dividem-se em dois grandes grupos, os enzimáticos e os não enzimáticos, sendo encontrados em produtos vegetais, e destacam-se com relação aos sintéticos, que se acumulam no organismo favorecendo os efeitos mutagênicos e carcinogênicos [6]. Podem ainda causar outros males, como aumento do peso do fígado e proliferação do retículo endoplasmático [4].

A incidência de câncer de pele tem aumentado a cada ano e uma das principais causas é a exposição excessiva ao sol, que gera grande quantidade de energia radiante que se propaga em forma de ondas, onde, quanto mais curto o comprimento de onda mais alta é a quantidade de energia propagada. A maior parte da radiação solar (99%) que atinge a terra é composta de energia não ionizante (infravermelho, visível e ultravioleta) [7]. A radiação ultravioleta é dividida em três regiões distintas: UVC (100-280nm), UVB (280-315nm) e UVA (315-400nm) [8, 9]. A radiação UVC é filtrada pela camada de ozônio da atmosfera, e, portanto, a radiação UV que alcança a superfície terrestre contém apenas UVB e UVA correspondendo a 5% e 95% respectivamente [7,10]. Estas radiações ultravioletas apresentam diferentes atividades sobre os organismos, benéficas ou não. Assim, a fim de evitar os malefícios causados por estas radiações, alguns estudos concentram esforços para avaliar a atividade fotoprotetora que as plantas podem apresentar, aumentando a eficácia dos protetores solares, procurando novas fontes naturais de compostos fotoprotetores que possam substituir ou reduzir as concentrações dos protetores solares tradicionais [11].

Adicionalmente, o conhecimento sobre plantas medicinais simboliza, muitas vezes, o único recurso terapêutico de algumas comunidades e grupos étnicos. A grande biodiversidade brasileira, aliada à legislação atualizada para o registro de medicamentos fitoterápicos, consolida o uso de plantas como primeiro recurso utilizado no tratamento de diversas enfermidades, sendo muitas vezes este uso feito de forma empírica, sem suas propriedades farmacológicas comprovadas [12]. Assim, representam uma opção terapêutica de grande importância para a manutenção das condições de saúde das pessoas, especialmente para a população de baixa renda, com o intuito de substituir ou auxiliar as terapias convencionais no tratamento de várias doenças, pela facilidade de obtenção e pelo baixo custo [1].

Diante deste contexto, o estudo teve como objetivo analisar a atividade antioxidante e fotoprotetora do extrato etanólico de oito espécies de plantas medicinais (*Dalbergia ecastaphyllum*, *Byrsonima gardneriana*, *Erythroxylum revolutum*, *Zanthoxylum rhoifolium*, *Pilocarpus spicatus*, *Lippia microphylla*, *Phyllanthus acuminatus* e *Krameria tomentosa*).

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

A parte aérea das espécies *Dalbergia ecastaphyllum*, *Byrsonima gardneriana*, *Erythroxylum revolutum*, *Zanthoxylum rhoifolium*, *Pilocarpus spicatus*, *Lippia microphylla*, *Phyllanthus acuminatus* e *Krameria tomentosa* foram coletadas em diferentes locais, no estado da Paraíba, Brasil. Uma exsiccata de cada material foi preparada e depositada no Herbário do Departamento de Sistemática e Ecologia (DSE)-UFPE e no Herbário Professor Lauro Pires Xavier da UFPB

(Tabela 1). O material botânico fresco foi desidratado em estufa com ar circulante, durante 72 horas, em temperatura média a 40°C, sendo, em seguida, triturado em moinho mecânico.

Tabela1: Espécies, local e época de coleta do material botânico.

Espécie	Local	Mês/Ano	Número excicata
<i>D. ecastaphyllum</i>	Rio Tinto-PB	Setembro/2010	45738 ^a
<i>B. gardneriana</i>	Serra Branca-PB	Março/2007	AGRA 947 ^b
<i>E. revolutum</i>	Serra Branca-PB	Junho/2010	AGRA 5695 ^b
<i>K. tomentosa</i>	Santa Rita- PB	Junho/2010	AGRA 3271 ^b
<i>P. spicatus</i>	Maturéia-PB	Junho/2011	AGRA 7428 ^b
<i>L. microphylla</i>	Serra Branca-PB	Junho/2010	AGRA 6118 ^b
<i>P. acuminatus</i>	Maturéia-PB	Março/2012	AGRA7432 ^b
<i>Z. rhaifolium</i>	Maturéia-PB	Junho/2011	AGRA 5184 ^b

¹Herbário do Departamento de Sistemática e Ecologia(DSE)-UFPE;

²Herbário Professor Lauro Pires Xavier da UFPB.

Preparo do Extrato

Para obtenção do extrato etanólico bruto (EEB), o pó de cada planta foi macerado em etanol (EtOH) a 95% por 72 horas, sendo tal processo repetido exaustivamente. Em seguida, a solução extrativa foi filtrada e concentrada em evaporador rotativo sob pressão reduzida a 40°C.

Dosagem de compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos totais foram determinados pelo método de Folin -Ciocalteu [14]. Foi utilizado 200 µL da amostra, 1,0 mL do reagente Folin-Ciocalteu (1:10) e após 4 minutos foi adicionado 800 µL de Na₂CO₃ 7,5% (m/v). As amostras foram protegidas da luz e após 120 min de incubação, a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 765 nm, em triplicata. Os resultados do teor de compostos fenólicos totais foram expressos em miligrama equivalente a ácido gálico (GAE mg)/g de peso seco da planta. O ácido gálico (0-500 mg/L) foi utilizado para a curva de calibração.

Capacidade antioxidante total equivalente ao TROLOX

A atividade antioxidante pelo método ABTS foi realizada conforme metodologia descrita por Uchôa [15] com algumas modificações. Este ensaio baseia-se na geração de cromóforo radical catiónico obtido a partir da oxidação de ABTS por persulfato de potássio. A reação de oxidação foi preparada com 7 mM da solução de ABTS mais persulfato de potássio 140 mM (concentração final) e a mistura foi incubada no escuro à temperatura ambiente (23°C - 25 ° C) durante 16 h (tempo necessário para a formação de radicais) antes da sua utilização. Uma vez formado, o radical foi diluído com etanol P.A. até a obtenção do valor de absorbância de 0,7 ± 0,02 na leitura de 734nm. Foi utilizado o trolox como padrão de referência. Os resultados foram expressos em TEAC (capacidade antioxidante equivalente ao Trolox e porcentagem de sequestro do radical).

Determinação do comprimento de onda máximo dos extratos secos

Para determinação do comprimento de onda máximo (λ_{max}), os extratos secos foram diluídos em álcool etílico absoluto PA (Merck) (100mg/L p/v) e realizada varredura entre os comprimentos de onda de 260 a 400nm (Espectrofotômetro FEMTO, modelo 800XI, em cubeta de quartzo de 1,0 cm caminho óptico). O experimento foi realizado em triplicata.

Determinação da atividade fotoprotetora UVB *in vitro*

A atividade fotoprotetora foi avaliada utilizando a leitura espectrofotométrica de soluções diluídas, de acordo com o Método de Mansur [16]. Os extratos foram previamente secos em estufa a 40 °C por 60 minutos e as diluições foram preparadas nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/L, em seguida varreduras de 260 a 400 nm, com intervalos de 5 nm foram realizadas, utilizado um espectrofotômetro (FEMTO, modelo 800XI, em cubeta de quartzo de 1,0 cm caminho óptico). Os cálculos foram realizados considerando os intervalos de λ

$$SPF = FC \cdot \Sigma_{290}^{320} EE(\lambda) \cdot abs(\lambda)$$

determinados por Mansur [16], com base na equação:

- (1) Os valores de $EE(\lambda)$ e $I(\lambda)$ utilizados para o cálculo do FPS (Fator de Proteção Solar) foram os mesmos usados da literatura. Aplicou-se o fator de diluição (Fd) para correção de equivalência dos FPS dos extratos com os valores de referência, onde FC = fator de correção (10), $EE(\lambda)$ = efeito eritemogênico da radiação; $I(\lambda)$ = intensidade do sol; $abs(\lambda)$ = leitura espectrofotométrica da absorbância da solução do filtro solar.

Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os valores foram considerados significativamente diferentes quando houve diferenças entre as médias no nível de 5% ($p < 0,05$). Foi utilizado o software GraphPad Prism®, utilizando a análise por ANOVA one-way com o Bonferroni *post hoc*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante encontrados estão apresentados na Tabela 2. Foram obtidos altos teores de compostos fenólicos, que variaram entre $416,20 \pm 0,04$ e $83,41 \pm 0,01$ (EAG mg/g), e destes, *Krameria tomentosa* e *Lippia microphylla* se destacaram, apresentando valores de $(416,20 \pm 0,04)$ e $(373,48 \pm 0,05)$, respectivamente. Estes resultados demonstram o grande potencial bioativo das plantas estudadas.

Tabela 2: Teor de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e FPS para os extratos etanólicos das espécies estudadas

Espécie	Compostos Fenólicos (EAG mg/g)	TEAC mM de Trolox/g de amostra	ABTS ⁺ (%)
<i>D. ecastaphyllum</i>	$222,72 \pm 0,01^a$	$2203,66 \pm 0,00^a$	$99,84 \pm 0,00^a$
<i>B. gardneriana</i>	$231,55 \pm 0,01^b$	$2206,66 \pm 0,00^b$	$99,68 \pm 0,00^b$
<i>E. revolutum</i>	$251,44 \pm 0,03^c$	$1185,66 \pm 0,00^c$	$84,44 \pm 0,00^c$
<i>Z. rhoifolium</i>	$84,58 \pm 0,11^d$	$850,00 \pm 0,05^d$	$36,54 \pm 0,05^d$
<i>P. spicatus</i>	$167,60 \pm 0,03^c$	$653,33 \pm 0,00^c$	$27,37 \pm 0,00^c$
<i>L. microphylla</i>	$373,48 \pm 0,05^f$	$793,33 \pm 0,01^f$	$33,90 \pm 0,01^f$
<i>P. acuminatus</i>	$83,41 \pm 0,01^g$	$226,66 \pm 0,00^g$	$7,46 \pm 0,00^g$
<i>K. tomentosa</i>	$416,20 \pm 0,04^h$	$2133,33 \pm 0,00^h$	$96,42 \pm 0,00^h$

Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão. OBS: as médias com letras diferentes dentro da mesma coluna apresentam diferença significativa entre si ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Bonferroni.

Não foram encontrados estudos anteriores de caracterização química, doseamento de compostos fenólicos, atividade antioxidante e cálculo de FPS da espécie *Krameria tomentosa*, sendo este estudo de grande relevância para a aplicação medicinal desta espécie. Com $416,20 \pm 0,04$ EAG mg/g o extrato da parte aérea de *K. tomentosa* destaca-se entre as outras espécies que possuem um conhecido teor de compostos fenólicos, como o “umbuzeiro” (*Spondias tuberosa*), que apresentou $100,07 \pm 0,02$ mg EAG/g do extrato metanólico das folhas [15]; a “cabaça” (*Crescentia cujete*), que apresentou $50,47 \pm 0,08$ mg EAG/g da fração metanólica do extrato etanólico das folhas [17]; o “caroá” (*Neoglaziovia variegata*), que apresentou $223,70 \pm 10,56$ mg

EAG/g do extrato etanólico das flores [11]; e a “atemoia” (*Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.), que apresentou $207,80 \pm 7,21$ mg EAG/g do extrato etanólico dos talos [18].

Atualmente, espécies vegetais que contêm altos teores de compostos fenólicos são alvos de interesse, devido à potencial propriedade antioxidante destas substâncias, como também por atuarem como poderosos agentes anti-infecciosos [19], anti-inflamatórios e anti-carcinogênicos, como resultado da sua atividade antioxidante [20]. Os compostos fenólicos são antioxidantes primários que promovem a remoção ou inativação dos radicais livres por meio da doação de átomos de hidrogênio, inibindo, assim, as reações em cadeia [21].

Para o ensaio utilizando o radical ABTS⁺, valores significativos foram obtidos para o TEAC que variaram entre de 2.206,66 mM a 226,66 mM e percentual de sequestro do radical de 99,86% a 7,46% (Tabela 2). Dos oito extratos etanólicos, três se destacaram *Dalbergia ecastaphyllum*, *Byrsonima gardneriana* e *Krameria tomentosa*, apresentando valores respectivos de TEAC de 2.206,66 mM, 2.203,66 mM e 2.133,33 mM e inibição de 99,84%, 99,68% e 96,44%.

Estudos anteriores identificaram flavonoides no extrato de *Dalbergia ecastaphyllum*, como rutina, isoliquiritigenina, formononetina, biochanina A, pinocembrina, liquiritigenina e medicarpina [22, 23, 24]. Teores de fenólicos de $(11,05 \pm 0,128)$ EAG em g/100 g de extrato seco), também foram encontrados na fração acetato de etila do extrato desta planta, sendo estes caracterizados como flavonoides e taninos por análise em cromatografia em camada delgada [25], valores menores do que os encontrados neste estudo (222,72 EAG mg/g).

Estudos recentes apontam para o potencial terapêutico de plantas [26, 27, 28, 29]. De acordo com os valores apresentados na Tabela 2, pode-se verificar que os extratos analisados possuem um elevado potencial antioxidante, em comparação com outras espécies da família Fabaceae, como *Stryphnodendron pulcherrimum*, *Myroxylon peruiferum* e *Abarema cochliocarpos*, que apresentaram um menor percentual de inibição variando entre 75,69% a 20,92% [1].

Visando avaliar o potencial fotoprotetor das espécies estudadas, foi determinado o comprimento de onda máximo de absorção no espectro de ultravioleta dos extratos, sendo observado absorvância máxima variando entre os comprimentos de onda de 285 nm a 260 nm na concentração de 100mg/L, como demonstrado na Tabela 3 e Figura 1.

Tabela 3 – Comprimentos de onda máximos (λ_{Max}) apresentados pelos extratos analisados

Espécie	Máximo λ (nm) na concentração de 100mg/mL	FPS*
<i>Dalbergia ecastaphyllum</i>	285	$5,38 \pm 0,009^a$
<i>Byrsonima gardneriana</i>	280	$9,73 \pm 0,018^b$
<i>Erythroxylum revolutum</i>	281	$4,92 \pm 0,007^c$
<i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	281	$4,53 \pm 0,006^s$
<i>Pilocarpus spicatus</i>	269	$4,44 \pm 0,020^e$
<i>Lippia microphylla</i>	283	$6,78 \pm 0,010^f$
<i>Phyllanthus acuminatus</i>	260	$4,55 \pm 0,007^s$
<i>Krameria tomentosa</i>	267	$6,62 \pm 0,040^d$

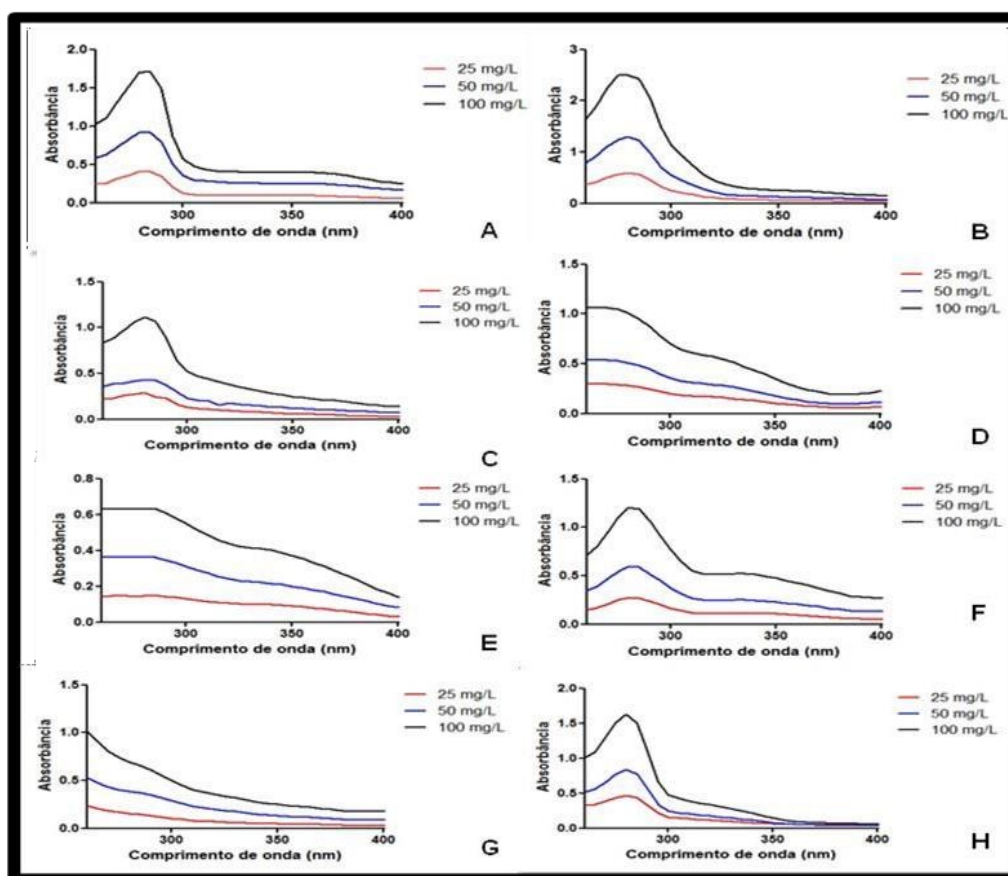


Figura 1 - Perfil de absorbância dos extratos nos comprimentos de onda de 260 a 400nm. A (*D. ecastaphyllum*), B (*B. gardneriana*), C (*E. revolutum*), D (*Z. rhoifolium*), E (*P. spicatus*), F (*L. microphylla*), G (*P. acuminatus*), H (*K. tomentosa*).

A absorção de uma substância em regiões diferentes do espectro ultravioleta é resultante de sua natureza química, sendo que as plantas que se destacam por possuírem uma ampla absorção de radiação na região ultravioleta são, em sua maioria, produtoras de uma mistura complexa de metabólitos secundários, destacando-se os compostos fenólicos, tais como flavonoides, taninos e antraquinonas [30]. Dos oito extratos etanólicos analisados, cinco apresentaram absorbância máxima na região de radiação UVB (*Dalbergia ecastaphyllum*, *Byrsonima gardneriana*, *Erythroxylum revolutum*, *Lippia microphylla* e *Zanthoxylum rhoifolium*) e os demais apresentaram absorbância máxima na região UVC (Tabela 3). O extrato de *Annona crassiflora* apresentou banda de absorção máxima próxima a 360 nm, região de radiação UVA, cujos raios têm sido extensivamente relacionados ao câncer de pele, fotoimunossupressão e fotoenvelhecimento [31].

O espectro de absorção dos flavonoides, quando dispersos em etanol, apresenta-se tipicamente com dois picos, sendo um entre 240 a 280 nm e o outro nos comprimentos de onda de 300 a 550 nm [32]. Dos extratos analisados, apenas os espectros obtidos com extratos de *Zanthoxylum rhoifolium* e *Phyllanthus acuminatus* apresentaram picos de absorbância característicos para flavonoides. Análises realizadas em extratos de *P. acuminatus* mostraram a presença de flavonoides, taninos, saponinas, esteroides, triterpenoides, cumarinase outros terpenoides [33], corroborando os resultados deste estudo. Em amostras de *Zanthoxylum rhoifolium*, já foram isolados os flavonoides hesperidina [34], vitexina e isovitexina [35], substâncias que apresentam atividade anti-inflamatória [36], vasoprotetora [37] e moduladora das células envolvidas na inflamação [38].

Nos espectros de varreduras obtidos com os extratos analisados (Figura 1), pode-se então observar que os extratos das espécies estudadas mostraram bandas características de absorção em UVB, já que houve absorbância entre os comprimentos de onda de 290 e 320 nm. Foi verificado que ocorreu um aumento na absorbância com o aumento da concentração, sendo para todas as amostras os melhores resultados foram obtidos na concentração de 100mg/mL.

Dessa forma, todas as espécies estudadas apresentam-se com um possível potencial fotoprotetor.

Os valores de FPS foram calculados de acordo com Mansur [16] e são exibidos na Tabela 3. Os extratos etanólicos da parte aérea das plantas em estudo apresentaram FPS que variaram entre $9,73 \pm 0,018$ e $4,44 \pm 0,020$.

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (*Resolução RDC nº 30 de 1 de junho de 2012*), o valor mínimo para FPS deve ser acima de 6,0 [39]. Três extratos analisados neste estudo apresentaram valores de FPS maiores que os estabelecidos pela ANVISA, *Byrsonima gardneriana*, *Lippia microphylla* e *Krameria tomentosa* ($9,73 \pm 0,018$; $6,78 \pm 0,010$ e $6,62 \pm 0,040$), respectivamente, e todos os extratos apresentaram valores de proteção solar maiores que o recomendado pela Food and Drug Administration (FDA) dos EUA, que considera como um

protetor solar, uma formulação com valor de FPS maior do que 2. No entanto, para garantir uma proteção adequada e minimizar os riscos e danos à pele, a FDA recomenda a utilização de protetores solares com um valor FPS igual ou superior a 15, combinado com outras medidas de proteção [40].

Atualmente, vem-se aumentando o interesse em estudar compostos naturais para determinar se cumprem este requisito, podendo, assim, ser classificados como "protetores solares verdes". Quando comprovada a capacidade de absorver a radiação solar, os antioxidantes podem intensificar a proteção final do produto e ou neutralizar os radicais livres produzidos na pele após exposição ao sol [41, 42, 43, 44]. A inclusão de produtos naturais em formulações fotoprotetoras é uma tendência [45], e diversas pesquisas têm priorizado a análise de constituintes químicos contendo cromóforos e compostos com atividade antioxidante [31], como os compostos fenólicos, principalmente os flavonoides [45], substâncias estas encontradas nos extratos em estudo que podem ser usados em associação com filtros químicos, o que traria benefícios à formulação como: aumento da fotoproteção e fornecimento de diversos metabólitos secundários com importantes propriedades antioxidantes.

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados evidenciados neste estudo conclui-se que os extratos etanólicos apresentaram um elevado potencial antioxidante, destacando as espécies *K. tomentosa* e *L. microphylla* para a análise dos compostos fenólicos totais e *D. ecastaphyllum*, *B. gardneriana* e *K. tomentosa* para o ensaio do radical ABTS⁺. Para a análise de fotoproteção, os extratos de *D. ecastaphyllum*, *B. gardneriana*, *E. revolutum*, *L. microphylla* e *Z. rhoifolium* apresentaram absorvância máxima na região de radiação UVB, e os demais apresentaram absorvância máxima na região UVC. Todos os extratos apresentaram potencial para FPS e podem ser utilizados na cosmetologia, proporcionando diversos benefícios.

AGRADECIMENTO

Os autores reconhecem o apoio dado pelo Laboratório de Produtos Naturais e Laboratório Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), bem como aos Herbários do Departamento de Sistemática e Ecologia (DSE)-UFPE e Professor Lauro Pires Xavier da UFPB.

REFERÊNCIAS

- [1] Lins-Neto, J.R., Uchôa, A.D.A., Moura, P.A., Bezerra-Filho, C.M., Tenório, J.C.G., Silva, A.G., Ximenes, R.M., Silva, M.V. and Correia, M.T.S. (2016) Phytochemical screening, total phenolic content and antioxidant activity of some plants from Brazilian flora. *Journal of Medicinal Plants Research*, 10, 409-416. <http://dx.doi.org/10.5897/JMPR2015.5979>
- [2] Atoui, A. K., Mansouri, A., Boskou, G. and Kefalas, P. (2006) Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, 827-36.
- [3] Gomez-Pinilla, F. and Nguyen, T.T. (2012) Natural mood foods: the actions of polyphenols against psychiatric and cognitive disorders. *Nutritional Neuroscience*, 15, 127-

33. <http://dx.doi.org/10.1179/1476830511Y.0000000035>

[4] Novaes, G.M., Silva, M.J.D., Achkar, M.T. and Vilegas, W. (2013) Compostos antioxidantes e sua importância nos organismos. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*, 11, 535-539. http://periodicos.unincor.br/index.php/revistaunincor/article/download/1150/pdf_85

[5] Niki, E. (2010). Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*, 49, 503-515. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.016>

[6] Birch, A.E. et al. (2001) Antioxidant properties of evening primrose seed extracts. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 4502-4507.

[7] Maier, T. and Korling, H.C. (2005) Sunscreens – which and what for? *Skin Pharmacology and Physiology*, 18, 253-62. https://epub.ub.uni-muenchen.de/16351/1/10_1159_000087606.pdf

[8] Polonini, H.C., Raposo, N.R.B. and Brandão, M.A.F. (2011) Fotoprotetores naturais como instrumento de ação primária na prevenção de câncer de pele. *Revista APS*, 14, 216-223. <https://aps.uff.emnuvens.com.br/aps/article/viewFile/1081/478>

[9] Costa, S.C.C., Detoni, C.B., Branco, C.R.C., Botura, M.B. and Branco, A. (2015) *In vitro* photoprotective effects of *Marcetia taxifolia* ethanolic extract and its potential for sunscreen formulations. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 25, 413-418. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2015.07.013>

[10] Kullavanijaya, P. and Lim, H.W. (2005) Photoprotection. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 32, 937-958. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2004.07.063>

[11] Oliveira-Júnior, R.G., Araújo, C.S., Santana, C.R.R., Souza, G.R., Lima-Saraiva, S.R.G., Guimarães, A. L., Oliveira, A.P., Siqueira-Filho, J.A., Pacheco, A.G.M. and Almeida, J.R.G.S. (2012). Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activity of extracts from the flowers of *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae). *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 4, 4489-4494. <http://www.jocpr.com/articles/phytochemical-screening-antioxidant-and-antibacterial-activity-of-extracts-from-the-flowers-of-neoglaziovia-variegata-br.pdf>

[12] Silva, M.S., Leite, K.R.B. and Saba, M.D. (2012) Anatomia dos órgãos vegetativos de *Hymenaea martiana* Hayne (Caesalpinioideae- Fabaceae): espécie de uso medicinal em Caetité-BA. *Brazilian Journal of Medicinal Plants*, 14, 673-679. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722012000400015>

[13] Lima, L.R. et al. (2013) Assessment of the antiedematogenic, antimicrobial and mutagenic activity of *Amburana cearensis* seeds (A.C. Smith) (Imburana-de-cheiro). *Brazilian Journal of Medicinal Plants*, 15, 415-422. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722013000300015>

[14] Li, A.B., Wonga, C.C., Ka-Wing, C. and Chen, F. (2008) Antioxidant Properties in Vitro and Total Phenolic Contents in Methanol Extracts from Medicinal Plants. *Swiss Society of Food Science and Technology*, 41, 385-390. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2007.03.011>

[15] Uchôa, A.D.A., Oliveira, W.F., Pereira, A.P.C., Silva, A.G., Cordeiro, B.M.P.C., Malafaia, C.B., Almeida, C.M.A., Silva, N.H., Albuquerque, J. F.C., Silva, M.V. and Correia, M.T.S. (2015) Antioxidant activity and phytochemical profile of *Spondias tuberosa* Arruda leave extracts. *American Journal of Plant Sciences*, 6, 3038-3044. <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2015.619298>

[16] Mansur, J.S., Breder, M.N.R., Mansur, M.C.A., Azulay, R.D. (1986). Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 61, pp.121-124.

[17] Parente, F.G.G., Oliveira, A.P., Rodrigues, C.M.S.C., Oliveira-Júnior, R.G., Paulo, I.M.M., Nunes, X.P., Delange, D.M. and Almeida, J.R.G.S. (2016) Phytochemical screening and antioxidant activity of methanolic fraction from the leaves of *Crescentia cujete* L. (Bignoniaceae). *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8, 231-

236. <http://www.jocpr.com/articles/phytochemical-screening-and-antioxidant-activity-of-methanolic-fraction-from-the-leaves-of-crescentia-cujete-l-bignoniaceae.pdf>
- [18] Rabêlo, S.V., Costa, M.M., Libório, R.C. and Almeida, J.R.G.S. (2014) Atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de atemoia (*Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36, 265-271. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452014000500031>
- [19] Saleem, M., Nazir, M., Ali, M.S., Hussain, H., Lee, Y.S., Riaz, N. and Jabbar, A. (2010) Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. *Natural Product Reports*, 27, 238-254. <https://dx.doi.org/10.1039/b916096e>
- [20] Krishnaiah, D., Sarbatly, R. and Nithyanandam, R. (2011) A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioprocess Processing*, 89, 217-233. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2010.04.008>
- [21] Heleno, S.A., Martins, A., Queiroz, M.J.R.P. and Ferreira, I.C.F.R. (2015) Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: a review. *Food Chemistry*, 173, 501-513. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.057>
- [22] Silva, B. B., Rosalen, P.L., Cury, J.A., Ikegaki, M., Souza, V.C., Esteves, A. and Alencar, S.M. (2008) Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, 5, 313-316. <https://dx.doi.org/10.1093/ecam/nem059>
- [23] Dausch, A., Moraes, C.S.; Fort, P. and Park, Y.K. (2008) Brazilian red propolis – Chemical composition and botanical origin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, 5, 435-441. <https://dx.doi.org/10.1093/ecam/nem057>
- [24] Araújo, J.M.E. (2014) Caracterização química e atividade leishmanicida dos extratos hidroetanólicos de própolis vermelha e *Dalbergia ecastophyllum* (Fabaceae). Dissertation, Federal University of Sergipe, Aracaju.
- [25] Aresi, C. (2011) Avaliação da potencial atividade antimicrobiana de produtos de origem natural: estudo bioguiado de *Dalbergia ecastophyllum* L. Taub. Dissertation, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis.
- [26] Ribeiro, D.A., Macêdo, D.G., Oliveira, L.G.S., Saraiva, M.E., Oliveira, S.F., Souza, M.M.A. and Menezes, I.R.A. (2014) Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil. *Brazilian Journal of Medicinal Plants*, 16, 912- 930. http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/13_059
- [27] Cordeiro, J.M.P. and Félix, L.P. (2014) Botanical medical knowledge of native species of the Caatinga and spontaneous plants in the Agreste region of the state of Paraíba, Brazil. *Brazilian Journal of Medicinal Plants*, 16, 685-692. http://dx.doi.org/10.1590/1983-084x/13_077
- [28] Silva, C.G., Marinho, M.G.V., Lucena, M.F.A. and Costa, J.G.M. (2015) Ethnobotanical survey of medicinal plants in the Caatinga area in the community of Sitio Nazaré, Milagres, Ceará, Brazil. *Brazilian Journal of Medicinal Plants*, 17, 133-142.
- [29] Silva, A. G., Silva, L. C. N., Bezerra Filho, C.M., Araújo, D. R. C., Silva, J. F. V., Arruda, I. R., Araújo, J. M., Correia, M. T. S., Macedo, A. J. and Silva, M. V. (2013). Antimicrobial activity of medicinal plants of the Caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil. *Current Topics in Phytochemistry* 94.
- [30] Violante, I.M.P., Souza, I.M., Venturini, C.L., Ramalho, A.F.S., Santos, R.A.N. and Ferrari, M. (2009) Avaliação *in vitro* da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 19, 452-457. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2009000300020>
- [31] Polonini, H.C., Lima, L.L., Gonçalves, K.M., do Carmo, A.M., da Silva, A.D. and Raposo,

- N.R.(2013). Photoprotective activity of resveratrol analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21, 964-968. <https://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2012.11.052>
- [32] Bobin, M. F., Raymond, M. and Martini, M.C. (1994) UVA/UVB absorption properties of natural products. *Cosmetics & Toiletries*, 109, 63-78.
- [33] Cárdenas-López, D., Marín Corba, C.A. and Suárez, L.S. (2002) Plantas útiles de Lagarto Cocha y Serranía de Churumbelo en el departamento de Putumayo. Bogotá, D.C. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas, Colombia.
- [34] Arruda, M.S.P., Fernandes, J.B., Vieira, P.C., Silva, M.F.G.F. and Pirani, J.R. (1992) Chemistry of *Zanthoxylum rhoifolium*: A new Secofuroquinoline Alkaloid. *Biochemical Systematics and Ecology*.
- [35] Krause, M.S., Bonetti, A.F., Turnes, J.M., Dias, J.F.G., Miguel, O.G., Duarte, M.R. (2013) Phytochemistry and biological activities of *Zanthoxylum rhoifolium* Lam., Rutaceae - Mini review. *Visão Acadêmica*, 14, 2013. <http://dx.doi.org/10.5380/acd.v14i4.33992>
- [36] Cazarolli, L. H., Zanatta, L., Alberton, E. H. and Figueiredo, M. S. R. B. (2008) Flavonoids: prospective drug candidates. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 8, 1429.
- [37] Servier do Brasil. (2017) Product informations (Daflon® 500 mg). http://servier.com.br/sites/default/files/microsoft_word_14.06.17_bula_paciente_sem_marcacao_daflon_1000_aprovada_anvisa_aprovada_claire_1.pdf
- [38] Li, S. Y., Ping, G.; Geng, L., Seow, W. K. and Thong, Y. H. (1994) Immunopharmacology and toxicology of the plant flavonoid baohuoside-1 in mice. *International Journal of Immunopharmacology*, 16, 227. [http://dx.doi.org/10.1016/0192-0561\(94\)90016-7](http://dx.doi.org/10.1016/0192-0561(94)90016-7)
- [39] Brazil. National Health Surveillance Agency (ANVISA) (2012). *Resolução RDC nº 30 de 1 de junho de 2012. Aprova o Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos e outras providências.*
- [40] FDA - Food and Drug Administration. (2013) Sunscreen drug products for over-the-counter human use.
- [41] Souza, F.P., Campos, G.R., Packer, J.F. (2013) Determinação da atividade fotoprotetora e antioxidante em emulsões contendo extrato de *Malpighia glabra* L. – Acerola. *Revista De Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 34, 69-77.
- [42] Nascimento, C.S., Nunes, L.C.C., Lima, A.A.N., Grangeiro-Júnior S. and Rolim-Neto, P.J. (2009) Incremento do FPS em formulação de protetor solar utilizando extratos de própolis verde e vermelha. *Revista Brasileira de Farmácia*, 90.
- [43] Dal'Belo, S.E. (2008) Avaliação da eficácia fotoprotetora, penetração cutânea e segurança de formulações cosméticas contendo extratos de Chá Verde e Ginkgo Biloba. Dissertation, University of São Paulo, São Paulo.
- [44] Chiu, A.E. and Kimball, A.B. (2003) Topical vitamins, minerals and botanical ingredients as modulators of environmental and chronological skin damage. *The British Journal of Dermatology*, 149, 681-91.
- [45] Oliveira-Júnior, R.G. and Almeida, J.R.G.S. (2012) Prospecção tecnológica de fotoprotetores derivados de produtos naturais. *Revista GEINTEC*, 3, 32-45.

3.3 JUSTICIDIN B: ATIVIDADE ANTI-*TRICHOMONAS VAGINALIS* E PERFIL CITOTÓXICO

Justicidin B: atividade anti-*Trichomonas vaginalis* e perfil citotóxico.

RESUMO

Tricomoníase é a doença, não viral, sexualmente transmitida, mais prevalente no mundo, estando associada a sérias consequências à saúde. Nos últimos anos o aumento do surgimento de isolados de *T. vaginalis* resistentes aos fármacos 5-nitroimidazóis tornou-se um agravante para o sucesso do tratamento da doença. A lignana Justicidin B pertence ao subgrupo arilnaftaleno e ocorre em diferentes espécies, como por exemplo, em *Phyllanthus acuminatus* Vahl. Não foram encontrados estudos na literatura sobre *T. vaginalis* e Justicidin B, desta forma este estudo teve como objetivo analisar a atividade de Justicidin B anti-*Trichomonas vaginalis* (JT), analisar o perfil citotóxico da molécula, frente a eritrócitos e modelo biológico de *Galleria mellonella*, bem como, para linhagens padrão de HeLa (ATCC® CCL-2™) e fibroblastos (CCD1072Sk) pelo método MTT. Para análise da atividade anti-*T. vaginalis* observou-se IC₅₀ de 7,2µg/mL, a inibição de crescimento nas concentrações de 10µg/mL e 20µg/mL foi mais significativa após 24 horas, conseguindo inibir o crescimento dos trofozoítos em mais de 68% e 85%, respectivamente. Para a viabilidade celular para HeLa, os resultados mostraram que a molécula apresentou atividade anticancerígena promissora, uma vez que nas concentrações de 20, 100 e 500 µg/mL os percentuais foram de 57,17; 15,76 e 1,95 respectivamente. A IC₅₀ da Justicidin B em células HeLa foi de 17,49 µg/mL. Para fibroblastos os resultados evidenciaram ausência de toxicidade nas concentrações 20 e 100 µg/mL, pois os percentuais foram de 90,65 e 75,36, respectivamente. Para *G. mellonella* não foi observada morte ou injúria visível nas larvas após cinco dias de análise e as taxas de sobrevivência foram de 100%, para as concentrações estudadas 10, e 50 mg/kg da larva. Para os eritrócitos a molécula não foi considerada ativa, pois após uma hora de incubação em temperatura ambiente e constante agitação, a taxa de hemólise foi negativa para todas as concentrações.

Palavra-chave: Justicidin B; Atividade anti-*Trichomonas vaginalis*; Atividade citotóxica.

INTRODUÇÃO

Tricomoníase é a doença não viral, sexualmente transmitida, mais prevalente no mundo (WHO, 2001). Causada pelo parasito extracelular *Trichomonas vaginalis* (Donné, 1836), é a única espécie patogênica do gênero *Trichomonas* que tem distribuição mundial (BHESANIA; NARAYANKHEDKAR, 2016). Apresenta manifestações clínicas diferentemente em homens e mulheres. No sexo masculino, na maioria dos casos,

a doença é assintomática, e quando sintomática, as queixas ocorrem na genitália externa, próstata e epidídimo. Podem ocorrer corrimentos mucopurulentos, disúria e pouco prurido ou ardência, imediatamente após relações sexuais (BENCHIMOL, 2004; PETRIN et al., 1998; CUDMORE et al., 2004). Já no sexo feminino, as manifestações clínicas começam com prurido local com corrimento vaginal espumoso, amarelo ou esverdeado e mucopurulento, dor abdominal baixa e disúria, podendo atingir um estado severo de vaginite. Pode ainda apresentar-se assintomática, porém, um terço desses casos torna-se sintomático em até seis meses (FICHOROVA, 2009; CUDMORE et al., 2004). A tricomoniase pode causar sérias consequências à saúde, como complicações na gravidez (KLEBANOFF et al., 2001), aumento da predisposição ao câncer cervical (VIAKKI et al., 2000), aumento da doença inflamatória pélvica (CHERPES et al., 2006), bem como está associada ao aumento da transmissão do HIV (SORVILLO, 2001).

Os fármacos de escolha na terapia anti *T. vaginalis* pertencem ao grupo dos 5-nitroimidazóis (HELMS et al., 2008), que causam efeitos carcinogênicos, teratogênicos e reações adversas. Além disso, o aumento do surgimento de isolados clínicos ou laboratoriais de *T. vaginalis* resistentes a esses fármacos torna-se um agravante para o sucesso do tratamento da doença (GOLDMAN et al., 2009). Diante dessa situação torna-se necessária a investigação do uso de moléculas e produtos naturais bioativos para fins terapêuticos.

Os extratos de *Phyllanthus* têm compostos secundários como alcalóides, flavonóides, lignanas, flavonóides, taninos e terpenos, entre outros, e muitos dos constituintes ativos são atribuídos biologicamente a estes metabólitos (KOMURAIAH, et al. 2009). A lignana Justicidin B pertence ao subgrupo arilnaftaleno e ocorre em diferentes espécies. Em *Phyllanthus acuminatus* é encontrada na raiz e na parte aérea (PETTIT et al., 1984; PETTIT; SCHAUFELBERGER, 1988). Importantes atividades farmacológicas têm sido relatadas para Justicidin B (HEMMATI; SERADJ, 2016) como, por exemplo, efeitos citotóxicos em diferentes linhagens neoplásicas, atividades antiprotozoárias, inibição da absorção óssea e propriedades antiplaquetárias e antitumorais (ASANO et al., 1996; GERTSCH et al., 2003; LUO et al., 2014). Estas atividades demonstram que, esta molécula desempenha um importante papel terapêutico, resultando num interesse considerável em relação à sua

produção. Não encontramos estudos na literatura sobre *T. vaginalis* e Justicidin B, dessa forma este estudo teve como objetivo analisar a atividade anti-*Trichomonas vaginalis* de Justicidin B, bem como, analisar o perfil citotóxico da molécula frente a linhagens padrão de HeLa (ATCC® CCL-2™), fibroblastos (CCD1072Sk) e eritrócitos, bem como ao modelo biológico de *Galleria mellonella*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Parte aérea da espécie *Phyllanthus acuminatus* Vahl foi coletada no município de Maturéia em março de 2012, no estado da Paraíba, Nordeste do Brasil. Uma amostra encontra-se depositada (AGRA7432) no Herbário Professor Lauro Pires Xavier da Universidade Federal da Paraíba-UFPB.

Extração da Justicidin B

O material botânico fresco (4 kg) foi seco, triturado e submetido à maceração exaustiva com EtOH (95%) por 3 vezes a cada 72 h. Após este processo, o extrato foi concentrado sob pressão reduzida a 400 para obter 80g do resíduo. O extrato bruto de EtOH (50 g) foi fracionado num funil de separação (hexano, AcOEt 8: 2 e 1: 1, 2: 8, AcOEt, AcOEt / MeOH 1: 1 e MeOH): Frações (hexano/ AcOEt 8:2). Para obtenção do composto de justicidin B 2,64g foram submetidos a CC (SiO₂, hexano, hexano / AcOEt, AcOEt).

Cultivo *in vitro* de *Trichomonas vaginalis*

A cepa de *T. vaginalis* JT foi isolada no Hospital Universitário da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil e tem sido mantida em cultura desde 1980. Os trofozoítos de *T. vaginalis* foram cultivados axenicamente em tubos contendo 7 mL de meio TYM (Diamond, 1957) acrescido de 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor (60°C por 1 hora). As culturas foram mantidas

em estufa a 37°C por 24 horas e o meio foi trocado após este período, que corresponde à fase logarítmica de crescimento. O meio TYM utilizado foi composto de 22 mg/ml de triptose, 11 mg/ml de extrato de levedura, 5,6 mg/mL de maltose, 1 mg/mL de L-cisteína, 0,2 mg/mL de ácido ascórbico 0,9 mg/mL de fosfato de potássio monobásico e 0,9 mg/ml de fosfato de potássio dibásico. Após adicionar os componentes acima, o pH foi ajustado para 6,2 e o meio autoclavado a 120°C por 20 minutos. Todas as observações de células vivas foram realizadas por microscopia óptica de contraste de fase, utilizando microscópio óptico invertido Axiovert, Zeiss. Os ensaios quantitativos de susceptibilidade para avaliação da atividade anti-Trichomonas foram realizados em eppendorf, utilizando-se três concentrações da Justicidin B (1, 10, 20 µg/mL). Foram utilizados 5×10^4 trofozoítos/mL em um volume final de 1 mL, incubados por 24 h, e a contagem foi realizada em câmara de Neubauer.

Cultivo *in vitro* de HeLa e Fibroblastos

Células de HeLa (ATCC® CCL-2™) e fibroblastos (CCD1072Sk) foram mantidos em laboratório, em meio DMEM suplementado de soro fetal bovino a 10%. O cultivo foi realizado em garrafas de 25 cm² e as células foram incubadas em estufa úmida com 5% de CO₂ a 37°C. Para os testes de viabilidade, as células foram cultivadas em placas de 24 poços, e os experimentos realizados quando atingida uma confluência de 70-80%. O meio de cultura foi trocado a cada dois dias e a proliferação foi controlada por um microscópio óptico invertido Axiovert, Zeiss.

Atividade citotóxica

Para analisar o efeito da Justicidin B sobre a capacidade redutora do 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium brometo (MTT) pelo metabolismo celular de HeLa e Fibroblastos, as células foram tratadas com solução de diferentes concentrações da molécula e avaliadas pelo método proposto por Mosmann (1983). Este método é baseado na redução do MTT a

cristais de formazan pelas células vivas. Aproximadamente 5×10^4 células foram colocadas em placa estéril de 96 poços para um volume final de 100 μL de meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Posteriormente, as células foram incubadas em diferentes concentrações da molécula (20, 100, 500 $\mu\text{g/mL}$). Após 24 horas, MTT (5 mg/mL) foi adicionado às células sendo incubadas por mais quatro horas. Após este período, o meio foi aspirado e adicionado 100 μL de HCl 0,04 N em álcool isopropílico para dissolver os cristais de formazan formados. A absorbância foi lida em leitor de placa de 96 poços em comprimento de onda de 562nm. O ensaio foi realizado em triplicata e em três experimentos independentes. O cálculo de inibição da proliferação celular foi realizado em comparação com o controle contendo células não tratadas pela molécula. Para os diversos cálculos matemáticos dos resultados foi utilizado o software GraphPad Prism 5.0.

Ensaio citotóxico em *Galleria mellonella*

Foram preparadas soluções-mãe da molécula nas concentrações de 10 e 50 mg/kg da larva, utilizando água como veículo. Para cada concentração, três grupos de dez larvas de *G. mellonella* foram selecionados aleatoriamente (pesando 0,22 g - 0,28 g), em seguida foi injetado em cada larva 10 μL por diluição utilizando seringa Hamilton (Sigma 60 Aldrich®, EUA). Um grupo de 10 larvas foi utilizado para o controle positivo (10 μL de água) e outro grupo de 10 larvas, como controle negativo (10 μL de DMSO). As larvas foram incubadas a 37 °C em placas de Petri e a taxa de mortalidade foi observada a cada 24 horas, durante 120 horas. As larvas foram consideradas mortas quando estavam imóveis, ou não conseguindo reorientar-se quando colocadas em sentido dorsal, ou ainda, quando apresentaram-se sem resposta ao toque. O experimento foi realizado em triplicata.

Atividade hemolítica

Para o ensaio da atividade hemolítica o concentrado de hemácia foi obtido coletando-se 5ml de sangue venoso humano, de um indivíduo adulto aparentemente saudável. Os eritrócitos humanos foram lavados três vezes com

0,9% de NaCl. A Justicidin B foi preparada nas concentrações de 20, 100, 500 µg/ml, diluídos com DMSO e NaCl 0.9%, em seguida foram adicionado eritrócidos a 2%. A mistura foi deixada em repouso à 37°C, por 60 minutos e posteriormente foi centrifugada por cinco minuto a 3000 rpm. Como controle positivo foi utilizado sangue com Triton X-100 a 0,1% e como controle negativo foi utilizado sangue, DMSO e NaCl 0.9%. Posteriormente, a mistura foi centrifugada por cinco minutos a 3000 rpm, sendo 200µL do sobrenadante transferidos para uma placa de 96 poços. A absorbância foi medida a 570 nm. O experimento foi realizado em triplicata e a percentagem de hemólise foi calculada usando a seguinte equação:

$$\text{Hemólise} = (A - A_0) / (AX - A_0) \times 100;$$

Onde: A é o valor obtido pela leitura da Densidade Ótica (OD570) com a solução do extrato; A0 é OD 570 em NaCl; e AX é OD 570 nm com 0,1% de Triton X-100.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade anti-*Trichomonas vaginalis*

Na análise da atividade anti-*T. vaginalis*, três concentrações da Justicidin B foram testadas. Observou-se que as concentrações 10µg/mL e 20µg/mL tiveram o efeito mais significativo na inibição de crescimento após 24 horas, conseguindo inibir o crescimento dos trofozoítos em mais de 68% e 85%, respectivamente. O DMSO utilizado pra diluir a molécula não interferiu nos resultados, pois seu controle apresentou-se equivalente ao controle negativo (Tabela 1). Esses resultados sugerem ainda que, de acordo com os dados, a IC₅₀ é 7,2µg/mL, porém, para uma confirmação mais efetiva, faz-se necessária a realização de estudos adicionais como a curva de morte. O efeito anti- *T. vaginalis* da Justicidin B, pode ser considerado moderado uma vez que a dose citotóxica é baixa, da ordem micromolar.

Hemmati e Seradj (2016) realizaram uma revisão sobre a Justicidin B, não encontrando nenhum estudo da atividade da molécula contra *Trichomonas vaginalis*. Porém, Gertsch e colaboradores (2003) analisaram a atividade antiprotozoária da Justicidin B e observaram atividade moderada para outros

protozoários como *T. Cruzi*, com IC₅₀ de 2,6 µg/ML, em comparação ao benidazol como controle positivo e atividade forte contra a forma tripomastigota de *T. brucei rhodesiense*, com IC₅₀ de 0,2 µg/mL.

Tabela 1: Percentual de inibição de *T. vaginalis*, frente à Justicidin B.

Controle 20 µg/mL	Controle DMSO 20 µg/mL	Justicidin B (% inibição)		
		1 µg/mL	10 µg/mL	20 µg/mL
100,00	96,30	24,2	68,9	84,51

Atividade citotóxica de HeLa e Fibroblastos pelo ensaio de MTT

A citotoxicidade foi definida por Nardone (1977) como sendo: “O conjunto de alterações da homeostase celular que provoca uma série de modificações que interfere na capacidade adaptativas células, bem como na sua sobrevivência, multiplicação e realização de suas funções metabólicas”. Os ensaios toxicológicos convencionais são muitas vezes lentos e trabalhosos, tornando-se impraticáveis, em contrapartida os ensaios colorimétricos podem ser miniaturizados em microplacas, sendo um método quantitativo usado para avaliação de células viáveis. No método colorimétrico MTT a coloração amarelada é reduzida a cristais de formazan de cor púrpura, por meio de enzimas redutases. A concentração dos cristais formados é diretamente proporcional à concentração das células viáveis em um ensaio, ou seja, quanto maior for a intensidade do roxo, maior será a quantidade de células vivas (FONSECA, 2006; GALDINO et al., 2014).

Para a viabilidade celular de células de Câncer Cervical (HeLa) frente a Justicidin B, os resultados mostraram que a molécula apresentou atividade anticancerígena promissora, uma vez que nas concentrações de 20, 100 e 500 µg/mL, os percentuais foram de 57,17; 15,76 e 1,95 respectivamente. O controle de DMSO nas mesmas condições em que a célula foi testada, não mostrou interferência nos resultados, nas concentrações de 20 e 100 µg/mL, porém apresentou para a concentração de 500 µg/mL (Figura 1). A IC₅₀ (50% de inibição do crescimento) da Justicidin B em células HeLa foi 17,49 µg/mL. Gertsch e colaboradores (2003) avaliaram citotoxicidade da Justicidin B isolada de *P. piscatorium* H.B.K. em células neoplásicas e constataram que a molécula apresentou citotoxicidade com a maior atividade contra células HeLa

comparáveis a helenalina como controle positivo, esses resultados corroboram com os encontrados no presente estudo.

Várias atividades farmacológicas foram descritas para a Justicidin B, que tornou-se conhecida por seus efeitos citotóxicos em diferentes linhagens de células neoplásicas (GERTSCH et al, 2003). Esta molécula mostrou potencial citotóxico contra o carcinoma colo retal L0V0 humano, linhagem celular (BGC-823) do cancro gástrico humano (JIN et al., 2014); para oito linhagens celulares derivadas de diferentes linfomas B (Ilieva et al., 2014); para mieloma múltiplo (MM); carcinoma de mama MDA-MB-231, MCF-7 (MOMEKOV, 2011).

Os fibroblastos são as células mais comuns do tecido conjuntivo e são capazes de modular seu metabolismo. Para estudos da atividade biológica de moléculas ativas, faz-se necessário investigar em células saudáveis percentuais de toxicidade, pois desta maneira não teriam causado morte ou danos às células hospedeiras (SILVA, 2009). Os resultados evidenciaram que a molécula não apresentou atividade citotóxica nas concentrações 20 e 100 $\mu\text{g/mL}$, pois os percentuais foram de 90,65 e 75,36, respectivamente. O controle de DMSO não mostrou interferência nos resultados para as concentrações de 20 e 100 $\mu\text{g/mL}$, porém apresentou para concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 2).

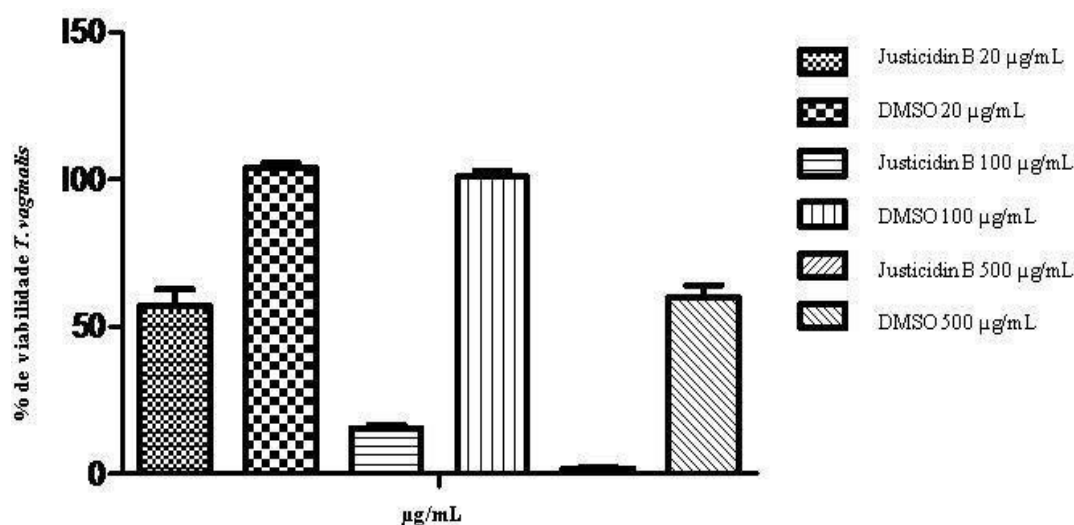


Figura 1: Avaliação da citotoxicidade *in vitro* da Justicidin B, frente a células de HeLa, pelo método MTT.

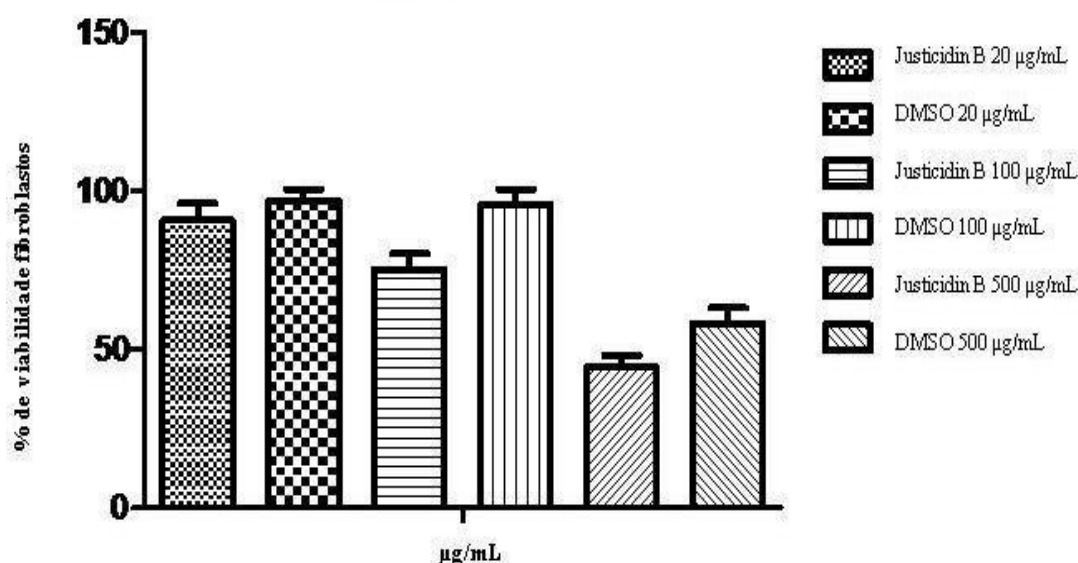


Figura 2: Avaliação da citotoxicidade *in vitro* da Justicidin B, frente a células de fibroblastos.

Ensaio citotóxico *in vivo* em modelo de *Galleria mellonella*

Para avaliar os efeitos tóxicos *in vivo* foi utilizado o modelo biológico de *Galleria mellonella*. Este modelo tem sido utilizado para a investigação da virulência de diversos patógenos humanos, devido às suas semelhanças entre o sistema imune inato com insetos e mamíferos (KAVANAGH; FALLON, 2010). Nesta pesquisa, após cinco dias de observação não se observou morte ou injúria visível nas larvas de *G. mellonella*, assim constatamos taxas de sobrevivência de 100% para todas as concentrações (10 e 50 mg/kg de larva) como visu pode ser visualizado na Tabela 2.

Tabela 2: Taxa de sobrevivência de *Galleria mellonella*, frente à Justicidin B.

Horas	Controle DMSO		Controle (H ² O)		Justicidin B	
	10 mg/kg	50 mg/kg	10 mg/kg	50 mg/kg	10 mg/kg	50 mg/kg
24	10 mortas	10 mortas	10 vivas	10 vivas	10 vivas	10 vivas
48	10 mortas	10 mortas	10 vivas	10 vivas	10 vivas	10 vivas
72	10 mortas	10 mortas	10 vivas	10 vivas	10 vivas	10 vivas
96	10 mortas	10 mortas	10 vivas	10 vivas	10 vivas	10 vivas
120	10 mortas	10 mortas	10 vivas	10 vivas	10 vivas	10 vivas
% sobrevivência	00±0,0	00±0,0	100±0,0	100±0,0	100±0,0	100±0,0

* experimento foi realizado em triplicata;

Atividade hemolítica

Para atividade hemolítica considera-se ativa a concentração capaz de

causar 50% de hemólise(CE₅₀) em eritrócitos. Neste estudo a Justicidin B não foi considerada ativa, pois após uma hora de incubação em temperatura ambiente e constante agitação, apresentou percentual negativo para todas as concentrações. Na tabela 3 pode-se evidenciar percentuais respectivos de - 1,40, -4,23, -8,27 para as concentrações de 20, 100, 500 µg/mL. O estudo mostra ainda que, o DMSO utilizado pra diluir a molécula não interferiu nos resultados, pois o percentual de hemólise ficou abaixo de 0,10%.

Tabela 3. Percentual de hemólise em diferentes concentrações dos extratos selecionados.

Justicidin B			DMSO		
20 µg/mL	100 µg/mL	500 µg/mL	20 µg/mL	100 µg/mL	500 µg/mL
-1,40±0,11	- 4,23±0,21	-8,27±0,18	-0,67±0,03	0,10±0,14	0,78±0,18

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados evidenciados neste estudo, pode-se concluir que a molécula Justicidin B apresentou atividade anti-*T. vaginalis* e atividade anticancerígena promissora para células de HeLa. Para fibroblastos os resultados evidenciaram ausência de toxicidade nas concentrações 20 e 100 µg/mL. Para *G. mellonella* não foi observada morte ou injúria visível nas larvas, apresentando taxas de sobrevivência de 100%. Nos eritrócitos a molécula não foi considerada ativa após uma hora de incubação, apresentando taxa de hemólise negativa. Desta forma, os resultados obtidos demonstram o grande potencial bioativo para a Justicidin B, uma vez que a molécula demonstrou atividade anti-*Trichomonas*, atividade esta ainda não relatada na literatura até o momento, servindo assim, de base para pesquisas futuras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASANO, J.; CHIBA, K.; TADA, M.; YOSHII, T. Antiviral activity of lignans and their glycosides from *Justicia procumbens*. **Phytochemistry**, v.42, p. 713-717, 1996.
- BENCHIMOL, M. Trichomonads under Microscopy. **Microsc. Microanal.**, v. 10, p. 528-550, 2004.
- BHESANIA A. HODIWALA 1; NARAYANKHEDKAR A. Trichomoniasis-A Review. **International Journal of Current Microbiology and Applied**

Sciences ISSN: 2319-7706 Volume 5 Number 6 (2016) pp. 731-741.

CHERPES, T. L.; WIESENFELD, H.C.; MELAN, M. A.; KANT, J. A.; COSENTINO, L. A.; MEYN, L. A. HILLIER, S. L. The associations between pelvic inflammatory disease, *Trichomonas vaginalis* infection, and positive Herpes simplex virus type 2 serology. **Sexually Transmitted Disease**, v. 33, p. 747-752, 2006.

CUDMORE, S. L.; DELGATY, K. L. HAYWARD-MCCLELLAND, S. F.; PETRIN, D. P.; GARBER, G. E. Treatment of infection caused by metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.17, p. 783-793, 2004.

FICHOROVA, R. N. Impact of *Trichomonas vaginalis* infection on innate immune responses and reproductive outcome. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 83, n. 1-2, p. 185-189, 2009.

FONSECA, H. A. A. **Estudo in vitro da toxicidade de corantes têxteis azo em *Tetrahymena pyriformis***. Departamento de Zoologia/ Antropologia Faculdade de Ciências da Universidade do Porto Outubro/ 2006. 83p.

GERTSCH, J.; TOBLER, R.T.; BRUN, R.; STICHER, O.; HEILMANN, J. Antifungal, antiprotozoal, cytotoxic and piscicidal properties of justicidin B and a new aryinaphthalide lignan from *Phyllanthus piscatorum*. **Planta Med.** v. 69, p.420–424, 2003.

GOLDMAN, L.M.; UPCROFT, J.A.; WORKOWSKI, K.; RAPKIN, A. Treatment of metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. **Sexual Health**, v. 6, p. 345-347, 2009.

HELMS, D. J.; MOSURE, D. J.; SECOR, W. E.; WORKOWSKI, K. A. Management of *Trichomonas vaginalis* in women with suspected metronidazole hypersensitivity. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 198, p. 370–377, 2008.

HEMMATI S.; SERADJ H. Justicidin B: A Promising Bioactive Lignan. **Molecules**, 2016.

JIN, H.; YIN, H. L.; LIU, S. J.; CHEN, L.; TIAN, Y.; LI, B.; WANG, Q.; DONG, J. X. Actividade citotóxica dos lignanos de *Justicia procumbens*. **Fitoterapia**, v. 94, p.70-76, 2014.

KAVANAGH K, FALLON J. *Galleria mellonella* larvae as models for studying fungal virulence. **Fungal Biol Rev.** v.24, p.79–83, 2010.

KLEBANOFF, M. A.; CAREY, J. C.; HAUTH, J. C.; HILLIER, S. L.; NUGENT, R. P.; THOM E. A.; ERNEST, J. M.; HEINE, R. P.; WAPNER, R. J.; TROUT, W.; MOAWAD, A.; LEVENO, K. J.; MODOVNIK, M.; SIBAI, B. M.; VAN DORSTEN, J. P.; DOMBROWSKI, M. P.; O'SULLIVAN, M. J.; VARNER, M.; LANGER, O.; McNELLIS, D.; ROBERTS, J. M. National

Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units. Failure of metronidazole to prevent preterm delivery among pregnant women with asymptomatic *Trichomonas vaginalis* infection. **N Engl J Med.**, v. 345, n. 7, p. 487-93, 2001.

LUO, J.; HU, Y.; KONG, W.; YANG, M. Evaluation and structure-activity relationship analysis of a new series of aryl naphthalene lignans as potential anti-tumor agents. **PLoS ONE** **2014**, 9.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOMEKOV, G.; KONSTANTINOV, S.; DINEVA, I.; IONKOVA, I. Efeito da justicidina B-A potente citotóxica e pro-apoptótica arilnaftaleno lignano em linhas celulares derivadas do câncer de mama humano. **Neoplasma**, v. 58, p. 320-325, 2011.

PETRIN, D., DELGATY, K., BHATT, K., GARBER, G. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. **Clin. Microbiol.**, v. 11, p. 300-317, 1998.

PETTIT, G.R.; SCHAUFELBERGER, D.E. Isolation and structure of the cytostatic lignan glycoside phyllanthostatin. **A.J. Nat. Prod.**, v. 51, p. 1104-1112, 1988.

PETTIT, G.R.; CRAGG, G.M.; SUFFNESS, M.I.; GUST, D.; BOETTNER, F.E.; WILLIAMS, M.; SAENZ-RENAULD, J.A.; BROWN, P.; SCHMIDT, J.M.; ELLIS, P.D. Antineoplastic agents. 104. Isolation and structure of the *Phyllanthus acuminatus* vahl (Euphorbiaceae) glycosides. **J. Org. Chem.**, v. 49, p. 4258-4266, 1984.

SILVA, M. R. **Padronização de método colorimétrico para avaliação de atividade biológica de substâncias sobre formas taquizoíticas de *Toxoplasma gondii*, com a avaliação de triterpenos ácidos sobre o parasito.** (60p.) 2009. Dissertação (Mestrado em bioiências aplicadas à farmácia). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

SORVILLO, F. et al. *Trichomonas vaginalis*, HIV, and african-americans. **Emerg Infect Dis**, v. 7, p. 927-32, 2001.

VIIKKI, M.; PUKKALA, E.; NIEMINEN, P.; HAKAMA, M. Gynaecological infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia. **Acta Oncologica**, v. 39, p. 71-75, 2000.

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados evidenciados neste estudo, pode-se concluir que:

Os extratos alcoólicos de *B. gardineriana* e *K. tomentosa* têm ação antimicrobiana frente a *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*. A combinação de clindamicina com extratos obteve interação sinérgica para *S. aureus*, *P. aeruginosa* e aditiva para *E. coli*, podendo ser uma opção a ser explorada e ainda, os extratos não possuem citotoxicidade; Os extratos etanólicos possuem um elevado potencial antioxidante, destacando-se *K. Tomentosa* e *L. microphylla* para a análise dos compostos fenólicos totais e *D. ecastaphyllum*, *B. gardneriana* e *K. tomentosa* para o ensaio do radical ABTS⁺. Para a análise de Fotoproteção, os extratos de *D. ecastaphyllum*, *B. gardneriana*, *E. revolutum*, *L. microphylla* e *Z. rhoifolium* apresentaram absorbância máxima na região de radiação UVB, e os demais apresentaram absorbância máxima na região UVC. Todos os extratos apresentaram potencial para FPS e podem ser utilizados na cosmetologia, proporcionando diversos benefícios às formulações.

A molécula Justicidin B apresentou atividade anti-*T. vaginalis* e atividade anticancerígena promissora para células de HeLa. Para fibroblastos os resultados evidenciaram ausência de toxicidade nas concentrações 20 e 100 µg/mL. Para *G. mellonella* não foi observada morte ou injúria visível nas larvas apresentando taxas de sobrevivência de 100%. Nos eritrócitos a molécula não foi considerada ativa após uma hora de incubação, apresentando taxa de hemólise negativa.

O conjunto dos resultados obtidos corrobora com grande potencial que as plantas medicinais possuem, como fonte de metabólitos, com: atividade antimicrobiana, antioxidante, fotoprotetora, antiprotozoária e citotóxica, sendo uma área promissora na busca de novos fármacos.

REFERÊNCIAS

- ABAD, M. J.; BERMEJO P.; VILLAR, A.; PALOMINO, S. S.; CARRASO L. Antiviral activity of medicinal plant extracts. **Phytother Res.** v. 11, p.198–202, 1997.
- ABENA, A. A.; NGONDZO-KOMBETI, G. R.; BIOKA, D. Psychopharmacologic properties of *Lippia multiflora*. **Encephale**, v. 24, p.449–54, 1998.
- ABEYSINGHE, P. D. Antibacterial activity of some medicinal mangroves against antibiotic resistant pathogenic bacteria. **Indian Journal of Pharmaceutical Science**, v.72, p.167-172, 2010.
- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants know as Medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.
- AGUIAR, R. M.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Unusual naphthoquinones, catechin and triterpene from *Byrsonima microphylla*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2388-2392, 2005.
- ALAGILLE, D.; BALDWIN, R.M.; ROTH, B.L.; WROBLEWSKI, J.T.; GRAJKOWSKA, E.; TAMAGNAN, G.D. Functionalization at position 3 of the phenyl ring of the potent mGluR5 noncompetitive antagonists MPEP. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.15, p. 945–949, 2005.
- ALIGIANIS N, KALPOUTZAKIS E, MITAKU S, CHINOUB. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 49: 4.168-4.2001. 170.
- ANDRADE NETO, J.M. et al. Volatile constituents of different populations of *Pilocarpus spicatus* Saint Hill. (Rutaceae) from the Northeast of Brazil. **The Journal of Essential Oil Research**, v.14, p.319-24, 2002.
- ARRUDA, M.S.P., FERNANDES, J.B., VIEIRA, P.C., SILVA, M.F.G.F. AND PIRANI, J.R. Chemistry of *Zanthoxylum rhoifolium*: A new Secofuroquinoline Alkaloid. **Biochemical Systematics and Ecology**. 1992.
- ARAÚJO, J.M.E. **Caracterização química e atividade leishmanicida dos extratos hidroetanólicos de própolis vermelha e *Dalbergia ecastophyllum* (Fabaceae)**. Dissertation, Federal University of Sergipe, Aracaju. 2014.
- ARESI, C. **Avaliação da Potencial Atividade Antimicrobiana de Produtos de Origem Natural: Estudo Bioguiado de *Dalbergia ecastophyllum* L. Taub.(77 p.) 2011**. Dissertação (Mestrado em farmácia). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.
- ASANO, J.; CHIBA, K.; TADA, M.; YOSHII, T. Antiviral activity of lignans and their glycosides from *Justicia procumbens*. **Phytochemistry**, v.42, p. 713-717, 1996.
- ASGARY S, NADERI GH, ASKARI N. Protective effect of flavonoids against red blood cell hemolysis by free radicals. **Experimental and Clinical Cardiology**. 10:2005.

ATOUI, A. K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chem.**, v. 89, p. 27-36, 2005.

AW, T.Y.; WIERZICKA, G.; JONES, D.P. Oral glutathione increases tissue glutathione in vivo. **Chem. Biol. Interac.**, v.80, p.89-97, 1991.

BABA, A.; KAWAMURA, N.; MAKINO, H.; OHTA, Y.; TAKETOMI, S.; SOHDA, T. Estudos sobre fármacos anti-reumáticos modificadores de doenças: Síntese de novos derivados de quinolina e quinazolina e seu efeito anti-inflamatório. **J. Med. Chem.**, v.39, 5176-5182, 1996.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; De PAULA, S. O.; MINIM, V. P.R.; BRESSAN, J.. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**, vol.23, n.4, 2010.

BENCHIMOL, M. Trichomonads under Microscopy. **Microsc. Microanal.**, v. 10, p. 528-550, 2004.

BHESANIA A. HODIWALA 1; NARAYANKHEDKAR A. Trichomoniasis-A Review. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences** ISSN: 2319-7706 Volume 5 Number 6 (2016) pp. 731-741.

BENIGNI, R.; CAPRA, C.; CATTORINI, P.E. Jaborandi. Pianti Medicinali. **Chimica Farmacologia e Terapia**, v.2, p.781- 787, 1964.

BETONI, J. E. C.; MANTOVANI, R. P.; BARBOSA, L. N.; DI STASI, L. C.; FERNANDES JR., A. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, n.4, p.387-390, 2006.

BERTINI ML. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleo essenciais de algumas plantas donordeste do Brasil. **Infarma**.17: 2005, 80-2.

BIRCH, A.E., FENNER, G.P.; WATKINS, R.; BOYD, L.C. Antioxidant proprieties of evening primrose seed extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p. 4502-4507, 2001.

BOBIN, M. F., RAYMOND, M. AND MARTINI, M.C. UVA/UVB absorption properties of natural products. **Cosmetics & Toiletries**, 109, 1994, 63-78.

BOHM, B. A.; GANDERS, F. R.; PLOWMAN, T. Biosystematics and evolution of cultivated coca (Erythroxylaceae). **Systematic Botany**, v. 7, p. 121-133, 1982.

BORGES, L. L.; LÚCIO, T. C.; GIL, E. de S.; BARBOSA, E. F. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. **Enciclopedia biosfera**, v. 7; p. 1-20, 2011.

BOTTEGA, A.; CANESTRINI, T.; RODRIGUES, M. A.; RAMPELOTTO, R. F.; DOS SANTOS, S. O.; SILVA, D. C.; HÖRNER, R. Abordagem das doenças sexualmente transmissíveis na adolescência: revisão de literatura. **Saúde (Santa Maria)**, Suplemento -

Artigos de revisão, p. 91-104, 2016.

BRANDÃO, M. G. L.; ZANETTI, N. N. S.; OLIVEIRA, G. R. R.; GOULART, L. O.; MONTE-MOR, R. L. M. Other medicinal plants and botanical products from the first edition of the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n. 1, p. 127-34, 2008.

BRANDON, K.; FONSECA, G. A. B.; RYLANDS, A. B.; SILVA, J. M. C. Conservação brasileira: desafios e oportunidades. **Megadiversidade**; v.1, p. 7-13, 2005.

BRASSEUR, A. Un reactif de choix pour la revelation des flavonoïdes: le melange diphenylborate D'aminoethanol -Peg 400. **J. Chromatogr.** 351: 1986, 351-355.

BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v.33, p. 229-239, 2010.

BRAZIL. National Health Surveillance Agency (ANVISA). Resolução RDC nº 30 de 1 de junho de 2012. Aprova o Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos e dá outras providências. 2012.

CACERES, A.; LÓPEZ, B.; JUÁREZ, X.. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. II Evaluation of antifungal activity of 7 American plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 40, p. 207-213, 1993.

CALDERON-MONTANO, J. M.; BURGOS-MORON, E.; PEREZ-GUERRERO, C.; LOPEZ-LAZARO, M.A. Review on the dietary flavonoid kaempferol. **Mini. Rev. Med. Chem.** v.11, p. 298-344, 2011.

CASTROGIOVANNI, P.; IMBESI, R. Oxidative stress and skeletal muscle in exercise. **Ital J AnatEmbryol**, v.117, n. 2, p.107-17, 2012.

CÁRDENAS-LÓPEZ, D.; MARÍN CORBA, C. A.; SUÁREZ SUÁREZ, L. S., [et.al.]. **Plantas útiles de Lagarto Cocha y Serranía de Churumbelo en el departamento de Putumayo**. Bogotá, D.C., Colombia: Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas, SINCHI, 40 p. 2002.

CARVALHO, A. M. A. Synopsis of the genus *Dalbergia* (Fabaceae: Dalbergiae) in Brazil. **Brittonia**, v. 49, n. 1, p. 87-109, 1997.

CARVALHO, A. M. Efeito da bomba de infusão de soluções sobre o grau de hemólise em concentrados de hemácias. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. 29: 2007.149-152.

CAZAROLLI, L. H., ZANATTA, L., ALBERTON, E. H. AND FIGUEIREDO, M. S. R. B. Flavonoids: prospective drug candidates. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, 8, 2008. 429.

CHANH, P. H.; KOFFI, Y.; CHANH A, P. H. Comparative hypotensive effects of compounds extracted from *Lippia multiflora* leaves. **Planta Med.**, v.54, p. 294-6, 1988.

CHARLTON, J. L. Actividade antiviral de lignanas. **J. Nat. Prod.** v. 61, p. 1447-1451, 1998.
CHERPES, T. L.; WIESENFELD, H. C.; MELAN, M. A.; KANT, J. A.; COSENTINO,

L. A.; MEYN, L. A.; HILLIER, S. L. The associations between pelvic inflammatory disease, *Trichomonas vaginalis* infection, and positive Herpes simplex virus type 2 serology. *Sexually Transmitted Disease*, v. 33, p. 747-752, 2006.

CHAN-BACAB MJ, PEÑA-RODRÍGUEZ LM. Plant natural products with leishmanicidal activity. *Nat Prod Rep. Review* 18:2001. 674-88.

CHENG SS. Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two Eucalyptus species. *Bioresource Technology*.100: 2009. 452-6.

CHERPES, T. L.; WIESENFELD, H.C.; MELAN, M. A.; KANT, J. A.; COSENTINO, L. A.; MEYN, L. A. HILLIER, S. L. The associations between pelvic inflammatory disease, *Trichomonas vaginalis* infection, and positive Herpes simplex virus type 2 serology. *Sexually Transmitted Disease*, v. 33, p. 747-752, 2006.

CHIU, A.E. AND KIMBALL, A.B. Topical vitamins, minerals and botanical ingredients as modulators of environmental and chronological skin damage. *The British Journal of Dermatology*, 149, 2003, 681-91.

CHUNG PY, NAVARATNAM P, CHUNG LY. Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2011. 10:1-6.

CUDMORE, S. L.; DELGATY, K. L. HAYWARD-MCCLELLAND, S. F.; PETRIN, D. P.; GARBER, G. E. Treatment of infection caused by metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Reviews*, v.17, p. 783-793, 2004.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v.4, p. 374, 1969.

CORREIA, A. F.; SEGOVIA, J. F. O.; GONÇALVES, M. C. A.; DE OLIVEIRA, V. L.; SILVEIRA, D.; CARVALHO, J. C. T.; KANZAKI, L. I. B. Amazonian plant crude extract screening for activity against multidrug-resistant bacteria. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, v.12, p.369-380, 2008.

Costa, S.C.C., Detoni, C.B., Branco, C.R.C., Botura, M.B. and Branco, A. *In vitro* photoprotective effects of *Marcetia taxifolia* ethanolic extract and its potential for sunscreen formulations. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 25, 2015, 413-418. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2015.07.013>

COSTA, S. M.; LEMOS, T.L.; PESSOA, O. D.; PESSOA, C.; MONTENEGRO, R. C.; BRAZ- FILHO, R. Chemical constituents from *Lippia sidoides* and cytotoxic activity. *J Nat. Prod.* v. 64, p.792-5, 2001.

COSTA, J.F.O. Immunomodulatory and antibacterial activities of extracts from Rutaceae species. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.20, n.4, p.502-505, 2010.

CORDEIRO, J.M.P. AND FÉLIX, L.P. Botanical medical knowledge of native species of the Caatinga and spontaneous plants in the Agreste region of the state of Paraíba, Brazil. *Brazilian Journal of Medicinal Plants*, 16, 2014, 685-692.

COTINGUIBA, G. G.; SILVA, J. R. N.; AZEVEDO, R. R. S.; ROCHAB, T. J. M.; SANTOS, A. F. Método de Avaliação da Defesa Antioxidante: Uma Revisão de Literatura. **UNOPAR CientCiênc Biol Saúde**, v. 15, n. 3, p. 231-7, 2013.

COW, C.; LEUNG, C.; CHARLTON, J. L. Atividade antiviral de arilnaftaleno e lignanas de arildihidronaftaleno. **Lata.J. Chem.Rev. Can.Chim.**, v.78, p.553-561, 2000.

CRAGG, G. M.; NEWMANN, D. J. Biodiversidade: um componente essencial na descoberta de novos fármacos In: YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de Produtos Naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 1ed. Itajaí: UNIVALLI, 2007.

DAL'BELO, S.E. **Avaliação da eficácia fotoprotetora, penetração cutânea e segurança de formulações cosméticas contendo extratos de Chá Verde e Ginkgo Biloba**. Dissertation, University of São Paulo, São Paulo. 2008.

DANIELE CM, MIRIAM S, MARIA EF, DANIEL R, LOURDES CS, ALBA RM, SOUZA-BRITO, WAGNER V, HÉRIDA RNS. Antimicrobial activity of *Byrsonima* species (Malpighiaceae). **Rev. bras. farmacogn.** 2008.

Da SILVA, S. L.; FIGUEREDO, P. M. S.; YANO, T. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. leaves. **Acta Amazonica**, v. 37, n. 2, p. 281-286, 2007.

DAR, A.A.; ARUMUGAM, N. Lignans of Sesame: Purification Methods, Biological Activities and Biosynthesis – a Review. **Bioorganic Chemistry**, v.50c, p.1-10, 2013.

DAUGSCH, A., MORAES, C.S.; FORT, P. AND PARK, Y.K. Brazilian red propolis – Chemical composition and botanical origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, 5, 2008, 435-441. <https://dx.doi.org/10.1093/ecam/nem057>

De LIMA, G. P.; De SOUZA, T. M.; De PAULA FREIRE, G.; FARIAS, D. F.; CUNHA, A. P.; RICARDO, N. M. Further insecticidal activities of essential oils from *Lippia sidoides* and *Croton* species against *Aedes aegypti* L. **Parasitol Res.** v.112, p.1953–8, 2013.

DIAS M, MONTEIRO MS. Antibióticos e resistência bacteriana, velhas questões, novos desafios. **Cadernos Otorrinolaringologia: clínica, investigação e inovação**. 2010.

Di STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. 2ed. São Paulo: ed. UNESP, 604p. 2002.

DOMINGUES, K.; GONÇALVES, A.; OLIVEIRA, C.P.; PERIM, C.M.; GONÇALVES, F.B. Avaliação de extratos de quebra-pedra (*Phyllanthus* sp) frente a patógenos causadores de infecções no trato urinário. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.17, n.3, 2015.

EI-GENDY M.M.A.; HAWAS U.W.; JASPARS, M. Novel bioactive metabolites from a marine derived bacterium *Nocardia* sp. **ALAA 2000.J Antibiot.**, v. 61, p.379–386, 2008.

FABRI, R.L.; NOGUEIRA, M.S.; BRAGA, F.G.; COIMBRA, E.S.; SCIO, E. *Mitracarpus frigidus* aerial parts exhibited potent antimicrobial, antileishmanial, and antioxidant effects. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 428–433, 2009.

FABRICANT, T. S.; FARNSWORTH, N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environ. Health Perspect.**, v.109, p. 69 – 75, 2001.

FDA - Food and Drug Administration. **Sunscreen drug products for over-the-counter human use.** 2013.

FICHOROVA, R. N. Impact of *Trichomonas vaginalis* infection on innate immune responses and reproductive outcome. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 83, n. 1-2, p. 185-189, 2009.

FERREIRA, P. I.; GOMES, J. P.; STEDILLE, L. I.; DA COSTA, R. L.; MANTOVANI, B. A. Potencial Terapêutico de Espécies Arbóreas em Fragmentos de Floresta Ombrófila Mista. **Floresta Ambient.**, vol.23, n.1, 2016. Epub 02-Fev-2016.

FICHOROVA, R. N. Impact of *Trichomonas vaginalis* infection on innate immune responses and reproductive outcome. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 83, n. 1-2, p. 185-189, 2009.

FILGUEIRAS, T. S.; PEREIRA, B. A. S. Flora do Distrito Federal. In: PINTO, M. N. (Org.). **Cerrado: caracterização, ocupação e perspectivas.** Brasília, DF: Ed. UNB, p. 331-388, 1990.

FONSECA, H. A. A. **Estudo in vitro da toxicidade de corantes têxteis azo em *Tetrahymena pyriformis*.** Departamento de Zoologia/ Antropologia Faculdade de Ciências da Universidade do Porto Outubro/ 2006. 83p.

FORESTIERI, A. M.; MONFORTE, M. T.; RAGUSA, S.; TROVATO, A. Antiinflammatory, analgesic and antipyretic activity in rodents of plant extracts used in African medicine. **Phytother Res.** v.10, p.100–6, 1996.

FRANCIS, J. K. **Wildland shrubs of the United States and its territories: taxonomic descriptions.v.1** International Institute of Tropical Forestry: United States Department of Agriculture, Forest Service.830p. 2004.

FRASSON, A. P.; CHARÃO, M. F.; ROSEMBERG, D. B.; SOUZA, A. P.; GARCIA, S. C.; BONORINO, C.; BOGO, M. R.; De CARLI, G. A.; TASCA, T. Analysis of the NTPDase and ecto- 5'-nucleotidase profiles in serum-limited *Trichomonas vaginalis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 170-177, 2012.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n.2, p.178-82,2005.

GANIE AS, YADAV SS. FT-IR spectroscopic analysis of *Holoptelea integrifolia* (Roxb.) plant seed extracts and their antibacterial activity. **Res. J. Med. Plant.** 9: 2015. 417-426.

GARCIA APM, ORLANDA JFF. Evaluación de La actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto hidroalcohólico bruto *Mangifera indica* Linneu. **Revista Cubana de Plantas Medicinales.** 2014.

GERTSCH, J.; TOBLER, R.T.; BRUN, R.; STICHER, O.; HEILMANN, J. Antifungal, antiprotozoal, cytotoxic and piscicidal properties of justicidin B and a new arynaphthalide lignan from *Phyllanthus piscatorum*. **Planta Med.** v. 69, p.420–424, 2003.

GIANNINI, T.C.; TAKAHASI, A; MEDEIROS, M.C.P; SARAIVA, A.M.; ALVES, S.I. Análise de Componentes Principais (PCA) das variáveis climáticas da área de ocorrência de *Krameria* Loefl. (Krameriaceae). In: **IX Congr. Ecologia do Brasil**, São Lourenço, 2009.

GIANNINI, T. C.; TAKAHAS A. I.; MEDEIROS, M. C.M.P.; SARAIVA, A.M.; SANTOS, I.A. Ecological niche modeling and principal component analysis of *Krameria* Loefl. (Krameriaceae) **Journal of Arid Environments**, v.75, p.870-872, 2011.

GIBBONS S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural product reports**.126: 2004. 263-277.

GIMENES, M.; LOBÃO, C.S. A Polinização de *Krameria bahiana* B.B. Simpson (Krameriaceae) por Abelhas (Apidae) na restinga, BA. **Neotropical Entomology**, v. 35, n.4, p. 440-445, 2006.

GERTSCH, J.; TOBLER, R.T.; BRUN, R.; STICHER, O.; HEILMANN, J. Antifungal, antiprotozoal, cytotoxic and piscicidal properties of justicidin B and a new arynaphthalide lignan from *Phyllanthus piscatorum*. **Planta Med.** v. 69, p.420–424, 2003.

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural product reports**, v. 126, p 263-277, 2004.

GILBERT, E., PIROT, F., BERTHOLLE, V., ROUSSEL, L., FALSON, F., PADOIS, K. Commonly used UV filter toxicity on biological functions: review of last decade studies. **Int. J. Cosmet. Sci.** v. 35, p. 208–219, 2013.

GOLDMAN, L.M.; UPCROFT, J.A.; WORKOWSKI, K.; RAPKIN, A. Treatment of metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. **Sexual Health**, v. 6, p. 345-347, 2009.

GOMES, S. V. F.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. **Eclética Química**, v. 36, n. 1, p.64-77, 2011.

GOMEZ-PINILLA, F. AND NGUYEN, T.T. Natural mood foods: the actions of polyphenols against psychiatric and cognitive disorders. **Nutritional Neuroscience**, 15, 2012, 127-33. <http://dx.doi.org/10.1179/1476830511Y.00000000035>

GONZAGA, W. Antibacterial alkaloids from *Zanthoxylum rhoifolium*. **Planta Medica**, v. 69, n. 4, p.371-374, 2003.

GONZALEZ-GUÈRECA, M.C.; SOTO-HERNANDEZ, M.; MARTINEZ-VAZQUEZ, M. Isolation of (-)(2S)-5,6,7,3',5'-pentahydroxyflavanone-7-O-β-D-glucopyranoside from *Lippia graveolens* H.B.K. var. *berlandieri* Schauer, a new anti-inflammatory and cytotoxic flavanone. **Nat Prod Res.**, v. 24, p.1528–36, 2010.

GOODMANN, R. P.; GHABRIAL, S. A.; FICHOROVA, R. N.; NIBERT, M.L.

Trichomonasvirus: a new genus of protozoan viruses in the family Totiviridae. **Archives of Virology**, v. 156, p. 171-179, 2011.

GOTTLEB, O.R.; YOSHIDA, M. Lignóides com atenção especial à química das neolignanais. **Química Nova**, p. 250-273, 1984.

GOLDMAN, L.M.; UPCROFT, J.A.; WORKOWSKI, K.; RAPKIN, A. Treatment of metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. **Sexual Health**, v. 6, p. 345-347, 2009.

GRIFFIN, W.J.; LIN, G.D. Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. **Phytochemistry**, v. 53, p. 623-637, 2000.

GROPPO, M.; PIRANI, J. R. Rutaceae. In: CAVALCANTI, T. B. (Org.). Flora do Distrito Federal, Brasil. Brasília, DF: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, v. 6, p. 63-86, 2007.

GUARATINI, T.; CALLEJON, D. R.; PIRES, D. C.; LOPES, J. N. C. Fotoprotetores derivados de produtos naturais: perspectivas de mercado e interações entre o setor produtivo e centros de pesquisa. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 717-721, 2009.

GURIB-FAKIM A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular aspects of medicine**. 27: 2006. 91-93.

HARBORNE JB. **Phytochemical Methods**. 3^a Ed. Londres: Chapman & Hall. 1998.

HENDRY ER, WORTHINGTON T, CONWAY BR, LAMBERT PA. Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1,8-cineole alone and in combination with chlorhexidine digluconate against microorganisms grown in planktonic and biofilm cultures. **J Antimicrob Chemother** 64: 2009. 1219- 1225.

HELMS, D. J.; MOSURE, D. J.; SECOR, W. E.; WORKOWSKI, K. A. Management of *Trichomonas vaginalis* in women with suspected metronidazole hypersensitivity. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 198, p. 370-377, 2008.

HEMMATI S.; SERADJ H. Justicidin B: A Promising Bioactive Lignan. **Molecules**, 2016.

HEINRICH, M. Ethnobotany and natural products: the search for new molecules new treatments of old diseases or a better understanding of indigenous cultures? **Curr.Top. Med. Chem.**, v.3, p. 29- 42, 2003.

HELENO, S.A., MARTINS, A., QUEIROZ, M.J.R.P. AND FERREIRA, I.C.F.R. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: a review. **Food Chemistry**, 173, 2015, 501-513. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.057>

HELMS, D. J.; MOSURE, D. J.; SECOR, W. E.; WORKOWSKI, K. A. Management of *Trichomonas vaginalis* in women with suspected metronidazole hypersensitivity. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 198, p. 370-377, 2008.

HEMMATI S.; SERADJ H. Justicidin B: A Promising Bioactive Lignan. **Molecules**, 2016.

HOLMSTED, B. Jaborandi: An interdisciplinary appraisal. **Journal of Ethnopharmacology**, v.1, p.3- 21, 1979.

HONIGBERG, B. M, BRUGEROLLE, G. Structure. In: HONIGBERG, BM (ed). **Trichomonads parasitic in humans**. Springer, Berlin Heidelberg New York, p 5–35, 1990.

ILIEVA, Y.;ZHELEZOVA, I.; ATANASOVA, T.; ZAHARIEVA, M. M.; SASHEVA, P.; IONKOVA, I.; KONSTANTINOV, S. Efeito citotóxico da justicidina derivada biotecnologicamente em células de linfoma humano. **Biotechnol.Lett.** v.36, p.2177-2183, 2014.

JACKSON C, AGBOKE A, VICTOR NWOKE V. In vitro evaluation of antimicrobial activity of combinations of nystatin and Euphorbia hirta leaf extract against Candida albicans by the checkerboard method. **Journal of Medicinal Plants Research**. 3:2009. 666-669.

JIN, H.; YIN, H. L.; LIU, S. J.; CHEN, L.; TIAN, Y.; LI, B.; WANG, Q.; DONG, J. X. Actividade citotóxica dos lignanos de *Justicia procumbens*. **Fitoterapia**, v. 94, p.70-76, 2014.

JAIN, S. K. & JAIN, N. K.; Multiparticulate carriers for sun-screening agents. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 32, p. 89-98, 2010.

JIN, H.; YIN, H. L.; LIU, S. J.; CHEN, L.; TIAN, Y.; LI, B.; WANG, Q.; DONG, J. X. Actividade citotóxica dos lignanos de *Justicia procumbens*. **Fitoterapia**, v. 94, p.70-76, 2014.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. **Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 612p. 2009.

JULLIAN, V. Validation of use of a traditional antimalarial remedy from French Guiana, *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 3, p. 348-352, 2006.

KAUR, G.J.; ARORA, D.S. Antibacterial and phytochemical screening of *Anethum graveolens*, *Foeniculum vulgare* and *Trachyspermum ammi*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 9:30, 2009.

KARPANEN TJ, WORTHINGTON T, HENDRY ER, CONWAY BR, LAMBERT PA. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine digluconate alone and in combination with eucalyptus oil, tea tree oil and thymol against planktonic and biofilm cultures of *Staphylococcus epidermidis*. **Alternative Medicine**, 2008.

KLEBANOFF, M. A.; CAREY, J. C.; HAUTH, J. C.; HILLIER, S. L.; NUGENT, R. P.; THOM E. A.; ERNEST, J. M.; HEINE, R. P.; WAPNER, R. J.; TROUT, W.; MOAWAD, A.; LEVENO, K. J.; MIODOVNIK, M.; SIBAI, B. M.; VAN DORSTEN, J. P.; DOMBROWSKI, M. P.; O'SULLIVAN, M. J.; VARNER, M.; LANGER, O.; McNELLIS, D.; ROBERTS, J. M. National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units. Failure of metronidazole to prevent preterm delivery among pregnant women with asymptomatic *Trichomonas vaginalis* infection. **N Engl J Med.** v. 345, n. 7, p. 487-93, 2001.

KAVANAGH K, FALLON J. *Galleria mellonella* larvae as models for studying fungal virulence. **Fungal Biol Rev.** v.24, p.79–83, 2010.

KLEBANOFF, M. A.; CAREY, J. C.; HAUTH, J. C.; HILLIER, S. L.; NUGENT, R. P.; THOM E. A.; ERNEST, J. M.; HEINE, R. P.; WAPNER, R. J.; TROUT, W.; MOAWAD, A.; LEVENO, K. J.; MIODOVNIK, M.; SIBAI, B. M.; VAN DORSTEN, J. P.; DOMBROWSKI, M. P.; O'SULLIVAN, M. J.; VARNER, M.; LANGER, O.; McNELLIS, D.; ROBERTS, J. M. National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units. Failure of metronidazole to prevent preterm delivery among pregnant women with asymptomatic *Trichomonas vaginalis* infection. **N Engl J Med.** v. 345, n. 7, p. 487-93, 2001.

KOMURAI AH, A. Antibacterial studies and phytochemical constituents of South Indian *Phyllanthus* species. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 19, p. 4991-4995, 2009.

KULLAVANI JAYA, P.; LIM, H. W. Photoprotection. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 52, p. 937-958. 2005.

KUMAR SN, SIJI JV, NAMBIAN B, MOHANDAS C. Activity and synergistic interactions of stilbenes and antibiotic combinations against bacteria in vitro. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 28:2012.3143-3150.

KRAUSE, M.S., BONETTI, A.F., TURNES, J.M., DIAS, J.F.G., MIGUEL, O.G., DUARTE, M.R. Phytochemistry and biological activities of *Zanthoxylum rhoifolium* Lam., Rutaceae - Mini review. **Visão Acadêmica**, 14, 2013. <http://dx.doi.org/10.5380/acd.v14i4.33992>

KRISHNAIAH, D., SARBATLY, R. AND NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and Bioproducts Processing**, 89, 2011, 217- 233. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2010.04.008>

LUO, J.; HU, Y.; KONG, W.; YANG, M. Evaluation and structure-activity relationship analysis of a new series of aryl naphthalene lignans as potential anti-tumor agents. **PLoS One** 2014, 9.

LAI, H.Y.; LIM, Y. Y.; KIM, K.H. *Blechnum orientale* Linn - a fern with potential as antioxidant, anticancer and antibacterial agent. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 10:15, 2010.

LEE, K. Discovery and Development of Natural Product-Derived Chemotherapeutic Agents Based on a Medicinal Chemistry Approach. **Journal of Natural Products**, v.73, p.500-516, 2010.

LEE, K.H.; XIAO, Z. Lignans no tratamento de câncer e outras doenças. **Phytochem.Rev.**, v. 2, p. 341-362, 2003

LEMO, T. L.; MATOS, F. J.; ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A. Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plants. **Phytother Res.**, v.4, p.:82–4, 1990.

LEONTI, M; STAFFORD, G. I.; DAL CERO, M; CABRAS, S; CASTELLANOS, M.E.; CASU, L; WECKERLE, C.S. Reverse Ethnopharmacology and Drug Discovery. **Journal of Ethnopharmacology**, v.198, p.417-431, 2017.

LI, S. Y., PING, G.; GENG, L., SEOW, W. K. AND THONG, Y. H. Immunopharmacology and toxicology of the plant flavonoid baohuoside-1 in mice. **International Journal of Immunopharmacology**, 16, 1994, 227. [http://dx.doi.org/10.1016/0192-0561\(94\)90016-7](http://dx.doi.org/10.1016/0192-0561(94)90016-7)

LI, A.B., WONGA, C.C., KA-WING, C. AND CHEN, F. Antioxidant Properties in Vitro and Total Phenolic Contents in Methanol Extracts from Medicinal Plants. **Swiss Society of Food Science and Technology**, 41, 2008, 385-390. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2007.03.011>

LIMA, L.R. et al. Assessment of the antiedematogenic, antimicrobial and mutagenic activity of *Amburana cearensis* seeds (A.C. Smith) (Imburana-de-cheiro). **Brazilian Journal of Medicinal Plants**, 15, 2013, 415-422. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722013000300015>

LIMA, E. O. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.;B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. 1 ed. Chapecó: Argos, p.482-501, 2001.

LINS-NETO, J.R.; UCHÔA, A.D. A.;MOURA, P.A.;BEZERRA-FILHO, C.M.;TENÓRIO, J.C.G.;SILVA, A.G.;XIMENES, R.M.;SILVA, M.V.; CORREIA, M.T.S. Phytochemical screening, total phenolic content and antioxidant activity of some plants from Brazilian flora. **Journal of Medicinal Plants Research**,v. 10, p.409-416, 2016.

LOIOLA, M. I. B.; AGRA, M. F.; BARACHO, G. S.; QUEIROZ, R. T. Flora da Paraíba, Brasil: Erythroxylaceae Kunth. **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, n.2, p. 473-487, 2007.

LORENZI, H.;MATOS.; F. J. A. 2002.**Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**.Ed. Nova Odessa, São Paulo. Instituto Plantarum, 512 p. 2012.

LORIAN, Victor. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. 5 ed. Williams & Wilkins. 2005.

LUO, J.; HU, Y.; KONG, W.; YANG, M. Evaluation and structure-activity relationship analysis of a new series of farnesyl naphthalene lignans as potential anti-tumor agents. **PLoS ONE** 2014, 9.

MALIK A, S BAI, R TENEJA, S. DALAL. . In vitro screening of some indian medicinal plants for their activity against extended spectrum. lactamases. **Br. Biotechnol. J.** 8:2015.1-10.

MACRAE; W. D.;HUDSON, J. B.; TOWERS, G. H. N. A ação antiviral de lignanas. **Planta Med.**, v.55, p. 531-535, 1989.

MADEIRO, S. A. L. **Novas neolignanas de *Krameria tomentosa* A. St.-Hill. (Krameriaceae).**(143 p.) 2012. Dissertação (Mestrado em produtos naturais e sintéticos bioativos). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.

MAFEZOLI, J. In vitro activity of Rutaceae species against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.73, p. 335–340, 2000.

MAIER, T.; KORLING, H.C. Sunscreens – which and for. **Skin Pharmacol Physiol**, v. 18, p. 253- 62, 2005.

MANSUR, M. C. P. P. R.; LEITÃO, S. G.; CERQUEIRA-COUTINHO, C.; VERMELHO, A. B.; SILVA, R. S.; PRESGRAVE, O. A. F.; Leitão, A. A. C.; LEITÃO, G. G.; RICCI-JÚNIOR, E.; SANTOS, E. P. In vitro and in vivo evaluation of efficacy and safety of photoprotective formulations containing antioxidant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.26, p. 251–258, 2016.

MANSUR, J.S., BREDER, M.N.R., MANSUR, M.C.A., AZULAY, R.D. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 61, 1986, pp.121-124.

MATOS, F. J. A.; OLIVEIRA, F. *Lippia sidoides* Cham. Pharmacognosy, chemistry and pharmacology. **Rev Bras Farmacogn.**, v. 79, p.84–7, 1998.

MAW, KL.; CATON-WILLIAMS, J.; SALON, J.; HUANG, Z. Simple ultraviolet and high-performance liquid chromatography for the evaluation of sunscreen efficacy. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 65, n. 2, p.328-335, 2011.

MEDEIROS M. **Avaliação in vitro e in vivo de Efeitos sinérgicos de Antibacterianos para o tratamento de infecções por *Acinetobacterbaumannii* multirresistentes produtoras de Carbapenemases tipo OXA endêmicas no Brasil.**2012.

MITCHELL G, LAFRANCE M, BOULANGER S, SÉGUIN DL, GUAY I, GATTUSO M, MARSAULT E, BOUARAB K, MALOUIN F. Tomatidine acts in synergy with aminoglycoside antibiotics against multiresistant *Staphylococcus aureus* and prevents virulence gene expression. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 67:2012.559-568.

MIMICA MATANOVIC, S.; BERGMAN, U.; VUKOVIC, D.; WETTERMARK, B. VLAHOVIC-PALCEVSKI, V. Impact of restricted amoxicillin/clavulanic acid use on *Escherichia coli* resistance—antibiotic DU90% profiles with bacterial resistance rates: a visual presentation. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, p. 369-373, 2010.

MOMEKOV, G.; KONSTANTINOV, S.; DINEVA, I.; IONKOVA, I. Efeito da justicidina B-A potente citotóxica e pro-apoptótica arilnaftaleno lignano em linhas celulares derivadas do câncer de mama humano. **Neoplasma**, v. 58, p. 320-325, 2011.

MOMEKOV, G.; YOSSIFOV, D.; GUENOVA, M.; MICHOVA, A.; STOYANOV, N.; KONSTANTINOV, S.; IONKOV, T.; SACHEVA, P.; IONKOVA, I. Mecanismos apoptóticos do arilnaftaleno lignano produzido por biotecnologia justicidina B na linhagem celular HL-60 derivada de leucemia mieloide aguda. **Pharmacol.Rep.**, v.66, p. 1073-1076, 2014.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOMEKOV, G.; KONSTANTINOV, S.; DINEVA, I.; IONKOVA, I. Efeito da justicidina

B-A potente citotóxica e pro-apoptótica arilnaftaleno lignano em linhas celulares derivadas do câncer de mama humano. **Neoplasma**, v. 58, p. 320-325, 2011.

MUKHERJEE A, RAJASEKARAN C. In vitro haemolytic activity of *Allium stracheyi* Baker. **Journal of Pharmacy Research**. 3: 2010, 1160-1162.

NADER TT. **Potencial de atividade antimicrobiana in vitro de extratos vegetais do cerrado frente a estirpes de *Staphylococcus aureus***. (dissertação de mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal. 2010.

NASCIMENTO, C.S., NUNES, L.C.C., LIMA, A.A.N., GRANGEIRO-JÚNIOR S. ANDROLIM-NETO, P.J. Incremento do FPS em formulação de protetor solar utilizando extratos de própolis verde e vermelha. **Revista Brasileira de Farmácia**, 90. 2009.

NCCLS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, approved standard-second edition M27-A2. **National Committee for Clinical Laboratory Standards**, Wayne, PA, USA. 2009.

NOVARETTI MCZ, AQUINO S, PISCOPO MR. Controle de Vendas de Antibióticos no Brasil: Análise do efeito dos atos regulatórios no uso abusivo pelos consumidores. **Revista Acadêmica São Marcos**. 2014.4: 25-39.

NEVES, K.; Espectro Solar, Sol e origem da radiação eletromagnética. Tecnopress – Edição Temática: **Proteção Solar**, n.7, Ano 3, p.10-13, 2008.

NICOLINI, P.; NASCIMENTO, J. W. L.; GRECO, K. V.; MENEZES, F. G. Fatores relacionados à prescrição médica de antibióticos em farmácia pública da região Oeste da cidade de São Paulo. **Ciênc. saúde coletiva**, v. 13, p. 689-696, 2013.

NIKI. E. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. **Free Radic Biol Med.**, v. 49, p.503-515, 2010.

NOVAES, G. M.; SILVA, M. J. D.; ACHKAR, M. T.; VILEGAS, W. Compostos antioxidantes e sua importância nos organismos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 11, n. 2, p. 535- 539, 2013.

OLIVEIRA PF, et al. Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. 2006. 16:510-6.

OLIVEIRA AC, Silva RS. Desafios do cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. **Revista Eletrônica de Enfermagem**. 2008. 10:189-197.

OHTA, K.; CHEN, Y. L.; MARUMO, S.; MUNAKATA, K. Estudos sobre componentes piscicidas de *Justicia hayatai* var. *decumbens*. Parte I. Isolamento e atividades piscicidas de justicidina A e B. **Agric. Biol. Chem.**, v. 33, p.610-614, 1969.

OKWUTE, S.K.; ONYIA, R.; ANENE, C.; AMODU, O.P. Protectant, insecticidal and antimicrobial potentials of *Dalbergia saxatilis* Hook f. (fabaceae). **African Journal of**

Biotechnology, v.8, n.23, p.6556-6560, 2009.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; MACHADO, J. N. M. Composição florística de uma floresta semidecídua montana, na serra de São José, Tiradentes, Minas Gerais. **Acta Botanica Brasílica**, v. 7, n. 2, p. 71- 88. 1993.

OLIVEIRA-JÚNIOR, R.G.;ARAÚJO, C.S.;SANTANA, C.R.R.;SOUZA, G.R.;LIMA-SARAIVA, S.R.G.;GUIMARÃES, A. L.;OLIVEIRA, A.P.;SIQUEIRA-FILHO, J.A.;PACHECO, A.G.M.;ALMEIDA, J.R.G.S. Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activity of extracts from the flowers of *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae). **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 4, p.4489-4494, 2012.

OLIVEIRA-JÚNIOR, R.G. AND ALMEIDA, J.R.G.S. Prospecção tecnológica de fotoprotetores derivados de produtos naturais. **Revista GEINTEC**, 3, 2012, 32-45.

OLIVEIRA Y.L.C.; SILVA, L.C.N.; ARAÚJO, J.M.; CORREIA, M.T.S.; SILVA, M.V. **Natural ProductResearch** (Print). 2012.

PACHÚ, C. O.**Processamento de plantas medicinais para obtenção de extratos secos e líquidos.UFCG (117p.) 2007**. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos). Universidade Federalde Campina de Grande, Campina Grande, 2007.

PANKEY GA, SABBATH LD. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Grampositive bacterial infections. **Clin. Infect. Dis.** 38:2004. 864–870.

PARENTE, F.G.G., OLIVEIRA, A.P., RODRIGUES, C.M.S.C., OLIVEIRA-JÚNIOR, R.G., PAULO, I.M.M., NUNES, X.P., DELANGE, D.M. AND ALMEIDA, J.R.G.S. Phytochemical screening and antioxidant activity of methanolic fraction from the leaves of *Crescentia cujete* L. (Bignoniaceae). **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, 8, 2016. 231-236. <http://www.jocpr.com/articles/phytochemical-screening-and-antioxidant-activity-of-methanolic-fraction-from-the-leaves-of-crescentia-cujete-l-bignoniaceae.pdf>

PASCUAL, M.E. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of ethnopharmacology**, v. 76, n. 3, p. 201-214, 2001.

PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ MATA, D.; VILLAR, A. *Lippia*: Traditional uses, chemistry and pharmacology: A review. **J Ethnopharmacol.**, v. 76, p. 201–14, 2001.

PAVÃO F. Structure of *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase complexed with chalepin, a natural product inhibitor, at 1.95 Angstrom resolution. **Febs Letters**, v.520, p.13-7, 2002.

PERES-BOTA D, RODRIGUEZ H, DIMOPOULOS G. Are infections due to resistant pathogens associated with a worse outcome in critically ill patients. **J Infect.** 47:2003. 307-316.

PEREIRA LLS et al. Ação inibitória e estabilidade do extrato de farinha de feijão branco sobre enzimas digestivas na presença de fluido gástrico simulado. **Revista Brasileira de**

Farmácia, 92: 367-372, 2011.

PETRIN, D., DELGATY, K., BHATT, K., GARBER, G. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. **Clin.Microbiol.**, v. 11, p. 300-317, 1998.

PETTIT, G.R.; SCHAUFELBERGER, D.E. Isolation and structure of the cytostatic lignan glycosidephyllanthostatin. **A.J. Nat. Prod.**, v. 51, p. 1104–1112, 1988.

PETTIT, G.R.; CRAGG, G.M.; SUFFNESS, M.I.; GUST, D.; BOETTNER, F.E.; WILLIAMS, M.; SAENZ-RENAULD, J.A.; BROWN, P.; SCHMIDT, J.M.; ELLIS, P.D. Antineoplastic agents. 104. Isolation and structure of the *Phyllanthus acuminatus* vahl (Euphorbiaceae) glycosides. **J. Org. Chem.**, v. 49, p. 4258–4266, 1984

PENELUC, T.; DOMINGUES, L. F.; ALMEIDA, G. N. de; AYRES, M. C. C.; MOREIRA, E. L.T.; CRUZ, A. C. F. da; BITTENCOURT, T. C. B. do S. C. de; ALMEIDA, M. A. O. de; BATATINHA, M. J. M. Atividade anti-helmíntica do extrato aquoso das folhas de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, supl. 1, p. 43-48, 2009.

PEREIRA, S. S.; LOPES, L. S.; MARQUES, R. B.; FIGUEIREDO, K. A.; COSTA, D. A.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. Antinociceptive effect of *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae) in models of acute pain in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, n. 2, p. 227-231, 2010

PERES-BOTA, D.; RODRIGUEZ, H.; DIMOPOULOS, G.- Are infections due to resistant pathogens associated with a worse outcome in critically ill patients? **J Infect**, v. 47, p. 307-316, 2003.

PERUMAL SAMY, R.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Therapeutic Potential of Plants as Anti- microbes for Drug Discovery. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.7, n.3, p. 283-294, 2010.

PETRIN, D., DELGATY, K., BHATT, K., GARBER, G. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. **Clin.Microbiol.**, v. 11, p. 300-317, 1998.

PETTIT, G.R.; SCHAUFELBERGER, D.E. Isolation and structure of the cytostatic lignan glycoside phyllanthostatin. **A.J. Nat. Prod.**, v. 51, p. 1104–1112, 1988.

PETTIT, G.R.; CRAGG, G.M.; SUFFNESS, M.I.; GUST, D.; BOETTNER, F.E.; WILLIAMS, M.; SAENZ-RENAULD, J.A.; BROWN, P.; SCHMIDT, J.M.; ELLIS, P.D. Antineoplastic agents. 104. Isolation and structure of the *Phyllanthus acuminatus* vahl (Euphorbiaceae) glycosides. **J. Org.Chem.**, v. 49, p. 4258–4266, 1984.

PIRANI, J. R. Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Rutaceae. **Rodriguésia**, v. 56, n. 86, p.189-204, 2005.

PITTET, D - Infection control and quality health care in the new millennium. **AmJ Infect Control**, v. 33, p. 258-267, 2005.

PILLAI SK, RC MOELLERING, GM ELIOPOULOS. Antimicrobial combinations, 365-440. In V. Lorian (ed.), Antibiotics in laboratory medicine, 5th ed. **The Lippincott Williams &**

Wilkins Co., Philadelphia, Pa.2005.

PLOWMAN, T. C.; HENSOLD, N. Names, types and distribution of neotropical species of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae). **Brittonia**, v. 56, n.1, p. 1-53, 2004.

POLONINI, H.C., RAPOSO, N.R.B. AND BRANDÃO, M.A.F. Fotoprotetores naturais como instrumento de ação primária na prevenção de câncer de pele. **Revista APS**, 14, 2011, 216-223. <https://aps.ufjf.emnuvens.com.br/aps/article/viewFile/1081/478>

POLONINI, H.C., LIMA, L.L., GONCALVES, K.M., DO CARMO, A.M., DA SILVA, A.D. AND RAPOSO, N.R. Photoprotective activity of resveratrol analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 21, 2013, 964-968. <https://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2012.11.052>
POZHIDAEV, A.E. Hypothetical way of pollen paerture patterning. 3. A family-based study of Krameriaceae. **Review of Palaeobotany and Palynology**, v. 127, p. 1-23, 2002.

RABÊLO, S.V., COSTA, M.M., LIBÓRIO, R.C. AND ALMEIDA, J.R.G.S. Atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de atemoia (*Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, 36, 2014, 265-271. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452014000500031>

RAO, Y. K.; GEETHANGILI, M.; FANG, S. H.; TZENG, Y. M. Atividades antioxidantes e citotóxicas de compostos fenólicos e compostos relacionados que ocorrem naturalmente: Um estudo comparativo. **Food Chem. Toxicol.**, v. 45, p. 1770-1776, 2007.

RIBEIRO, D.A., MACÊDO, D.G., OLIVEIRA, L.G.S., SARAIVA, M.E., OLIVEIRA, S.F., SOUZA, M.M.A. AND MENEZES, I.R.A. Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil. **Brazilian Journal of Medicinal Plants**, 16, 2014, 912- 930. http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/13_059

ROBERTS EAH, CARTWRIGHT RA, OLDSCHOOL M. Phenolic substances of manufactured tea. I. Fractionation and paper chromatography of water-soluble substances. **J Sci Food Agr** 8: 1957. 72-80.

ROBIN, A.L. Ocular hypotensive efficacy and safety of a combined formulation of betaloxol and pilocarpine. **Trans Am Ophthalmol Soc**, v.94, p.89-101, 1996

ROLIM TL, et al. **Constituintes químicos e atividade antioxidante de *Byrsonima gardneriana* (Malpighiaceae)**. *Quím Nova*. 36: 2013. 524-527.

SANGUINETTI M, POSTERARO B, ROMANO L, BATTAGLIA F, LOPIZZO T, DE CAROLIS E, FADDA G. In vitro activity of Citrus bergamia (bergamot) oil against clinical isolates of dermatophytes. **J Antimicrob Chemother** 59: 2007. 305-308.

SILVA VA. et al. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana do extrato da *Lippia sidoides* Cham. sobre isolados biológicos de *Staphylococcus aureus*. **Rev. bras. plantas med.** 12: 2010.452-455.

SOUSA EOSILVA NF, RODRIGUES FFG, CAMPOS AR, LIMA SG, COSTA JGM. Chemical compositi and resistance modifying effect of *Lantana camara* lin. **Pharmacognosy**

magazine. 6:2010. 79-82.

SILVA, C.G., MARINHO, M.G.V., LUCENA, M.F.A. AND COSTA, J.G.M. Ethnobotanical survey of medicinal plants in the Caatinga area in the community of Sitio Nazaré, Milagres, Ceará, Brazil. **Brazilian Journal of Medicinal Plants**, 17, 2015, 133-142.

SILVA, A. G., SILVA, L. C. N., BEZERRA FILHO, C.M., ARAUJO, D. R. C., SILVA, J. F. V., ARRUDA, I. R., ARAUJO, J. M., CORREIA, M. T. S., MACEDO, A. J. AND SILVA, M. V. Antimicrobial activity of medicinal plants of the Caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil. **Current Topics in Phytochemistry** 94. 2013.

SILVA, M. R. **Padronização de método colorimétrico para avaliação de atividade biológica de substâncias sobre formas taquizoíticas de *Toxoplasma gondii*, com a avaliação de triterpenos ácidos sobre o parasito.(60p.)** 2009. Dissertação (Mestrado em bioiências aplicadas à farmácia). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

SORVILLO, F. et al. *Trichomonas vaginalis*, HIV, and african-americans. **Emerg Infect Dis**, v. 7, p.927-32, 2001.

SALEEM, M.; NAZIR, M.; ALI, M.S.; HUSSAIN, H.; LEE, Y.S.; RIAZ, N.; JABBAR, A. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. **Natural Product Reports**, v. 27, p. 238-254, 2010.

SALGADO, M. A. S. Crescimento inicial de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. em diferentes condições de sombreamento. **Boletim do Herbário Ezechias Paulo Heringer**, v. 3, p. 37-45, 1998.

SANTOS, H. S.; COSTA, S. M.; PESSOA, O. D.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; FORTIER, S. Cytotoxic naphthoquinones from roots of *Lippia microphylla*. **Z Naturforsch C**. v. 58, p. 517-20, 2003.

SANTOS, H.S.; SILVEIRA, E. R.; COSTA, S. M.; LEMOS, T. L.; PESSOA, O. D.; UCHOA, D. E. ¹H AND ¹³C NMR application to structure elucidations of prenylated naphthoquinone dimers from *Lippia microphylla*. **An Ressonância Magn Nucl.**, v.1, p. 32-6, 2002.

SANTOS, A.P.; MORENO, P.R.H. *Pilocarpus* spp.: A survey of its chemical constituents and biological activities. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, p.115-137, 2004.

SANNOMIYA, M.; FONSECA, V.B.; SILVA, M.A. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 1-6, 2005.

SAWAYA, A.C.H.F. Screening species of *Pilocarpus* (Rutaceae) as sources of pilocarpine and other imidazole alkaloids. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 58, p.471-480, 2011.

SCOTTI, L.; VELASCO, M. V. R. **Envelhecimento cutâneo à luz da cosmetologia: estudo das alterações na pele no decorrer do tempo e da eficácia das substâncias ativas empregadas na prevenção.** São Paulo: Tecnopress, 2003.

SCHALKA, S.; DOS REIS, V. M. S. Fator de proteção solar: significado e controvérsias*. **An. Bras.Dermatol.** v.86, n. 3, p. 507-515, 2011.

Servier do Brasil. (2017)**Product informations** (Daflon® 500 mg). http://servier.com.br/sites/default/files/microsoft_word_14.06.17_bula_paciente_sem_marcacao_daflon_1000_aprovada_anvisa_aprovada_claire_1.pdf

SILVA, B.B.; ROSALEN, P.L.; CURY, J.A.; IKEGAKI, M.; SOUZA, V.; ESTEVES, A.; ALENCAR, S.M. Chemical Composition and Botanical Origin of Red Propolis, a New Type of Brazilian Propolis.**Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v.5, n.3, p.313- 316, 2008.

SECOR, W. E. Neglected parasitic infections in the United States: trichomoniasis. **Am J Trop MedHyg**, v. 90, n. 5, p. 800-4, May 2014.

SILVA, B. B, ROSALEN, P.L., CURY, J.A., IKEGAKI, M., SOUZA, V.C., ESTEVES, A. AND ALENCAR, S.M. (2008) Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of of Brazilian propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, 5, 2008, 313- 316.<https://dx.doi.org/10.1093/ecam/nem059>

SILVA, S. A. S.; CASTRO, J. C. M.; SILVA, T. G.; CUNHA, E.V.L.; BARBOSA, J.M.F.; SILVA, M.S. Kramentosan, a new trinorlignan from the roots of *Krameria tomentosa*. **Natural Product Letters**, v. 15, n.5, p. 323-329, 2001.

SILVA, M.J.; SALES, M.F. O gênero *Phyllanthus* L. (Phyllanthaceae - Euphorbiaceae Juss.) no biomacaatinga do estado de Pernambuco. **Rodriguésia**,v. 55, n. 84, p. 105-130,2004.

SILVA, M.J.; SALES, M.F. *Phyllanthus*L. (Phyllanthaceae) em Pernambuco, Brasil. **Acta Bot.Bras.**, v. 21, n.1, p.79-98, 2007.

SILVA, S. L. da; FIGUEIREDO, P. M.; YANO, T. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. leaves. **Acta Amazonica**, v. 37, n. 2, p. 281-286, 2007.

SILVA, V.A. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana do extrato da *Lippia sidoides* Cham. sobre isolados biológicos de *Staphylococcus aureus*. **Rev. bras. plantas med.** v.12, n.4, p. 452-455,2010.

SILVA, F. H. M.; SANTOS, F.A.R. Pollen morphology of the shrub and arboreal flora of mangroves of Northeastern Brazil.**Wetlands Ecology and Management**, v. 17, p. 423-443, 2009.

SILVA, M.S., LEITE, K.R.B. AND SABA, M.D. Anatomia dos órgãos vegetativos de *Hymenaea martiana* Hayne (Caesalpinioideae- Fabaceae): espécie de uso medicinal em Caetité-BA. **Brazilian Journal of Medicinal Plants**, 14, 2012, 673-679.<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722012000400015>

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Orgs).**Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre:Editora da UFRGS: Florianópolis:Editora da UFSC, 1104p. 2010.

SIMÕES, E.R.; SANTOS, E. A.; de ABREU, M. C.; SILVA, J. do N, NUNES, N. M.; da COSTA, M. P.; PESSOA. O. D.; PESSOA, C.; FERREIRA, P. M.J. Biomedical properties and potentiality of *Lippia microphylla* Cham. and its essential oils. **Intercult Ethnopharmacol.**, v.4, n.3, p.256-63, Review. 2015

SIMPSON, B.B. Krameriaceae. Flora Neotropica Monograph. New York: **New York Botanical Garden**, v.49, p. 2-88, 1989.

SIMPSON, B. B. Krameriaceae. **Flora Neotropica. Monograph**, v. 49, p.1 – 109, 1989.

SIMPSON, B.B. The past and present uses of Rhatany (*Krameria*, Krameriaceae). **Economic Botany**, v. 43, n. 3, p. 397-409, 1991.

SIMPSON, B. B.; WEEKS, A.; HELFGOTT, D. M.; LARKIN, L. L. Species relationships in *Krameria* (Kameriaceae) based on ITS sequences and morphology: implications for character utility and biogeography. **Systematic Botany**, v. 29, p. 97 – 108, 2004.

SKORUPA, L.; A. **Revisão taxonômica de *Pilocarpus Vahl* (Rutaceae). (426p) 1996.** Tese (Doutorado – Área de concentração – Botânica) - Instituto de Biologia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 1996.

SOUSA, E. O.; SILVA, N. F.; RODRIGUES, F. F. G.; CAMPOS, A. R.; LIMA, S. G.; COSTA, J. G. M. Chemical compositi and resistance modifying effect of *Lantana camara* lin. **Pharmacognosy magazine**, v. 6, p.79-82, 2010.

SOUZA, P. Z. **Dinâmica espaço-temporal de *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. em restinga nosul do Brasil.(118 p)2010.**Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Pós-Graduação em Ecologia, Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

SOUZA, F.P.,CAMPOS,G.R.,PACKER,J.F. Determinação da atividade fotoprotetora e antioxidante em emulsões contendo extrato de *Malpighia glabra* L. – Acerola. **Revista De Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, 34, 2013, 69-77.

SUN, L.; ZHANG, J.; LU, X.; ZKANG, L. Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p.2689–2696, 2011.

ROLIM, T. L.; WANDERLEY, F. T. de S.; Da CUNHA; E. V. L.; TAVARES, J. F.; De OLIVEIRA, A. M. F.; De ASSIS, T. S. Constituintes químicos e atividade antioxidante de *Byrsonima gardneriana* (Malpighiaceae). **Quím. Nova**, v.36, n.4, p.524-527, 2013.

TANIGUCHI, T.; KITAZAWA, Y. A risk-benefit assessment of drugs in the management of glaucoma. **Drug saf.**, v.11, n.1, p.68-74, 1994.

TORRES, D.S.C.; CORDEIRO, I.;GIULIETTI, A.M. O gênero *Phyllanthus* L. (Euphorbiaceae) na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 17, n. 2, p. 265-278, 2003.

TULP, M., BOHLIN, L. Unconventional natural sources for future drug discovery. **Drug**

Discov.Today, v. 9, p.450-458, 2004.

UCHÔA, A.D.A., OLIVEIRA, W.F., PEREIRA, A.P.C., SILVA, A.G., CORDEIRO, B.M.P.C., MALAFAIA, C.B., ALMEIDA, C.M.A., SILVA, N.H., ALBUQUERQUE, J. F.C., SILVA, M.V. AND CORREIA, M.T.S. Antioxidant activity and phytochemical profile of *Spondias tuberosa* Arruda leave extracts. **American Journal of Plant Sciences**, 2015, 6, 3038-3044. <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2015.619298>

UENG, Y. F.; CHEN, C. C.; CHEN, C. F. Inibição da hidroxilação de benzo (a) pireno por lignanas isoladas de *Justicia procumbens*. **J. Food Drug Anal.**, v. 8, p. 309-314, 2000.

VALENTIN, A.; PÉLISSIER, Y.; BENOIT, F.; MARION, C.; KONE, D.; MALLIE, M.; et al. Composition and antimalarial activity in vitro of volatile components of *Lippia multiflora*. **Phytochemistry**, v.40, p.:1439–42, 1995.

VASUDEVA, N.; MANISHA, V.; SHARMA, S.K.; SARDANA, S. Chemistry and biological activities of the genus *Dalbergia*. **Pharmacognosy Reviews**, v. 3, p.307-319, 2009.

VERAS, H. N.; RODRIGUES, F.F.; COLARES, A. V.; MENEZES, I. R.; COUTINHO, H. D.; BOTELHO, M. A.; et al. Synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil of *Lippia sidoides* and thymol. **Fitoterapia**, v. 83, p.508–12, 2012.

VERPOORTE, R.; COLLIN, A.; MEMELINK, J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. **Biochem.Rev.**, v.1, p.13-25, 2002.

VIIKKI, M.; PUKKALA, E.; NIEMINEN, P.; HAKAMA, M. Gynaecological infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia. **Acta Oncologica**, v. 39, p. 71-75, 2000.

VIOLANTE, I.M.P., SOUZA, I.M., VENTURINI, C.L., RAMALHO, A.F.S., SANTOS, R.A.N. AND FERRARI, M. Avaliação *in vitro* da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 19, 2009, 452-457. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2009000300020>

WAGNER H, BLADT S. **Plant drug analysis -A thin layer chromatography atlas**. Springer. 2.ed. Munich. 1996.

WANG, S. Q.; OSTERWALDER, U.; JUNG, K. Ex vivo evaluation of radical sun protection factor in popular sunscreens with antioxidants. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.25, n.6, p.525-530, 2011.

WEBSTER, G.L. 1956a. A monographic study of the West Indian species of the *Phyllanthus* L. **Journal of the Arnold Arboretum** 37: 91-122.

WEBSTER, G.L. 1956b. A monographic study of the West Indian species of the *Phyllanthus* L. **Journal of the Arnold Arboretum** 37: 341-357.

WEBSTER, G.L. Three new sections and a new subgenus of *Phyllanthus* (Euphorbiaceae). **Novon**, v. 12, p. 290-298, 2002.

WEBSTER, G.L. A synopsis of the Brazilian taxa of *Phyllanthus* section *Phyllanthus* (Euphorbiaceae). **Lundelia**, v.5, p. 1-26, 2002.

WINDAYANI, N.; RUKAYADI, Y.; HAKIM, E. H.; RUSLAN, K.; SYAH, Y. M. Antifungal activity of lignans isolated from *Phyllanthus myrtifolius* Moon. against *Fusarium oxysporum*. **Phytochemistry**, v. 12, p. 33–39, 2014.

YOUNG, A.J.; LOWE, G.M. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.385, p. 20-17, 2001.

ZADOK, D. Combined timolol and pilocarpine vs pilocarpine alone and timolol alone in the treatment of glaucoma. **Am J Ophthalmol**, v.117, n.6, p.728-731, 1994.

ZAGO A.. Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. 19 (4): 2009. 828-833.

ZORATI G. C.; MELLO, S. A. Incidência da Tricomoníase em Mulheres atendidas pelo sistema único de saúde em Cascavel e no Oeste do Paraná. **Arquivo de Ciências da Saúdeda UNIPAR**, v. 13, n. 2, p.133-138, 2009.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O.; GUERRA, M. P. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. rev. ampl. Florianópolis: Ed. da UFSC; Porto Alegre: Ed. da UFRGS, p. 577-614, 2004.

APÊNDICE A – ARTIGO ORIGINAL I

African Journal of Microbiology Research

Phytochemical profile, evaluation of the cytotoxic and antibacterial activity of ethanolic extracts of medicinal plants.

Francinete Carla Nunes Cavalcanti Viana¹; Deizi Caroline da Silva Barbosa¹; Fernanda Pacífico de Almeida Neves¹; Tiago Fonseca Silva¹; Joelma Pessoa¹; Bruna Cordeiro¹; Clovis Macêdo Bezerra Filho¹; Rafael Matos Ximenes²; Joseane Fechine Tavares³; Maria Tereza dos Santos Correia¹; Márcia Vanusa da Silva¹.

¹ Biochemistry Department, Biosciences Center, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil.

² Department of Antibiotics, Biosciences Center, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil.

³ Pharmaceutical Sciences Department, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, Castelo Branco, 58051-970, João Pessoa, Paraíba, Brazil.

ABSTRACT

Natural products isolated or in association with the original medicines, have been tested for a more effective control for microorganisms aiming potentiation in their action and minimization of undesirable effects. Faced with the biotechnological potential of medicinal plants, the study of the antimicrobial action of its metabolites represents a fundamental step towards the use of these products. Thus, the present work aimed to know the phytochemical profile and the evaluation of the cytotoxic and antibacterial activity of medicinal plants against multiresistant bacteria. Ethanolic extracts were prepared from the aerial parts of *Dalbergia ecastaphyllum*, *Byrsonima gardineriana*, *Erythroxylum revolutum*, *Zanthoxylum rhaiifolium*, *Pilocarpus spicatus*, *Lippia microphylla*, *Phyllanthus acuminatus*, *Krameria tomentosa*. The phytochemical approach of extracts by thin layer chromatography (TLC) revealed the presence of Flavonoids, Triterpenes, Steroids, Cinnamic Derivatives, Saponins, Monoterpenes and Sesquiterpenes, Proanthocyanidins, Curaminas and no extract presented quinones. In the analysis of the antibacterial activity of the extracts, it was verified that these showed inhibitory activity for the studied bacteria, varying the Minimal Inhibitory Concentration between 390 and 6250 µg / ml. All extracts tested showed a bactericidal potential with the MBC / MIC ratio between 1 and 4, except for the extract of *K. tomentosa* for *E. coli* that presented bacteriostatic potential. Among the extracts studied, two were selected for the study of Checkerboard, *Byrsonima gardineriana* against *Staphylococcus aureus* (MIC 390 µg/ ml) and *Pseudomonas aeruginosa* (MIC 3130 µg/ml), as well as *Krameria tomentosa* against *Staphylococcus aureus* (MIC 390 µg/mL) and *Escherichia coli* (MIC 6250 µg/ml). In evaluation of extracts cytotoxicity on human type O erythrocytes, it was observed that the extracts doesn't present cytotoxicity. Thus, in view of the obtained results, it is concluded that the extracts analyzed have bioactive potential, being promising and served as the basis for studies aiming at obtaining new antimicrobials.

Keywords: Phytochemical profile; Antibacterial activity; Cytotoxic activity and medicinal plants.

INTRODUCTION

Plants produce in addition to the primary metabolites, a large variety of secondary metabolites, although not essential to the producer organism, play an important role in the survival of the plant in its ecosystem. The secondary plant metabolic pathways give rise to several classes of compounds, such as alkaloids, terpenoids, anthocyanins, steroids, flavonoids, quinones,

coumarins, which are sometimes present in commercial applications such as pharmaceuticals, dyes, flavors and insecticides. (Kaur et al., 2009, Fabri et al., 2009, Lai et al., 2010).

From the introduction of the oldest antimicrobial agent to the most recent, there has been a selective pressure of microorganisms caused mainly by the indiscriminate use of antibiotics and chemotherapeutics, resulting in the development of resistant species and significantly increasing the risk of infection. (Peres-Bota, 2003; Pittet D, 2005). Resistance to a particular drug is directly associated with its misuse, since more than 60% of these drugs are prescribed in an irrational and indiscriminate way (Novaretti et al., 2014). Faced with this situation, hospital infections are recognized as one of the main causes of morbidity, mortality and increase in hospital costs, especially in developing countries. Thus, resistance to antibacterial agents has become an important public health problem, since of the two million people who contract a bacterial disease in hospitals in Brazil every year, about 70% of the cases involve bacterial strains that are resistant to at least one drug (Oliveira & Silva, 2008; Dias & Monteiro, 2010). In an attempt to more effectively control microorganisms, some measures have been taken, such as reducing the use of antibiotics. In addition, researchers have tested natural products isolated and in association with the original medicines (Sousa et al., 2010), aiming at enhancing their action and minimizing undesirable effects (Gibbons, 2004; Gurib-Fakim, 2006). Antimicrobial studies have shown that plant extracts have bactericidal effects and may be a solution to the problems caused by increased bacterial resistance to antibiotics (Malik et al., 2015; Ganaz & Yadav, 2015; Yazan et al., 2016).

Use of plants in folk medicine is one of the oldest forms of medicinal practice in mankind. The knowledge of the healing properties of these plants was acquired in a totally empirical way, and transmitted through time. In recent years, knowledge about the therapeutic potential of plants with antimicrobial activity has aroused scientific interest, seeking new ways to control and treat various diseases (Garcia & Orlanda, 2014).

Medicinal plants provide chemical substances that are used as models for structural modifications and optimization of pharmacological and biochemical properties, serving as inspiration for organic chemicals, stimulating them to face challenges in the synthetic construction of new molecular structures (BRAZ-FILHO, 2010). Natural products, including plant metabolites, are known for their importance in drug development (Leonti et al, 2017).

Given the biotechnological potential that medicinal plants have research aimed at investigating the action of chemical compounds, as well as, evaluate the bioactive potential of the plants under study becomes timely, so that the results can contribute to the increase of the quality of new Drugs, as well as bringing knowledge from the scientific point of view. Thus, the present work aimed to know the phytochemical profile, the cytotoxic and antibacterial activity of ethanolic extracts of medicinal plant.

MATERIAL AND METHODS

Plant materials

Material parts of *Dalbergia ecastaphyllum*, *Byrsonima gardneriana*, *Erythroxylum revolutum*, *Zanthoxylum rhoifolium*, *Pilocarpus spicatus*, *Lippia microphylla*, *Phyllanthus acuminatus* and *Krameria tomentosa* were collected at different sites, as mentioned in Table 1. The fresh botanical material was dehydrated in an oven with circulating air for 72 hours, at average temperature at 40°C, and then comminuted in a mechanical mill.

Table 1: Botanical material data

Species	Colect site	Month/Year	Deposit number
<i>D. ecastaphyllum</i>	Rio Tinto-PB	Setembro/2010	45738 ^a
<i>B. gardneriana</i>	Serra Branca-PB	Março/2007	AGRA 947 ^b

<i>E. revolutum</i>	Serra Branca-PB	Junho/2010	AGRA 5695 ^b
<i>K. tomentosa</i>	Santa Rita- PB	Junho/2010	AGRA 3271 ^b
<i>P. spicatus</i>	Maturéia-PB	Junho/2011	AGRA 7428 ^b
<i>L. microphylla</i>	Serra Branca-PB	Junho/2010	AGRA 6118 ^b
<i>P. acuminatus</i>	Maturéia-PB	Março/2012	AGRA743 2 ^b
<i>Z. rhaifolium</i>	Maturéia-PB	Junho/2011	AGRA 5184 ^b

^a Herbário do Departamento de Sistemática e Ecologia(DSE)-UFPE;

^bHerbário Professor Lauro Pires Xavier da UFPB.

Extracts production

Plant powder was macerated in 95% ethanol (EtOH) for 72 hours, which process was repeated thoroughly.

Then the extractive solution was filtered and concentrated on rotary evaporator under reduced pressure at 40 °C.

Microrganisms

All strains was obtained from collection of Antibiotics Department - Universidade Federal de Pernambuco colection, UFPE(UFPEDA), *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 02), *Escherichia coli* (UFPEDA 224) and *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 416).

Phytochemical analysis

Eight extracts were suspended in methanol to a final concentration of 10 mg / mL. Aliquots of 5 µl of each extract were submitted to thin layer chromatography (TLC). The tests consisted on simple qualitative chemical

reactions that demonstrated presence of compounds such as: tannins, flavonoids, steroids, saponins and alkaloids. Polyamide (11 F254-merck) plates were used for analysis of the secondary metabolites, using different mobile phases and specific developers (Table 2). (Brasseur & Angenot, 1986; Harborne JB, 1998; Roberts EAH, 1957; Wagner H, 1996).

Table 2- TLC conditions

Secondary metabolites	Standard	Elution system	Revelator	References
Flavonoid, Cinnamics acids	Quercetin, rutin, chrologenic acid	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O(100:11:11:27 v/v)	NEU	Wagner & Bladt, 1996 Brasseur & Angenot, 1986
Triterpens and streroids	β-sitosterol	Toluen:AcOEt(90:10 v/v)	Lieberman &Burchard	Harborne, 1998
Saponins	-	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O(100:11:11:27 v/v)	Lieberman &Burchard	Harborne, 1998
Mono sesquiterpens	e Timol	Toluen:AcOEt(97:3 v/v)	Anisaldehyde sulfuric KOH	Harborne, 1998
Cumarinss and Quinones	Cumarin and lapachol Pilocarpine	CHCl ₃ -MeOH (98:2 v/v)	Dragendorff	Wagner & Bladt, 1996
Alkaloids	-	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O(100:11:11:27 v/v)	Vanilin chloridic	Wagner & Bladt, 1996
Proantocianidin	Catequin	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O(100:11:11:27 v/v)	-	Bladt, 1996
				Roberts <i>et al.</i> 1957

Antibacterial activity

Antimicrobial activity was evaluated by Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (BMC) determination, according to Oliveira et al. (2012).

The extracts were diluted in 10% Dimethylsulfoxide (DMSO) in Mueller-Hinton Broth medium. In the 96-well sterile microplate, serial dilutions of the extracts in quadruplicates were performed, varying the concentration from 50,000 µg / ml to 195 µg / ml. 10 µl of the bacterial suspension (1.5 x 10⁸ CFU / ml) was then inoculated into each well. It was used as negative control (medium), solvent control (medium, DMSO and bacterial suspension) and positive control (medium and bacterial suspension).

After 24h incubation at 37°C, a resazurin solution (0.01%) was used as indicator, change in color from purple to pink was recorded with bacterial growth. The lowest concentration, in which there is no color change was taken as the MIC. Cultures were seeded in MHA medium (Mueller-Hinton Agar) and incubated for 24 h at 37 ° C to determine the CMB, which corresponds to the minimum concentration of extract that causes the elimination of the microorganism (NCCLS, 2009).

Time kill assay

S. aureus and *P. aeruginosa* culture were diluted 1: 100 in MHB and placed overnight under agitation at 37 ° C. On reaching na OD₆₀₀ 0.1 , they were distributed in fresh MHB tubes containing extracts of *B. gardineriana* and *K. tomentosa* at concentrations of 1/2 MIC (195 µg / ml), MIC (390 µg / ml) and 2x MIC (780 Mg / ml) for *S. aureus* and 1/2 MIC (1565 µg / ml), MIC (3130 µg / ml) and 2x MIC (6260 µg / ml) for *P. aeruginosa*. Bacterial growth was monitored every 1 hour and 30 minutes, from 0 hours to 6 hours and after 24 hours, using 4 µl of suspensions diluted in triplicate. The plates were incubated at 37 ° C for 24 h and subsequently calculated at CFU / ml

Checkerboard assay

To evaluate the synergistic effect from extracts with the best antimicrobial activity (microdilution), the modified microdilution technique for the Checkerboard assay was performed according to the methodology described by Pillai & Moellering (2005). This assay the antimicrobial was chosen based on the antibiogram. The *S. aureus* suspension was standardized from a 24 hour culture in MH to 0.5 of the McFarland scale (approximately 1.0 x 10⁸ CFU / ml). The wells of the microplates (96 wells) were filled with 80µL of MH. In the last column n. 12), 100 µL of clindamycin at 0.1 µg / mL was added for serial dilution, sequentially transferring 100 µL from the previous well to the next well to column 2. Likewise, in the first row (A) 100µL of the root extract solution at 125µg / mL was added for further serial dilution. Therefore, column 1 contains only the extract and the H line only clindamycin. In the well H1 was made the control of bacterial growth. In addition, 20 µL of the *S. aureus* suspension was dispensed into each well. The microplates were incubated for 24 hours at 37 ° C and after this period a visual reading of bacterial growth and reading

with resazurin developer (100 µg / mL), used as an indicator of bacterial growth, was performed. The experiments were carried out in triplicate.

For the evaluation of the interaction between the different treatments, the fractional inhibitory concentration index (FICI) was calculated according to the following formula:

$$FICI = \frac{(MIC_{in \text{ extract combination}})}{(MIC \text{ extract})} + \frac{(MIC_{in \text{ clindamycin combination}})}{(MIC \text{ clindamycin})}$$

FICI obtained was evaluated following this parameters according to Kumar *et al.* (2012).

Table 3. FICI values showing interactions

INTERACTION	FICI (mg/mL)
Sinergism	CIF≤0,5
Aditive	0,5<CIF≤1
Indiferent	1<CIF≤2
Antagonism	CIF≤2

FICI: fractional inhibitory concentration index; FIC: fractional inhibitory concentration.

Hemolytic in vitro assay

Hemolytic activity assay was performed using red blood cell extract obtained by collecting 5 ml of human venous blood from an apparently healthy adult individual. Human erythrocytes were washed three times with 0.9% NaCl. Extracts were prepared at the concentration of 2000, 1000, 500, 250 and 125 µg / ml, diluted with DMSO and 0.9% NaCl, then added 4% erythrocytes to these extracts. The mixture was allowed to stand at 37 ° C for 60 minutes and then centrifuged for five minutes at 3000 rpm. As positive control, blood was used with 0.1% Triton X-100 and blood, DMSO and NaCl 0.9% were used as the negative control. Subsequently, the mixture was centrifuged for five minutes at 3000 rpm, 200 µL of the supernatant was transferred to a 96-well plate. Absorbance was measured at 570 nm. The percentage of hemolysis was calculated using the following equation:

$$\text{Hemolysis} = (A - A_0) / (AX - A_0) \times 100;$$

Where: A is measured value at OD570 in extract solution, A0 means OD 570 in NaCl and AX is OD 570 nm, with Triton X-100 0.1%.

RESULTS AND DISCUSSION

Phytochemical analysis

The chromatographic plates were analyzed according to the presence (+) or absence (-) of the secondary metabolites identified by the developers, as shown in table 4. In this way the phytochemical approach of the extracts by thin layer chromatography (TLC) revealed the presence of Flavonoids, Triterpenes, Steroids, Cinnamic Derivatives, Saponins, Monoterpenes and Sesquiterpenes, Proanthocyanidins, Curamines. The secondary metabolites found in most of the extracts were Triterpenes and Steroids, with the exception of *K. tomentosa* that presented only traces for these two metabolites. Then the most present compounds were flavonoids, Proanthocyanidins, monoterpenes and sesquiterpenes. No extract had quinones.

According to some authors, tannins and flavonoids in plants, perform activities as protection against insects, microorganisms and solar radiation, therapeutic action for its anti-inflammatory, antifungal, antioxidant and healing action (Zuananni and Montanha, 2004).

Terpenoids form a large group with very diverse structures derived from C5 isoprene units. They are subdivided into six classes: Iridoides, monoterpenes, sesquiterpenes, diterpenes, triterpenes and saponins (Chan-Bacab and Pena Rodriguez, 2001). In the present study, the use of the herbicide-resistant insecticides (Cheng et al., 2009), disinfectants (Hendry et al., 2009), fungicides (Sanguinetti et al., 2007) and bactericides (Karpanen et al. 2008). Rolin et al., 2013, studying the ethanolic extract of *Byrsonima gardneriana* by column chromatography with silica gel, isolated five triterpenes, in our study triterpenes were also found in *B. gardneriana* in the CCD test.

Tabela 4- Resultados de análise fitoquímica dos extratos de plantas da medicinais.

Metabolitos secundários	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8
Flavonoids	+++ (	+++ (	+(1	+(2	+++ (	+++ (1,	+++ (1,	+++ (1,2
Derived	1)	1)	tr	+++	1)	2)	2)	)
cinnamic	-	-	+++	+++	+	tr	+	+
Triterpens	+++	+++			+++	+++	+++	tr

Steroids	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	tr
Saponins	-	-	-	++	++	-	-	-
Monoterpenes	T r	Tr	tr	++	++	++	++	tr
Sesquiterpenes	-	-	-	+	-	+	-	-
Alkaloids								
Curamins	-	-	-	+++	+++	-	+	-
Quinones	-	-	-	-	-	-	-	-
Proantocianidins	+(3)	+++ ^(3,4)	+(4)	-	-	-	-	+++ ^(3,4)

(-) negative; (+) low concentration ; (++) médium concentration; (+++) higher concentration; (tr) traços. E1: *D. ecastophyllum*; E2: *B. gardineriana*; E3: *E. revolutum*; E4: *Z. rhaifolium*; E5: *P. spicatus*; E6: *L. microphylla*; E7: *P. acuminatus*; E8: *K. tomentosa*. Nota: ⁽¹⁾aglicona e heterosides de 3',4'-OH flavonoids; ⁽²⁾aglicons e heterosides of 3'- OH flavonoides; ⁽³⁾Proantocianidins oligomeric; ⁽⁴⁾Proantocianidins polimerics.

Antibacterial activity

In the analysis of the antibacterial activity of the extracts, it was verified that these showed inhibitory activity for the studied bacteria, varying the Minimal Inhibitory Concentration between 390 and 6250 µg / ml (Table 4). The most promising extracts for *S. aureus* were those of the species, *Byrsonima gardineriana* and *Krameria tomentosa* with IMC of 390 µg / ml and CMB of 1560 µg / ml, for both extracts. However, for *P. aeruginosa* the *Byrsonima gardineriana* extract presented MICs of 6250 and CMB and 12500 µg / ml. For *Escherichia coli* the extract that presented the best MIC was *Krameria tomentosa* 6250 µg / ml, but for this extract the CMB was 50,000 µg / ml. The other extracts presented MICs ranging from 780 to 50,000 µg / ml (Table 5).

The results obtained for *S. aureus* for all extracts, with the exception of the extract of *P. acuminatus*, were shown to be promising for inhibition of *Staphylococcus aureus*, since the concentrations were lower than those reported in the literature also for *S. aureus* with extracts of *Vismia guianensis* and *Symphonia globulifera* in which they presented MIC of 312500 µg / ml for both extracts (Araújo, 2010).

Table 5- Antimicrobial activity of medicinal plants extracts against multiresistant bacteria.

Species	Bac 01		Bac 02		Bac 03	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MI C	MB C
	µg/mL					
<i>B. gardineriana</i>	390	1560	3130	6250	12500	-
<i>D. ecastaphyllum</i>	780	3130	6250	12500	50000	-
<i>E. revolutum</i>	1560	3130	25000	-	ND	ND
<i>K. tomentosa</i>	390	1560	ND	ND	6250	50000
<i>L. microphylla</i>	1560	3130	25000	-	12500	12500
<i>P. spicatus</i>	6250	1250	ND	ND	12500	50000
<i>P. acuminatus</i>	50000	50000	25000	-	50000	50000
<i>Z. rhaifolium</i>	12500	12500	25000	-	50000	50000

MIC = Minimum Inhibitory Concentration, MBC = Minimum bactericidal concentration Bac 01 =

Staphylococcus aureus, Bac 02 = *Pseudomonas aeruginosa*, Bac 03 = *Salmonella enteritidis*, Bac 04 = *Klebsiella pneumoniae*, Bac 05 = *Escherichia coli* - = no inhibition, ND = no determination

In the present study, the antimicrobial activity of methanolic extracts of *Byrsonima fagifolia*, *Byrsonima basiloba* and *Byrsonima intermedia* was determined by Michelin et al. (2008) and determined for the extract of *B. basiloba* MIC of 6000 µg / ml against *Staphylococcus epidermidis* and for the extract of *B. intermedia* MIC Of 1500 µg / ml against *E. faecalis* and 3000 µg / ml against *B. subtilis*. In our study the extract of *B. gardineriana* showed an

excellent antimicrobial activity for *S. aureus* being more promising than that presented for the *Byrsonima* species studied by Michelin et al. (2008).

There is no consensus on the acceptable level for extracts of plant material when compared to standard antibiotics. Some authors consider only results similar to those of known antibiotics provided that a fraction is already determined (Aligianis et al., 2001).

The results of the present study show that the essential oil of *Lippia sidoides* inhibited the multiplication of strains of *Staphylococcus aureus* according to Bertini et al., (2005) e Oliveira et al., (2006). Nader (2010) studying the hexanic extract of *Lippia sidoides* found a reasonable antimicrobial activity, with a MIC of 500 µg / mL. These data differ from those found in our study where the ethanolic extract of *Lippia microphylla* presented MIC of 1560 µg / mL for *S. aureus*. Compounds can be classified as microbicidal agents when CMB / MIC ≤ 4 (Pankey and Sabath, 2004). All the extracts tested for the studied bacteria presented a bactericidal potential with the relation CMB / CMI with values between 1 and 4, except for the extract of *K. tomentosa* for

Escherichia coli that presented bacteriostatic potential, because it presented a relation of 8 between the MIC and The CMB (Table 6).

Table 6. CMB/CMI ratio.

PLANT	Bac 01	Bac 02	Bac 03
	MCB/MIC		
<i>Byrsonima gardineriana</i>	4	2	-
<i>Dalbergia ecastaphyllum</i>	4	2	-
<i>Erythroxylum revolutum</i>	2	-	-
<i>Krameria tomentosa</i>	4	ND	8
<i>Lippia microphylla</i>	2	-	-
<i>Pilocarpus spicatus</i>	2	ND	-
<i>Pyllanthus acuminatus</i>	1	-	4
<i>Zanthoxylum rhaifolium</i>	1	-	-

MIC = Minimum Inhibitory Concentration, MBC = Minimum bactericidal concentration; Bac 01 = *Staphylococcus aureus*, Bac 02 = *Pseudomonas aeruginosa*, Bac 03 = *Salmonella enteritidis*, Bac 04 = *Klebsiella pneumoniae*, Bac 05 = *Escherichia coli* - = no inhibition, ND = no determined

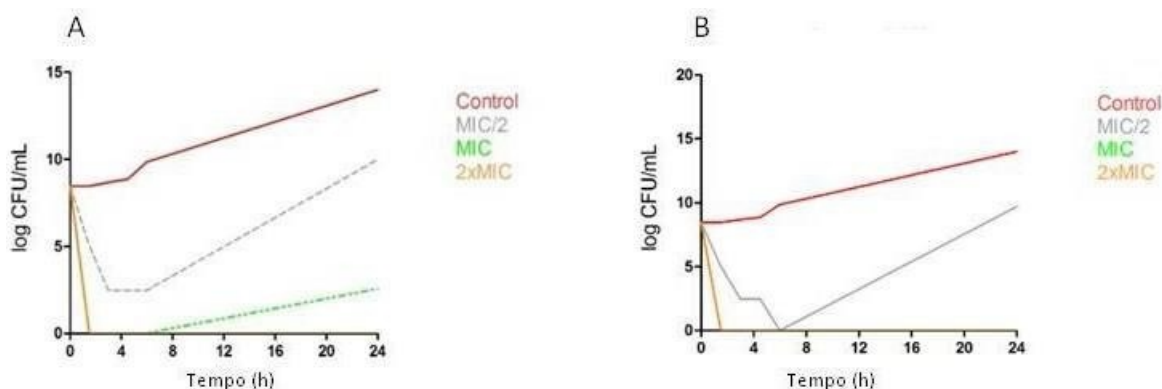


Figura 1: Growth curves *B. gardineriana* (A) and *K. tomentosa* (B) against *S. aureus*.

Antibiogram

Based on antibiogram, the antimicrobials Imipenem, Gentamicin, Amikacin, Tetracycline, Nitrofurantoin and Meropenem showed sensitivity for the five bacterial species, whereas Oxacillin, Clindamycin and Ampicillin presented resistance to most extracts, highlighting Clindamycin that showed resistant profile for *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* bacteria and intermediate resistance profile for *S. aureus* (Table 7). Bacterial resistance to antimicrobial agents is considered to be an inherent problem in antimicrobial therapy, which is why it is always necessary to seek new therapeutic sources. Testing natural products may be an important alternative measure to help solve this resistance problem (Silva et al., 2010).

Checkerboard assay

For this assay, an antimicrobial was selected based on its resistance profile, according to the antibiogram performed (Table 7). In this way, the antimicrobial clindamycin presented resistance for all species, except for *S. aureus* that presented intermediate resistance and for this reason, was selected for analysis. The extracts selected were *Byrsonima gardineriana* against *Staphylococcus aureus* (MIC 390 µg / ml) and *Pseudomonas aeruginosa* (MIC 3130 µg / ml), which were selected as the best minimum inhibitory concentration for different bacteria to perform the Checkerboard study. MI) as well as *Krameria tomentosa* against *Staphylococcus aureus* (MIC 390 µg / ml) and *Escherichia coli* (MIC 6250 µg / ml).

Table 7. Bacterial profile resistance.

Antimicrobial	Bacteria species		
	BAC 01	BAC 02	BAC 03
Imipenem	S	S	S
Gentamicin	S	S	S
Oxacillin	S	R	R
Ciprofloxacin	I	S	S
Cefuroxime	S	R	S
Amikacin	S	S	S
Cefepime	S	R	S
Tetracycline	S	S	S
Ácido Nalidíxico	I	R	S
Cefazolin	S	R	S
Nitrofurantoin	S	S	S
Meropenem	S	S	S
Cotrimoxazole	S	I	S
Clindamycin	I	R	R
Cefoxitin	S	I	S
Ampicillin	R	R	S

S= Sensible; R= Resistant; I= Intermediary; BAC 01= *Staphylococcus aureus*; BAC 02= *Pseudomonas aeruginosa*; BAC 03= *Salmonella enteritidis*; BAC 04 = *Klebsiella pneumoniae*; BAC 05= *Escherichia coli*.

The Checkerboard method is an in vitro assay in which it analyzes the effect of

combinations of antimicrobial agents with distinct mechanisms of action on bacterial growth (Lorian, 2005; Medeiros, 2012).

The results obtained in this study by the Checkerboard trial were promising since, when tested in combination, plant extract and clindamycin, the Minimum Inhibitory Concentration was lower than when tested alone. For *Staphylococcus aureus* the MIC B. *gardineriana* was 390 µg / mL, whereas the FICI was 0.041 mg / mL, and the MIC K. *tomentosa* was 390 µg / mL whereas the FICI was 0.052 mg / mL for *Escherichia coli* MIC K. *tomentosa* was 6250 µg / mL, whereas FICI was 0.123 mg / mL and for *Pseudomonas aeruginosa* the MIC was 2.33 mg / mL, whereas FICI was 0.7 mg / mL. That is to say, in the treatment for said bacteria the therapeutic dose of the antimicrobial (clindamycin) combined with the plant extract may be lower, thereby retarding the development of resistance to the microorganism and improving the outcome of the therapy. These values are expressed as fractional inhibitory concentration index, calculated by an equation, and values ≤ 5 indicate a synergistic interaction, where the degree of synergism increases when the value tends to zero (Jackson et al., 2009). Based on this information, the result obtained from the association of the antimicrobial with the extracts in the proportion of 1: 2 (v / v) demonstrated synergistic interaction for *S. aureus* and *P. aeruginosa*, while for *E. coli* the interaction was classified as added (Table 8).

According to reports in the literature, the association of the essential oil of *E. citriodora* with antimicrobials (ampicillin, chloramphenicol, tetracycline) presented synergism for the species *S. epidermidis*. (Oliveira et al., 2006). In other studies carried out by Zago A. (2009), essential oils of lemongrass, mint and ginger presented synergistic interaction with eight, seven and five drugs tested respectively for *Staphylococcus aureus* species.

There are other studies that demonstrate synergism as the association of stilbenes and ciprofloxacin (Kumar et al., 2012), pentacyclic triterpenoids and methicillin and vancomycin antibiotics (Chung et al., 2011), of silibinin and ampicillin or gentamicin (Lee et al. (Gentamicin, Kanamycin, Tobramycin, Amikacin and Streptomycin) (Mitchell et al., 2012), among others.

Combining antimicrobials with natural products may be a therapeutic strategy. Combination therapy can be used to expand the antimicrobial spectrum to prevent the emergence of resistant organisms to minimize toxicity as well as to achieve synergistic antimicrobial activity (Kumar et al., 2012).

Table 8. Index of fractional inhibitory concentration for multiresistant bacterial species and interaction between clindamycin and extracts.

Bacteria	Alcoholic extract	FICI (mg/mL)	Interaction
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Byrsonima gardineriana</i>	0,041	Sinergism
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Krameria tomentosa</i>	0,052	Sinergism
<i>Escherichia coli</i>	<i>Krameria tomentosa</i>	0,123	Sinergism
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Byrsonima gardineriana</i>	0,7	Adicionad

FICI: fractional inhibitory concentration index; *S. aureus* = *Staphylococcus aureus*; *P. aeruginosa* = *Pseudomonas aeruginosa*; *E. coli* = *Escherichia coli*.

Hemolytic in vitro assay

For the evaluation of cytotoxicity, extracts of *Byrsonima gardineriana*, *Krameria tomentosa*, were selected, as they presented the best antimicrobial performance for each bacterium studied. In the evaluation of the cytotoxicity of extracts on human type O erythrocytes, it was observed that there was a low hemolytic activity (hemolysis rate <8%), for all extracts at all concentrations analyzed (Table 9), when compared with the groups Treated with Triton-X (positive control), indicating that there is no damage to the cell membrane of the human

erythrocytes, that is, the extracts did not present toxicity to the eukaryotic cells.

The mechanical stability of the erythrocyte membrane is important as an indicator of cytotoxicity and the in vitro hemolysis assay is widely used for the toxicological evaluation of plant extracts (Mukherjee & Rajasekaran, 2010). The major concern of hemolytic activity is the fact that free hemoglobin in plasma is harmful to health causing damage to vital organs such as liver, kidneys and heart, hence the importance of analyzing the toxic action of extracts (Carvalho et al., 2007).

Hemolytic activity may be a result of pore formation in cell membranes altering its permeability, and promoting cell rupture; however, several non-specific mechanisms may be responsible for erythrocyte hemolysis. These compounds can also cause hemoglobin oxidation producing meta-hemoglobin and thus cause hemolysis (Mukherjee & Rajasekaran, 2010), and can act as biological membrane protectors against the induction of oxidative damage induced by free radicals (Asgary et al. 2005). Phenolic compounds may present hemolytic activity by the oxidation of hemoglobin, forming meta-hemoglobin (Pereira et al., 2011).

Table 9. Hemolysis percentual according to extract concentrations.

Extract	Hemolysis %				
	2000mg/ mL	1000 mg/mL	500 mg/mL	250 mg/mL	125 mg/mL
<i>B. gardineriana</i>	6,49 ±0,018	3,79±0,01 7	1,54±0,003	0,59±0,008	0,17±0,004
<i>K. tomentosa</i>	3,25±0,0 15	1,48±0,00 3	0,78±0,008	0,32±0,003	0,02±0,001

CONCLUSION

According to the results evidenced in this study, we can conclude that, the alcoholic extracts have antimicrobial action against the bacteria studied. The combination of clindamycin and extracts obtained synergistic and additive interaction, which may be an option to be explored, and the extracts do not have cytotoxicity. The research of natural products with therapeutic potential is of great importance, the possibility of interaction, when associated with antimicrobials and extracts with inhibitory activity against the growth of bacterial species, may suggest future research and a greater exploitation of the obtained results.

REFERENCES

- Aligianis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou IB. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49: 4.168-4.170.
- Asgary S, Naderi GH, Askari N. (2005) Protective effect of flavonoids against red blood cell hemolysis by free radicals. Experimental and Clinical Cardiology. 10:88-90.
- Bertini ML. (2005) Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleo essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. Infarma. 17:80-2.
- Brasseur, Angenot (1986) Un reactif de choix pour la revelation des flavonoïdes: le melange diphenylborate D'aminoethanol -Peg 400. J. Chromatogr. 351: 351-355.
- Braz-Filho R. (2010) Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. Química Nova. 33:229-239.
- Cavalcanti Filho. (2014) Avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais extraídos de *Buchenavia tetraphylla*.
- Carvalho. (2007) Efeito da bomba de infusão de soluções sobre o grau de hemólise em concentrados de hemácias. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. 29:149-152.

- Chan-Bacab MJ, Peña-Rodríguez LM. (2001) Plant natural products with leishmanicidal activity. *Nat Prod Rep. Review* 18:674-88.
- Cheng SS. (2009) Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two *Eucalyptus* species. *Bioresource Technology*. 100:452-6.
- Chung PY, Navaratnam P, Chung LY. (2011) Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 10:1-6.
- Daniele CM, Miriam S, Maria EF, Daniel R, Lourdes CS, Alba RM, Souza-Brito, Wagner V, Hérica RNS. (2008) Antimicrobial activity of *Byrsonima* species (Malpighiaceae). *Rev. bras. farmacogn.*
- Dias M, Monteiro MS. (2010) Antibióticos e resistência bacteriana, velhas questões, novos desafios. *Cadernos Otorrinolaringologia: clínica, investigação e inovação*
- Fabri RL, Nogueira MS, Braga FG, Coimbra ES, Scio E. (2009) *Bioresource Technology*. 100: 428-433.
- Ganie AS, Yadav SS. (2015) FT-IR spectroscopic analysis of *Holoptelea integrifolia* (Roxb.) plant seed extracts and their antibacterial activity. *Res. J. Med. Plant*. 9: 417-426.
- García APM, Orlanda JFF. (2014) Evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto hidroalcohólico bruto *Mangifera indica* Linneu. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*.
- Gibbons S. (2004) Anti-staphylococcal plant natural products. *Natural product reports*. 126: 263-277.
- Gurib-Fakim A. (2006) Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular aspects of medicine*. 27: 91-93.
- Harborne JB. (1998) *Phytochemical Methods*. 3^a Ed. Londres: Chapman & Hall.
- Hendry ER, Worthington T, Conway BR, Lambert PA. (2009) Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1,8-cineole alone and in combination with chlorhexidine digluconate against microorganisms grown in planktonic and biofilm cultures. *J Antimicrob Chemother* 64: 1219-1225.
- Jackson C, Agboke A, Victor Nwoke V. (2009) In vitro evaluation of antimicrobial activity of combinations of nystatin and *Euphorbia hirta* leaf extract against *Candida albicans* by the checkerboard method. *Journal of Medicinal Plants Research*. 3:666-669.
- Kaur GJ, Arora DS. (2009) *BMCComplementary and Alternative Medicine*. 9:30-39.
- Karpanen TJ, Worthington T, Hendry ER, Conway BR, Lambert PA. (2008) Antimicrobial efficacy of chlorhexidine digluconate alone and in combination with eucalyptus oil, tea tree oil and thymol against planktonic and biofilm cultures of *Staphylococcus epidermidis*.
- Kumar SN, Siji JV, Nambisan B, Mohandas C. (2012). Activity and synergistic interactions of stilbenes and antibiotic combinations against bacteria in vitro. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 28:3143-3150.
- Lai HY, Lim YY, Kim KH. (2010) *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 10:15.
- Lee YS, Jang KA, Cha JD. (2010) Synergistic antibacterial effect between silibinin and antibiotics in oral bacteria. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*. 1-7.
- Malik A, S Bai, R Teneja, S. Dalal. (2015). In vitro screening of some indian medicinal plants for their activity against extended spectrum lactamases. *Br. Biotechnol. J*. 8:1-10.
- Marco Leonti, Gary I. Stafford, Maja Dal Cero, Stefano Cabras, Maria Eugenia Castellanos, Laura Casu, Caroline S. Weckerle. *Reverse Ethnopharmacology and Drug Discovery. Journal of Ethnopharmacology*.
- Lorian Victor. (2005) *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 5 ed. Williams & Wilkins.
- Medeiros M. (2012) Avaliação in vitro e in vivo de Efeitos sinérgicos de Antibacterianos para o tratamento de infecções por *Acinetobacter baumannii* multirresistentes produtoras de Carbapenemases tipo OXA endêmicas no Brasil.
- Mitchell G, Lafrance M, Boulanger S, Séguin DL, Guay I, Gattuso M, Marsault E, Bouarab K,

- Malouin F. (2012) Tomatidine acts in synergy with aminoglycoside antibiotics against multiresistant *Staphylococcus aureus* and prevents virulence gene expression. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 67:559- 568.
- Mukherjee A, Rajasekaran C. (2010) In vitro haemolytic activity of *Allium stracheyi* Baker. *Journal of Pharmacy Research*. 3:1160-1162.
- Nader TT. (2010) Potencial de atividade antimicrobiana in vitro de extratos vegetais do cerrado frente estirpes de *Staphylococcus aureus*. (dissertação de mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Jaboticabal.
- NCCLS. (2009) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, approved standard- second edition M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, USA.
- Novaretti MCZ, Aquino S, Piscopo MR. (2014) Controle de Vendas de Antibióticos no Brasil: Análise do efeito dos atos regulatórios no uso abusivo pelos consumidores. *Revista Acadêmica São Marcos*. 4: 25-39.
- Oliveira PF, et al. (2006) Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 16:510-6.
- Oliveira AC, Silva RS. (2008) Desafios do cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. *Revista Eletrônica de Enfermagem*. 10:189-197.
- Oliveira YLC, Silva LCN, Araújo JM, Correia MTS, Silva MV. (2012) *Natural Product Research*.
- Pankey GA, Sabbath LD (2004). Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram positive bacterial infections. *Clin. Infect. Dis*. 38:864–870.
- Peres-Bota D, Rodriguez H, Dimopoulos G. (2003) Are infections due to resistant pathogens associated with a worse outcome in critically ill patients. *J Infect*. 47:307-316.
- Pereira LLS et al. (2011) Ação inibitória e estabilidade do extrato de farinha de feijão branco sobre enzimas digestivas na presença de fluido gástrico simulado. *Revista Brasileira de Farmácia*. 92: 367-372.
- Pittet D (2005). Infection control and quality health care in the new millennium. *Am J Infect Control*. 33:258-267.
- Pillai SK, RC Moellering, And GM Eliopoulos (2005). Antimicrobial combinations, 365-440. In V. Lorian (ed.), *Antibiotics in laboratory medicine*, 5th ed. The Lippincott Williams & Wilkins Co., Philadelphia, Pa.
- Roberts EAH, Cartwright RA, Oldschool M (1957). Phenolic substances of manufactured tea. I. Fractionation and paper chromatography of water-soluble substances. *J Sci Food Agr* 8: 72-80.
- Rolim TL, et al. (2013) Constituintes químicos e atividade antioxidante de *Byrsonima gardneriana* (Malpighiaceae). *Quím Nova*. 36: 524-527.
- Sanguinetti M, Posteraro B, Romano L, Battaglia F, Lopizzo T, De Carolis E, Fadda G. (2007) In vitro activity of *Citrus bergamia* (bergamot) oil against clinical isolates of dermatophytes. *J Antimicrob Chemother* 59: 305-308.
- Silva VA. et al. (2010) Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana do extrato da *Lippia sidoides* Cham. sobre isolados biológicos de *Staphylococcus aureus*. *Rev. bras. plantas med*. 12: 452-455.
- Sousa EO, Silva NF, Rodrigues FFG, Campos AR, Lima SG, Costa JGM. (2010) Chemical composition and resistance modifying effect of *Lantana camara* Lin. *Pharmacognosy magazine*. 6: 79-82.
- Wagner H, Bladt S (1996). *Plant drug analysis -A thin layer chromatography atlas*. Springer. 2.ed. Munich.
- Zago A. (2009). Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos

humanos. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 19 (4): 828-833.

Zuanazzi JAS, Montanha JA.(2004). Flavonóides. In: *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Simões, C.M.O., Guerra, M.P. et al (orgs.) 5ª edição, revisada, ampliada, primeira reimpressão-Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC.

APÊNDICE B – ARTIGO ORIGINAL II

Antioxidant and photoprotective activity of ethanolic extracts of medicinal plants

Francinete Carla Nunes Cavalcanti-Viana¹; Amanda Dias de Araújo¹; Aline de Sousa Carvalho¹; Fernanda Granja da Silva Oliveira²; Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida²; Josean Fechine Tavares³; Maria Tereza dos Santos Correia¹; Márcia Vanusa da Silva¹.

¹ Biochemistry Department, Biosciences Center, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil.

²Center of Studies of Medicinal Plants (NEPLAME), Federal University of São Francisco Valley, Av. José de SáManiçoba, s/n, CEP 56304-917, Petrolina, Pernambuco, Brazil.

³Pharmaceutical Sciences Department, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, Castelo Branco, 58051-970, João Pessoa, Paraíba, Brazil.

E-mail: cavalcanti.fran@hotmail.com Tel.: +55 81 2126 8547; fax: +55 81 2126 8576

Abstract

Studies have shown the role of free radicals as one of those responsible for aging and degenerative diseases. Among the methods that determine the ability of antioxidants to sequester free radicals, the ABTS radical sequestration method can be highlighted. Phenolic compounds have been related to the antioxidant activity of medicinal plants. Ultraviolet radiation can be harmful to organisms, some studies focus efforts on evaluating photoprotective activities that plants may exhibit. This work proposes to evaluate the antioxidant and photoprotective activity in vitro of ethanolic extracts of medicinal plants. The crude ethanolic extract (EEB) was prepared from aerial parts of eight species (*Dalbergia ecastaphyllum*, *Byrsonima gardneriana*, *Erythroxylum revolutum*, *Zanthoxylum rhoifolium*, *Pilocarpus spicatus*, *Lippia microphylla*, *Phyllanthus acuminatus* and *Krameria tomentosa*). For the total phenolic compounds extracts, *K. tomentosa* and *L. microphylla* obtained the highest results with 416.20 and 373.48 mg GAE/g, respectively. For the test using the ABTS + radical, we showed respective values of 2206.66 mM, 2203.66 mM and 2133.33 mM TEAC and 99.84%, 99.68% and 96.42% of inhibition for *D. ecastaphyllum*, *B. gardneriana* and *K. tomentosa*. For the photoprotection analysis, the extracts of *D. ecastaphyllum*, *B. gardneriana*, *E. revolutum*, *L. microphylla* and *Z. rhoifolium*, presented maximum absorbance in the region of UVB radiation, and the others showed maximum absorbance in the UVC region. All extracts presented potential for SPF and can be used in association with chemical or cosmetic filters, providing the formulations with benefits.

Keywords: Medicinal plants; Antioxidant activity; Photoprotection.

1. Introduction

The oxidation and reduction processes are essential for life and represent normal phenomena that occur in cellular metabolism. Among the substances involved in these reactions are free radicals, which are organic or inorganic compounds with one or more unpaired electrons in the last electron layer, and these molecules are chemically unstable and very reactive [1]. Studies have shown the role of free radicals as responsible for aging and degenerative diseases, such as cancer, cardiovascular diseases, cataracts, immune system disorder and brain dysfunction [2, 3]. These molecules are also responsible for the decrease of food and raw materials life span [4].

Antioxidant compounds are substances which, are capable of retarding or even inhibiting oxidation of the substrate when present in small concentrations relative to the oxidizable substrate [5], and may be of natural and synthetic origin. The natural antioxidants are divided in two large groups, the enzymatic and the non-enzymatic, being found in vegetal products, and can stand out, because the synthetics can be accumulated in the organism favoring the mutagenic and carcinogenic effects [6]. They may also cause other diseases, such as increased liver weight and proliferation of the endoplasmic reticulum [4].

The incidence of skin cancer has increased each year and a major cause is excessive exposure to the sun light, which generates a large amount of radiant energy that propagates in the form of waves, where the shorter the wavelength, the higher the amount of energy propagated. Most of the solar radiation (99%) that reaches the earth is composed of non- ionizing energy (infrared, visible and ultraviolet) [7]. Ultraviolet radiation is divided into three distinct regions: UVC (100- 280nm), UVB (280-315nm) and UVA (315-400nm) [8, 9]. The UVC radiation is filtered by the ozone layer of the atmosphere, and therefore the UV radiation that reaches the Earth's surface contains only UVB and UVA corresponding to 5% and 95% respectively [7, 10]. These ultraviolet radiations have different activities on the organisms, beneficial or not. Thus, to avoid the harmful effects caused by these radiations, some studies concentrate

efforts to evaluate the photoprotective activity that plants can present, increasing the effectiveness of the sunscreens, looking for new natural sources of photoprotective compounds that can replace or reduce the concentrations of the synthetic sunscreens [11].

In addition, knowledge about medicinal plants often symbolizes the only therapeutic resource of some communities and ethnic groups. The great Brazilian biodiversity in addition to the updated legislation for the registration of herbal medicines, consolidates the use of plants as the first resource used in the treatment of several diseases, and this use is often done empirically, without its pharmacological properties confirmed scientifically [12]. Thus, they represent a therapeutic option of great importance for the maintenance of the health conditions of the people, especially for the low- income population, with the purpose of replacing or assisting the conventional therapies in the treatment of several diseases, for the ease of obtaining and for the low cost [13].

In this context, the study aimed to analyze the antioxidant and photoprotective activity of the ethanolic extract of eight species of medicinal plants (*Dalbergia ecastaphyllum*, *Byrsonima gardneriana*, *Erythroxylum revolutum*, *Zanthoxylum rhoifolium*, *Pilocarpus spicatus*, *Lippia microphylla*, *Phyllanthus acuminatus* and *Krameria tomentosa*).

2. Materials and Methods

2.1 Vegetal Material

The aerial parts of the species *Dalbergia ecastaphyllum*, *Byrsonima gardneriana*, *Erythroxylum revolutum*, *Zanthoxylum rhoifolium*, *Pilocarpus spicatus*, *Lippia microphylla*, *Phyllanthus acuminatus* and *Krameria tomentosa*, were collected in different locations in the state of Paraíba, Brazil. A voucher specimen of each material was prepared and deposited in the Herbarium of the Department of Systematics and Ecology (DSE) - UFPE and in the Herbarium Professor Lauro Pires Xavier (UFPB) (Table 1). The fresh botanical material was dehydrated in an oven with circulating air for 72 hours, at average temperature at 40 °C, and then powdered in a mechanical mill.

Table 1. Collection of botanical material

Species	Location	Month/Year	Voucher number
<i>D. ecastaphyllum</i>	Rio Tinto, Paraíba	September/2010	45738 ¹
<i>B. gardneriana</i>	Serra Branca, Paraíba	March/2007	AGRA 947 ²
<i>E. revolutum</i>	Serra Branca, Paraíba	June/2010	AGRA 5695 ²
<i>K. tomentosa</i>	Santa Rita, Paraíba	June/2010	AGRA 3271 ²
<i>P. spicatus</i>	Maturéia, Paraíba	June/2011	AGRA 7428 ²
<i>L. microphylla</i>	Serra Branca, Paraíba	June/2010	AGRA 6118 ²
<i>P. acuminatus</i>	Maturéia, Paraíba	March/2012	AGRA 7432 ²
<i>Z. rhoifolium</i>	Maturéia, Paraíba	June/2011	AGRA 5184

¹Herbarium of the Department of Systematics and Ecology (DSE) - UFPE; ²Herbarium Professor Lauro Pires Xavier (UFPB).

2.2 Preparation of the extracts

To obtain crude ethanolic extracts (BSE), the powder of each plant was macerated in 95% ethanol for 72 hours, and this process was repeated thoroughly. Then, the extractive solution was filtered and concentrated on rotary evaporator under reduced pressure at 40 °C.

2.3 Determination of total phenolic compounds

Total phenolic compounds were determined by the method of Folin-Ciocalteu [14]. For this, 200 µL sample was used, 1.0 mL of Folin-Ciocalteu reagent (1:10) and after 4 minutes it was added 800 µL of Na₂CO₃ 7.5% (m/v). The samples were protected from light and after 120 min of incubation, the absorbance was measured in a spectrophotometer at 765 nm in triplicate. The results of the total phenolic compounds content were expressed in milligrams of gallic acid equivalent (mg GAE/g) per gram of dry weight of the plant. Gallic acid (0-500 mg / L) was used for the calibration curve.

2.4 Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)

The antioxidant activity by the ABTS method was performed according to the methodology described by with modifications [15]. This assay is based on the generation of cationic radical chromophore obtained from the oxidation.

of ABTS by potassium persulfate. The oxidation reaction was prepared with 7 mM ABTS solution added to 140 mM potassium persulfate (final concentration) And the mixture was incubated protected from light at room temperature (23

°C - 25 °C) for 16 h (time required for radical formation) prior to use. Once formed, the radical was diluted with ethanol until the absorbance value of 0.7 ± 0.02 was obtained on the wavelength 734 nm. Trolox was used as the reference standard. The results were expressed in TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) and percentage of radical sequestration.

2.5 Determination of the maximum wavelength of dry extracts

For determining the maximum wavelength (λ_{max}), the dried extracts were diluted with absolute ethyl alcohol (Merck) (100mg/L p/v) and a scan was performed between the wavelengths of 260 to 400 nm (Spectrophotometer FEMTO, model 800XI, using 1.0 cm quartz cell optical path). The experiment performed in triplicate.

2.6 Determination of UVB photoprotective activity *in vitro*

The photoprotective activity was evaluated using the spectrophotometric method using diluted solutions [16]. The extracts were previously oven dried at 40 °C for 60 minutes and dilutions were prepared at the concentrations of 25, 50 and 100 mg/L, then scans of 260 to 400 nm, with 5 nm intervals were performed, using a spectrophotometer (FEMTO, Model 800XI, in a 1.0 cm quartz cell optical path). The calculations were performed considering the intervals of λ determined [16], based on equation:

$$SPF = FC \cdot \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \cdot abs(\lambda)$$

(1) The values of $EE(\lambda)$ and $I(\lambda)$ used for the calculation of SPF (Solar Protection Factor) were the same as those used in the literature [16]. FC = correction factor (10), $EE(\lambda)$ = erythemogenic effect of radiation; $I(\lambda)$ = intensity of the sun; $Abs(\lambda)$ = spectrophotometric reading of the absorbance of the sunscreen solution.

2.7 Statistical analysis

All assays were performed in triplicate. The values were considered significantly different when there were differences between the means at the 5% level ($p < 0.05$). GraphPad Prism® software was used, using one-way ANOVA analysis with Bonferroni *post hoc*.

3. Results and Discussion

The results of the determination of total phenolic compounds and antioxidant activity are shown in Table 2. High contents of phenolic compounds were obtained, ranging from 416.20 ± 0.04 and 83.41 ± 0.01 (mg GAE/g), and of these, *Krameria tomentosa* and *Lippia microphylla* stood out, presenting values of (416.20 ± 0.04) and (373.48 ± 0.05) , respectively. These results demonstrate the great bioactive potential of the plants studied.

Table 2. Content of total phenolic compounds and antioxidant activity for the ethanolic extracts of the species studied

Species	Total Phenolic Compounds (mg GAE/g)	TEAC mM/g of sample	ABTS ⁺ (%)
<i>D. ecastaphyllum</i>	222.72 ± 0.01^a	2203.66 ± 0.00^a	99.84 ± 0.00^a
<i>B. gardneriana</i>	231.55 ± 0.01^b	2206.66 ± 0.00^b	99.68 ± 0.00^b
<i>E. revolutum</i>	251.44 ± 0.03^c	1185.66 ± 0.00^c	84.42 ± 0.00^c
<i>Z. rhoifolium</i>	84.58 ± 0.11^d	850.00 ± 0.05^d	36.54 ± 0.05^d
<i>P. spicatus</i>	167.60 ± 0.03^e	653.33 ± 0.00^e	27.37 ± 0.00^e
<i>L. microphylla</i>	373.48 ± 0.05^f	793.33 ± 0.01^f	33.90 ± 0.01^f
<i>P. acuminatus</i>	83.41 ± 0.01^g	226.66 ± 0.00^g	7.46 ± 0.00^g
<i>K. tomentosa</i>	416.20 ± 0.04^h	2133.33 ± 0.00^h	96.42 ± 0.00^h

Values expressed as mean $\pm$ standard deviation. Note: the means with different letters within the same column present a significant difference between them ($p < 0.05$) according to the Bonferroni test.

No previous studies of chemical characterization, phenolic compound dosing, antioxidant activity and SPF calculation of the *Krameria tomentosa* species were found. Therefore, this study has a great relevance for the knowledge of the medicinal application of this species. Presenting 416.20 ± 0.04 mg GAE/g of the extract of the aerial parts, *K. tomentosa* can be highlighted among other species, which have a known content of phenolic compounds, such as "umbuzeiro" (*Spondias tuberosa*), which presented 100.07 ± 0.02 mg GAE/g of the leaf methanolic extract [15], "cabaça" (*Crescentia cujete*), which presented 50.47 ± 0.08 mg GAE/g of the methanolic fraction of the leaves ethanolic extract [17], "caroá" (*Neoglaziovia variegata*), which presented 223.70 ± 10.56 mg GAE/g of the ethanolic extract of the flowers [11] and "atemoia" (*Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.), which presented 207.80 ± 7.21 mg GAE/g of the ethanolic extract of stems [18].

Presently, plant species that contain high levels of phenolic compounds are targets of interest due to the potential antioxidant properties of these substances as well as to act as powerful anti-infective agents [19], anti-inflammatory and anti-carcinogenic because of its antioxidant activity [20]. Phenolic compounds are primary antioxidants that promote the removal or inactivation of free radicals through the donation of hydrogen atoms, inhibiting chain reactions [21].

For the assay using the ABTS + radical, significant values were obtained for the TEAC ranging from 2206.66 mM to 226.66 mM and the percentage of radical sequestration from 99.86% to 7.46% (Table 2). *Dalbergia ecastaphyllum*, *Byrsonima gardneriana* and *Krameria tomentosa* presented the respective TEAC values of 2206.66 mM, 2203.66 mM and 2113.33 mM and inhibition of 99.84%, 99.68% and 96.42%.

Previous studies have identified flavonoids in the extract of *Dalbergia ecastaphyllum*, as rutin, isoliquiritigenin, formononetin, biochanin A, pinocembrin, liquiritigenin and medicarpin [22, 23, 24]. Phenolic contents of $(11.05 \pm 0.128$ g GAE/100 g of dry extract) were also found in the ethyl acetate fraction of the extract of this plant, which were characterized as flavonoids and tannins by thin layer chromatography [25], values lower than those found in this study (222.72 mg GAE/g). Recent studies point to the therapeutic potential of Brazilian medicinal plants [26, 27, 28, 29]. According to the values presented in Table 2, it can be verified that the extracts analyzed have a high antioxidant potential compared to other species of the Fabaceae family, as

Stryphnodendron pulcherrimum, *Myroxylon peruiferum* and *Abarema cochliocarpos*, which had a lower percentage of inhibition ranging from 75,69% to 20,92% [1].

Aiming to evaluate the photoprotective potential of the species studied, the maximum wavelength of absorption in the ultraviolet spectrum of the extracts was determined, and maximum absorbance ranging from 285 nm to 260 nm wavelengths at 100 mg/L was observed, as demonstrated in Table 3 and Figure 1.

Table 3. Maximum wavelengths (λ_{Max}) presented by the analyzed extracts

Species	Maximum wavelengths (nm (100mg/L))	SPF*
<i>Dalbergia ecastaphyllum</i>	285	5.38 $\pm$ 0.009 ^a
<i>Byrsonima gardneriana</i>	280	9.73 $\pm$ 0.018 ^b
<i>Erythroxylum revolutum</i>	281	4.92 $\pm$ 0.007 ^c
<i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	281	4.53 $\pm$ 0.006 ^g
<i>Pilocarpus spicatus</i>	269	4.44 $\pm$ 0.020 ^e
<i>Lippia microphylla</i>	283	6.78 $\pm$ 0.010 ^f
<i>Phyllanthus acuminatus</i>	260	4.55 $\pm$ 0.007 ^g
<i>Krameria tomentosa</i>	267	6.62 $\pm$ 0.040 ^d

*Values expressed as mean $\pm$ standard deviation. Note: the means with different letters within the same column present a significant difference between them ($p < 0.05$) according to the Bonferroni test.

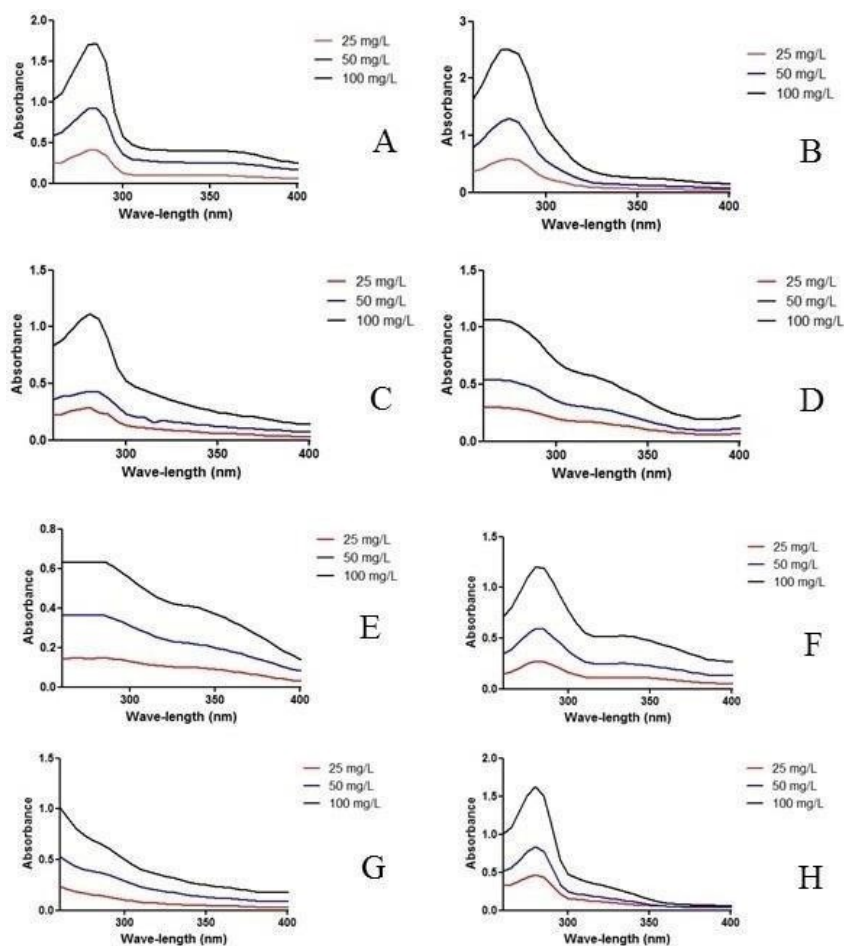


Figure 1 - Absorbance profile of extracts at wavelengths from 260 to 400 nm. A (*D. ecastaphyllum*), B (*B. gardneriana*), C (*E. revolutum*), D (*Z. rhoifolium*), E (*P. spicatus*), F (*L. microphylla*), G (*P. acuminatus*), H (*K. tomentosa*).

The absorption of a substance in different regions of the ultraviolet spectrum is a result of its chemical nature, and the plants that stand out for the wide absorption of radiation in the ultraviolet region are mostly producers of a complex mixture of secondary metabolites, highlighting phenolic compounds such as flavonoids, tannins and anthraquinones [30]. From the eight ethanolic analyzed extracts, five presented absorbance in the region of UVB radiation (*Dalbergia ecastaphyllum*, *Byrsonima gardneriana*, *Erythroxylum revolutum*, *Lippia microphylla* and *Zanthoxylum rhoifolium*) and the others showed maximum absorbance in the UVC region (Table 3). The extract of *Annona crassiflora* presented a maximum absorption band near 360 nm, Region of UVA radiation, whose rays have been extensively related to skin cancer, photoimmunosuppression and photoaging [31].

The absorption spectrum of flavonoids, when dispersed in ethanol, is typically presented with two peaks, one being between 240 and 280 nm and the other in the range of 300 to 550 nm [32]. From the extracts analyzed, only the spectra obtained with extracts of *Zanthoxylum rhoifolium* and *Phyllanthus acuminatus* showed characteristic absorbance values for flavonoids. Analysis carried out with *P. acuminatus* extracts showed the presence of flavonoids, tannins, saponins, steroids, triterpenoids, coumarins and other terpenoids [33], corroborating the results of this study. In samples of *Zanthoxylum rhoifolium*, have been isolated the flavonoids hesperidin [34], vitexin and isovitexin [35], Substances that have anti-inflammatory activity [36], vasoprotective [37] and modulates controlling the cells involved in inflammation [38].

In the spectra of scans obtained with the analyzed extracts (Figure 1), it can be observed that the species studied showed characteristic bands of absorption in UVB, since there was absorbance between the wavelengths of 290 and 320 nm. It was verified that an increase in the absorbance occurred as an increase in the concentration, and for all the samples the best results

were obtained in the concentration of 100mg/L. Thus, all species studied present a potential photoprotective potential. The SPF values were calculated [16] and are shown in Table 3. The ethanolic extracts of the aerial part of the plants under study presented SPF that varied between 9.73 ± 0.018 and 4.44 ± 0.020 . According to the National Agency of Sanitary Surveillance (ANVISA), the minimum value for SPF should be 6.0 [39]. Three extracts analyzed in this study presented higher SPF values than those determined by ANVISA, *Byrsonima gardneriana*, *Lippia microphylla* and *Krameria tomentosa* (9.73 ± 0.018 , 6.78 ± 0.010 e 6.62 ± 0.040), respectively, and all extracts showed higher sun protection values than the one recommended by the Food and Drug Administration (FDA), which considers as a sunscreen, a formulation with SPF value greater than 2. However, to ensure proper protection and minimize skin risks and damages, the FDA recommends the use of sunscreens with an SPF value equal to or greater than 15, combined with other protective measures [40].

Nowadays, the interest in studying natural compounds has increased to determine if they meet this requirement and can be classified as "green sunscreens". When proven to be able to absorb solar radiation, antioxidants can enhance the ultimate protection of the product and either neutralize the free radicals produced on the skin after sun exposure [41, 42, 43, 44]. *The inclusion of natural products in photoprotective formulations is a trend [45], and several researches have prioritized the analysis of chemical constituents containing chromophores and compounds with antioxidant activity [8], such as phenolic compounds, especially flavonoids [18], substances found in the extracts under study that can be used in association with chemical sunscreens, which would benefit the formulation, as increased photoprotection and supply of several secondary metabolites with important antioxidant properties.*

4. Conclusions

According to the results of this study, important data could be found, as the ethanolic extracts presented a high antioxidant potential, highlighting the species *K. tomentosa* and *L. microphylla* for the analysis of the total phenolic compounds and *D. ecastaphyllum*, *B. gardneriana* and *K. tomentosa* for the ABTS+ radical assay. For the evaluation of the photoprotective activity, the extracts of *D. ecastaphyllum*, *B. gardneriana*, *E. revolutum*, *L. microphylla* and *Z. rhoifolium* presented maximum absorbance in the region of UVB radiation, and the others had maximum absorbance in the UVC region. All extracts presented potential for SPF and can be used in cosmetology, providing several benefits to formulations.

Acknowledgments

The authors acknowledge the support given by the Laboratory of Natural Products and Molecular Biology Laboratory of the Department of Biochemistry of the Federal University of Pernambuco (UFPE), Coordination of Improvement of Higher Level Personnel (CAPES) and National Council of Scientific and Technological Development (CNPq), as well as the Herbarium of the Department of Systematics and Ecology (DSE) - UFPE and the Herbarium Professor Lauro Pires Xavier of the UFPB.

References

- [1] Lins-Neto, J.R., Uchôa, A.D.A., Moura, P.A., Bezerra-Filho, C.M., Tenório, J.C.G., Silva, A.G., Ximenes, R.M., Silva, M.V. and Correia, M.T.S. (2016) Phytochemical screening, total phenolic content and antioxidant activity of some plants from Brazilian flora. *Journal of Medicinal Plants Research*, 10, 409-410.
- [2] Atoui, A. K., Mansouri, A., Boskou, G. and Kefalas, P. (2006) Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, 89, 27-36. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.075>
- [3] Gomez-Pinilla, F. and Nguyen, T.T. (2012) Natural mood foods: the actions of polyphenols against psychiatric and cognitive disorders. *Nutritional Neuroscience*, 15, 127-133. <http://dx.doi.org/10.1179/1476830511Y.0000000035>

- [4] Novaes, G.M., Silva, M.J.D., Achkar, M.T. and Vilegas, W. (2013) Compostos antioxidantes e sua importância nos organismos. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*, 11, 535-539.
- [5] Niki, E. (2010). Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*, 49, 503-515. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.016>
- [6] Birch, A.E. et al. (2001) Antioxidant proprieties of evening primrose seed extracts. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 4502-4507.
- [7] Maier, T. and Korling, H.C. (2005) Sunscreens – which and what for? *Skin Pharmacology and Physiology*, 18, 253- 62. https://epub.ub.uni-muenchen.de/16351/1/10_1159_000087606.pdf
- [8] Polonini, H.C., Raposo, N.R.B. and Brandão, M.A.F. (2011) Fotoprotetores naturais como instrumento de ação primária na prevenção de câncer de pele. *Revista APS*, 14, 216-223. <https://aps.uff.emnuvens.com.br/aps/article/viewFile/1081/478>
- [9] Costa, S.C.C., Detoni, C.B., Branco, C.R.C., Botura, M.B. and Branco, A. (2015) In vitro photoprotective effects of *Marcetia taxifolia* ethanolic extract and its potential for sunscreen formulations. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 25, 413-418. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2015.07.013>
- [10] Kullavanijaya, P. and Lim, H.W. (2005) Photoprotection. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 52, 937-958. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2004.07.063>
- [11] Oliveira-Júnior, R.G., Araújo, C.S., Santana, C.R.R., Souza, G.R., Lima-Saraiva, S.R.G., Guimarães, A. L., Oliveira, A.P., Siqueira-Filho, J.A., Pacheco, A.G.M. and Almeida, J.R.G.S. (2012). Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activity of extracts from the flowers of *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae). *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 4, 4489-4494. <http://www.jocpr.com/articles/phytochemical-screening-antioxidant-and-antibacterial-activity-of-extracts-from-the-flowers-of-neoglaziovia-variegata-br.pdf>
- [12] Silva, M.S., Leite, K.R.B. and Saba, M.D. (2012) Anatomia dos órgãos vegetativos de *Hymenaea martiana* Hayne (Caesalpiniaceae- Fabaceae): espécie de uso medicinal em Caetité-BA. *Brazilian Journal of Medicinal Plants*, 14, 673- 679. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722012000400015>
- [13] Lima, L.R. et al. (2013) Assessment of the antiedematogenic, antimicrobial and mutagenic activity of *Amburana cearensis* seeds (A.C. Smith) (Imburana-de-cheiro). *Brazilian Journal of Medicinal Plants*, 15, 415-422. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722013000300015>
- [14] Li, A.B., Wonga, C.C., Ka-Wing, C. and Chen, F. (2008) Antioxidant Properties in Vitro and Total Phenolic Contents in Methanol Extracts from Medicinal Plants. *Swiss Society of Food Science and Technology*, 41, 385-390. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2007.03.011>
- [15] Uchôa, A.D.A., Oliveira, W.F., Pereira, A.P.C., Silva, A.G., Cordeiro, B.M.P.C., Malafaia, C.B., Almeida, C.M.A., Silva, N.H., Albuquerque, J. F.C., Silva, M.V. and Correia, M.T.S. (2015)

Antioxidant activity and phytochemical profile of *Spondias tuberosa* Arruda leave extracts. *American Journal of Plant Sciences*, 6, 3038- 3044. <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2015.619298>

[16] Mansur, J.S., Breder, M.N.R., Mansur, M.C.A., Azulay, R.D. (1986). Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 61, pp.121-124.

[17] Parente, F.G.G., Oliveira, A.P., Rodrigues, C.M.S.C., Oliveira-Júnior, R.G., Paulo, I.M.M., Nunes, X.P., Delange, (2016) Phytochemical screening and antioxidant activity of methanolic fraction from the leaves of *Crescentia cujete* L. (Bignoniaceae). *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8, 231- 236.

[18] Rabêlo, S.V., Costa, M.M., Libório, R.C. and Almeida, J.R.G.S. (2014) Atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de atemoia (*Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36, 265- 271. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452014000500031>

[19] Saleem, M., Nazir, M., Ali, M.S., Hussain, H., Lee, Y.S., Riaz, N. and Jabbar, A. (2010) Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. *Natural Product Reports*, 27, 238- 254. <https://dx.doi.org/10.1039/b916096e>

[20] Krishnaiah, D., Sarbatly, R. and Nithyanandam, R. (2011) A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing*, 89, 217-233. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2010.04.008>

[21] Heleno, S.A., Martins, A., Queiroz, M.J.R.P. and Ferreira, I.C.F.R. (2015) Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: a review. *Food Chemistry*, 173 501-513.

[22] Silva, B. B, Rosalen, P.L., Cury, J.A., Ikegaki, M., Souza, V.C., Esteves, A. and Alencar, S.M. (2008) Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of of Brazilian propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, 5, 313-316. <https://dx.doi.org/10.1093/ecam/nem059>

[23] Dausch, A., Moraes, C.S.; Fort, P. and Park, Y.K.(2008) Brazilian red propolis – Chemical composition and botanical origin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, 5, 435-441. <https://dx.doi.org/10.1093/ecam/nem057>

[24] Araújo, J.M.E. (2014) Caracterização química e atividade leishmanicida dos extratos hidroetanólicos de própolis vermelha e *Dalbergia ecastophyllum* (Fabaceae). Dissertation, Federal University of Sergipe, Aracaju.

[25] Aresi, C. (2011) Avaliação da potencial atividade antimicrobiana de produtos de origem natural: estudo bioguiado de *Dalbergia ecastophyllum* L. Taub. Dissertation, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis.

[26] Ribeiro, D.A., Macêdo, D.G., Oliveira, L.G.S., Saraiva, M.E., Oliveira, S.F., Souza, M.M.A. and Menezes, I.R.A. (2014) Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil. *Brazilian Journal of Medicinal Plants*, 16, 912-930. http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/13_059

- [27] Cordeiro, J.M.P. and Félix, L.P. (2014) Botanical medical knowledge of native species of the Caatinga and spontaneous plants in the Agreste region of the state of Paraíba, Brazil. *Brazilian Journal of Medicinal Plants*, 16, 685- 692. http://dx.doi.org/10.1590/1983-084x/13_077
- [28] Silva, C.G., Marinho, M.G.V., Lucena, M.F.A. and Costa, J.G.M. (2015) Ethnobotanical survey of medicinal plants in the Caatinga area in the community of Sítio Nazaré, Milagres, Ceará, Brazil. *Brazilian Journal of Medicinal Plants*, 17, 133-142. http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/12_055
- [29] Silva, A. G., Silva, L. C. N., Bezerra Filho, C.M., Araujo, D. R. C., Silva, J. F. V., Arruda, I. R., Araujo, J. M., Correia, M. T. S., Macedo, A. J. and Silva, M. V. (2013) Antimicrobial activity of medicinal plants of the Caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil. *Current Topics in Phytochemistry*, 11, 81-82.
- [30] Violante, I.M.P., Souza, I.M., Venturini, C.L., Ramalho, A.F.S., Santos, R.A.N. and Ferrari, M. (2009) Avaliação *in vitro* da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 19, 452-457. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2009000300020>
- [31] Polonini, H.C., Lima, L.L., Gonçalves, K.M., do Carmo, A.M., da Silva, A.D. and Raposo, N.R. (2013). Photoprotective activity of resveratrol analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21, 964- 968. <https://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2012.11.052>
- [32] Bobin, M. F., Raymond, M. and Martini, M.C. (1994) UVA/UVB absorption properties of natural products. *Cosmetics & Toiletries*, 109, 63-78.
- [33] Cárdenas-López, D., Marín Corba, C.A. and Suárez, L.S. (2002) Plantas útiles de Lagarto Cocha y Serranía de Churumbelo en el departamento de Putumayo. Bogotá, D.C. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas, Colombia.
- [34] Arruda, M.S.P., Fernandes, J.B., Vieira, P.C., Silva, M.F.G.F. and Pirani, J.R. (1992) Chemistry of *Zanthoxylum rhoifolium*: A new Secofuroquinoline Alkaloid. *Biochemica Systematics and Ecology*, 20, 173-178.
- [35] Krause, M.S., Bonetti, A.F., Turnes, J.M., Dias, J.F.G., Miguel, O.G., Duarte, M.R. (2013) Phytochemistry and biological activities of *Zanthoxylum rhoifolium* Lam., Rutaceae - Mini review. *Visão Acadêmica*, 14, 2013. <http://dx.doi.org/10.5380/acd.v14i4.33992>
- [36] Cazarolli, L. H., Zanatta, L., Alberton, E. H. and Figueiredo, M. S. R. B. (2008) Flavonoids: prospective drug candidates. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 8, 1429. https://www.researchgate.net/publication/23458951_Flavonoids_Prospective_Drug_Candidates
- [37] Servier do Brasil. (2017) Product informations (Daflon® 500 mg).
- [38] Li, S. Y., Ping, G.; Geng, L., Seow, W. K. and Thong, Y. H. (1994) Immunopharmacology and toxicology of the plant flavonoid baohuoside-1 in mice. *International Journal of Immunopharmacology*, 16, 227. [http://dx.doi.org/10.1016/0192-0561\(94\)90016-7](http://dx.doi.org/10.1016/0192-0561(94)90016-7)

- [39] Brazil.National Health Surveillance Agency (ANVISA) (2012). Resolução RDC nº 30 de 1 de junho de 2012. Aprova o Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos e dá outras providências.
- [40] FDA - Food and Drug Administration. (2013). Sunscreen drug products for over-the-counterhuman use. Code of Federal Regulations. Title 21, 5.<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?cfrpart=352>
- [41] Souza,F.P.,Campos,G.R.,Packer,J.F. (2013)Determinação da atividade fotoprotetora e antioxidante em emulsões contendo extrato de *Malpighia glabra* L. – Acerola. Revista De Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, 34, 69-77. http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/article/viewFile/1747/1365
- [42] Nascimento, C.S., Nunes, L.C.C., Lima, A.A.N., Grangeiro-Júnior S. andRolim-Neto, P.J. (2009) Incremento do FPSem formulação de protetor solar utilizando extratos de própolis verde e vermelha. *Revista Brasileira de Farmácia*, 90, 334-339.http://www.rbfarma.org.br/files/pag_334a339_incremento_fps_257_90-4.pdf
- [43] Dal'Belo, S.E. (2008) Avaliação da eficácia fotoprotetora, penetração cutânea e segurança de formulações cosméticas contendo extratos de Chá Verde e GinkgoBiloba. Dissertation, University of São Paulo, São Paulo.
- [44] Chiu, A.E. and Kimball, A.B. (2003) Topical vitamins, minerals and botanical ingredients as modulators of environmental and chronological skin damage. *The British Journal of Dermatology*, 149, 681- 91.<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2133.2003.05540.x>
- [45] Oliveira-Júnior, R.G. and Almeida, J.R.G.S. (2012) Prospecção tecnológica de fotoprotetores derivados de produtos naturais. *Revista GEINTEC*, 3, 32-40.www.revistageintec.net/portal/index.php/revista/article/download/85/176

ANEXO C – NORMAS DO PERIÓDICO I

African Journal of Microbiology

Research

<http://www.academicjournals.org/journal/AJMR/authors>

Introduction

Authors should read the editorial policy and publication ethics before submitting their manuscripts. Authors should also use the appropriate reporting guidelines in preparing their manuscripts.

Research Ethics

Studies involving human subjects should be conducted according to the World Medical Association (WMA) Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects.

Studies involving non human animals should follow appropriate ethical guidelines such as the Animal Welfare Act, The Animals (Scientific Procedures) Act (Amendment) Order 1993, The EU parliament directive on the protection of animals used for scientific purposes, ARRPs policies and guidelines, etc.

Reporting guideline

Responsible reporting of research studies, which includes a complete, transparent, accurate and timely account of what was done and what was found during a research study, is an integral part of good research and publication practice and not an optional extra.

See additional guidelines for

reporting of health research.

Preparing your manuscript

The type of article should determine the manuscript structure. However, the general structure for articles should follow the IMRAD structure.

Title

The title phrase should be brief.

List authors' full names (first-name,

middle-name, and last-name). Affiliations of

authors (department and institution).

Emails and phone numbers

Abstract

The abstract should be less than 300 words. Abstract may be presented either in unstructured or structured format. The keywords should be less than 10.

Abbreviations

Abbreviation should be used only for non standard and very long terms.

The Introduction

The statement of the problem should be stated in the introduction in a clear and concise manner.

Materials and methods

Materials and methods should be clearly presented to allow the reproduction of the experiments.

Results and discussion

Results and discussion maybe combined into a single section. Results and discussion may also be presented separately if necessary.

Disclosure of conflict of interest

Authors should disclose all financial/relevant interest that may have influenced the study.

Acknowledgments

Acknowledgement of people, funds etc should be brief.

Tables and figures

Tables should be kept to a minimum.

Tables should have a short descriptive title.

The unit of measurement used in a

table should be stated. Tables

should be numbered

consecutively.

Tables should be organized in Microsoft Word or

Excel spreadsheet. Figures/Graphics should be

prepared in GIF, TIFF, JPEG or PowerPoint.

Tables and Figures should be appropriately cited

in the manuscript.

References

References should be listed in an alphabetical order at the end of the paper. DOIs, PubMed IDs and links to referenced articles should be stated wherever available.

Examples:

Baumert J, Kunter M, Blum W, Brunner M, Voss T, Jordan A, Klusmann U, Krauss S, Neubrand M, Tsai YM (2010). Teachers' mathematical knowledge, cognitive activation in the classroom, and student progress. *Am. Educ. Res. J.* 47(1):133-180.

<http://dx.doi.org/10.3102/0002831209345157>

Christopoulos DK, Tsionas EG (2004). "Financial Development and Economic Growth: Evidence from Panel Unit Root and Cointegration Tests" *J. Dev. Econ.* pp.55-74

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jdeveco.2003.03.002>

Goren A, Laufer J, Yativ N, Kuint J, Ben Ackon M, Rubinshtein M, Paret G, Augarten A (2001). Transillumination of the palm for venipuncture in infants. *Pediatric. Emerg. Care* 17:130-131.

<http://dx.doi.org/10.1097/00006565-200104000-00013> PMID:11334094

Mishra A, Mishra SC (2001). Cost-effective diagnostic nasal endoscopy with modified otoscope. *J. Laryngol. Otol.* 115:648-649.

<http://dx.doi.org/10.1258/0022215011908739> PMID:11535147

Acceptance Certificate

Authors are issued an Acceptance Certificate for manuscripts that have been reviewed and accepted for publication by an editor.

Payment of manuscript handling fee

Once a manuscript has been accepted, the corresponding author will be contacted to make the necessary payment of the manuscript handling fee. Kindly note that on the manuscript management system, the payment option is only enabled for manuscripts that have been accepted for publication.

Proofs

Prior to publication, a proof is sent to the corresponding author. Authors are advised to read the proof and correct minor typographical or grammatical errors. Authors should promptly return proofs to the editorial

office.

Publication

Once proofs are received at the editorial office, the manuscripts are usually included in the next issue of the journal. The article will thereafter be published on the journal's website

Publication Notification

After the article is made available on the journal's website, a publication notice is sent to the corresponding author with links to the issue and article.

ANEXO D– NORMAS DO PERIÓDICO II

AMERICAN OF PLANT AND SCIENCES

To expedite the review process, please format the manuscript in ways as follow:

Article type:
One Column

Manuscript organization:

1. All manuscripts are expected to be prepared as a single PDF or MS Word document with the complete text, references, tables and figures included. Any revised manuscripts prepared for publication should be sent as a single editable Word document. LaTeX paper is also acceptable for publication, but it should be in PDF for review first.

2. Manuscripts should be written in English. Title, author(s), and affiliations should all be included on a title page as the first page of the manuscript file, followed by a 100-300 word abstract and 3-5 keywords. The order they follow is: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Introduction.

Figure and table requirement:

3. All figures or photographs must be submitted as jpg or tif files with distinct characters and symbols at 500 dpi (dots per inch). Test your figures by printing them from a personal computer. The online version should look relatively similar to the personal-printer copy. Tables and equations should be in an editable rather than image version. Tables must be edited with Word/Excel. Equations must be edited with Equation Editor. Figures, tables and equations should be numbered and cited as Figure 1, Figure 2, Figure 3, etc. in sequence.

How to count page numbers:

4. Before submission or after acceptance, type your manuscript single spaced, and make all the characters in the text, tables, figure legends, footnotes and references in a single typeface and pointsize as 10 pt Times New Roman. This will save space, make it easier for reviewers and editors to process the submitted work, and contributes to slowing down global warming by using less paper.

References format:

5. All references should be numbered in square brackets in the text and listed in the REFERENCES section in the order they appear in the text. Below are some examples:

Journal Articles:

[1] García, J.I., Sepúlveda, S. and Noriega-Hoces, L. (2010) Beneficial Effect of Reduced Oxygen Concentration with Transfer of Blastocysts in IVF Patients Older than 40 Years Old. *Health*, 2, 1010-1017.

[2] Maganioti, A.E., Chrissanthi, H.D., Charalabos, P.C., Andreas, R.D., George, P.N. and Christos, C.N. (2010) Cointegration of Event-Related Potential (ERP) Signals in Experiments with Different Electromagnetic Field (EMF)

Conditions. Health, 2, 400-406.

[3] Bootorabi, F., Haapasalo, J., Smith, E., Haapasalo, H. and Parkkila, S. (2011) Carbonic

[4] Proteins on Arsenic-Induced Oxidative Stress in Blood and Kidney of Rats. Health, 1, 167-172.

http://www.scirp.org/fileOperation/download.aspx?path=Health20090100017_97188589.pdf&type=journal

Conference Proceedings:

[5] Clare, L., Pottie, G. and Agre, J. (1999) Self-Organizing Distributed Sensor Networks. Proceedings SPIE Conference Unattended Ground Sensor Technologies and Applications, Orlando, 3713, 229-237.

Thesis:

[6] Heinzelman, W. (2000) Application-Specific Protocol Architectures for Wireless Networks. Ph.D. Dissertation, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge.

Internet:

[7] Honeycutt, L. (1998) Communication and Design Course.

<http://dcr.rpi.edu/commdesign/class1.html>