

Volume 9 - Número 3
Julho - Setembro 2015

REVISTA
FITOS[®]

e-ISSN 2446-4775

Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Fitoterápicos

Antibacterial activity of *Schinopsis brasiliensis* against
phytopathogens of agricultural interest

Formação de mudas de alface provenientes de sementes
peletizadas com altas diluições

Bioactivity of extracts from *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L.
Burt & R.M. Sm. against sinusitis causing bacterial
pathogens

Análise morfométrica dos túbulos seminíferos de
camundongos suplementados com óleo de alho

Antioxidant and antimicrobial properties of ethanolic
extract of *Libidibia ferrea* pods

Bauhinia forficata Link (Fabaceae)

Estudo do desempenho comercial dos insumos
farmacêuticos vegetais sob a ótica do Comércio Exterior

Bauhinia forficata Link (Fabaceae)





e-ISSN: 2446-4775

Presidente da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ): Paulo Ernani Gadelha Vieira

Diretor do Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos): Hayne Felipe da Silva

Coordenador do Núcleo de Gestão em Biodiversidade e Saúde (NGBS): Glauco de Kruse Villas-Bôas

Editor Coordenador: Alaíde Braga de Oliveira, UFMG

Editores Assistentes: Adrian M Pohlit, INPA
Fatima Checheto, UEPJMF
Jislaine de Fátima Guilhermino, FIOCRUZ
José Eduardo Lahoz da Silva Ribeiro, UEL
José Maria Gusman Ferraz, UNICAMP
Maria Augusta Arruda, FIOCRUZ

Editor Executivo: Rosane de Albuquerque dos Santos Abreu, FIOCRUZ

Corpo Editorial:

Angelo Cunha, UFRJ (*in memoriam*)

Anny Magali Maciel Trentini, GETEC, Herbarium

Benjamin Gilbert, FIOCRUZ

Carmen Penido, FIOCRUZ

Cecília Veronica Nunez, INPA

Claudia do Ó Pessoa, UFCE

Cristina Dislich Ropke, Centroflora

Edeltrudes de Oliveira Lima, UFPB

Elfriede Marianne Bacchi, USP

Emídio Vasconcelos Leitão da Cunha, UFPB

Emiliano Barreto, UFAL

Fernão Castro Braga, UFMG,

João Antonio Pegas Henriques, UFRGS

João Carlos Palazzo de Mello, UEM

João Ernesto de Carvalho, CPQBA – UNICAMP

João Marcos Hausmann Tavares, UFRJ

José Maria Barbosa Filho, UFPB

Lucio Ferreira Alves, FIOCRUZ

Luis Carlos Marques, UNIBAN

Luis Vitor Sacramento, UNESP – Araraquara

Mahabir Gupta, Universidad do Panamá

Manuel Odorico de Moraes Filho, UFCE

Maria Aparecida Medeiros Maciel, UFRN

Maria Cristina Marcucci Ribeiro, UNIBAN

Maria Fâni Dolabela, UFPR

Mary Ann Foglio, CPQBA-UNICAMP

Paulo Kageyama, USP

Rivaldo Niero, UNIVALI

Ronan Batista, UFBA

Rosendo Augusto Yunes, UFSC

Sônia Soares Costa, UFRJ

Suzana Guimarães Leitão, UFRJ

Thereza Christina Barja Fidalgo, UERJ

Valdir Cechinel Filho, UNIVALI

Valdir Florencio da Veiga Junior, UFAM

Wagner Luiz Barbosa, UFPA

Wagner Vilégas, UNESP – Araraquara

REVISTA FITOS

Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos

Núcleo de Gestão em Biodiversidade e Saúde - NGBS

Correspondência / Mail

Toda correspondência deve ser enviada para:

All mail should be sent to:

Núcleo de Gestão em Biodiversidade e Saúde – NGBS

Complexo Tecnológico de Medicamentos – CTM Farmanguinhos, FIOCRUZ

Av. Comandante Guarany, 447 Jacarepaguá - Rio de Janeiro

RJ - CEP 22775-903

revistafitos@far.fiocruz.br

tel.: (21) 3348-5370, 3348-5598

Assinaturas/Subscriptions

Pedidos e informações sobre assinaturas podem ser obtidos por telefone ou e-mail.

Subscriptions orders or enquiries may be obtained by phone or e-mail.

Tel: (21) 3348-5370, 3348-5598

E-mail : revistafitos@far.fiocruz.br

Acesso on-line / On line Access

Os artigos estão disponíveis em formatos PDF e HTML no endereço eletrônico:

www.revistafitos.far.fiocruz.br

Classificação CAPES-Qualis

Qualis B5 (Medicina e Ciências Biológicas II, Biodiversidade, Saúde Coletiva)

Qualis B4 (Engenharia e Biodiversidade)

Qualis C (Ciências Biológicas I e II, Farmácia, Biotecnologia, Química)

Escritório Editorial

Assistente Editorial – Yolanda Castro Arruda

Gerente Editorial – Preciosa de Jesus Meireles de Oliveira

Gerente de Comunicação – Denise Monteiro da Silva

Administrador do sistema e Designer – Eugênio Fernandes Telles

Revisora – Tatiana Vasconcelos Chaves Pontes

Auxiliar Administrativo – Luana Antonio Oliveira

Associada à ABEC

**Associação Brasileira
de Editores Científicos**



Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca de
Medicamentos e Fitomedicamentos/ Farmanguinhos / FIOCRUZ – RJ

Revista Fitos: pesquisa, desenvolvimento e inovação em fitoterápicos. / Fundação Oswaldo Cruz; Instituto de Tecnologia em Fármacos; Núcleo de Gestão em Biodiversidade e Saúde. – v.1, n.1, (Jun. 2005), - . Rio de Janeiro: NGBS, 2005 – v.: il.

Anual: 2007 e 2011

Interrompida: 2008, 2014

Quadrimestral: 2010

Trimestral: 2012

Semestral: 2005, 2006, 2009, 2013

e-ISSN 2446-4775

1. Fitoterápicos. 2. Fitofármacos. 3. Medicamentos de origem vegetal. 4. Biodiversidade. 5. Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (PD&I) I. Fundação Oswaldo Cruz. II. Instituto de Tecnologia em Fármacos. Núcleo de Gestão em Biodiversidade e Saúde.

CDD 615.12

Revista Fitos

e-ISSN 2446-4775

Volume 9, número 3

Julho-Setembro, 2015

EDITORIAL

165-166

AGROECOLOGIA

Antibacterial activity of *Schinopsis brasiliensis* against phytopathogens of agricultural interest

Atividade antibacteriana de Schinopsis brasiliensis contra fitopatógenos de interesse na agricultura

Ronan Batista, Poliana G. Guimarães, Indiana S. Moreira, Pedro C. Campos Filho, José Lucas de A. A. Ferraz, Quelmo S. de Novaes

167-176

AGROECOLOGIA

Formação de mudas de alface provenientes de sementes peletizadas com altas diluições

Lettuce seedlings formation from pelleted seeds with high dilutions

Roberto Luiz Queiroz, Elen Sonia Maria Duarte, Maximiliano Marques, Vanessa Aparecida Goulart, Guilherme Ferreira Marques

177-184

ETNOFARMACOLOGIA

Bioactivity of extracts from *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt & R.M. Sm. against sinusitis causing bacterial pathogens

Bioatividade de extratos de Alpinia zerumbet (Pers.) B.L. Burt & R.M. Sm. contra patógenos bacterianos causadores de sinusite

Grasiela Merícia Costa, Rodrigo Suga, Patrícia Oliveira, Fernando César Silva, Paula Magalhães, Lucienir Duarte, Luiz Macedo Farias

185-194

FARMACOLOGIA

Análise morfométrica dos túbulos seminíferos de camundongos suplementados com óleo de alho

Morphometric analysis of seminiferous tubules of mice supplemented with garlic oil

Nilo Francisco Zancanaro Filho, Alexandre Schneider Angioletti, Silvana Tomazoni de Oliveira

195-206

FARMACOLOGIA

Antioxidant and antimicrobial properties of ethanolic extract of *Libidibia ferrea* pods

Propriedade antioxidante e antimicrobiana do extrato etanólico de vagens de Libidibia ferrea

Patricia Nascimento, Talita Silva, José Gomes, Mitaliene Silva, Silvana Souza, Rosângela Falcão, Tania Silva, Keila Moreira

207-216

FARMACOLOGIA

Bauhinia forficata Link (Fabaceae)

Bauhinia forficata Link (Fabaceae)

Raquel Elisa Silva-López, Bruna Cristina Santos

217-232

INOVAÇÃO (GESTÃO E CTI EM SAÚDE)

Estudo do desempenho comercial dos insumos farmacêuticos vegetais sob a ótica do Comércio Exterior

Study of commercial performance of pharmaceutical drugs vegetables in a Foreign Trade optics

Orlando Nascimento, José Maldonado, Adriano Arnóbio

233-246

A Revista Fitos Eletrônica (RFE), lançada em agosto de 2014, publica artigos relativos a Plantas Medicinais que contribuam para PD&I (Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação) de medicamentos nas seguintes áreas do conhecimento: Agroecologia, Botânica, Etnofarmacologia, Farmacologia, Inovação (Gestão e CT&I em Saúde) e Química.

Neste número, a Fitos traz artigos predominantemente nas áreas de Agroecologia, Farmacologia e Inovação (Gestão e CT&I em Saúde).

Dois artigos, com focos bastante distintos, constam da sessão de Agroecologia que, segundo o Marco Referencial em Agroecologia da Embrapa, publicado em 2006, é definida como um campo de conhecimento transdisciplinar que contem os princípios teóricos e metodológicos básicos para possibilitar o desenho e o manejo de agroecossistemas sustentáveis e, além disso, contribuir para a conservação da agrobiodiversidade e da biodiversidade em geral, assim como dos demais recursos naturais e meios de vida. (Coelho, 2011). <http://www.essentiaeditora.iff.edu.br/index.php/sMosaicoAmbiental/article/view/2191>

Um deles trata da aplicação da Homeopatia na agricultura, tecnologia que, segundo os autores, do Centro Universitário do Sul de Minas (UNIS), Varginha, MG, vem sendo aplicada com sucesso por agricultores nacionais e de outros países como Cuba, Inglaterra, Alemanha, França e Itália.

No segundo artigo de Agroecologia, pesquisadores da UFBA e universidades estaduais da Bahia relatam experimentos com *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardiaceae) na avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* contra alguns fitopatógenos de interesse na agricultura, com resultados positivos. Neste caso, é interessante ressaltar que a espécie em questão, conhecida como braúna ou baraúna, é endêmica, típica da Caatinga, e de reconhecida ação contra cepas resistentes de *Staphylococcus aureus* e que, mais uma vez se observa o potencial de aplicações de plantas medicinais em outras áreas, como a agricultura.

Na sessão de Farmacologia encontram-se três artigos. Um deles, de pesquisadores da Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI, SC, relata experimentos de toxicologia em que se investiga a ação do óleo de alho em túbulos seminíferos de camundongos. Sua importância está relacionada ao uso, às vezes exacerbado do alho e à carência de informações quanto à toxicidade e os efeitos, em especial, sobre o sistema reprodutor masculino.

Pesquisadores da FIOCRUZ, RJ, apresentam uma revisão sobre aspectos botânicos, empregos não medicinais, fitoquímica e ações farmacológicas da *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae), uma planta medicinal da biodiversidade brasileira.

O terceiro artigo se refere à avaliação das atividades antioxidante e antimicrobiana de frutos do pau-ferro, *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz (Leguminosae), uma planta brasileira encontrada nas regiões norte e nordeste do Brasil.

O artigo de Nascimento, Maldonado e Arnóbio, da FIOCRUZ, em que se analisa o Desempenho Comercial dos Insumos Farmacêuticos Vegetais sob a Ótica do Comércio Exterior, no período de janeiro de 2002 a dezembro

de 2014, coloca em números uma realidade da qual temos alguma consciência, a dependência externa do Brasil na área farmacêutica, mas que, quando focada nos insumos farmacêuticos vegetais, é simplesmente chocante para um país que tem uma das maiores biodiversidades do planeta e o uso de plantas medicinais é considerável. Um aspecto positivo é que as exportações cresceram 222% no período considerado, mas as importações tiveram aumento semelhante mas deficits marcantes foram registrados em 2013 e 2014. Estes e outros dados relevantes foram alvo de análises e reflexões valiosas pelos autores. Todos estes artigos contribuem, portanto, para o avanço em PD&I de medicamentos a partir de plantas medicinais e aplicações destas em áreas não menos importantes como, por exemplo, a agricultura.

Aproveitamos o momento para agradecer a todos os autores que tiveram seus artigos publicados na RFE em 2015 e desejamos que os leitores se sintam estimulados a contribuir para o sucesso da RFE em 2016.

Aláide Braga de Oliveira

Antibacterial activity of *Schinopsis brasiliensis* against phytopathogens of agricultural interest

Atividade antibacteriana de *Schinopsis brasiliensis* contra fitopatógenos de interesse na agricultura

¹ Poliana G. Guimarães; ² Indiana S. Moreira; ² Pedro C. Campos Filho; ² José Lucas de A. A. Ferraz; ³ Quelmo S. de Novaes; ^{4*} Ronan Batista

¹ Department of Human Sciences and Technology, Bahia State University, Campus XXII, Brazil.

² Department of Basic and Instrumental Studies, State University of Southeast of Bahia, Brazil.

³ Department of Plant and Animal Science, State University of Southeast of Bahia, Brazil.

⁴ Department of Organic Chemistry, Institute of Chemistry, Federal University of Bahia, Brazil.

Correspondência: ronbatis@ufba.br

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* da planta *Schinopsis brasiliensis* contra alguns fitopatógenos de interesse na agricultura. Extratos etanólicos foram obtidos e ensaiados contra o fungo *Fusarium solani* e bactérias do gênero *Xanthomonas*, *Pectobacterium*, *Ralstonia* e *Acidovorax*. Os resultados mostraram, em geral, um bom desempenho destes extratos contra as bactérias ensaiadas, com valores de concentração inibitória mínima entre 312,5 e 10.000 µg.mL⁻¹. Além disso, um triterpeno (glutinol) e um pirocatecol são relatados como constituintes químicos desta espécie. Conclui-se que *S. brasiliensis* apresenta potencial para ser usado no controle de doenças de plantas causadas pelas bactérias pertencentes aos gêneros *Xanthomonas*, *Ralstonia* e *Acidovorax*.

Palavras-chave: fitopatógenos; *Schinopsis brasiliensis*; glutinol; pirocatecol; *Artemia salina*; agricultura.

Abstract

The aim of this work was to evaluate the *in vitro* antimicrobial activity of *Schinopsis brasiliensis* against certain phytopathogens of agricultural interest. Ethanolic crude extracts were obtained and assayed against *Fusarium solani* and bacteria pertaining to the genera *Xanthomonas*, *Pectobacterium*, *Ralstonia* and *Acidovorax* using the broth micro-dilution technique. The results demonstrated a good aptitude of *S. brasiliensis* extracts to inhibit growth of the majority of the evaluated phytopathogenic bacteria, with MIC values in the range from 312.5 to 10,000 µg.mL⁻¹. Moreover, triterpene glutinol and a pyrocatechol are shown to be the chemical constituents of *S. brasiliensis*. The results suggest that *S. brasiliensis* has the potential for agricultural use to control plant diseases

caused by phytopathogenic bacteria belonging to the genera *Xanthomonas*, *Ralstonia* and *Acidovorax*.

Keywords: phytopathogens; *Schinopsis brasiliensis*; glutinol; pyrocatechol; *Artemia salina*; agriculture.

1. Introdução

Recent estimates indicate that the world's population is expected to expand from the current 6.7 billion to 9 billion by 2050 (Ronald, 2011). Global food production is not increasing fast enough to support this rapidly growing population; therefore, it is believed that world agricultural production needs to increase 50% by 2030 to accommodate this higher demand for food (Ronald, 2011; Davies et al., 2009). Diseases of crop plants are among the most important constraints in the production of adequate quantities of food, committing up to a third of the world production (Khan, 2008; Agrios, 2005). Therefore, a reduction in the losses of crops to pests and phytopathogens is understood to be equivalent to creating more land and more water to increase real agricultural production (Ronald, 2011).

Pesticides are widely used to control plant diseases around the world (Khamna, Yokota and Lumyong, 2009). Although the use of such products has a positive short-term effect for the producer, their long-term employment has many negative effects for society and the environment, such as the pollution of soil and water, deposition of agrochemical residues on food and the emergence of resistant pathogens, among others (Khamna, Yokota and Lumyong, 2009; Stangarlin et al., 1999; Kimati et al., 1997).

To reduce the negative effects of pesticides, natural alternatives are being searched for the control of phytopathogens. Within this context, there is an intense and increasing current search for new antimicrobial agents from plants as a result of the

growing resistance of pathogenic microorganisms to synthetic products (Amaral and Bara, 2005).

According to Di Piero, Novaes and Pascholati (2010) one valid alternative is to exploit the biological activity of secondary metabolites available in crude plant extracts and essential oils from medicinal plants of native flora. In this connection, some examples can be found in the literature, from which we select three ones: 1. *In vitro* control of the fungi *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. musae* and *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* by the essential oils of *Cymbopogon nardus*, *C. citratus* and *Eucalyptus citriodora* (Alves et al., 2003); 2. Control of anthracnose in guava fruit (*Psidium guajava* L.) by the aqueous extract and essential oil of cloves (*Syzygium aromaticum*) (Rozwalka et al., 2008); 3. Control of common bacterial blight in bean plants by bushy matgrass (*Lippia Alba*) and pepper-rosmarin (*Lippia sidoides*) tinctures and the essential oils of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) (Vigo et al., 2009).

Schinopsis brasiliensis Engl. (Anacardiaceae) is the most important species representing the genus *Schinopsis* native to Brazil (Saraiva et al., 2011; Albuquerque et al., 2007). An endemic tree popularly known as "braúna" or "baraúna" (Albuquerque et al., 2007; Cardoso, David and David, 2005), it is typical of the Caatinga and of high economic value to the Northeast region (Albuquerque et al., 2007). The antibacterial activity of baraúna extracts against resistant strains of *Staphylococcus aureus* has been reported (Saraiva et al., 2011). Furthermore, few phytochemical studies have been conducted with this

plant, of which we highlight the isolation of a few alkyl and alkenyl phenols, among other components (Cardoso, David and David, 2005).

Schinopsis brasiliensis extracts have shown antibacterial action against microorganisms pathogenic to human beings and are considered to be a plant species with a potential use in phytopathogen control. As no research until this moment has described the antimicrobial effect of this plant against phytopathogenic microorganisms, the purpose of this work was to assess the antimicrobial activity of *Schinopsis brasiliensis* extracts against some phytopathogenic agents with important economic value for agriculture. Therefore, the *S. brasiliensis* extracts were tested against the fungus *Fusarium solani*, a causative agent of root rot of potatoes and beans; as well as against the phytopathogenic *Xanthomonas* bacteria: *Xanthomonas campestris* PV (pv). *Campestris* and *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, which causes black rot in crucifers and bacterial canker in grapevines, respectively. In addition, the phyto bacteria *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, which causes soft rot in greenery; *Ralstonia solanacearum*, which causes bacterial wilt in banana trees and green peppers; and *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, responsible for bacterial spot in melons were also assayed. At last, the ecotoxicity potential of *S. brasiliensis* extracts was assessed by means of brine shrimp lethality (BSL) bioassay against *Artemia salina*.

2. Material and Methods

2.1. Plant material collection and extract preparation

The leaves, bark and secondary roots of *Schinopsis brasiliensis* were collected at the Caatinga Grande ranch, municipal area of Malhada de Pedras, southwest region of Bahia, during the month of June,

2011. An exsiccate was deposited at the UESB herbarium, in Vitória da Conquista city, Bahia state, Brazil, under the code HUESBVC 4124. The different parts were dried separately in a forced air circulation oven at 50°C for 48 hours. The dried plant material – leaves, bark and secondary roots – was milled and exhaustively extracted with 96% ethanol by maceration to give, after concentration in a rotary evaporator, the corresponding ethanolic extracts of the leaves (EEL, 12.90g), stems (EES, 11.26g) and roots (EER, 5.58g).

2.2. Isolation of compounds 1 and 2 from EEL

A part of the crude ethanolic leaf extract of *Schinopsis brasiliensis* (EEL, 9.0g) was chromatographed on a silica gel column and eluted with increasingly polar solvent systems, resulting in eleven fractions of 500mL each: two from hexane (Frs. 1-2), four from dichloromethane (Frs. 3-6), four from ethyl acetate (Frs. 7-10) and one from methanol (Fr. 11). Fraction 3 (294mg) was rechromatographed on the silica gel column and eluted with increasingly polar mixtures of hexane and ethyl acetate, resulting in forty-six sub-fractions of 10mL each. Sub-fraction 11, eluted with hexane-ethyl acetate (8:2), afforded substance 1 (10mg), which was pure under TLC and spectroscopic analysis. This substance was identified as triterpene glutinol on the basis of the IR, ¹H and ¹³C NMR data that were identical to those described in the literature (Tuan, Hung and Chien, 2005).

The initial fractionation of EEL was repeated to obtain a larger quantity of the dichlorometanic fractions, which were grouped (1.0g) and submitted again to column chromatography on silica gel, employing increasingly polar mixtures of hexane and ethyl acetate as eluents to afford seventy-seven fractions 30mL each. Fraction 54, eluted with hexane-ethyl acetate (7:3), provided compound 2 (44mg), which was identified as a pyrocatechol whose IR and NMR data were very similar to those reported for Z,Z-4-

(heptadeca-8,11-diennyl)-benzene-1,2-diol (Sargent, Wangchareontrakul and Jefferson, 1989).

Glutinol (1). IR, ν_{\max} (cm⁻¹): 3445, 3391, 2930, 2850, 1454, 1361, 1180. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ): 5.63 (m, 1H), 3.47 (s, 1H), 1.16 (s, 3H), 1.14 (s, 3H), 1.04 (s, 3H), 1.09 (s, 3H), 1.00 (s, 3H), 0.99 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 0.85 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz, δ): 18.2 (C-1), 27.8 (C-2), 76.3 (C-3), 40.8 (C-4), 141.6 (C-5), 122.0 (C-6), 23.6 (C-7), 47.4 (C-8), 34.8 (C-9), 49.7 (C-10), 34.6 (C-11), 30.3 (C-12), 39.3 (C-13), 37.8 (C-14), 32.1 (C-15), 36.0 (C-16), 30.1 (C-17), 43.1 (C-18), 35.1 (C-19), 28.2 (C-20), 33.1 (C-21), 38.9 (C-22), 28.9 (C-23), 25.4 (C-24), 16.2 (C-25), 19.6 (C-26), 18.4 (C-27), 32.0 (C-28), 34.5 (C-29), 32.3 (C-30).

Pyrocathecol 2. IR, ν_{\max} (cm⁻¹): 3375, 3008, 2924, 2854, 1604, 1518, 1462, 1373, 1280, 1192, 1114, 956, 864, 786, 721. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ): 6.76 (d, $J=8.0$, 1H), 6.69 (t, $J=2.0$, 1H), 6.59 (dd, $J=2.0, 8.0$; 1H), 5.35-5.14 (m, 4H), 2.77 (m, 2H), 2.48 (t, $J=8.0$, 2H), 2.06-2.01 (m, 4H), 1.55 (m, 2H), 0.89 (t, $J=7.0$, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz, δ): 141.31 (C-1'), 143.43 (C-2'), 115.44 (C-3'), 136.10 (C-4'), 120.61 (C-5'), 115.16 (C-6'), 35.23 (C-1), 31.88 (C-2), 29.68 (CH₂), 29.40 (CH₂), 29.30 (CH₂), 27.20 (CH₂), 130.11 (CH), 127.92 (CH), 25.62 (CH₂), 128.00 (CH), 130.20 (CH), 29.23 (CH₂), 31.57 (CH₂), 22.66 (CH₂), 14.09 (CH₃).

2.3. Antifungal assay

For the antifungal evaluation of the extracts, the fungus *Fusarium solani* isolated from passion fruit trees and kept at the UESB Phytopathology Laboratory at the Vitória da Conquista campus was used. *Fusarium solani* colonies were grown on 90-mm Petri dishes containing potato-dextrose-agar (PDA) culture medium (Merck). The dishes were placed in Biochemical Oxygen Demand (BOD)

incubation at 25°C for seven days to allow the fungus to colonize the entire diameter of the dish.

Extracts EEL, EES and EER (200mg each) were separately diluted in acetone (5mL) and topped with off distilled, autoclaved water (20mL), resulting in solutions each with a 10mg.mL⁻¹ concentration. To arrive at the desired concentrations of 0.001; 0.005; 0.01; 0.02; 0.05; 0.1; 0.25; 0.5 and 1mg.mL⁻¹, the solutions obtained from the extracts in PDA were proportionally diluted and placed on Petri dishes. For the negative control without extracts (0mg.mL⁻¹), only PDA medium, distilled and autoclaved water (20mL) and acetone (5mL) were used.

Following solidification of the culture medium on the Petri dishes containing the concentrations mentioned above, 5-mm discs containing 8-day-old *Fusarium solani* mycelium were minced to the center of each dish, which were then sealed with plastic film and placed randomly into the incubation chamber at 25°C. The lowest concentration of extract that inhibited the growth of the test microorganisms was determined to be the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) (Ostrosky et al., 2008). This analysis was conducted by measuring the diameters of the colonies (the mean out of two diametrically opposed measurements) every two days, beginning after 48 hours of incubation and lasting for seven days, i.e., until the moment when the control treatment fungus had colonized the entire surface of the culture medium. Potassium phosphite (K₂HPO₃) was used as the positive control.

2.4. Antibacterial assay

To evaluate the antibacterial activity of the *S. brasiliensis* extracts through the broth micro-dilution technique, the following standard bacterium strains were utilized, which were supplied by the Cultures Collection of the Phytopathology Laboratory, Rural Federal University of Pernambuco, with the respective cultures from where they were isolated:

Xanthomonas campestris pv. *campestris* (Xcc56) from cabbage leaves; *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Xcv112) from vine branches; *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc23) from lettuce leaves; *Ralstonia solanacearum* (Race 1) (CGH12) from fresh pepper stems; *Ralstonia solanacearum* (Race 2) (B19) from bananas; and *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac1.12) from yellow melon.

2.4.1. Preparation of inoculum

The inoculum was prepared by emulsifying the overnight colonies from an agar *Mueller Hinton* by diluting a broth culture (Suffredini, Varella and Younes, 2007). A 0.5 McFarland standard (Andrews, 2001) was used for visual comparison to adjust the suspension to a density equivalent to approximately 10^8 colony-forming units per mL (CFU/mL). Alternatively, the inoculum could be adjusted photometrically. The suspensions of the organisms were diluted in 0.85% saline or broth to give 10^8 CFU/mL. The plates were inoculated within 30min of standardizing the inoculum to avoid changes in the inoculum density.

2.4.2. Microdilution broth assay

The extracts were tested using the microdilution broth assay (MDBA) in sterile conditions, according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (2009) (CLSI, 8th Ed.). The assay was adapted for high-throughput conditions using Müller-Hinton broth (MHB) medium (Difco™) in 96-well microplates. The inoculum was adjusted to 1×10^8 CFU/mL with fresh colonies grown on sterilized Müller-Hinton Agar (MHA) medium (Difco™). The bacterial suspensions at the different concentrations were prepared in MHB from the 1×10^8 CFU/mL stock. A 10 μ L aliquot of the bacterial suspension was dispensed into the wells containing MHB medium (45 μ L) and a 45- μ L aliquot of the extract at different concentrations (20; 10; 5;

2.5; 1.25; 0.63; 0.31 and 0.16mg.mL⁻¹). The microplates were incubated at 25°C for 24h. The inhibition of bacterial growth was assessed using 0.01% Resazurin (7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one-10-oxide, Sigma-Aldrich®) solution to verify the presence of microbial growth (Suffredini et al., 2004). A pink or red color after the addition of the Resazurin solution indicated the presence of growing viable cells, and a blue color indicated a lack of microbial growth. MIC was determined to be the lowest concentration visually analyzed to effect total growth inhibition. Gentamicin was used as the positive control.

2.5. Brine Shrimp Lethality Bioassay

The toxicity bioassay against *Artemia salina* was conducted according to the procedure described recently (Batista et al., 2009). Brine shrimp eggs were hatched in artificial seawater (40g/L, sea salt). After 24 hours of incubation at warm room temperature (27-30 °C) under artificial light, the nauplii were collected with a Pasteur pipette and maintained for an additional 24 hours under the same conditions to reach the metanauplii stage. We prepared the solutions by diluting 50mg of each extract in 1mL of dimethylsulphoxide (DMSO). Working in triplicate 12.5, 25 and 50 μ L aliquots of these solutions were diluted in 5mL of previously prepared sea salt solution containing *A. salina* larvae (10-20 metanauplii), thereby obtaining concentrations of 125, 250 and 500 μ g/mL of EEL, EES and EER extracts. A negative control was prepared with DMSO sea salt solution with only *A. salina* larvae (10-20 metanauplii), and lapachol was used as the positive control. Twenty four hours later, the number of survivors was counted, and the lethal concentration 50% (LC₅₀), defined as the sample concentration that causes the death of 50% of the larvae, was calculated using Probit analysis with 95% confidence intervals (Finney, 1971).

3. Results and Discussion

The antifungal, antibacterial and brine shrimp lethality activities of *Schinopsis brasiliensis* extracts EER, EES and EEL were evaluated, and their corresponding results are shown in **TABLE 1**. As noted, the EER, EES and EEL extracts were inactive against *Fusarium solani*, displaying MIC values above 1mg/mL.

TABLE 1 also presents the Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) of the *S. brasiliensis* ethanolic extracts obtained by the broth micro-dilution method against six phytopathogenic bacteria, displaying MIC values in the range from 312.5 to 10,000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The leaf extract exhibited a lower MIC against three of the microorganisms tested: *Ralstonia solanacearum* (Race 2, B19), *A. avenae* subsp. *citrulli* (Aac1.12) and *X. campestris* pv. *campestris* (Xcc56). The stem extract was efficient against only the bacteria *R. solanacearum* (Race 1, CGH12), having a MIC of 312.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The leaf, stem and root extracts were equally efficient against *X. campestris* pv. *campestris* (Xcc56). From all the bacterias tested, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc23) was the most resistant, having a MIC between 5,000 and 10,000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for all three of the *S. brasiliensis* extracts assayed. This result allowed us to consider EER, EES and EEL to be inactive against this bacterium according to the criteria established by Tegos and collaborators (2002). The root extract displayed a MIC of 625 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ against the bacteria *X. campestris* pv. *campestris* (Xcc56) and *A. avenae* subsp. *citrulli* (Aac1.12), and of 1,250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ against the bacteria *X. campestris* pv. *viticola* (Xcv112) and *R. solanacearum* (Race 1, CGH12). We also noted that the stem extract presented the highest MIC values against the majority of the assayed bacteria, with the exception of *X. campestris* pv. *campestris* (Xcc56) and *R. solanacearum* (Race 1, CGH12), against which the extract reached a MIC value of 625 and 312.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively. Additionally, the *S.*

brasiliensis leaf extract presented the best performance, being capable of inhibiting the growth of the microorganism *A. avenae* subsp. *citrulli* (Aac1.12), with a MIC value of 312.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. In general, these results demonstrate the good aptitude of *S. brasiliensis* extracts to inhibit the growth of the evaluated phytopathogenic bacteria.

EEL was the most active extract against the phytopathogenic bacteria assayed. It was submitted to a phytochemical study aiming to identify the chemical entity(ies) responsible for its antibacterial activity. This extract was fractionated on a silica gel column, which provided triterpene glutinol (**1**) and a pyrocatechol **2** (**FIGURE 1**), whose structures were determined by comparison of their IR, ^1H and ^{13}C NMR data with those available in the literature (Tuan, Hung and Chien 2005; Sargent, Wangchareontrakul and Jefferson, 1989). To the best of our knowledge, this paper is the first to report the occurrence of both natural products **1** and **2** in *Schinopsis brasiliensis*. When compounds **1** and **2** were assayed against the same phytopathogenic bacteria, neither was found to be active, with MIC values above 5,000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (**TABLE 1**). These results indicate that the most potent antibacterial activity observed for EEL is not attributed to these isolated compounds, although they may take part in a likely synergism or potentiation when present in this extract, and thus deserve further studies to clarify this possibility. Furthermore, Saraiva and collaborators (2011) and Chaves and collaborators (2011) attributed the antimicrobial activity of *Schinopsis brasiliensis* to the high concentration of phenolic compounds, such as tannins and flavonoids, which could not be isolated from EEL in our attempts described in this present paper.

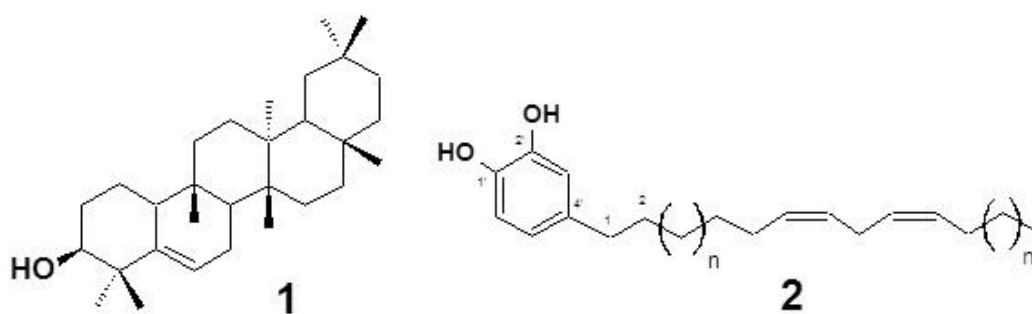


FIGURE 1. Chemical structures of compounds glutinol (**1**) and pyrocatechol **2** isolated from *Schinopsis brasiliensis* leaves.

The preliminary results (data not shown) suggest that all of the extracts from *Schinopsis brasiliensis* might be acting as bacteriostatic agents. From the point of view of their potential application in agriculture, these findings are important results because apart from controlling the disease caused by the phytopathogens, they also have a lower environmental impact due to the lack of more toxic

residues that would rest on the agricultural products. The presence of bactericidal antibiotic substances would damage the local biodiversity and the health of the consumers of these products. As an example, copper sulfate, which is also a bacteriostatic agent, is largely used to control phytopathogens in agriculture and has low toxicity compared to other pesticides (Legaspi and Zenz, 1994).

TABLE 1. Antimicrobial and brine shrimp lethality (BSL) activities of *Schinopsis brasiliensis* extract EER, EES and EEL, and substances **1** and **2** against some phytopathogens and *Artemia salina*.

Sample	Fungus * <i>F. solani</i> (MIC, mg/mL)	Bacteria (MIC, µg/mL) #						<i>A. salina</i> (LC ₅₀ , µg/mL)
		<i>X.c.</i> (I) ^a	<i>X.c.</i> (II) ^b	<i>P.c.</i> ^c	<i>R.s.</i> (I) ^d	<i>R.s.</i> (II) ^e	<i>A.a.</i> ^f	
EER ¹	> 1.0	625	1,250	5,000	1,250	2,500	625	> 1000
EES ²	> 1.0	625	2,500	10,000	312.5	10,000	2,500	> 1000
EEL ³	> 1.0	625	1,250	5,000	625	1,250	312.5	> 1000
1			> 5,000					
2		> 5,000	> 5,000	> 5,000	> 5,000	> 5,000	> 5,000	
K ₂ HPO ₃	0.001							
Gentamicin		0.250	0.031	0.031	0.031	> 4.00	0.031	
Lapachol								68.1

* Using the mycelial growth inhibition method in dishes; # Using the broth micro-dilution technique.

Phytopathogenic bacteria: ^a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc56); ^b *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Xcv112); ^c *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc23); ^d *Ralstonia solanacearum* (Race 1) (CGH12); ^e *Ralstonia solanacearum* (Race 2) (B19); ^f *Acidovorax avenae* subsp. *citulli* (Aac1.12).

¹ Ethanolic extract of roots; ² Ethanolic extract of stems; ³ Ethanolic extract of leaves.

Papadopoulos and collaborators (2004) reported the presence of glutathione S-transferase (GST) as an internal detoxification system in the three development phases (24h, 48h and adults) of *Artemia salina*, which are affected by a number of internal or external factors, therefore changing the organism's susceptibility to various environmental contaminants. For this reason, this micro-crustacean is a valid model to evaluate the toxicity of xenobiotics against vertebrates and invertebrates (Brophy et al., 1989; Grant and Matsumura, 1988) and can be used as a valid tool to evaluate the ecotoxicity of antimicrobial agents and plant extracts (Nunes et al., 2006). When the ecotoxicity of *S. brasiliensis* extracts was evaluated using the BSL bioassay against *A. salina*, the LC₅₀ values were above 1,000µg/mL for all of the extracts and there were no deaths of the microcrustacean's larvae up to the highest concentration assayed, indicating that these extracts are non-toxic for *A. salina* (**TABLE 1**) and potentially non-toxic to the environment.

Our results indicate the potential application of *Schinopsis brasiliensis* for agricultural use as a botanical agent to control plant diseases caused by phytopathogenic bacteria pertaining to the genera *Xanthomonas*, *Ralstonia* and *Acidovorax*. Further studies are still needed to confirm the *in vivo* antibacterial activity of these extracts.

4. Conclusions

This work reports the *in vitro* antibacterial activity of *Schinopsis brasiliensis* extracts against five strains of phytopathogenic bacteria and shows that such extracts are potentially non-toxic to the environment. Moreover, the triterpene glutinol and a pyrocatechol are described here for the first time as the chemical constituents of *S. brasiliensis*. The results suggest that this plant has potential for agricultural use to control plant diseases caused by phytopathogenic

bacteria belonging to the genera *Xanthomonas*, *Ralstonia* and *Acidovorax*.

5. Acknowledgements

The authors are grateful to FAPESB (PET0009/2012) for grants and financial support. Prof. Dr. Elineide Barbosa de Souza and the Phytobacteriology Laboratory of the Rural Federal University of Pernambuco (UFRPE) are fully acknowledged for the donation of standard bacteria strains.

6. References

- AGRIOS, G.N. 2005. *Plant Pathology*. Elsevier Academic Press. San Diego.
- ALBUQUERQUE, U.P.; MEDEIROS, P.M.; ALMEIDA, A.L.S.; MONTEIRO, J.M.; LINS NETO, E.M.F.; MELO, J.G.; SANTOS, J.P. 2007. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 114, p. 325-354.
- ALVES, E.S.S.B.; PUPO, M.S.; MARQUES, S.S.; VILCHES, T.T.B.; SANTOS, R.B.; VENTURA, J.A.; FERNANDO, P.M.A. 2003. Avaliação de óleos essenciais na inibição do crescimento de fungos de fruteiras tropicais. *Fitopatologia Brasileira*, v.28, p. 343-345.
- AMARAL M.F.Z.J.; BARA, M.T.F. 2005. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v.2, p. 5-8.
- ANDREWS, J.M. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 48, p. 5-16.
- BATISTA, R.; BRANDÃO, G.C.; BRAGA, F.C.; OLIVEIRA, A.B. 2009. Cytotoxicity of *Wedelia*

- paludosa* D.C. extracts and constituents. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.19, p. 36-40.
- BROPHY, P.M.; PAPADOPOULOS, A.; TOURAKI, M.; COLES, B.; KORTING, W.; BARRETT, J. 1989. Purification of cytosolic glutathione transferases from *Schistocephalus solidus* (plerocercoid): interaction with anthelmintic and products of lipid peroxidation. *Molecular Biochemical Parasitology*, v. 36, p.187-196.
- CARDOSO, M.P.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. 2005. A new alkyl phenol from *Schinopsis brasiliensis*. *Natural Product Research*, v.19, p.431-433.
- CHAVES, T.P.; DANTAS, I.C.; FELISMINO, D.C.; VIEIRA, K.V.M.; CLEMENTINO, E.L.C.; COSTAS, L.S. 2011. Atividade antimicrobiana das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engler. *Biofar, Revista de Biologia e Farmácia*, v. 5, p.11-17.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE 2009. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Approved Standard, Eighth Edition. CLSI document M7-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- DAVIES, B.; BAULCOMBE, D.; CRUTE, I.; DUNWELL, J.; GALE, M.; JONES, J.; PRETTY, J.; SUTHERLAND, W.; TOULMIN, C. 2009. *Reaping the Benefits: Science and the sustainable intensification of global agriculture*. Royal Society, London.
- DI PIERO, R.M.; NOVAES, Q.S.; PASCHOLATI, S.F. 2010. Effect of *Agaricus brasiliensis* and *Lentinula edodes* mushrooms on the infection of passionflower with *Cowpea aphid-borne mosaic virus*. *Brazilian Archives of Biology Technology*, v. 53, p. 269-278.
- FINNEY, D.J. 1971. *Probity analysis*. Cambridge University Press. Cambridge.
- GRANT, D.F.; MATSUMURA, F. 1988. Glutathione S-transferase-1 in *Aedes aegypti* larvae: purification and properties. *Insect Biochemistry*, v. 18, p.615-622.
- KHAMNA, S.; YOKOTA, A.; LUMYONG, S. 2009. Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 25, p. 649-655.
- KHAN, M.R. 2008. *Plant Nematodes: Methodology, Morphology, Systematics, Biology and Ecology*. Science publishers. Enfield, NH.
- KIMATI, H.; FERNANDES, N.G.; SOAVE, J.; KUROZAWA, C.; BRIGNANI NETO, F.; BETTIOL, W. 1997. *Guia de Fungicidas Agrícolas. Recomendações por Cultura [Agricultural Fungicide Guide. Recommendations by Culture]*. Grupo Paulista de Fitopatologia. Jaboticabal.
- LEGASPI, J.A.; ZENZ, C. 1994 – *Occupational health aspects of pesticides*. In: ZENZ, C.; DICKERSON, O.B.; HORVATH JR., E.P: *Occupational Medicine*, p.617-653. Mosby-Year Book Inc. New York.
- NUNES, B.S.; CARVALHO, F.D.; GUILHERMINO, L.M.; VAN STAPPEN, G. 2006. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. *Environmental Pollution*, v. 144, p. 453-462.
- OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L.; KANEKO, T.M.; NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B.R. 2008. Methods to evaluate the antimicrobial activity and determination of minimum inhibitory concentration (MIC) for medicinal plants. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.18, p. 301-307.
- PAPADOPOULOS, A.I.; LAZARIDOU, E.; MAURIDOU, G.; TOURAKI, M. 2004. Glutathione S-transferase in the branchiopod *Artemia salina*. *Marine Biology*, v.144, p. 295-301.

- RONALD, P. 2011. Plant Genetics, Sustainable Agriculture and Global Food Security. *Genetics Society of America*, v. 188, p.11-20.
- ROZWALKA, L.C.; LIMA, M.L.R.Z.C.; MIO, L.L.M.; NAKASHIMA, T. 2008. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. *Ciência Rural*, v.38, p. 301-307.
- SARAIVA, A.M.; CASTRO, R.H.A.; CORDEIRO, R.P.; SOBRINHO, T.J.S.P.; CASTRO, V.T.N.A.; AMORIM, E.L.C.; XAVIER, H.S.; PISCIOTTANOL, M.N.S. 2011. *In vitro* evaluation of antioxidant, antimicrobial and toxicity properties of extracts of *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardiaceae). *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 5, p.1724-1731.
- SARGENT, M.V.; WANGCHAREONTRAKUL, S.; JEFFERSON, A. 1989. The synthesis and identification of alkenyl and alkadienyl catechols of Burmese Lac. *Journal of Chemical Society, Perkin Transactions*, v.1, p. 431-439.
- STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S.; NOZAKI, M.H. 1999. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. *Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, v. 11, p. 16-21.
- SUFFREDINI, I.B.; SADER, H.S.; GONÇALVES, A.G.; REIS, A.O.; GALES, A.C.; VARELLA, A.D.; YOUNES, R.N. 2004. Screening of antibacterial active extracts obtained from plants native to Brazilian Amazon rain forest and Atlantic forest. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 37, p. 379-84.
- SUFFREDINI, I.B.; VARELLA, A.D.; YOUNES, RN. 2007. Minimal inhibitory concentration and minimal bactericidal concentration results from three selected antibacterial plant extracts from the Amazon and Atlantic Brazilian rain forests. *Revista do Instituto de Ciências e Saúde*, v. 25, p. 131-132.
- TEGOS, G.; STERMITZ, F.R.; LOMOVSKAYA, O.; LEWIS, K. 2002. Multidrug drug inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, p.3133-3141.
- TUAN, L.A.; HUNG, N.V.; CHIEN, N.Q. 2005. Chemical constituents of *Xerospermum laevigatum* Radlk. *Vietnam Journal of Chemistry*, v. 43, p. 643-646.
- VIGO, S.C.; MARINGONI, A.C.; CAMARA, R.C.; LIMA, G.P.P. 2009. Ação de tinturas e óleos essenciais de plantas medicinais sobre o crestamento bacteriano comum do feijoeiro e na produção de proteínas de indução de resistência. *Summa Phytopathologica*, v. 35, p. 293-304.

Formação de mudas de alface provenientes de sementes peletizadas com altas diluições

Lettuce seedlings formation from pelleted seeds with high dilutions

¹ Roberto Luiz Queiroz, ² Elen Sonia Maria Duarte Rosa, ³ Maximiliano Marques, ³ Vanessa Aparecida Goulart, ³ Guilherme Ferreira Marques

¹ Produção Agroecológica e Homeopatia, Centro Universitário do Sul de Minas (UNIS), Varginha, MG.

² Departamento de Fitotecnia, IFET/BAIANO, Teixeira de Freitas, BA.

³ Curso de Engenharia Agrônômica, Centro Universitário do Sul de Minas (UNIS), Varginha, MG.

Correspondência: robertoqueiroz@unis.edu.br

Resumo

A peletização de sementes vem sendo caracterizada como uma importante forma de maximização nos custos de produção de mudas pelo fato de reduzir o trabalho e mão de obra de distribuição manual de sementes, reduzindo ainda a prática do desbaste de plantas excedentes. No entanto, o interesse comercial pelo encapsulamento de semente avançou após a semeadura mecanizada, prática de plantio direto e, principalmente, pela possibilidade de inserção de nutrientes, reguladores de crescimento e aplicação de agrotóxicos como forma de constituir melhorias na sanidade das plantas. Nesse sentido, objetivou-se avaliar a produção de mudas de alface (*Lactuca sativa* L. c.v. Grand Rapids) oriundas de sementes peletizadas com preparados homeopáticos submetidas à cobertura de homeopatia de *Phosphorus 30CH*. Os resultados apontam que a utilização de homeopatia de *Sulphur 6CH* e *Nux vomica 6CH* são capazes de propiciar mudas saudáveis e vigorosas quando comparadas com a testemunha.

Palavras-chave: agroecologia; homeopatia; *Lactuca sativa* L.

Abstract

The seed pelleting has been characterized as an important way of maximizing the seedlings production costs because of lower labor and manpower manual seed distribution, while reducing the practice of surplus plants thinning. However, the commercial interest in seed encapsulation advanced after mechanized seeding, tillage practice and especially the possibility of inclusion of nutrients, growth regulators and pesticides application as a way to provide improvements in the health of plants. In this sense, the objective was to evaluate the production of lettuce seedlings (*Lactuca sativa* L. cv. Grand Rapids) arising from pelleted seeds with homeopathic

preparations submitted homeopathy coverage *Phosphorus* 30CH. The results show that the use of *Sulphur* 6CH homeopathy and *Nux* 6CH are able to provide healthy and vigorous seedlings when compared to the control.

Keywords: agroecology; homeopathy; *Lactuca sativa* L.

Introdução

A homeopatia vem se fundamentando como opção de tratamentos de seres abióticos e bióticos no intuito de reordenar a energia vital do organismo, bem como no equilíbrio de sintomas (Arruda et al., 2005). Desde a Instrução Normativa nº 007, de 17 de maio de 1999 e, mais recentemente por intermédio da Instrução Normativa nº. 046, de outubro de 2011 (BRASIL, 2011), os preparados altamente diluídos (homeopatia) são recomendados tanto para o controle fitossanitário como para o reequilíbrio fisiológico das plantas de acordo com o enunciado do criador da Homeopatia, Samuel Hahnemann (1755-1843) e, ainda destacada como Tecnologia Social, conforme a UNESCO e a Fundação Banco do Brasil, em 2003 (Bonfim et al., 2012).

Em plantas, as experiências com uso da homeopatia, vêm sendo realizadas por agricultores nacionais e de outros países (Cuba, Inglaterra, Alemanha, França, Itália), com resultados surpreendentes na minimização de ataques de insetos, pragas (Almeida et al., 2003), germinação de sementes (Bonfim et al., 2012), aumento de compostos secundários (Duarte, 2007), fisiologia de plantas (Bonato, 2007) e produção de mudas saudáveis (Arruda et al., 2005).

Em sistemas vegetais hortícolas a ciência da ultradiluição é aplicável, pois os princípios fundamentais da homeopatia são coerentes com as leis da natureza, são imutáveis e pertinentes a todos os seres vivos. Casali, Castro e Andrade (2002), dissertam que a escolha do preparado homeopático a ser utilizado no vegetal deva ser pontuada pelas

possibilidades de analogia com a matéria médica humana e animal; pelo “*simillimum*” do elemento químico nutricional de maior hierarquia na família, gênero, espécie ou variedade, e também por utilização da isopatia.

No aspecto medicamentoso e, de acordo com o conhecimento tradicional, *Lactuca sativa* é utilizada em diversos tratamentos, incluindo a insônia, tosse seca, dores reumáticas, ansiedade (Harsha e Anilakumar, 2012), também confere proteção contra estresse oxidativo, possivelmente pela atividade das vitaminas C e E, polifenóis e carotenoides (Harsha e Anilakumar, 2013). Além disso, o teor de nutrientes deste vegetal inclui quantidade apreciável de alguns minerais, como cálcio e ferro (Romani et al., 2002).

O negócio de hortaliças multiplicadas por sementes movimentou no varejo durante 2010/2011 a quantia de R\$ 40,60 bilhões. A alface contribui com R\$ 7,79 bilhões, representando a segunda principal hortaliça comercializada, sendo a alface tipo crespa com aproximadamente 53% do mercado nacional (Absem, 2011).

A prática de revestimento de sementes como forma de proteção de plantas é remota sendo originada no século XVIII onde há relatos de utilização de salmoura no controle de pragas (Costa, 2003). Atualmente, com avanço das doenças e pragas, a peletização de sementes tornou-se um fator importante para determinação do stand vegetativo comercial no campo, sendo utilizados diversos materiais tais como: fungicidas, nutrientes,

pesticidas, polímeros, corantes de identificação dentre outros.

Diante das diversas limitações impostas pelos meios bióticos e abióticos no estabelecimento de plântulas e pela necessidade de desenvolver meios de sobrevivência do tegumento sem a utilização de insumos não permitidos em sistemas orgânicos de produção, objetivou-se verificar a influência de diversas peletizações homeopáticas no desenvolvimento inicial de alface.

Material e Métodos

O experimento foi realizado em condições de cultivo protegido na área de experimento do UNIS-MG, Varginha-MG. As sementes de alface, utilizadas no experimento, foram aquênios convencionais, da marca HORTICERES, cultivar GRAND RAPIDS, origem: E.U. A; porcentagem de germinação de 98% e pureza de 99%.

O delineamento experimental foi no modelo em blocos ao acaso (DIC), em esquema fatorial 5 x 3, sendo quatro tratamentos homeopáticos além da testemunha - água destilada e dois tipos de cobertura de plantas: água destilada e homeopatia de *Phosphorus* 30CH, perfazendo 15 tratamentos x 3 repetições, em que cada parcela é representada por cinquenta células da bandeja, sendo os tratamentos discriminados como:

1. Sementes peletizadas/ Talco + *Carbo vegetabilis* 6CH
2. Sementes peletizadas/ Talco + *Nux vomica* 6CH
3. Sementes peletizadas/ Talco + *Sulphur* 6CH
4. Sementes peletizadas/ Talco + *Arnica montana* 6CH
5. Sementes peletizadas/ Talco + água (testemunha)
6. Cobertura com *Phosphorus* 30CH
7. Cobertura com água destilada

As sementes tratadas de alface foram plantadas em bandejas descartáveis de 200 células, preenchidas com substrato de fibra de coco sendo disposta a 1m de altura do chão e irrigadas duas vezes ao dia.

A solução homeopática *Phosphorus* 30CH determinada como cobertura foi aplicada por aspersão (pulverizador manual tipo spray) nas folhas das mudas de alface após a semeadura com repetição a cada três dias, até o final do experimento. Utilizou-se um papel cartolina objetivando proteger os demais tratamentos da deriva do *Phosphorus* 30CH no momento da pulverização.

Os preparados homeopáticos foram adquiridos de farmácia de manipulação de medicamentos homeopáticos (Bioética Ltda. – Varginha-MG) em forma líquida (etanol 70%). O processo de revestimento das sementes, ou seja, a peletização seguiu a metodologia de Bonfim e colaboradores (2012), respeitando a relação peso/volume, sendo: um grama de pó para um mL de adesivo. O insumo utilizado foi talco farmacêutico inerte, cuja composição é $Mg_3Si_4O_{10}(OH)_2$, e o adesivo refere-se aos tratamentos de soluções homeopáticas (*Carbo Vegetabilis* 6CH, *Nux Vomica* 6CH, *Sulphur* 6CH e *Arnica* 6CH). Os preparados homeopáticos foram impregnados no talco farmacêutico com auxílio de placa de petri com intuito de formar um pó semi pastoso, íntegro, branco, o qual revestiu as sementes.

As características analisadas foram: Massa fresca (MFPA) e seca (MSPA) da parte aérea, Massa fresca (MFR) e seca (MSR) da raiz e Comprimento da Raiz (CR). A característica (CR) foi determinada no final do experimento, com auxílio de régua graduada sendo os resultados expressos em mm. As características de massa fresca de parte aérea e raiz foram definidas, separadamente, por intermédio de pesagem em balança eletrônica de precisão de 0,001g. Para a obtenção das características de massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca de

raiz (MSR), foi feita a embalagem (separados por tratamentos e características) em sacos de papel Kraft, encaminhado à secagem em estufa com ventilação forçada de ar, a 65 °C, até peso constante e determinada a massa seca em balança eletrônica de precisão de 0,01g.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, no software ASSISTAT, versão 7.

Resultados e Discussão

De acordo com a análise de variância não se verificou interação entre peletização e cobertura para as características estudadas, permitindo a comparação/discussão dos fatores “homeopatia” e

“cobertura”, separadamente. Para o fator “homeopatia” somente a característica de massa seca de parte aérea (MSPA) e massa seca de raiz, para “cobertura” resultaram em efeitos não significativos.

As diferenças apontadas pela estatística (**TABELA 1**) sustentam a hipótese de que o talco e a água possuem a capacidade de receber a informação dos preparados homeopáticos e, previamente, em contato com outro biosistema retransmitir essa estrutura informacional (Bastide, 1995). Esses resultados apontam que os preparados homeopáticos foram capazes de provocar o sistema biológico da semente demonstrando a eficácia da homeopatia e contrapondo-se aos argumentos de efeito placebo, tão comumente propagada pelos que duvidam da ciência homeopática (**TABELA 1**).

TABELA 1. Resumo da análise de variância para massa fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da parte aérea (MSPA), massa fresca da raiz (MFR), comprimento da raiz (CR) e massa seca da raiz (MSR), de mudas de alface c.v GRAND RAPIDS provenientes de peletização de sementes com homeopatia e submetidas à cobertura com preparado homeopático de *Phosphorus 30CH*. Varginha-MG, UNIS-MG, 2014.

F.V	GL	QUADRADO MÉDIO				
		MFPA (g)	MSPA (g)	MFR (g)	CR (cm)	MSR (g)
Peletização	4	0,008599**	0,000028 ^{ns}	0,009323*	705,33*	0,000012**
Cobertura	1	0,179189*	0,000270*	0,050262*	1435,90*	0,000007 ^{ns}
Peletização*Cobertura	4	0,001607 ^{ns}	0,000101 ^{ns}	0,002880 ^{ns}	241,30 ^{ns}	0,000011 ^{ns}
Resíduo	109	0,002973	0,000055	0,001331	191,79	0,000005
CV (%)		27,23	44,25	22,69	15,68	23,33

**Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

* Significativo pelo teste F a 1% de probabilidade. ^{ns} Não significativo.

O comprimento de raiz foi a única característica afetada pela cobertura homeopática de *Phosphorus 30CH*, resultando em resposta superior à média geral que foi

de 88,33 mm. Moraes (2009) obteve resposta no crescimento de raiz de eucalipto clone 3336 ao serem submetidos às dinamizações 6 e 12CH de *Phosphorus*.

A homeopatia de fósforo foi capaz de estimular o metabolismo radicular das mudas de alface, demonstrando que essas plantas foram capazes de reagir à presença da homeopatia no substrato.

Em todas as homeopatias utilizadas observam-se respostas diferenciadas nas características analisadas, escapando a linearidade dos estímulos, apresentado pela significância nas diferenças das características analisadas, excetuando a MSPA, bem como, MSR com homeopatia *Phosphorus* 30CH em cobertura (**TABELA 2**). Esse padrão de resposta é explicado como revelação da relação particular do

medicamento com o organismo (Silva, 2006), confirmando que as ultradiluições possuem frequência de onda própria (Bonato, 2007) podendo derivar na falta de relação proporcional entre o estímulo e a resposta (Bellavite, 2003).

Ao ser submetido à homeopatia de *Sulphur* 6CH as mudas de alface c.v GRAND RAPIDS produziu aumento de 0,0454 g planta⁻¹ de massa fresca de parte aérea (MFPA) em relação à testemunha (água) que apresentou 0,1790 g planta⁻¹ como o menor valor (**TABELA 2**).

TABELA 2: Massa fresca (MFPA) e seca (MSPA) de parte aérea, massa fresca (MFR) e seca (MSR) de raiz e comprimento da raiz (CR) de mudas de alface c.v GRAND RAPIDS, peletizadas com homeopatia expostas a cobertura de preparado homeopático de *Phosphorus* 30CH. Varginha-MG, UNIS-MG, 2014.

Homeopatia	Características analisadas				
	MFPA (g)	MSPA (g)	MFR (g)	CR (mm)	MSR (g)
Água (testemunha)	0,1790 b	0,0163	0,1621 ab	88,56 ab	0,0093 ab
<i>Carbo vegetabilis</i> 6CH	0,2137 ab	0,0181	0,1382 b	79,95 b	0,0082 b
<i>Sulphur</i> 6CH	0,2242 a	0,0159	0,1807 a	94,30 a	0,0095 a
<i>Arnica montana</i> 6CH	0,1987 ab	0,0172	0,1400 b	87,29 ab	0,0086 ab
<i>Nux vomica</i> 6CH	0,1853 ab	0,0152	0,1785 a	91,57 a	0,0100 a
Cobertura com Homeopatia	MFPA (g)	MSPA (g)	MFR (g)	CR (mm)	MSR (g)
Água (testemunha)	0,2388 a	0,0181 a	0,1798 a	84,87 b	0,0089
<i>Phosphorus</i> 30CH	0,1615 b	0,0151 b	0,1389 b	91,79 a	0,0093
CV(%)	27,23	44,25	22,69	15,68	23,33
Média Geral	0,2002	0,0168	0,1607	88,33	0,0091

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não se diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em estudos realizados por Bonato e Silva (2003) ficou comprovado a influência do preparado homeopático *Sulphur* 5CH no aumento da produção de matéria seca da parte aérea de rabanete, diferentemente deste experimento onde a mesma característica (massa seca) não diferiu

estatisticamente entre os tratamentos. Resultados semelhantes foram apresentados por Bonato, Proença e Reis (2009) que ao utilizar homeopatia de *Sulphur* 6CH obtiveram incrementos na massa fresca de plantas de *Mentha arvensis*, bem como o aumento no conteúdo de óleo essencial.

Nas características inerentes à raiz (MFR, CR e MSR) nota-se que a homeopatia de *Carbo vegetabilis* 6CH resultou em redução significativa comparativamente ao preparado homeopático de *Sulphur* 6CH que proporcionou as melhores médias no sistema radicular das mudas de alface. Esse resultado é semelhante à pesquisa de Pulido e colaboradores (2014) que obtiveram o mesmo padrão estatístico, ou seja, melhores resultados utilizando *Sulphur* 6CH e piores usando ultradiluição de *Carbo vegetabilis* 6CH nas variáveis: matéria seca de raiz e longitude da maior raiz de plântulas de repolho híbrido *Fuyutoy*.

Os aspectos estatísticos na resposta de *Nux vomica* 6CH nas características da raiz de mudas de alface c.v. GRAND RAPIDS, assemelharam-se ao tratamento com *Sulphur* 6CH. Moreno (2000) e Brunini e Sampaio (1994) caracterizam as homeopantias de *Sulphur* e *Nux vomica* como os principais policrostos da matéria médica, cuja patogenesia é extensa e com os mais diversificados sintomas. Efeito constatado em plantas de alface c.v. Regina por Queiroz (2015), que comprovou aumento nas médias das características MFF (massa fresca das folhas), NF (número de folhas) e MSF (massa seca das folhas) submetidas ao preparado de *Nux vomica* 6 CH quando comparado ao tratamento controle (água destilada).

Preparado homeopático de *Sulphur* manifesta-se fortificando a reação orgânica e “jogando fora” aquilo que se enquadra como prejudicial à sua vitalidade. Sendo indicado em casos de intoxicação, que se externaliza na superfície do corpo, bem como em supressões que causam sintomas variáveis e alternantes, dadas as alterações do meio (Voisin, 1987). Por outro lado, a ultradiluição de *Nux vomica*, tem sido maximizada como grande descontaminador de plantas intoxicadas por agrotóxico e por adubos químicos sintéticos solúveis, agindo nos tecidos das

plantas e também no solo, propiciando-lhes a homeostase (Cupertino, 2008).

Possivelmente as respostas significativas das ultradiluições de *Nux vomica* e *Sulphur* possam ter contribuído para com toda a potencialidade reação aos fatores externos cumprindo com a busca inerente pela sobrevivência e pela auto regulação (Andrade, 2004) das sementes de alface c.v. GRAND RAPIDS que estavam tratadas de forma convencional (inseticida e fungicida), antes da peletização com preparados homeopáticos.

As respostas positivas das ações homeopáticas condizem com a teoria de Schembri (1992) e Vithoulkas (1980). Os pesquisadores investigaram os preparados homeopáticos em baixas dinamizações, que por serem densos e moleculares, são mais eficazes no corpo físico como no caso dos vegetais.

Arenales (1999) evidencia que o *Carbo vegetabilis* é o medicamento da geada, pois a geada queima os tecidos vegetais pelo frio, assim como o fogo queima o vegetal pela ação do calor. Com relação às exigências de clima, as plantas de alface têm preferência por climas amenos, tolerando geadas leves. Por esse aspecto a preparação homeopática *Carbo vegetabilis* não possui similitude com mudas de alface, podendo-se inferir que as respostas negativas de *Carbo vegetabilis* 6CH nas características de raiz de mudas de alface c.v. GRAND RAPIDS, são sinais artificiais (patogenesia), denominada segundo Kent (1996) de ação primária do ser submetido aos estímulos de preparados ultradiluídos.

Conclusões

A cobertura com homeopatia de *Phosphorus* 30 CH, propiciou maior comprimento de raiz, quando comparada com aplicação de água (testemunha).

As homeopatas de *Nux vomica* 6CH e *Sulphur* 6CH, promoveram incrementos nas características condicionadas à raiz de mudas de alface c.v. GRAND RAPIDS, quando confrontada com o tratamento *Carbo vegetabilis* 6CH.

Todos os medicamentos homeopáticos foram capazes de provocar maiores efeitos positivos e incrementaram, a depender do tratamento, a massa fresca de parte aérea.

As preparações não moleculares de *Carbo vegetabilis* 6CH reduziu, significativamente, as características de raiz analisadas.

Referências

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO COMÉRCIO DE SEMENTES E MUDAS - ABSEM. 2014 Projeto para o levantamento dos dados socioeconômicos da cadeia produtiva de hortaliças no Brasil, 2010/2011. Campinas, 2011. Disponível: http://www.abcsem.com.br/docs/direitos_reservados.pdf. Acesso em: 12 jan 2015.

ALMEIDA, A. A. de; GALVÃO, J. C. C.; CASALI, V. W. D.; LIMA, E. R. de; MIRANDA, G. V. 2003. Tratamentos homeopáticos e densidade populacional de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith, 1797) (*Lepidoptera: Noctuidae*) em plantas de milho no campo. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, Sete Lagoas, v.2, n.2, p.1-8.

ANDRADE, F. M. C. 2004. *Alterações da vitalidade do solo com o uso de preparados homeopáticos*. 378p. Tese (Doutorado em Fitotecnia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

ARENALES MC. 1999. *A homeopatia na agropecuária orgânica*. In: Encontro Mineiro sobre Produção Orgânica de Hortaliças. 1, 1998. Viçosa, MG. ANAIS... UFV, 1999. p.54-6.

ARRUDA, V. M.; CUPERTINO, M. do C.; LISBOA, S. P.; CASALI, V. W. D. 2005. *Homeopatia tri-uma na agronomia*. UFV: Viçosa, 119 p.

BASTIDE, M. Basic research on high dilution effects. In: TADDEI-FERRETTI, C.; MAROTTA, P. (Ed.). 1995. *High dilution effects on cells and integrated systems*. London: Words Scientific Publishing, v. 3, p. 3-15.

BELLAVITE, P. 2003. Complexity science and Homeopathy: a synthetic overview. *Homeopathy*, London, v. 92, p.203-212.

BONATO, C. M.; SILVA, E. P. 2003. Effect of the homeopathic solution Sulphur on the growth and productivity of radish. *Acta Scientiarum*, v. 25, p. 259-263.

BONATO, C. M. 2007. Homeopathy in the host physiology. *Fitopatologia Brasileira*, v. 32, supl., p. 79-82.

BONATO, C. M.; PROENÇA, G.T.; REIS, B. 2009. Homeopathic drugs *Arsenicum album* and

Sulphur affects the growth and essential oil content in mint (*Mentha arvensis*). *Acta Scientiarum*, v. 31, p. 101-105.

BONFIM, F. P. G.; CASALI, V. W. D.; MENDONÇA, E. G.; MARTINS, E. R. 2012. Estresse hídrico em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) tratado com os preparados homeopáticos de *Arnica montana*. *Enciclopédia biosfera*, v. 8, p. 530- 538.

BRASIL. 2011. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 46 de 6 de outubro de 2011. Estabelecer o Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal, bem como as listas de Substâncias Permitidas para uso nos Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF.

- BRUNINI, C.; SAMPAIO, C. 1994. *Homeopatia: princípios, doutrina e farmácia*. São Paulo: Mythos Editora, 247 p.
- CASALI, V.W.D.; CASTRO, D.M.; ANDRADE, F.M.C. 2002. *Pesquisa sobre homeopátias nas plantas*. In: Seminário Brasileiro Sobre Homeopatia na Agropecuária Orgânica, 3º, Campinas do Sul – RS, Anais... p. 16-24.
- COSTA, M. de A. 2003. *Peletização de sementes de brócolos em leite de jorro cônico*. 243p. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- CUPERTINO, M.C. 2008. *O conhecimento e a prática sobre homeopatia pela família agrícola*. 132p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia), Universidade Federal de Viçosa.
- DUARTE, E.S.M. 2007. *Crescimento e teor de óleo essencial em plantas de Eucalyptus citriodora e Eucalyptus globulus tratadas com homeopatia*. 188p. Tese (Doutorado em Fitotecnia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- KENT, J. T. 1996. *Filosofia homeopática*. Tradução: Ruth Kelson. São Paulo: Robe.
- HARSHA, S. N.; ANILAKUMAR, K. R. 2012. Effects of *Lactuca sativa* extract on exploratory behavior pattern, locomotor activity and anxiety in mice. *Asian Pacific Journal Tropic*, v. 47, p.9 - 15.
- HARSHA, S. N.; ANILAKUMAR, K. R. 2013. Antioxidant properties of *Lactuca sativa* leaf extract involved in the protection of biomolecules. *Biomedicine & Preventive Nutrition*. v. 3, p. 367–373.
- MORAES, L.C.C.A. de V. 2009. *Crescimento e qualidade de mudas clonais de eucalipto com aplicação de preparados homeopáticos*. 54f. Tese (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- MORENO, J. A. 2000. *Organon a arte de curar* de Samuel Hahnemann. Belo Horizonte: Hipocrática Hahnemanniana, 277 p.
- PULIDO, E.E.; BOFF, P.; DUARTE, T.S.; BOFF M. 2014. Preparados homeopáticos en el crecimiento y en la producción de repollo cultivado en sistema orgánico. *Horticultura Brasileira*, v. 8, p. 267-272.
- QUEIROZ, R.L. 2015. *Alelopatia de manjeriço e uso do preparado homeopático Nux vomica em alface*. 78f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- ROMANI, A.; PINELLI, P.; GALARDI, C.; SANI, G.; CIMATO, A.; HEIMLER, D. 2002. Polyphenols in greenhouse and open-air-grown lettuce. *Food Chem*. v. 79, p. 337-342.
- SCHEMBRI, J. 1992. *Conheça a Homeopatia*. 3 ed. Belo Horizonte: Rona, 268 p.
- SILVA, R. T. B. da. 2006. *Interpretação matemático-física dos efeitos de ultradiluições em Sphagneticola trilobata (L.) Pruski*. 140f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- VITHOULKAS, G. 1980. *Homeopatia: ciência e cura*. Tradução: Sônia Régis. São Paulo: Cultrix, 436 p.
- VOISIN, H. 1987. *Manual de matéria médica para o clínico homeopata*. 2 ed. São Paulo: Andrey, 1160 p.

Bioactivity of extracts from *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm. against sinusitis causing bacterial pathogens

Bioatividade de extratos de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm. contra patógenos bacterianos causadores de sinusite

¹ Grasiela M. Costa; ¹ Rodrigo G. Suga; ² Patrícia L. Oliveira; ² Paula P. Magalhães; ² Luiz M. Farias; ³ Lucienir P. Duarte; ^{1,3,*} Fernando C. Silva

¹Faculdade de Farmácia, Universidade de Itaúna, Minas Gerais, Brasil.

²Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brasil.

³Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brasil.

Correspondência: fcsquimico@yahoo.com.br

Resumo

Alpinia zerumbet (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm. tem sido indicada na medicina popular brasileira para tratar reumatismo, dor de cabeça e sinusite. Para avaliar o efeito de extratos e frações de flores de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm., a fim de validar cientificamente o uso da planta para o tratamento de sinusite, foi proposto este estudo. Os extratos e frações foram preparados e analisados por ensaios fitoquímicos. A atividade antibacteriana contra 12 patógenos bacterianos associados com a sinusite foi avaliada empregando o método de diluição em ágar. A fração hexânica apresentou o mais amplo espectro de atividade, inibindo 10 das 12 bactérias testadas, especialmente *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Fusobacterium necrophorum*. O menor valor de MIC foi observado para a fração em acetato de etila contra *Streptococcus pneumoniae* ($32 \mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$). Todos os extratos e frações testadas apresentaram atividade contra *Prevotella intermedia*. Por outro lado, nenhum extrato ou fração exibiu efeito antibacteriano contra *Streptococcus agalactiae*. A solução usada na medicina popular brasileira mostrou atividade inibitória contra os microorganismos isolados a partir de pacientes com sinusite crônica e aguda. Este estudo demonstra promissora atividade antibacteriana de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm. contra bactérias responsáveis pela sinusite aguda e crônica e valida o seu uso pela primeira vez.

Palavras-chave: atividade antibacteriana; prospecção fitoquímica; medicina popular; Zingiberaceae.

Abstract

Alpinia zerumbet (Pers.) B.L. Burt & R.M. Sm. is indicated in Brazilian traditional medicine to treat rheumatism, headache and sinusitis. To evaluate the effect of extracts and fractions of flowers from *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt & R.M. Sm. in order to provide a scientific rationale for the use of the plant for the treatment of sinusitis, this study was realized. The extracts and fractions were prepared and analyzed by phytochemical investigation. Antibacterial activity against 12 bacterial pathogens associated with sinusitis was evaluated by employing an agar dilution method. The hexane fraction showed the broader activity spectrum inhibiting 10 out of the 12 tested bacteria specially *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, and *Fusobacterium necrophorum*. The lower MIC value was observed for the ethyl acetate fraction against *Streptococcus pneumoniae* ($32 \mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$). All extracts and fractions tested expressed activity against *Prevotella intermedia*. On the other hand, none of them exhibited antibacterial effect against *Streptococcus agalactiae*. The solution used in Brazilian traditional medicine showed inhibitory activity against microorganisms isolated from acute and chronic sinusitis patients. This study demonstrates the promising antibacterial activity of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt & R.M. Sm. against bacteria responsible for acute and chronic sinusitis and validates its use for the first time.

Keywords: antibacterial activity; phytochemical investigation; traditional medicine; Zingiberaceae.

Introduction

Sinusitis is defined as an inflammation of the tissues lining one or more of the paranasal sinuses consequently to an upper respiratory tract infection, an allergic reaction, or autoimmune problems. Infectious sinusitis is a highly prevalent respiratory condition associated predominantly with viruses. However, bacterial sinusitis usually causes more severe symptoms and lasts longer than viral sinusitis (DeMuri and Wald, 2012). The most common bacteria isolated from pediatric and adult patients with acute sinusitis are *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* and *Streptococcus pyogenes*. *Staphylococcus aureus* and anaerobic bacteria (*Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, and *Peptostreptococcus*) are the main microorganisms recovered from chronic sinusitis patients (Brook, 2011).

Sinusitis has also important implications from a societal perspective. In the United States, the annual

treatment cost associated with the disease has been estimated at \$ 3.5 - 5.8 billion, including \$ 1.8 billion for children less than 12 years of age (Abzug, 2014). Conventional medical treatment of sinusitis includes antibacterials and corticosteroids, with adjunctive care involving decongestants and antihistamines (Helms and Miller, 2006).

Antimicrobial resistance has become a global concern, mainly due to the increasing rates of multiresistant bacterial pathogens consequently to the haphazard use of commercial antibacterial drugs commonly employed for the treatment of infectious diseases. Medicinal plants offer the most suitable alternative in the search for herbal and new antibacterial compounds of natural origin (Panda, 2014). As an example recently Noundou and collaborators (2014) reported the antibacterial activity of the extracts of roots, stems, and leaves of *Alchornea floribunda* Müll. Arg. a plant commonly found throughout Central, Western, Eastern, and

Southern Africa, used to treat urinary, respiratory, and intestinal problems.

The growing use of phytotherapy as an integrating medical practice in several countries has been remarkable. The use of medicinal plants in Brazil is facilitated by plant diversity and low cost associated with therapeutics, which has called the attention of health assistance programs and professionals (Santos et al., 2011).

Based on this context, *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm. (Zingiberaceae) has considerable value. The genus *Alpinia* originated in East Asia, but it is currently cultivated in various regions, as a particular consequence of its ornamental and therapeutic value (Victório, 2011). *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm. also known as *A. speciosa* (Blume) D. Dietr is native of tropical China, Japan, India, Cambodia, Thailand, Vietnam, and Malaysia. It is widely cultivated and distributed in most tropical and semi-tropical areas including the United States, Peru, and Brazil (Thenmozhi, Sureshikumar and Venugopalan, 2011). According to Victório (2011) the rhizomes of members of this species arrived in Brazil by accident, having been mixed in the sand that served as ballasts for the Portuguese caravels returning from the Indies.

Alpinia zerumbet (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm. is among the most popular medicinal plants in different regions of Brazil, and its use has been suggested by Brazil's Unified Health System (UHS, in Brazil SUS – Sistema Único de Saúde (Brazil, 2009). The peasants in the Ribeirão Preto municipality (São Paulo state, Brazil) use the plant to treat rheumatism and heart disease (Victório, 2011). In Recife (Pernambuco, Northeastern Brazil), where *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm. is called "colônia", it is used for the treatment of sinusitis (Albuquerque et al., 2007). The antibacterial activities of crude extracts prepared from flowers of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt &

R.M. Sm. by using solvents with a large range of polarities against pathogens related to sinusitis was evaluated for the first time in order to validate the use of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm. in traditional treatments for the disease.

Materials and methods

Plant material

The flowers of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm. were purchased from Company of Natural Plants and Flowers, Natureza São Francisco LTDA, Itaúna municipality, Minas Gerais state, Southeastern Brazil, in september 2013. The identification of the plant material was confirmed by comparing with INCT Herbarium - Virtual Herbarium of the Flora and Fungi (INCT, 2013), and with a voucher specimen (BHCB 2290) deposited in the BHCB Herbarium, ICB, UFMG, Belo Horizonte, Brazil.

Preparation of extracts and fractions

The plant material was dried, finely ground into powder, and extracted for 120 h (hours) with methanol at room temperature (75 g plant material/1 L solvent). After extraction, the methanol was concentrated using a rotary evaporator and dried in a fume hood, providing crude methanol extract (ME). Approximately, 1/3 of the extract was sequentially partitioned with hexane, dichloromethane, ethyl acetate, and butanol. The fractions obtained from this partition were concentrated using a rotary evaporator until the total removal of the solvent, providing fractions in hexane (HF), dichloromethane (DF), ethyl acetate (AF), and butanol (BF), according to the methodology proposed by Filho and Yunes (1998) with modifications. The solution used in Brazilian traditional medicine for treating sinusitis patients was also prepared. The flowers were dried, extracted with ethanol 92 % at room temperature, concentrated

using a rotary evaporator, and dried in a fume hood, providing the alcoholic extract (AE).

Phytochemical investigation

The screening of chemical constituents (steroids, triterpenes, saponins, alkaloids and flavonoids) of the extracts and fractions was performed using chemical methods, according to the methodology previously suggested by Wagner and Bladt (2001). The chemical characterization was based on the addition of specific reagents to decoction aliquots and observing the changes in solution color or precipitate formation. The following experiments were performed: characterization of flavonoids (cyaniding reaction) and saponins (the rate of spume) and testing for the presence of triterpenes, steroids (Liebermann-Burchard reaction), and alkaloids (precipitation reactions with Dragendorff) (Wagner and Bladt, 2001).

Bacterial strains

The bacterial pathogens *Porphyromonas gingivalis* FDC 381, *Prevotella intermedia* ATCC 25611, *Peptostreptococcus anaerobius* ATCC 27337, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 10953, *Fusobacterium necrophorum* ATCC 25586, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 33591, *Streptococcus agalactiae* (clinical sample), *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Streptococcus pneumoniae* (clinical sample), α -hemolytic *Streptococcus* (clinical sample), and *Moraxella catarrhalis* (clinical sample) were used as indicator of biological activity of tested extracts and fractions.

Antibacterial activity of extracts and fractions against sinusitis-causing bacterial pathogens

Antibacterial activity of the extract ME and its derived fractions HF, DF and AF was determined by employing an agar dilution method (CLSI, 2013). This quantitative assay allows the determination of the minimum inhibitory concentration of each tested substance. Stock solutions of the specified extracts ($5120 \mu\text{g mL}^{-1}$) were prepared in 10% dimethyl sulfoxide (DMSO)/water. The solutions were then added to melted solid culture media in order to obtain concentrations ranging from 512 to $0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Bacterial inoculate were adjusted to match the 0.5 McFarland turbidity standard and spotted onto the agar surface. To confirm the viability of the organisms, two control plates containing culture media without any extract were included in every assay. One of them was the first plate to be inoculated and the other one corresponded to the last plate. Additionally, another control consisting of culture media added with different concentrations of chloramphenicol was also employed. It was also confirmed that the final concentration of DMSO did not inhibit bacterial growth.

The extract AE and the fraction BF were tested by using an overlay method (Booth, Johnson and Wilkins, 1977). An aliquot of $10 \mu\text{L}$ of pure AE and BF ($5210 \mu\text{g mL}^{-1}$) were dropped onto the surface of Tryptic Soy Agar. After allowing the surface of the agar plates to dry, semisolid medium added with each tested bacterial culture was poured onto the plate. Ethanol 92 % employed to obtain the extract AE was also tested and showed no effect on bacterial strains.

Information regarding culture media, bacterial inoculates, and incubation conditions are described in the **TABLE 1**. Both tests were performed in duplicate.

TABLE 1. Cultivation conditions and bacterial inoculate employed for antibacterial activity testing of extracts and fractions obtained from flowers of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt & R.M. Sm.

Bacterial strains	Antibacterial		activity testing		Incubation conditions
	Agar dilution (MIC ^a)	Overlay method			
		Media ^b	Inoculate		
<i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Peptostreptococcus anaerobius</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> and <i>Fusobacterium necrophorum</i>	BA ^c	BHI-S ^d	150 µL		Anaerobiosis, 37 °C, 48 h
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Staphylococcus aureus</i>	MH ^e	TSB ^f	10 µL		Aerobiosis, 37 °C, 24 h
<i>Streptococcus</i> spp. And <i>Moraxella catarrhalis</i>	MH-S ^g	BHI-S	50 µL		Candle jar, 37 °C, 48 h

^a, minimum inhibitory concentration; ^b, semisolid media (0.7 % w/v agar); ^c, Brucella Agar (Difco, Sparks, MD, USA) supplemented with 0.05 mg/mL hemin, 0.01 mg/mL⁻¹ menadione, and 5 % sheep blood; ^d, Brain Heart Infusion (Difco) supplemented with 0.5 % yeast extract (Difco), 0.05 mg/mL⁻¹ hemin (Inlab, São Paulo, SP, Brazil), and 0.01 mg/mL menadione (Inlab); ^e, Mueller Hinton Agar (Difco); ^f, Tryptic Soy Broth (Difco); ^g, Mueller Hinton Agar (Difco) supplemented with 5 % sheep blood.

Results and Discussion

Antimicrobial resistance is one of the most serious health threats worldwide with unpredictable consequences. The spread of drug resistance among clinically relevant bacteria emphasizes the need for searching for alternative antimicrobial agents. The main advantage of natural products is that crude extracts contain a mixture of compounds like phenols, acids, esters, aldehydes etc. differently from synthetic antimicrobial drugs that contain a single active principle. This feature makes the development of resistance unlikely to occur (Rao et al., 2010).

The phytochemical screening of the extracts obtained from *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt & R.M. Sm.

flowers employing methanol and ethanol and of the fractions originated from the partition of ME revealed the presence of five classes of secondary metabolites as depicted in the **TABLE 2**. Triterpenoids were the most commonly found compounds, detected in all but one fraction. On the other hand, steroids and saponins were observed in only one extract/fraction each. AF and AE, the extract employed in Brazilian traditional medicine showed the higher diverse composition represented by three secondary metabolites groups. Both of them presented triterpenoids and flavonoids. In addition, alkaloids and saponins were also observed in AF and AE, respectively.

TABLE 2. Groups of secondary metabolites in the extracts and fractions of flowers from *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm.

Secondary metabolites	Extracts its fractions					
	AE	ME	HF	DF	AF	BF
Steroids	-	-	+	-	-	-
Triterpenoids	+	+	-	+	+	+
Saponins	+	-	-	-	-	-
Flavonoids	+	-	-	-	+	+
Alkaloids	-	+	-	-	+	-

^a, alcoholic extract; ^b, methanol extract; ^c, hexane fraction; ^d, dichloromethane; ^e, ethyl acetate fraction; ^f, butanol fraction.

Several reports on different *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm. extracts have been previously published. A phytochemical investigation of aqueous extract of leaves from the plant revealed the presence of flavonoids (Mpalantinos et al., 1998). According to Zoghbi and collaborators (1999), the major component of the essential oil from the leaves and flowers of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm. was identified as terpinene-4-ol. The leaves also showed limonene (25.1%) and terpinene (17.4%) and in the flowers 1,8-cineole (23.1%) and sabinene (14.5%) were also identified. The terpenes 1,8-cineole, camphor, borneol, and methyl cinnamate were reported as main constituents of essential oils of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm. flowers, whereas the major components of seed oils were alpha-cadinol, T-murolol, alpha-terpinenol, delta-cadinene, and terpinene-4-ol. The analysis of phenolic composition indicated that *p*-hydroxybenzoic acid, syringic acid, and ferulic acid predominated in the ethyl acetate extract of plant flowers, while *p*-hydroxybenzoic acid, syringic acid, and vanillin were

the major phenolics detected in the seeds (Elzaawely, Xuan and Tawata, 2007). The decoction of aerial parts of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm. showed the presence of flavonoids (Macedo et al., 2012). Steroids were found in the acetone extract from rhizomes, stems, leaves, flowers, pericarps, and seeds of the plant (Chompoo et al., 2012). To the best of our knowledge, alkaloids and triterpenoids have not been detected in *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm. yet.

Sinusitis is a highly prevalent respiratory disease that frequently presents infectious origin. Considering that the *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm. alcoholic extract is employed to treat sinusitis patients, the antibacterial activity of two extracts and the derived fractions obtained from plant flowers against 12 bacteria were evaluated. The microorganisms selected for the study are associated with the etiopathogenesis of acute and chronic sinusitis in both pediatric and adult patients. Two different methods were selected taking into account the characteristics and availability of the material. The agar dilution method was used whenever possible. This assay is more informative since it generates quantitative data. The fraction BF could not be tested by this technique due to the small amount available. Also the determination of MIC was also not possible for AE since the extract was tested used as it is prepared in the traditional medicine without any quantitation procedure.

Data regarding the susceptibility testing of tested sinusitis-causing bacteria are presented in the **TABLE 3**. The lower MIC value was observed for a polar fraction, AF (32 µg/mL against *S. pneumoniae*). In this result, among the non-polar fractions, the lower MIC value was observed for HF (64 µg/mL against *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, and *F. necrophorum*). This fraction inhibited 10 out of the 12 tested strains, showing the broader antibacterial activity spectrum which demonstrates that overall HF was the most

active fraction. ME, DF, and AF exhibited activity against eight bacterial strains each. The fraction BF, tested by the overlay method, showed activity against only four bacterial strains each. The same result was observed for the extract employed in the Brazilian traditional medicine. AE exhibited activity against *P. intermedia*, *P. aeruginosa*, α -hemolytic *Streptococcus*,

and the *M. catarrhalis*, agents of acute and chronic sinusitis. It should be highlighted that *S. agalactiae* was not inhibited by any of the tested extracts and fractions obtained from flowers of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt & R.M. Sm. On the contrary, *P. intermedia* showed susceptibility to all of them.

TABLE 3. Results of the antibacterial activity testing of extracts and fractions obtained from flowers of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt & R.M. Sm.

Bacterial strains	Plant extractions, fractions and control						
	ME ^{a,b}	HF ^{a,c}	DF ^{a,d}	AF ^{a,e}	CM ^{a,f}	AE ^{g,h}	BF ^{g,i}
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	256 ^j	64	- ^k	-	1	-	+ ^l
<i>Prevotella intermedia</i>	512	128	256	256	1	+	+
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	512	128	256	256	2	-	+
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	512	64	512	512	1	-	-
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	-	64	-	512	1	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	256	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	256	512	256	128	4	-	-
<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	-	-	-	2	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	256	512	-	2	-	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	128	128	128	32	2	-	-
α -hemolytic <i>Streptococcus</i>	512	128	256	256	2	+	-
<i>Moraxella catarrhalis</i>	512	128	256	256	0.5	+	-

^a, agar dilution method; ^b, methanol extract; ^c, hexane fraction; ^d, dichloromethane; ^e, ethyl acetate fraction; ^f, chloramphenicol; ^g, overlay method; ^h, alcoholic extract; ⁱ, butanol fraction; ^j, minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$); ^k, absence of activity; ^l, antibacterial activity.

Correa, Lima and Costa (2010) published a survey of investigations on *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt & R.M. Sm. conducted from 1987 to 2008. They reported the expression of activity against several bacteria by extracts of different polarities obtained from leaves and rhizomes of the plant. Results from qualitative and quantitative assays were presented. The hexane, chloroform, acetone, methanol, and hydroalcoholic extracts were tested against eight bacteria; *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *P. aeruginosa*, *Serratia marcescens*, and *Mycobacterium smegmatis*. The chloroform extract of the rhizome showed good activity against *E. faecalis*. Also significant activities were reported for the acetone extract of the rhizome against *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. faecalis*, and *M. luteus*. Halos exceeding 20 mm were obtained for all of them and MIC value was 500 µg mL⁻¹ for *E. faecalis* and 125 µg mL⁻¹ for the other three microorganisms.

This paper reports, for the first time, the bioactivity of extracts and fractions from *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt & R.M. Sm. flowers against sinusitis-causing bacterial pathogens. The overall data generated, demonstrate that the antimicrobial activity of the two extracts and the derived fractions cover a wide range of bacteria associated with the etiopathogeny of the disease, indicating that the plant may be an important source for alternative antimicrobials. The results provide a scientific rationale for the use of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt & R.M. Sm. to treat sinusitis.

Conclusion

The antibacterial activity of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt & R.M. Sm. against sinusitis-associated bacterial pathogens contributes to validate its use as a traditional treatment for the disease. In general all the extracts and fractions obtained from plant flowers exhibited a broad activity range inhibiting several

bacterial agents of sinusitis. Five secondary metabolites have been detected in the extracts and fractions and up to three metabolites groups have been observed in each extract/fraction. Data generated suggest that more than one of these metabolites group expresses antibacterial activity that may explain the different activity spectrum of the extracts and fractions obtained. Taken together, the results indicate the potentiality of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt & R.M. Sm. as a source of antimicrobial substances against clinically relevant bacteria.

Acknowledgments

Authors are thankful to the financial support provided by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação Universidade de Itaúna.

References

- ABZUG, M.J. 2014. Acute sinusitis in children: Do antibiotics have any role? *Journal of Infection*, v.68, S33–S37.
- ALBUQUERQUE, U.P.; MONTEIRO, J.M.; RAMOS, M.A.; AMORIM, E.L.C. 2007. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v.110, p. 76-91.
- BOOTH, S.J.; JOHNSON, J.L.; WILKINS, T.D. 1977. Bacteriocin production by strains of *Bacteroides* isolated from human feces and the role of these strains in the bacterial ecology of the colon. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 11, p. 718-724.
- BRAZIL. 2009. Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. Ministério da Saúde. Disponível em: <http://

<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/07/renisus.pdf>> Acesso 07 dez. 2015.

BROOK, I. 2011. Microbiology of sinusitis. *Proceedings of the American Thoracic Society*, v.8, p.90-100.

CLSI – 2013. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

CHOMPOO, J.; UPADHYAY, A.; GIMA, S.; FUKUTA, M.; TAWATA, S. 2012. Anthiaterogenic Properties of Acetone Extract of *Alpinia zerumbet* Seeds. *Molecules*, v. 17, p. 6237-6248.

CORREA, A.J.C.; LIMA, C.E.; COSTA, M.C.C.D. 2010. *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt & R.M. Sm. (Zingiberaceae): survey of publications in pharmacological and chemical areas from 1987 to 2008. *Brazilian Journal of Medicinal Plants*, v.12, p. 113-119.

DEMURI, G.P.; WALD, E.R. 2012. Clinical practice. Acute bacterial sinusitis in children. *New England Journal of Medicine*, v.367, p. 1128-1134.

ELZAAWELY, A.A.; XUAN, T.D.; TAWATA, S. 2007. Essential oils, kava pyrones and phenolic compounds from leaves and rhizomes of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt & R.M. Sm. and their antioxidant activity. *Food Chemistry*, v.103, p. 486-494.

FILHO, V.C.; YUNES, R.A. 1998. Strategies for obtaining pharmacologically active compounds from medicinal plants. Medicinal plants. Concepts about structural modification to improve the activity. *Química Nova*, v.21, p. 99-105.

HELMS, S.; MILLER, A.L. 2006. Natural Treatment of Chronic Rhinosinusitis. *Alternative Medicine Review*, v.11, p. 196-207.

INCT 2013. Herbarium - Virtual Herbarium of the Flora and Fungi: <<http://inct.florabrasil.net/herbario-virtual>>. (retrieved 09.09.13).

MACEDO, I.T.F.; BEVILAQUA, C.M.L.; OLIVEIRA, L.M.B.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; MORAIS, S.M.; MACHADO, L.K.A.; RIBEIRO, W.L.C. 2012. In vitro activity of *Lantana camara*, *Alpinia zerumbet*, *Mentha villosa* and *Tagetes minuta* decoctions on *Haemonchus contortus* eggs and larvae. *Veterinary Parasitology*, v.190, p. 504-509.

MPALANTINOS, M.A.; MOURA, R.S.; PARENTE, J.P.; KUSTER, R.M. 1998. Biologically Active Flavonoids and Kava Pyrones from the Aqueous Extract of *Alpinia zerumbet*. *Phytotherapy Research*, v.12, p. 442-444.

NOUNDOU, X.S.; KRAUSE, R.W.M.; VUUREN, S.F.; NDINTEH, D.T.; OLIVIER, D.K. 2014. Antibacterial activity of the roots, stems and leaves of *Alchornea floribunda*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.151, p. 1023-1027.

PANDA, S.K., 2014. Ethno-medicinal uses and screening of plants for antibacterial activity from Similipal Biosphere Reserve, Odisha, India. *Journal of Ethnopharmacology*, v.151, p. 158-175.

RAO, K.; CH, B.; NARASU, L.M.; GIRI, A. 2010. Antibacterial Activity of *Alpinia galanga* (L) Willd Crude Extracts. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.162, p. 871-884.

SANTOS, R.L.; GUIMARÃES, G.P.; NOBRE, M.S.C.; PORTELA, A.S. 2011. Analysis about phytotherapy as an integrating practice in the Brazilian Unified Health System (UHS). *Brazilian Journal of Medicinal Plants*, v.13, p. 486-491.

THENMOZHI, S.; SURESHKUMAR, S.; VENUGOPALAN, R. 2011. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activity of *Alpinia speciosa* K.

Schum rhizomes. *Journal of Pharmacy Research*, v.4, p. 728-729.

VICTÓRIO, C.P. 2011. Therapeutic value of the genus *Alpinia*, Zingiberaceae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.21, p. 194-201.

WAGNER, H.; BLADT, S. 2001. *Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas*. Second Edition, Springer, Berlin.

ZOGHBI, M.G.B.; ANDRADE, E.H.A.; MAIA, J.G.S. 1999. Volatile constituents from leaves and flowers of *Alpinia speciosa* K. Schum. and *A. pupurata* (Viell.) Schum. *Flavor and Fragrance Journal*, v.14, p. 411-41

Análise morfométrica dos túbulos seminíferos de camundongos suplementados com óleo de alho

Morphometric analysis of seminiferous tubules of mice supplemented with garlic oil

¹Alexandre Schneider Angioletti; ¹Nilo Francisco Zancanaro Filho; ¹Silvana Tomazoni de Oliveira

¹ Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI

Correspondência: nilozancanaro@hotmail.com

Resumo

Introdução: O alho (*Allium sativum*) é amplamente utilizado na culinária e no tratamento e prevenção de diversas patologias. A literatura carece quanto à toxicidade e os efeitos que o consumo exacerbado de alho pode ocasionar no sistema reprodutor masculino. O óleo de alho é composto por compostos voláteis presentes em seus bulbos. Este estudo tem como objetivo avaliar a morfometria de túbulos seminíferos de camundongos suplementados com óleo de alho. **Metodologia:** Foram tratados 32 camundongos BALB/c machos divididos em 4 grupos experimentais: 1,4 mg/kg (dose terapêutica); 14 mg/kg; 28 mg/kg; e controle incorporado ao farelo de ração. Após o período experimental os animais foram sacrificados e tiveram os testículos removidos e pesados. Após os procedimentos padrões para preparação das lâminas histológicas, foi medida a espessura dos túbulos seminíferos, através da distância da parede até o lúmen. **Resultados e Discussão:** Através das medições, não foram observadas diferenças estatísticas que pudessem indicar alterações nestas estruturas em animais suplementados com óleo de alho quando comparados aos animais do grupo controle. A partir deste estudo conclui-se que camundongos suplementados com óleo de alho, em diferentes doses, em um período de 35 dias, não apresentaram alterações na morfometria de túbulos seminíferos que pudessem indicar toxicidade.

Palavras-chave: Alho; *Allium sativum*; túbulos seminíferos; histologia; camundongos; fitoterápicos.

Abstract

Introduction: Garlic (*Allium sativum*) is widely used in cooking and in the treatment and prevention of various diseases. The literature lacks for toxicity and the effects that excessive consumption of garlic can cause the male reproductive system. The garlic oil comprises volatile compounds in their bulbs. This study aims to evaluate the morphometric of the seminiferous tubules with garlic oil supplemented mice. **Methods:** We treated 32 BALB/c mice divided into 4 experimental groups: 1,4 mg/kg (therapeutic dose); 14 mg/kg; 28 mg/kg; and control incorporated into feed meal. After the experimental period, the animals were sacrificed and had their testes

removed and weighed. Following standard procedures for preparation of histological slides, we measured the thickness of the seminiferous tubules through the distance from the wall to the lumen. **Results and Discussion:** Through the measurements of the seminiferous tubules, no statistical differences could indicate changes in these structures in animals supplemented with garlic oil compared with the control group were observed. From this study it is concluded that supplemented mice with garlic oil, in different doses, for a period of 35 days, showed no morphometric changes in the seminiferous tubules which could indicate toxicity.

Keywords: Garlic; *Allium sativum*; seminiferous tubules; histology; mice; phytotherapics.

Introdução

O *Allium sativum*, de nome popular “alho”, é um vegetal da família das Liláceas. É uma planta utilizada tanto na culinária como no tratamento e prevenção de doenças com registros datados desde o período medieval (Leonêz, 2008).

Caracteriza-se por um bulbo arredondado, conhecido como cabeça, composto por 10 a 12 bulbilhos (dentes), envolto por uma casca, que pode apresentar coloração branca, rosada ou roxa. Existem diferentes tipos de alho e quase todos diferem em relação a tamanho, cor, forma, sabor, número de dentes por bulbo e acidez. A botânica classifica todos os tipos de alho derivados da espécie *Allium sativum*. Desta espécie originam-se duas subespécies: a *ophioscorodon* e a *sativum*. Destas duas subespécies existem oito variedades de alho: seis do tipo *ophioscorodon* e dois do tipo *sativum*. Abaixo dessas oito variedades existem outros 17 grupos de sub-variedades de alho; acredita-se que existem mais de 600 sub-variedades de alho no mundo. Isso ocorre porque as características individuais do alho são modificadas de acordo com as condições de cultivo, do solo, da temperatura, do período de chuvas, da altitude e do tempo de cada lugar (Revista Aditivos e Ingredientes, 2010).

A atividade farmacológica do alho envolve uma variedade de compostos de organo enxofre, destes o

mais notável é a alicina, responsável pelo odor característico do alho. Quando o alho é cortado, amassado ou moído, ocorre a lise da membrana celular do bulbo, isto faz com que o composto precursor aliína (sulfóxido de S-alil-L-cisteína) entre em contato com a enzima alinase formando a alicina e outros tiossulfinaos. Esses compostos da decomposição enzimática têm função importante na dieta, apresentando efeitos farmacológicos contra diversas patologias. A atividade terapêutica é demasiadamente extensa, como por exemplo, combater patologias cardiovasculares e endócrinas, além de apresentar caráter antimicrobiano, antifúngico, anti-helmíntico, antiviral e antineoplásico (Katzung, 2010).

Os fitoterápicos são medicamentos obtidos exclusivamente a partir de matérias-primas ativas vegetais (Brasil, 2004). A utilização de plantas para fins terapêuticos é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (Veiga Jr., Pinto e Maciel, 2005). Ao longo dos séculos os produtos de origem vegetal constituíram as bases para tratamento das mais diversas patologias (Hohenberger et al., 2012).

Na terapia contemporânea observa-se crescente redescoberta do valor das plantas medicinais para a cura, prevenção e tratamento de patologias. Entretanto, o uso incorreto desses fitoterápicos pode causar danos à saúde do indivíduo. Desta forma,

estudos envolvendo propriedades e toxicidade de plantas com propriedades medicinais têm sido exaustivamente investigadas.

Os herbanários e curandeiros utilizam o alho para combater inúmeras doenças há milhares de anos. Há indícios de seu uso no antigo Egito, na Grécia (onde era conhecido como “rosa fedida”) e na Babilônia há mais de cinco mil anos. Foi Hipócrates o primeiro a descrever com detalhes o uso terapêutico do alho, como diurético e laxante. Plínio e Galeno, médicos romanos, também utilizavam o alho para o tratamento de infecções intestinais, problemas digestivos, hipertensão, senilidade e impotência. Atualmente, médicos naturalistas e outros adeptos da cura pelas ervas receitam o alho para prevenir resfriados, gripes e outras doenças infecciosas (Revista Aditivos e Ingredientes, 2010).

Os compostos ativos do alho mostram-se eficazes quanto à prevenção de doenças cardiovasculares: aumentam os níveis séricos de HDL (colesterol “bom”), reduzem as taxas de triglicérides, inibem a agregação plaquetária, além de possuírem propriedades hipoglicemiantes. Estudos em relação ao potencial antimicrobiano do alho mostraram-se eficaz no combate da *Helicobacter pylori*, bactéria responsável pela maioria dos casos de dispepsia (dificuldade de digestão), câncer gástrico e também de úlceras gástricas e duodenais (Machado et al., 2010). Entretanto, a atividade antifúngica do alho é mais intensa do que a sua atividade antibacteriana (Simões et al., 2010). Alguns dos princípios ativos do alho inibem as nitrosaminas, substâncias tóxicas associadas ao câncer de estômago (Prati, 2012).

Apesar de o alho ser amplamente utilizado tanto na culinária quanto para fins medicinais, o seu consumo excessivo pode provocar efeitos adversos tais como, transtorno gastrointestinal, flatulência e mudanças na flora intestinal. Não há um consenso bem estabelecido quanto à ingestão diária recomendada, entretanto, a

ingestão de um a dois dentes de alho cru por dia é considerada segura para adultos (Silva, 2009).

Há milhares de anos os óleos essenciais são extraídos de plantas e usados nas indústrias de perfumes, cosméticos e fármacos. São frações voláteis, naturais, extraídas de plantas aromáticas que evaporam à temperatura ambiente. Os óleos essenciais são geralmente extraídos das plantas nas partes aéreas (folhas e ramos finos), cascas, troncos, raízes, frutos, flores, sementes e resinas (Santos et al., 2004). O óleo de alho (*Allium sativum*) é composto por óleos voláteis presentes em seus bulbos, cuja composição inclui os compostos como o dialilsulfeto, dialilidissulfeto e dialiltrisulfeto (Herbarium, 2013).

Já são de domínio e conhecimento popular os inúmeros benefícios comprovados que o consumo de alho traz à saúde. Entretanto, a literatura carece de informações quanto à toxicidade e os efeitos que o consumo exacerbado de alho pode ocasionar, em especial, ao sistema reprodutor masculino.

Estudos recentes que investigaram os efeitos da utilização do óleo de alho, na gestação de fêmeas de camundongos da linhagem *Swiss*, demonstraram que a administração diária desta substância, em doses mais elevadas do que aquelas recomendadas terapêuticamente, causou redução da taxa de implantação, viabilidade fetal e diminuição do peso dos fetos, embora não tenham apresentado más formações externas (Macedo, 2012).

A partir destes resultados, que sugeriram a toxicidade do óleo de alho em fêmeas gestantes, surgiu o interesse em investigar a toxicidade no sistema reprodutor de camundongos machos, neste caso, em especial, nos testículos.

Os efeitos colaterais do consumo de alho sobre as funções reprodutivas permanecem pouco investigadas. Neste contexto, estudos recentes

evidenciaram que o consumo bruto, durante um mês, de alho cru em doses de 5%, 10%, 15% e 30%, ocasionaram a redução da secreção de testosterona e alterou a espermatogênese de roedores (Hammami et al., 2008). Outros estudos apontaram que a ingestão de doses em 5%, 10% e 15% de alho cru induziu a apoptose em células germinativas testiculares de roedores provocando a inibição da expressão de enzimas das células de Leydig e marcadores das células de Sertoli (Hammami et al., 2009).

Ao investigar os efeitos do extrato aquoso de alho sobre a morfologia testicular em ratos albinos, Obidike e colaboradores (2012) observaram um aumento na reserva de esperma no epidídimo. Estes resultados, de acordo com o autor do trabalho, sugerem que o alho possa ser utilizado para melhorar a fertilidade masculina.

O sistema reprodutor masculino é composto de testículos, da genitália interna (glândulas acessórias e ductos) e da genitália externa. Os testículos são estruturas pares ovoides e possuem uma cápsula externa fibrosa resistente que envolve uma massa de túbulos seminíferos enrolados e agrupados em cerca de 250 a 300 compartimentos. Os túbulos seminíferos constituem aproximadamente 80% da massa testicular de um homem adulto. Cada túbulo individual tem 0,3 a 1 metro de comprimento e é o local de produção dos espermatozoides. No interior dos túbulos seminíferos podem ser visualizados dois tipos de células: as células germinativas em vários estágios de maturação e as células de Sertoli, que regulam o desenvolvimento dos espermatozoides. A espermatogênese, que é o processo de desenvolvimento da espermatogônia até a liberação do espermatozoide, ocorre em cerca de 60 dias em humanos (Silverthorn, 2010). Em camundongos este processo leva cerca de 40 dias para ser finalizado (Nagy et al., 2003).

As células germinativas, conhecidas como espermatogônias, são encontradas agrupadas próximo à extremidade basal das células de Sertoli, logo acima da lâmina basal dos túbulos seminíferos. Elas sofrem divisões mitóticas produzindo células germinativas adicionais, onde algumas permanecem próximo da borda externa do túbulo para produzir as futuras espermatogônias, e outras entram em meiose e tornam-se espermatócitos primários. Cada espermatócito primário sofre meiose e se divide em dois espermatócitos secundários. Destes, cada um se divide em duas espermatídes. As espermatídes, que contém 23 cromossomos simples, amadurecem formando os espermatozoides que são liberados dentro do lúmen dos túbulos seminíferos. O desenvolvimento dos espermatócitos ocorre em colunas, da borda externa do túbulo em direção ao lúmen. Entre cada coluna existe uma única célula de Sertoli que se estende da borda externa até o lúmen do túbulo. Circundando o lado de fora do túbulo existe uma lâmina basal que atua como barreira, impedindo que algumas moléculas, presentes do líquido intersticial, entrem no túbulo seminífero. Esta lâmina basal permite a entrada da testosterona, produzida pelas células de Leydig, que se encontram na parte externa do túbulo, onde existe um tecido intersticial que consiste principalmente em vasos sanguíneos e estas células (Silverthorn, 2010).

Materiais e Método

Para os testes foram utilizados 32 camundongos BALB/c machos (3 meses de idade) pesando entre 22 a 26g, provenientes do Biotério da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA – UNIVALI), sob o parecer nº 014/12. Os animais foram mantidos sob temperatura controlada a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e com fotoperíodo de 12 horas, com água e ração *ad libitum*, exceto durante o procedimento experimental. Os animais foram distribuídos em 9 caixas conforme

os grupos e as doses administradas. As caixas foram forradas com maravalha, que são lâminas finas de madeira, a fim de manter o ambiente interno livre da umidade provocada pela urina e fezes que certamente de maneira contrária desfavoreceriam o bem estar dos animais. Além disto, houve o fornecimento de papel toalha para enriquecimento ambiental e para construção de ninhos, prática esta adotada em todos os protocolos experimentais do Laboratório de Reprodução Assistida, local onde o protocolo experimental foi desenvolvido.

Os estudos in vivo foram realizados de acordo com as normas e cuidados com o bem estar e biossegurança na experimentação, conforme descritas na Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, e de acordo com as diretrizes da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

Para o tratamento foi utilizado óleo de alho (*Allium sativum*) adquirido em farmácias de manipulação. As doses administradas foram calculadas por extrapolação alométrica, que significa estabelecer através de cálculo matemático as doses de fármacos entre animais de grupos taxonômicos diferentes, possibilitando o uso das referências farmacológicas de um animal modelo para um animal alvo. Essa metodologia utiliza a taxa metabólica basal, possibilitando calcular doses em miligramas por quilocaloria consumida pelo animal (mg/kcal) (Pachaly, 2006).

De acordo com as diretrizes estabelecidas pela *Organisation for Economic Co-operation and Development* - OECD (1996) para teste de produtos químicos, as doses administradas seguiram uma sequência descendente dividida em três grupos de teste e um grupo controle. Os animais foram tratados com diferentes doses de óleo de alho, baseando-se na dose terapêutica para seres humanos que é de 500 mg/dia que equivale a 7,350 mg/kg/dia de alho cru, considerando um adulto de 70kg.

Os animais foram tratados durante um período experimental de 35 dias, período que compreende um ciclo da espermatogênese em camundongos (Nagy et al., 2003). Os grupos tratados receberam o óleo de alho incorporado ao farelo de ração umedecido com água no período matutino, após um período de jejum de 12h. Este protocolo de jejum foi estabelecido para que se tivesse a garantia de que os animais comeriam todo farelo e desta forma o tratamento acontecer de acordo com o padrão pré-estabelecido. Após todo o consumo da ração com o tratamento a ração convencional retornava as caixas e assim permanecia durante o restante do dia e, novamente, retirada durante o período noturno. Os grupos testes foram organizados da seguinte maneira:

Grupo 1 – Controle (8 camundongos): receberam somente água filtrada em volume igual ao tratamento incorporada ao farelo de ração durante 35 dias.

Grupo 2 – Dose Terapêutica (8 camundongos): receberam a dose terapêutica correspondente a posologia utilizada para seres humanos (1,4 mg/kg) incorporada ao farelo de ração, durante 35 dias.

Grupo 3 – Dose 10x (8 camundongos): receberam 10x a dose terapêutica (14 mg/kg) incorporada ao farelo de ração, durante 35 dias.

Grupo 4 – Dose 20x (8 camundongos): receberam 20x a dose terapêutica (28 mg/kg) incorporada ao farelo de ração, durante 35 dias.

Após o término do período experimental os camundongos foram sacrificados em câmara de O₂/CO₂. Os testículos foram coletados e tiveram seus pesos registrados. Após a pesagem deu-se início aos processamentos para análise histológica, adaptados de Banzato (2010). Os testículos esquerdos foram imersos em formol 10% por 10 horas para fixação. Em seguida, foram removidos do fixador e cortados transversalmente em três pedaços. As extremidades

dos testículos foram desprezadas e somente a porção mediana foi considerada para a análise histológica. Após 72 horas no formol, a solução foi substituída por álcool 70°, para sofrer o processo de desidratação. Após 24 horas em álcool 70°, as peças receberam quatro banhos nas concentrações alcoólicas de 90° - 90° - 100° - 100° no período de 24 horas. Depois de 24 horas em álcool 100°, em cada peça foram aplicados três banhos de xilol, com duração de 30 minutos cada banho. Após os banhos em xilol, as peças receberam três banhos de parafina, com duração de 1 hora cada banho.

Concluído os banhos, as peças foram incluídas transversalmente em parafina. Com a utilização do micrótomo, os blocos de parafina com as peças incluídas foram submetidos a cortes histológicos de 7µm (micrômetros) de espessura. A partir daí, foram realizados os procedimentos do protocolo padrão de coloração H&E (hematoxilina e eosina) para posterior análise em microscópio óptico de luz.

Para a análise foi confeccionada uma lâmina para cada testículo, obtido dos animais de cada grupo. Cada lâmina correspondente ao testículo de um único animal contendo 5 seções histológicas. O intervalo entre cada seção histológica foi de 10 µm (micrômetros). Em cada seção histológica foram analisados 2 túbulos seminíferos. Os túbulos seminíferos selecionados para análise foram os que se encontravam no parênquima cortical do testículo por conta da sua uniformidade. Em cada estrutura foi realizada a medição da distância da parede externa até o lúmen do túbulo seminífero utilizando-se a lente objetiva que fornece um aumento ampliado 400X. As medições foram realizadas em microscópio óptico de luz com a utilização de ocular micrométrica OSM 221817.

Os parâmetros registrados foram submetidos a testes estatísticos por análise de variância (ANOVA). Todas as análises foram avaliadas com confiança de 95% ($\alpha = 0,05$).

Resultados e Discussão

O alho é uma planta que vem sendo cultivada e consumida pelos seres humanos há muitas décadas. Além do seu uso na culinária para realçar e recriar o sabor dos alimentos o alho é igualmente popular por conta dos benefícios que o seu consumo pode trazer para a saúde reduzindo o mau colesterol e a pressão arterial. O alho também tem sido utilizado no combate a infecções, como vermífugo e também no combate a fungos do gênero *Aspergillus* encontrado em amendoins que quando consumido por humanos podem causar câncer hepático (Viegas et al., 2005).

Por possuir antioxidantes e flavonoides, compostos extraídos a partir do alho, tem sido utilizado, também, pela indústria de cosméticos no combate ao envelhecimento. Acredita-se que a maioria dessas propriedades atribuídas ao alho se deve à riqueza de substâncias sulfurosas presentes na sua composição. Entretanto, o consumo excessivo desta planta pode trazer efeitos indesejáveis ao trato gastrointestinal, e isto também já é conhecido. Não há um consenso estabelecido quanto à dose diária recomendada (Silva, 2009).

Estudos sobre toxicologia clínica de fitoterápicos são importantes para a determinação de efeitos adversos e/ou tóxicos, já que existe uma grande quantidade de fitoterápicos disponíveis para consumo no mercado e para a maioria deles não há dados suficientes que comprovem cientificamente a veracidade dos seus efeitos (Turolla e Nascimento, 2006).

Quanto à toxicidade e os efeitos que o consumo exacerbado de alho pode ocasionar, há escassez na literatura, em especial, referentes ao sistema reprodutor masculino. A toxicidade reprodutiva está relacionada com qualquer interferência na capacidade reprodutiva, tanto em machos quanto em fêmeas, provocada por um agente causador da toxicidade. A avaliação toxicológica é utilizada para

analisar resultados experimentais de um composto com o objetivo de classificá-lo e ao mesmo tempo obter informações a respeito da forma correta quanto à sua utilização.

Os ensaios pré-clínicos de toxicidade reprodutiva avaliam o potencial de uma determinada substância em interferir sobre o sistema reprodutor e causar efeitos indesejáveis capazes de comprometer a fertilidade, o acasalamento, o desenvolvimento embrionário, o parto e o desenvolvimento pós-natal dos descendentes até à maturidade sexual (Santos, 2012).

Para se avaliar o efeito tóxico causado por uma substância pode ser analisado alterações do peso corporal e de órgãos como fígado, baço, rins e gônadas (Reboredo et al., 2006).

Estudos realizados por Souza, Silva e Amaral (2013) onde foi utilizado a suplementação com óleo de alho, em camundongos, não foram observadas mudanças físicas e/ou comportamentais, que pudessem caracterizar sinais de toxicidade sistêmica nos grupos estudados. O peso dos rins e do fígado não foi diferente do encontrado no grupo controle. Alterações no peso e morfologia do fígado são bons indicadores de toxicidade, por ser este o órgão que detém grande concentração de enzimas responsáveis pela detoxificação dos agentes tóxicos através dos hepatócitos (OGA, 2003).

No presente estudo os animais do grupo controle e os animais tratados com *Allium sativum* também não apresentaram alterações significativas no peso corporal. Um estudo similar realizado por Santiago e colaboradores (2009) para avaliar alterações cardiovasculares em ratos tratados com alho (125 mg/Kg por via oral) não apresentou diferença nos valores do peso corporal.

Os agentes nocivos podem exercer seus efeitos ao nível pré-testicular, testicular e pós-testicular. O nível

pré-testicular envolve alterações no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, com impedimento da dinâmica hormonal necessária à ocorrência da espermatogênese. Efeitos citotóxicos e genotóxicos nas células da linhagem germinativa caracterizam os efeitos testiculares (Oshio e Guerra, 2009).

A histopatologia testicular é um dos parâmetros mais sensíveis para avaliar as possíveis alterações na fertilidade masculina. Aspectos degenerativos testiculares podem ser identificados em secções coradas por hematoxilina e eosina. A exemplo disso, a hipocelularidade e a morte celular no epitélio seminífero, a formação de células multinucleadas (células gigantes compostas de espermatócitos e espermátides) e a presença de espermátides arredondadas e restos celulares no epidídimo (Oshio e Guerra, 2009).

Realizadas as medições dos túbulos seminíferos (parede externa até o lúmen) através da microscopia óptica, não foram observadas diferenças estatísticas que pudessem indicar alterações morfológicas nestas estruturas em animais suplementados com óleo de alho com relação aos animais do grupo controle.



FIGURA 1. Microscopia óptica do túbulo seminífero em aumento de 400x, referente aos animais do grupo controle.

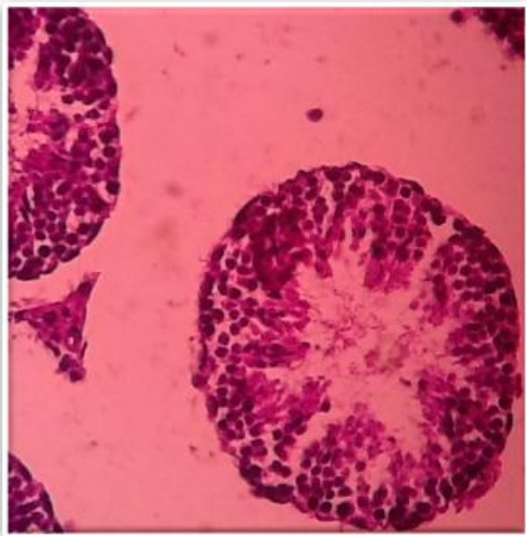


FIGURA 2. Microscopia óptica do túbulo seminífero em aumento de 400x, referente aos animais do grupo Dose Terapêutica (1,4 mg/kg).

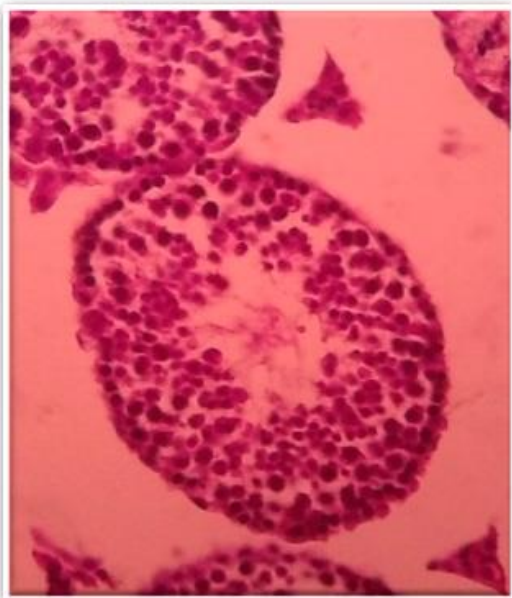


FIGURA 3. Microscopia óptica do túbulo seminífero em aumento de 400x, referente aos animais do grupo Dose 10x (14 mg/kg).

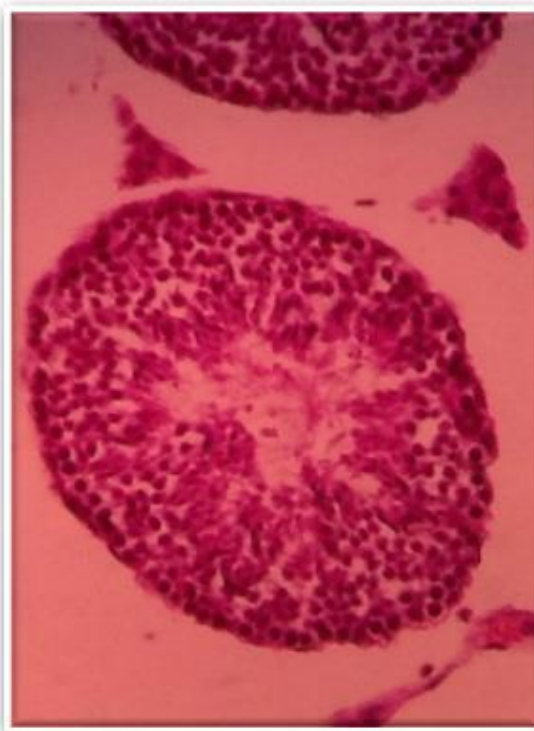


FIGURA 4. Microscopia óptica do túbulo seminífero em aumento de 400x, referente aos animais do grupo Dose 20x (28 mg/kg).

Tanto os animais do grupo controle quanto os animais dos grupos que foram suplementados com doses específicas de óleo de alho, mostraram suas características morfológicas inalteradas, não apresentando sinais de toxicidade durante o período de 35 dias de tratamento. Os valores das medições dos túbulos seminíferos e peso dos testículos encontram-se nas **TABELAS 1 e 2**.

TABELA 1. Média geral e valor máximo/mínimo das medidas (μm) dos túbulos seminíferos relacionado com os respectivos grupos (Controle, Terapêutica, 10x, 20x).

Dose	Controle (Água)	Terapêutica (1,4 mg/kg)	10x (14 mg/kg)	20x (28 mg/kg)
Nº de túbulos seminíferos analisados por grupo	80	80	80	80
Média e Desvio Padrão	243 \pm 27	270 \pm 25	265 \pm 27	272 \pm 15
Máximo	308	321	324	307
Mínimo	200	211	220	232

TABELA 2. Média geral e valor máximo/mínimo dos pesos (g) dos testículos dos 32 camundongos utilizados na pesquisa, sem distinção por grupo-dose.

Testículo	Direito	Esquerdo*
Total de testículos Pesados	32	32
Média e Desvio Padrão	0,087 \pm 0,007	0,088 \pm 0,008
Máximo	0,101	0,112
Mínimo	0,072	0,073

* Testículo utilizado na pesquisa

Estudos com o óleo de alho realizados por Souza, Silva e Amaral (2013), comprovaram que o peso dos testículos e índice gonadossomático permaneceram inalterados assim como os parâmetros espermáticos, corroborando com os resultados encontrados neste trabalho.

Obidike e colaboradores (2012), que analisaram a morfologia testicular em ratos albinos, sugeriram que o extrato aquoso de alho resultou em uma melhora significativa, ao observar um aumento na reserva de esperma no epidídimo.

Estudos existentes a respeito do *Allium sativum* em diferentes doses de alho cru apresentaram toxicidade significativa nas funções reprodutivas de camundongos machos (Hammami et al., 2008, 2009). A eficácia quanto à terapêutica do alho na prevenção das mais diversas patologias vem sendo divulgada e pesquisada ano após ano. A cada dia surgem novos trabalhos apresentando novas metodologias de pesquisas com padrões e protocolos experimentais aprimorados. Novos estudos poderão confirmar ou questionar os dados já existentes e assim determinar qual a melhor forma de preparo e dosagens necessárias de alho para a obtenção de seus efeitos, ou mesmo se apresentará efeitos tóxicos.

A partir deste estudo, foi possível concluir que em camundongos suplementados com óleo de alho em diferentes doses em um período de 35 dias, não apresentaram toxicidade significativa na histologia dos túbulos seminíferos.

Referências

REVISTA ADITIVOS E INGREDIENTES, 2010. São Paulo: Editora Insumos, v.67, p.20-26. Disponível em: <http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/edicoes_materias.php?id_edicao=46>. Acesso em : 24.11.2015

BANZATO, T. P. 2010. *Avaliação de parâmetros reprodutivos e análise histológica do testículo de ratos expostos ao cádmio in útero e durante a lactação*. Trabalho de Conclusão do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas. Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, Sorocaba.

BRASIL 2004 - Resolução RDC nº. 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Ministério da Saúde. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

HAMMAMI, I.; NAHDI, A.; MAUDUIT, C.; BENAHMED, M.; AMRI, M.; BEN A., A.; ZEKRI, S.; EL MAY, A.; EL MAY, MV. 2008. The inhibitory effects on adult male reproductive functions of crude garlic (*Allium sativum*) feeding. *Asian Journal of Andrology*, China, v. 10, n. 4, p. 593-601.

HAMMAMI, I.; AMARA, S.; BENAHMED, M.; EJ MAY, M.; MAUDUIT, C. 2009. Chronic crude garlic-feeding modified adult male rat testicular markers: mechanisms of action. *Reprod. Biol. Endocrinol*, Londres, v. 7, p. 65.

HERBARIUM Laboratório Botânico LTDA. 2013. ÓLEO DE ALHO (bula). Dra. Anny M. Trentini. CRF-PR nº 4081. Colombo.

HOHENBERGER, G.F.; GROSSELLI, F.; KRANN, R.; CEOLIN, T. 2012. *Uso do Allium sativum na fitoterapia*. Congresso de Iniciação Científica, 21: Amostra Científica, 4. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

KATZUNG, B.G. 2010. *Farmacologia básica e clínica*. 10ed. AMGH. Porto Alegre.

LEONÊZ, A.C. 2008. *Alho: alimento e saúde*. Monografia (Especialista em Gastronomia e Saúde) – Centro de Excelência em Turismo, Universidade de Brasília - UnB, Brasília.

MACEDO, C.C. 2012. *Efeitos do óleo de Allium sativum (alho) sobre a gestação em camundongos*. Trabalho de Conclusão do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas – Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI, Itajaí.

MACHADO, M.; SOUSA, A.; COELHO, N.; CHAVES, D. 2010. *O alho e a cebola na prevenção do câncer*. CONNEPI - Congresso Norte-Nordeste de Pesquisa e Inovação. V CONNEPI, Maceió.

- NAGY, A.; GERTSENSTEIN, M.; VINTERSTEN, K, BEHRINGER, R. 2003. *Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual*. CSHL Press, Cold Spring Harbor, 3ed.
- OBIDIKE, I.R.; EZEMA, W.S.; AKA, L.O.; OMOJA, V.U.; ODO, R.I.; ONUOHA, E.O.; OBODOECHI, L.O. 2012. Effects of aqueous garlic (*Allium sativum*) extract on testicular morphology and function in lead nitrate (Pb(NO₃)₂)-treated albino rats. Londres, p. 1-6, DOI 10.1007/s00580-012-1466-x. (<http://link.springer.com/journal/580>).
- OECD – 1996. Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline for testing of chemicals, nº 422 de 22 de março de 1996.
- OGA, S. 2003. Fundamentos de toxicologia. 2ed. Atheneu. São Paulo.
- OSHIO, L. T.; GUERRA, M. O. 2009. Métodos em toxicologia do sistema reprodutor masculino e fertilidade em roedores. *Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais*, v. 1, n. 3, p. 148-152.
- PACHALY, J.R. 2006. *Terapêutica por Extrapolação Alométrica*. In CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. (Org.). *Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária*. 1ed. São Paulo: Roca, p. 1215-1223.
- PATRI, P. 2012. Relato de caso: o alho como alimento funcional. *Pesquisa & Tecnologia*, São Paulo, v. 9, n. 1.
- REBOREDO, M.M; LUCINDA, L.M.F.; ROCHA, C. B; QUEIROZ, G.T; FARIA, V.C; VIEIRA, V. A.; SÁ, R.C.; CARVALHO, J.C. 2006. Avaliação da toxicidade do extrato aquoso de *Caesalpinia ferrea* em órgãos vitais, no sistema reprodutor e na produção de espermatozoides de ratos Wistar submetidos a tratamento subagudo. *Boletim do Centro de Biologia da Reprodução*, v. 25, p. 17-29.
- SANTIAGO, M.B, NASCIMENTO, A.M, COUTO, W.C, OLIVEIRA, N.W, LESSA, F.C, FRANQUINI, J.V, PINTO, V.D. 2009. Administração do *Allium sativum* sobre as alterações cardiovasculares de ratos Wistar com infarto de miocárdio. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, v. 30, n. 1, p. 75-82.
- SANTOS, A.S.; ALVES, S.M.; FIGUEIREDO, F.J.C.; ROCHA NETO, O.G. 2004. Descrição de sistema e métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório. *Comunicado Técnico-Embrapa* 99, Belém, 6p.
- SANTOS, E.C.S. 2012. *Avaliação do potencial tóxico do extrato hidroalcoólico de Pradosiahuberi Ducke sobre o sistema reprodutor masculino e órgãos vitais de ratos e sua prole*. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.
- SILVA, E.Y.Y. 2009. *Propriedades funcionais “in vitro” e “in vivo” de alhos frescos e processados*. 209 f. Tese de doutorado - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília.
- SILVERTHORN, D.U. 2010. *Fisiologia humana: uma abordagem integrada / Dee Unglaub Silverthorn*; tradução de Aline de Souza Pagnussatet al.– 5ed. Artmed. Porto Alegre.
- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PALAZZO DE MELLO, J.C.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. 2010. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6ed. Porto Alegre: UFRGS Editora, Porto Alegre. Editora da UFSC, Florianópolis.
- SOUZA, K.R.; SILVA, A. A; AMARAL, V. L. L. 2013. *Efeitos do óleo de Allium sativum (alho) sobre os parâmetros reprodutivos de camundongos*. Trabalho de Iniciação Científica do Curso de Biomedicina – Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI, Itajaí.

TUROLLA, M. S. dos R.; NASCIMENTO, E. de S. 2006. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, n. 2, p. 289-306.

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

VIEGAS, E.C.; SOARES, A.; CARMO, M.G.F.; ROSSETTO, C.A.V. 2005. Toxicidade de óleos essenciais de alho e casca de canela contra fungos do grupo *Aspergillus flavus*. *Horticultura Brasileira*, v. 23, n. 4, p. 915-91

Antioxidant and antimicrobial properties of ethanolic extract of *Libidibia ferrea* pods

Propriedade antioxidante e antimicrobiana do extrato etanólico de vagens de *Libidibia ferrea*

¹Patrícia L. A. Nascimento; ²Talita C. E. S. Nascimento; ²José E. G. Gomes; ²Mitaliene D. S. Silva; ²Silvana A. Souza; ³Tania M. S. Silva; ⁴Rosangela A. Falcão; ⁵Keila A. Moreira

¹ Faculty of Odontology, Caruaruense Association of Higher Education.

² Departments of Morphology and Animal Physiology, Federal Rural University of Pernambuco.

³ Department of Molecular Sciences, Federal Rural University of Pernambuco.

⁴ Department of Biological Sciences, University of Pernambuco.

⁵ Academic Unit of Garanhuns, Federal Rural University of Pernambuco.

* Corresponding author: moreirakeila@hotmail.com

Abstract

Libidibia ferrea is a typical plant of northern and north-east Brazil and has well-known medicinal properties that can be found in ethanolic extracts such as antipyretic, anti-inflammatory and anti-rheumatic compounds. This study seeks to evaluate the potential antioxidant and antimicrobial activity of ethanol extracts from *Libidibia ferrea* pods. The pods were used for the preparation of ethanolic extracts of *L. ferrea* which is used to determine biological activity, and measure their total phenolic content. For quantification of antioxidant methods of DPPH, ABTS and β -carotene were employed and the method of minimum inhibitory concentration (MIC) to measure the antimicrobial activity. The ethanolic extract of *L. ferrea* showed excellent antioxidant activity, as well as other similar substances commonly used for this purpose such as citric acid and trolox. In addition, it had antimicrobial activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria.

Keywords: pau ferro; *Caesalpinia ferrea*; medicinal properties; antioxidant.

Resumo

Libidibia ferrea é uma planta típica do norte e nordeste do Brasil conhecida por suas propriedades medicinais que podem ser encontrados em extratos alcoólicos, possui compostos antipiréticos, anti-inflamatórios e antirreumáticos. Este estudo visa avaliar o potencial antioxidante e atividade antimicrobiana do extrato etanólico de vagens de *Libidibia ferrea*. As vagens foram empregadas na preparação de extrato etanólico de *L. férrea*, utilizado na determinação da atividade biológica, e para mensurar seu conteúdo fenólico total. Os métodos

DPPH, ABTS e β -caroteno foram utilizados para quantificar a atividade antioxidante, e o método da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para avaliar a atividade antimicrobiana. O extrato etanólico de *L. ferrea* apresentou atividade antioxidante excelente, bem como outras substâncias compatíveis normalmente utilizadas para este fim, tais como ácido cítrico e trolox. Além disso, demonstrou atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.

Palavras-chave: pau ferro; *Caesalpinia ferrea*; propriedades medicinais; antioxidante.

Introduction

The basionym of *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz (Leguminosae) is *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. (Caesalpinaceae) according to the International Plant Names Index, 2009, (<http://www.ipni.org/>). It is a large tree that is found in the north and north east regions of Brazil, especially Pernambuco and Ceará states, where it is commonly known as juca or pau ferro (Peters et al., 2008).

Recent scientific studies have shown that *L. ferrea* contains compounds which have antimicrobial, anti-inflammatory, analgesic, antioxidant and hypoglycemic properties (Ferreira and Soares, 2015). It is used in folk medicine to treat diabetes, as antipyretic and antirheumatic, anti-inflammatory and antinociceptive activities have already been found in the ethanol extract of the fruits of this species (Vasconcelos et al., 2011; Lima et al., 2012).

The aqueous extract of the seeds of *C. ferrea* have cellulase, amylase, anticoagulant and larvicide activities against *A. aegypti* (Cavalheiro et al., 2009). In the Amazon region of Brazil, the fruits of *C. ferrea* (Brazilian ironwood) are widely used as an antimicrobial and healing medicine to treat many ailments including oral infections (Sampaio et al., 2009).

Phytochemical studies have reported that aqueous extracts of *Caesalpinia ferrea* pods and barks consist of a mixture of different compounds with anti-

inflammatory and analgesic actions, which confirms its popular use and ethnomedicinal value (Carvalho et al., 1996; Pereira et al., 2012).

The crude extract of *Caesalpinia ferrea* contains anthraquinones, alkaloids, depsides, depsidones, flavonoids, lactones, saponins, sugars, tannins, sesquiterpenes and triterpenes. Tannins are considered as the main component (Souza et al., 2006). Phenolic compounds, such as tannins and flavonoids, have antimicrobial and antioxidative properties and are involved in the defence against fungi and other microorganisms (Oliveira et al., 2010).

For centuries, extracts from plants have been used as folk remedies to treat various ailments, with many natural products leading to the development of clinically beneficial drugs (Siqueira et al., 2012). Organisms that belongs to the vegetable kingdom are those that have contributed most significantly to providing compounds which possess a large spectrum of biological properties (Cavalheiro et al., 2009).

The aim of this study is to evaluate the potential of both antioxidants, as the antimicrobial properties of ethanolic extracts obtained from the pods of *Libidibia ferrea*, are indicative of the presence of chemical compounds that may be used in various branches of industrial biology.

Materials and Methods

Plant material

The pods (peel and seeds) of *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz (Leguminosae) were collected from the town of Garanhuns, State of Pernambuco, in North-East Brazil. A sample of the collected material was classified and filed (Specimen Number 89749), at the Herbarium D'Ardano de Andrade Lima, Institute of Agronomy, Pernambuco - IPA, Pernambuco, Brazil. It was dried at 40°C in a Circulated Air Incubator for 48 hours, grounded in a grinder and stored to -20 °C.

Reagents

Tryptic Soy Broth -TSB (Acumedia, Lansing, USA), Müeller-Hinton Broth (HIMEDIA, Mumbai, India), dimethyl sulfoxide (FMaia, Cotia, Brazil), chloramphenicol (Ariston, São Paulo, Brazil) were used and all the solvents were HPLC commercial grade. The β -carotene, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), linoleic acid, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), potassium persulfate, 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), gallic acid, and the Folin-Ciocalteu reagent were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

Preparation of the extract

The ethanolic extract of the *L. ferrea* pod was obtained by repeated soaking under agitation in ethanol P.A. at a ratio of 1:10, until the depletion of substances extractable by ethyl alcohol. For the concentration of the extract, ethanol was removed from the filtrate using a rotary evaporator at 40°C under reduced pressure.

Determination of the total phenolic content

The determination of the total phenolic content present in the ethanolic extract of *L. ferrea* pods was carried out by the Folin-Ciocalteu spectrophotometric method

(Slinkard and Singleton, 1977) with modifications. Gallic acid was used as a standard. Briefly, 300 μ l of a solution of the ethanolic extract (1 mg.mL⁻¹) was added to 60 μ l of the Folin-Ciocalteu reagent and 2460 μ l of distilled water, and this mixture was stirred for 1 minute. Following this, 180 μ l of sodium carbonate (2%) was added to the mixture, which was then shaken for 30 seconds, and resulted in a final concentration of 100 μ g/ml. After two hours of incubation, the absorbance of each sample was determined spectrophotometrically at 760 nm. The results were expressed as mg of gallic acid equivalents (GAE)/g of extract.

DPPH free radical scavenging assay

The free radical scavenging activities of the samples were determined by means of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) spectrophotometric method in accordance with the study of Silva and collaborators (2011). This method is often used to determine the ability of plant species to capture free radicals (Ghasemnezhad, Sherafati and Payvast, 2011).

A stock solution of the ethanolic extract of *L.ferrea* pod was prepared at 5.0 mg/ml. The appropriate amounts of an ethanolic solution of DPPH• (23.6 μ g/ml) were added to samples to obtain final concentrations ranging from 100 to 500 μ g/ml. The absorbance was measured at 517 nm after an incubation interval of 30 min with ultrasonication in the dark. The EC₅₀ value is the sample concentration necessary to reduce the absorbance of DPPH by 50%; ascorbic acid was used as a standard.

ABTS radical cation assay

This test involves the generation of the ABTS chromophore •+ by oxidation of ABTS [2,2'-azinobis-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid)] with potassium persulfate. The test was performed according to the method of Re and collaborators (1999) with modifications. ABTS was dissolved in

water at a concentration of 7 mM. The ABTS radical cation (ABTS^{•+}) was produced by reacting ABTS stock solution with 2.45 mM potassium persulfate (final concentration) and allowing the mixture to stand in the dark for 12–16 h before use. After this, the ABTS^{•+} solution was diluted with ethanol (approximately 1:100 v/v) until an absorbance of 0.7±0.05 nm was reached. A stock solution of the ethanolic extract was prepared with a concentration of 1.0 mg/ml. An appropriate amount of ABTS^{•+} (2700 µl) was added to each sample to give final concentrations ranging from 20 to 120 µg/ml, and the samples were ultrasonicated in the dark after a period of 10 minutes. Then, the absorbance of the samples was measured at 734 nm. Trolox (0.1 mg/ml) was used as a positive control.

The β-Carotene bleaching test

The level of antioxidant activity was determined by conducting the β-carotene bleaching test and employing the method of Bamoniri and collaborators (2010) with modifications. A solution of linoleic β-carotene/linoleic acid was prepared by adding an aliquot of 150 µl of β-carotene solution to 160 µl of linoleic acid and 660 µl of Tween 20. After this, 140 ml of oxygenated distilled water was added to the system. The absorbance of this emulsion at 470 nm was adjusted to 0.6 - 0.7 nm. Aliquots of the crude ethanolic extract of *L.ferrea* pod (16 µg/ml) were compared with the control (without an antioxidant) and to Trolox (16 µg/ml), which was used as a standard antioxidant. An initial reading of the absorbance was taken immediately after the samples and the standard were added to the system to determine the baseline. Subsequently, the absorbance was monitored every 20 minutes for 120 minutes. The samples were kept in a water bath at 40°C between the readings. The antioxidant capacity was expressed as the percentage inhibition of oxidation.

Determination of minimal inhibitory concentration

The microbial strains used belong to Gram positive families (*Staphylococcus aureus* UFPEDA 02, *Enterococcus faecalis* ATCC 6057, *Bacillus subtilis* UFPEDA 86) and Gram negative families (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumonia* ATCC 29665, and *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 416) bacteria, which were acquired from the Antibiotics Department of the Federal University of Pernambuco, Brazil.

The broth microdilution assay was performed in accordance with the CLSI reference method M7-A6, for bacteria (Clinical Laboratory Standards Institute, 2003). Ninety-six-well microplates were used to determine the MIC of the crude ethanolic extract of *Libidibia ferrea* pod. Briefly, the crude extract was dissolved in DMSO (1 mg/ml) and then diluted in water to achieve concentrations ranging from 500µg/ml to 25µg/ml. The inoculum size was adjusted to each microorganism to yield a cell concentration of 10⁸ CFU ml. A final volume of 100 µl was achieved in each well. One well with a specific medium and microorganism was used as control of the growth, and one inoculated well was free of the test extract so that it could check the sterility of the media. The microplates were prepared in triplicate and incubated at 37°C for 24 h. The MIC was determined by measuring the absorbance of each well with a microplate reader (ASYS UVM 340, Cambridge, UK). The MIC was defined as the lowest sample concentration that inhibited bacterial growth in proportion to the growth of the controls. Chloramphenicol (50 µg/ml) was used as a positive control for all the bacterial strains.

Statistical analysis

All the samples were analysed in triplicate, and the results were pooled and expressed as the means ± standard error. A statistical analysis was performed with GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, USA). The anti-free

radical activity was determined by conducting a linear regression analysis with a confidence interval of 95% ($p < 0.05$). The results were expressed as $EC_{50} \pm SEM$, which represents the concentration of the sample necessary to reduce the absorbance of DPPH or ABTS $^{•+}$ by 50% compared with the negative control.

Results

In choosing a suitable assay to investigate the antioxidant activity, ethanolic extract of *Libidibia*

ferrea pods was evaluated to determine their total phenolic content by means of the Folin-Ciocalteu method; the radical scavenging activity was assessed through DPPH and ABTS assays and their antioxidant potential was measured through the β -carotene bleaching test. **TABLE 1** shows the free radical scavenging activity (DPPH $^{\bullet}$ and ABTS $^{•+}$) of the ethanolic extract of the *L. ferrea* pod. The results demonstrated a high radical scavenging activity when compared with a control of antioxidant capacity (trolox and ascorbic acid).

TABLE 1. Free radical scavenging activity (DPPH $^{\bullet}$ and ABTS $^{•+}$) and total phenolic content of the ethanolic extract of *L. ferrea* pod.

Total Phenolic (mg GAE/g extract \pm SD)*	EC50 DPPH (μ g /ml \pm SD)	EC50 ABTS (μ g /ml \pm SD)
Ethanolic extract	Ethanolic extract Ascorbic Acid	Ethanolic extract Trolox
32.6 \pm 0.0	4.4 \pm 0.05	3.3 \pm 0.02
		2.5 \pm 0.06 2.9 \pm 0.05

*GAE/g extract - Gallic acid equivalent/g extract.

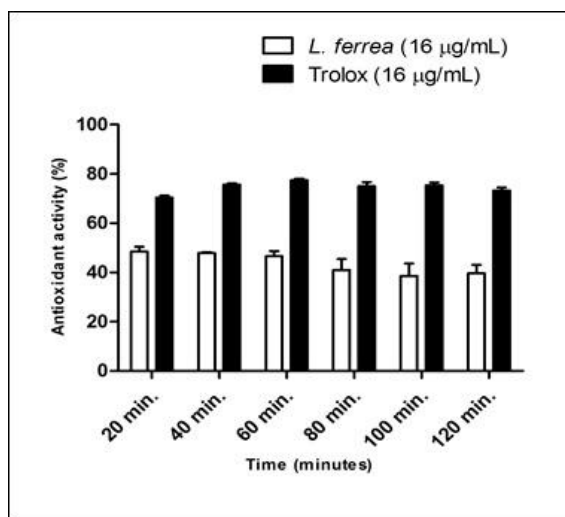


FIGURE 1. Antioxidant activity of the ethanolic extract of *L. ferrea* determined using the β -carotene bleaching test. Black columns – Trolox (16 μ g/mL); white columns – *L. ferrea* pod ethanolic extract (16 μ g/mL).

The antioxidant activity of the ethanolic extract of *L. ferrea* which was determined by using the β -carotene bleaching test is shown in **FIGURE 1**. When the extract activity is compared with the standard Trolox which is a vitamin E analogue, it can be observed that the antioxidant activity was excellent (46.63%).

The minimum inhibitory concentrations (MICs) in μ g/ml for the ethanolic extract of *L. ferrea* pod, are shown in **TABLE 2**. Our results reveal that all the tested strains of Gram-positive and Gram-negative bacteria were inhibited by the ethanolic extract of the *Libidibia ferrea* pods.

TABLE 2. Minimal inhibitory concentrations (MIC) for the ethanolic extract of *Libidibia ferrea* pod tested on different microorganisms.

Microorganisms	Concentrations ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Gram positive bacteria	
<i>Enterococcus faecalis</i>	50
<i>Bacillus subtilis</i>	50
<i>Staphylococcus aureus</i>	125
Gram negative bacteria	
<i>Escherichia coli</i>	50
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	125
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50

Discussion

Antioxidant activity

Phenolic compounds are commonly found in both edible and inedible plants, and have multiple biological effects, including antioxidant activity (Silva et al., 2011).

The total phenolic content value of this study was higher than that found by Oliveira and collaborators (2010) who identified a phenolic content of 0.151 ± 0.005 mg GAE/g extract for *C. ferrea* wood extract. However Surveswaran and collaborators (2007) evaluated the total phenolic content of *Caesalpinia bonducella* (L.) Roxb. Seeds and *Caesalpinia sappan* L. heartwood and found 1.3 and 94.7 mg GAE/g dry weight. The nature of the species, parts of the tree and extraction techniques that were used may explain the differences between the studies.

A preliminary phytochemical analysis of the hydroalcoholic extracts of stem, bark and leaves of *C. Ferrea*, showed the presence of flavonoids, saponins,

tannins, coumarins, sterols and phenolic compounds (Lima et al., 2012).

The free radical scavenging of DPPH forms the basis of a common antioxidant assay (Sharma and Bhat, 2009). The DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate) free radical method is an antioxidant assay based on electron-transfer that produces a violet solution in ethanol. This free radical, which is stable at room temperature, is reduced in size in the presence of an antioxidant molecule, and gives rise to a colourless ethanol solution. The use of the DPPH assay is an easy and fast way to evaluate antioxidants by spectrophotometry, so it might be a useful way of assessing different products at the same time (Huang, Ou and Prior, 2005). The extract was able to reduce the stable free radical DPPH \cdot to the yellow DPPH.

The ABTS assay is based on the generation of a blue/green ABTS $^{\cdot+}$ that can be reduced by antioxidants, and is applicable to both hydrophilic and lipophilic antioxidant systems. The ABTS assay is superior to the DPPH assay when applied to a variety of plant foods containing hydrophilic, lipophilic, and high-pigmented antioxidant compounds, whereas the DPPH assay uses a radical dissolved in organic media and is, therefore, applicable to hydrophobic systems (Floegel et al., 2011).

Surveswaran and collaborators (2007) evaluated all the antioxidant capacities of *Caesalpinia bonducella* (L.) Roxb. Seeds and *Caesalpinia sappan* L. heartwood by ABTS and DPPH and their results were 0.61 and 0.13 mmol trolox/100g dry weight for *C. bonducella* and 34.65 and 28.33 mmol trolox/100 g dry weights respectively.

The health effects of medicinal plants can partly be attributed to the presence of phenolic compound, which may have an effect as a result of their antioxidant properties (Kaur, Arora and Singh, 2008).

Tannins and flavonoids have a therapeutic value due to their anti-inflammatory, anti-fungal, antioxidant and healing properties (Araújo et al., 2008).

With regard to its antioxidant activity, the use of the β -carotene is due to the bleaching of this compound during the autoxidation of linoleic acid in aqueous emulsion where the decay is monitored by its absorbance in the visible region. The addition of an antioxidant-containing sample, individual antioxidants or natural extracts assists in retarding the β -carotene decay (Roginsky and Lissi, 2005). Antioxidants are able to scavenge radicals, hydrogen peroxide and other peroxides and prevent the formation of radicals (Martysiak-Zurowska and Went, 2012).

Antimicrobial activity

Generally, owing to their extra protective outer membrane and other particular features, Gram-negative bacteria are considerably more resistant to antibacterial agents than Gram-positive bacteria (Bamoniri et al., 2010). However, in this study, a higher concentration is only needed for *S. aureus* e *K. pneumoniae* (125 μ g/ml). The MIC values obtained in this study meet the stringent endpoint criteria adopted by some authors (Cos et al., 2006; Mbosso et al., 2010), which considers concentrations of up to 1 mg/ml for extracts or 0.1 mg/ml for isolated compounds when displaying antimicrobial activities.

Sampaio and collaborators (2009) found minimum inhibitory concentration values of the crude extract of *C. ferrea* fruits for *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus oralis* and *Lactobacillus casei* of 25.0, 40.0, 66.0, 100.0, 66.0 μ g/ml, respectively. Cavalheiro and collaborators (2009) observed that the aqueous extract of seeds do not inhibit the growth of any bacterial strains analyzed, which demonstrates the presence of distinct compounds between the pods and seeds of this plant species.

Interestingly, our current findings show a remarkable antimicrobial activity against Gram negative and Gram positive bacteria, ranging from 50 to 125 μ g/ml. To put these values into context, extracts with MICs \leq 100 μ g/ml and isolated compounds with MICs \leq 10 μ g/ml can be considered to be of great value (Cos et al., 2006). Significantly, since our results were an ethanolic extract, they show remarkable activity against most Gram negative and Gram positive bacteria.

A phytochemical investigation of the hydroalcoholic extract of the stem bark and leaves of *Caesalpinia ferrea* has revealed flavonoids, saponins, tannins, coumarins, steroids and other phenolic compounds (Vasconcelos et al., 2011). Phenolic compounds, such as tannins and flavonoids, have antimicrobial and antioxidative properties and are involved in the defence against fungi and other microorganisms (Boudet, 2007). The antimicrobial activity of this extract may be on account of the presence of tannins, flavonoids and terpenoids in its composition (Siqueira et al., 2012). Nakamura and collaborators (2002) study identified gallic acid among the active constituents of Juca fruits. Gallic acid has been found to have antibacterial, antiviral and antifungal activities, and also anti-inflammatory, anti-tumour, antianaphylactic, antimutagenic, chloretic and bronchodilator activities (Nakamura et al., 2002).

Conclusion

In this study, it has been shown that ethanolic extract of *L. ferrea* pod is capable of inhibiting the growth of Gram positive and Gram negative microorganisms. Moreover, antioxidant and free radical scavenging activity was found. It is expected that further studies currently in progress will enable us to understand the nature of the precise compounds and mechanisms involved.

Acknowledgments

The authors thank the Rural Federal University of Pernambuco (UFRPE), the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq), and National Council for the Improvement of Higher Education - CAPES, for structural and financial support.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

ARAÚJO, T.A.S.; ALENCAR, N.L.; AMORIM, E.L.C.; ALBUQUERQUE, U.P. 2008 - A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. *Journal of Ethnopharmacology*, v.120, p.72–80.

BAMONIRI, A.; EBRAHIMABADI, A.H.; MAZOOCHI, A.; BEHPOUR, M.; KASHI, F.J.; BOUDET, A.M. 2007 - Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry*, v.68, p.22-24.

CARVALHO, J.C.T.; TEIXEIRA, J.R.M.; PERGENTINO, J.C.S.; BASTOS, J.K.; SANTOS FILHO, D.; SARTI, J. 1996 - Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. *Journal of Ethnopharmacology*, v.53, p.175-178.

CAVALHEIRO, M.G.; FARIAS, D.F.; FERNANDES, G.S.; NUNES, E.P.; CAVALCANTI, F.S.; VASCONCELOS, I.M.; MELO, V.M.M.; CARVALHO, A.F.U. 2009 - Biological and enzymatic activities of aqueous extract of seeds from *Caesalpinia ferrea* Mart., Leguminosae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.19, n2, p.586-591.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; M7-A6. 2003.

COS, P.; VLIETINCK, A.J.; BERGHE, D.V.; MAES, L. 2006 - Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of Ethnopharmacology*, v.106, p.290-302.

FERREIRA, M.R.A.; SOARES, L.A.L. 2015 - *Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul.) L.P. Queiroz: A review of the biological activities and phytochemical composition. *Journal of Medicinal Plants Research*, v.9, n.2, p.140-150.

FLOEGEL, A.; KIM, D.O.; CHUNG, S.J.; KOO, S.I.; CHUN, O.K. 2011 - Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.24, p.1043–1048.

GHASEMNEZHAD, M.; SHERAFATI, M.; PAYVAST, G.A. 2011 - Variation in phenolic compounds, ascorbic acid and antioxidant activity of five coloured bell pepper (*Capsicum annum*) fruits at two different harvest times. *Journal of Functional Foods*, v.3, p.44–49.

HAUNG, D.J.; OU, B.X.; PRIOR, R.L. 2005 - The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, p.1841-1856.

KAUR, R.; ARORA, S.; SINGH, B. 2008 - Antioxidant activity of the phenol rich fractions of leaves of *Chukrasia tabularis* A. Juss. *Bioresource Technology*, v.99, p.7692–7698.

LIMA, S.M.A.; ARAÚJO, L.C.C.; SITÔNIO, M.M.; FREITAS, A.C.C.; MOURA, S.L.; CORREIA, M.T.S.; MALTA, D.J.N.; GONÇALVES-SILVA, T. 2012 - Anti-inflammatory and analgesic potential of *Caesalpinia*

ferrea. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.2, n.1, p.169-175.

MARTYSIAK-ZUROWSKA, D.; WENTA, W. 2012 - A comparison of ABTS and DPPH methods for assessing the total antioxidant capacity of human milk. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, v.11, n.1, p.83-89.

MBOSSO, E.J.T.; NGOUELA, S.; NGUEDIA, J.C.A.; BENG, V.P.; ROHMER, M.; TSAMO, E. 2010 - In vitro antimicrobial activity of extracts and compounds of some selected medicinal plants from Cameroon. *Journal of Ethnopharmacology*, v.128, p.476-481.

NAKAMURA, E.S.; KUROSAKI, F.; ARISAWA, M.; MUKAINAKA, T.; OKUDA, M.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; PASTORE, J.F. 2002 - Cancer chemo preventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. *Cancer Letters*, v.177, p.119-124.

OLIVEIRA, L.S.; SANTANA, A.L.B.D.; MARANHÃO, C.A.; MIRANDA, R.C.M.; LIMA, V.L.A.G.; SILVA, S.I.S.; NASCIMENTO, M.S.; BIEBER, L. 2010 - Natural resistance of five woods to *Phanerochaete chrysosporium* degradation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.64, p.711-715.

PEREIRA, L.P.; SILVA, R.O.; BRINGEL, P.H.S.F.; SILVA, K.E.S.; ASSREUY, A.M.S.; PEREIRA, M.G. 2012 - Polysaccharide fractions of *Caesalpinia ferrea* pods: potential anti-inflammatory usage. *Journal of Ethnopharmacology*, v.139, p.642-648.

PETERS, V.M.; SOUZA, S.O.; CARVALHO, J.C.T.; BORGES, L.V.; GUERRA, M.O. 2008 - Evaluation of reproductive toxicity of aqueous extract of the fruits from *Caesalpinia ferrea* Mart. in rats. *Boletín latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas*, v.7, n.5, p.268-272.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. 1999 - Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, v.26, p.11231-1237.

ROGINSKY, V.; LISSI, E.A. 2005 - Review of methods to determinate chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, v.92, p.235-254.

SAMPAIO, F.C.; PEREIRA, M.S.V.; DIAS, C.S.; COSTA, V.C.O.; CONDE, N.C.O.; BUZALAF, M.A.R. 2009 - In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. *Journal of Ethnopharmacology*, v.124, p.289-294

SHARMA, O.P.; BHAT, T.K. 2009 - DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, v.113, p.1202-1205.

SILVA, L.C.N.; SILVA-JÚNIOR, C.A.; SOUZA, R.M.; MACEDO, A.J.; SILVA, M.V.; CORREIA, M.T.S. 2011 - Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. *Food and Chemical Toxicology*, v.49, p.2222-2228.

SIQUEIRA, C.F.Q.; CABRAL, D.L.V.; SOBRINHO, T.J.S.P.; AMORIM, E.L.C.; MELO, J.G.; ARAÚJO, T.A.S. 2012 - Albuquerque UP. Levels of tannins and flavonoids in medicinal plants: evaluating bioprospecting strategies. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* Article ID 434782, doi:10.1155/2012/434782.

SLINKARD, K.; SINGLETON, V.L. 1977 - Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology Viticulture*, v.28, p.49-55.

SOUZA, A.B.; SOUZA, L.M.S.; CARVALHO, J.C.T.; MAISTRO, E.L. 2006 - No clastogenic activity of *Caesalpinia ferrea* Mart. (Leguminosae) extract on

bone marrow cells of Wistar rats. *Genet Genetics and Molecular Biology*, v.29, p.380–383.

SURVESWARAN, S.; CAI, Y.Z.; CORKE, H.; SUN, M. 2007 - Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chemistry*, v.102, p.938–953.

VASCONCELOS, C.F.B.; MARANHÃO, H.M.L.; BATISTA, T.M.; CARNEIRO, E.M.; FERREIRA, F.;

COSTA, J.; SOARES, L.A.L.; SÁ, M.D.C.; SOUZA, T.P.; WANDERLEY, A.G. 2011 - Hypoglycaemic activity and molecular mechanisms of *Caesalpinia ferrea* Martius bark extract on streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v.137, p.1533–1541.

THE INTERNATIONAL PLANT NAMES INDEX (IPNI), 1 March 2009. Disponível em <<http://www.ipni.org/>> Acesso 25 ago. 2015.

***Bauhinia forficata* Link (Fabaceae)**

***Bauhinia forficata* Link (Fabaceae)**

¹* Raquel Elisa da Silva López e ¹ Bruna Cristina dos Santos

¹ Laboratório de Química de Produtos Naturais, Instituto de Tecnologia de Fármacos, FIOCRUZ.

* Correspondência: rlopez@far.fiocruz.br

Resumo

Bauhinia forficata é uma leguminosa nativa da Mata Atlântica vulgarmente conhecida como pata de vaca. Ela ocorre em quase todos os tipos de solos e sua madeira é usada na produção de papel, lenha e peças de carpintaria e, suas folhas como alimentação animal. É também empregada como cobertura vegetal, planta ornamental, mas sobre tudo, é uma planta medicinal. Seus principais componentes biologicamente ativos incluem compostos flavonóides que parecem ser os grandes responsáveis por suas propriedades farmacológicas, no entanto, terpenos, esteróides, ácidos aromáticos, quinonas, lactonas, alcalóides, inibidores de proteases, proteases e lectinas têm sido isolados e purificados a partir de diferentes órgãos de várias espécies do gênero *Bauhinia*. Estes novos compostos têm sido caracterizados e suas propriedades farmacológicas são objetos de intensas investigações. As folhas, as flores e as cascas do caule de *B. forficata* têm sido usadas na medicina popular para o tratamento de diferentes tipos de patologias, especialmente diabetes, dores e processos inflamatórios.

Palavras-chave: gênero *Bauhinia*; *Bauhinia forficata*; pata-de-vaca; constituintes químicos; efeitos farmacológicos.

Abstract

Bauhinia forficata is a legume native from Atlantic Forest named as cowage. It occurs in almost all types of soils, its wood is used in the production of pulp and paper, wood and carpentry and its leaves employed as animal feed. It is also used in plant cover, as an ornamental plant, but, more importantly, as a medicinal plant. Among the most important biologically active ingredients include are flavonoid compounds that appear to be largely responsible for its pharmacological properties. However, terpenes, steroids, aromatic acids, quinones, lactones, alkaloids, lectins and protease inhibitors have also been isolated and purified from various organs of several species of the genus *Bauhinia*. These new compounds have been characterized and their pharmacological properties are the purpose of intense investigation. The leaves, seeds and stem from *Bauhinia* species have been used in folk medicine for the treatment of different kinds of diseases and conditions, especially diabetes, infection, pain and inflammatory processes.

Key-words: *Bauhinia* genus; *Bauhinia forficata*; cowage; chemical constituents; pharmacological effects.

Introdução

Bauhinia é um gênero denominado por Carolus Linnaeus, em 1753, em homenagem ao botânico franco-suíço Gaspar Bauhin. Compreende mais de 300 espécies amplamente distribuídas nas florestas tropicais e subtropicais, sendo que 64 destas podem ser encontradas no Brasil. Tais espécies pertencem à subfamília *Caesapinoideae* e à família *Fabaceae* (Vaz e Tozzi, 2005). São comumente conhecidas como “pata de vaca” ou “unha de vaca” devido ao formato de suas folhas que são compostas de dois folíolos unidos na base (**FIGURA 1**). É uma espécie plástica quanto a solos, ocorrendo em quase todos os tipos, preferindo os profundos, permeáveis e de boa fertilidade química (Costa, 1971). Suas folhas e caule são usados na medicina popular para o tratamento de diferentes tipos de patologias, especialmente diabetes, infecções, dores e processos inflamatórios (Alice et al., 1995). Nos últimos anos, o interesse nas plantas do gênero *Bauhinia* tem aumentado consideravelmente em todo o mundo, uma vez que estudos experimentais confirmaram suas observações etnofarmacológicas. A maioria das espécies são de origem do continente Asiático mas existem espécies nativas do Brasil como a *B. longifolia* e a *B. forficata* (Fortunato, 1986).

As plantas do gênero *Bauhinia* apresentam porte arbóreo médio ou arbustivo. Além de suas propriedades medicinais, apresentam potencial para uso em recuperação de áreas degradadas, sendo empregada também como planta ornamental (Oliveira et al., 2001). Suas folhas medem quando adultas de 7-12 cm de comprimento e como característica marcante, apresentam-se divididas em dois lobos, como já mencionado. Os ápices dos lobos

são agudos ou acuminados e a margem folia é lisa. A nervação é palmada, sendo constituída de 9-11 nervuras (Miyake, Akisue e Akisue, 1986).

Possuem flores zigomorfas dispostas em racemos axilares que variam de cor, de acordo com a espécie e subespécie, geralmente róseas ou brancas. A inflorescência é em racemo axilar, as flores são vistosas, possuem 5 pétalas alongadas com até 9 cm de comprimento e 10 estames compridos (Carvalho, 2003). Seus frutos são legumes ou vagens achatados e deiscentes do tipo linear (Fortunato, 1986). As sementes são achatadas e apresentam poros, medindo aproximadamente 1 cm e a coloração é de castanho a preta (Carvalho, 2003). Possui tronco tortuoso de 30 a 40 cm de diâmetro (Fortunato, 1986).



FIGURA 1. *Bauhinia forficata* (Subfamília Caesalpinaceae). Nota-se que as folhas são bilobadas, que é característica marcante do gênero (Plataforma Agroecológica da Fiocruz – PAF, FIOCRUZ, agosto de 2013, foto de Valério Morelli).

O objetivo deste estudo foi fazer uma breve revisão acerca dos aspectos botânicos, dos empregos não medicinais, dos principais constituintes e das

possíveis ações farmacológicas da *Bauhinia forficata*, que é uma planta medicinal da biodiversidade brasileira.

Revisão da Literatura

Bauhinia forficata

A leguminosa *B. forficata* se assemelha muito com outras folhas de outras espécies do gênero *Bauhinia*, contudo sua principal característica morfológica é a presença de espinhos e suas flores são exclusivamente brancas (Oliveira e Saito, 1989). Ela possui dois espinhos no ramo onde fica aderido o pecíolo de cada folha, formando uma espécie de forca, dando origem ao nome (**FIGURA 1**). Planta arbustiva, decídua, grande ou arbórea, perene, que atinge até 8m de altura. Tem ramos frágeis, pendulares, glabros ou pubescentes, com acúleos gêmeos na axila foliar. Folhas alternas, medindo de 8 a 9 cm de comprimento, ovais ou lanceoladas, divididas acima do meio, glabras, compostas de dois folíolos unidos pela base, pouco divergentes, obtusas ou um pouco agudas, ou acuminadas na base, arredondadas ou subcodiformes, membranáceas, com a forma típica de 9 nervos. Acúleos quase sempre gêmeos, ora uniformemente retos, ora ligeiramente curvos para dentro, finos, ou grossos. Flores axilares ou terminais, brancas. Seus frutos são do tipo legume, lineares, medindo 15 a 25 cm de comprimento por 2 cm de largura (Costa, 1971). Planta caducifólia, rebrotando a partir de outubro. Espécie pioneira, heliófita, habita a Mata Atlântica, na Floresta Ombrófila Mista, Floresta Ombrófila Densa e Floresta Estacional Decidual. São encontradas na região Nordeste (Pernambuco, Bahia, Alagoas), Sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro) e Sul (Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul) (Vaz, 2013).

Esta espécie é fonte de madeira que é usada em caixotaria, na produção de celulose e papel, na construção civil servindo para caibros, mourões e estacas, para produção de carvão e lenha de boa qualidade e na produção de peças em carpintaria e marcenaria (Backes e Irgang, 2004). Tem importante emprego paisagístico pela beleza de suas flores, é uma espécie ornamental, nos parques e jardins ou como cerca-viva, é também recomendada para arborização de ruas estreitas e sob a rede elétrica (Vaz, 2013). Esta espécie é importante fixadora de nitrogênio no solo, portanto o seu uso é recomendado em reflorestamentos mistos destinados à recuperação de ecossistemas degradados e de terrenos erodidos, bem como na restauração de mata ciliar em locais com inundações periódicas de rápida duração ou períodos de leve encharcamento (Lorenzi, 2002).

As pétalas frescas de *B. forficata* são comestíveis *in natura*, sendo carnosas e adocicadas, ou adicionadas em doces, compotas e geleias. Além disso, são também melíferas e fornecem pólen. Suas folhas são utilizadas na alimentação animal, a forragem, pois são ricas em proteínas e carboidratos (Hayashi e Appezzato-da-Glória, 2009). As cascas de seus frutos são utilizadas em artesanato e as fibras destas cascas são tão resistentes que eram usadas na fabricação de cordas (Vaz, 2013). Apesar do uso desta leguminosa para os mais diversos fins, *B. forficata* é uma importante planta medicinal brasileira, e todos os seus órgãos são utilizados para diferentes propósitos terapêuticos (Trojan-Rodrigues et al., 2012). Esta grande diversidade de ações e emprego se deve à variedade de seus constituintes químicos, localizados em diferentes órgãos da planta e que variam desde metabólitos secundários até compostos mais complexos como peptídeos e proteínas. Alguns destes componentes serão discutidos adiante.

Principais substâncias isoladas

1) Metabólitos secundários

Embora o foco deste estudo seja a espécie *B. forficata*, é importante mostrar o panorama fitoquímico do gênero *Bauhinia* (TABELA I), visto que tais constituintes parecem ser conservados entre as diferentes espécies, e tais informações são essenciais para o bom entendimento da constituição química e dos respectivos efeitos farmacológicos.

Estudos fitoquímicos e farmacológicos realizados com diversas espécies do gênero *Bauhinia* revelaram que as principais moléculas do metabolismo secundário incluem em geral os flavonóides, terpenóides, triterpenóides, glicosídeos esteroidais, lactonas, esteroides, taninos e quinonas (TABELA I). Contudo, apesar da maioria destes compostos serem conhecidos, muito pouco é sabido sobre suas atividades farmacológicas. As espécies mais estudadas fitoquimicamente são: *B. manca*, *B. candidans*, *B. uruguayensis*, *B. purpurea*, *B. forficata* e *B. splendens*. Existem outras espécies de *Bauhinia*

usadas na medicina popular, como a *B. monandra*, *B. holophylla* e *B. rufa*, porém ainda não foram encontrados estudos consistentes sobre a constituição química e a respectiva atividade farmacológica da maioria destas espécies (Silva e Cechinel Filho, 2002).

De modo geral, as espécies do gênero *Bauhinia* são caracterizadas pelo acúmulo de flavonóides livres e glicosilados nas suas folhas e, especialmente em *B. forficata*, são relatados elevados teores de β -sitosterol e kanferol-3,7-diramnosídeo (Pinheiro et al., 2006; Ferreres et al., 2012) e também de um heterosídeo denominado de bauhinósídeo particularmente em suas folhas e sementes (Costa, 1971).

Nas partes vegetais da espécie *forficata*, foram encontrados esteróis, flavonóides (especialmente Kampferol, rutina e quercetina), pinitol, taninos (flobatênicos e pirogálicos), cumarinas, ácidos orgânicos, glicosídeos, heterosídeos (cianogênicos e saponínicos), gomas, mucilagens e sais minerais (Silva et al., 2000).

TABELA I – Alguns compostos identificados nas espécies do gênero *Bauhinia*

Espécie de <i>Bauhinia</i>	Moléculas	Referência bibliográfica
<i>B. aurea</i>	Glicosídeo diidroflavonol, flavan-3-ols	Shang e colaboradores, 2007.
<i>B. forficata</i> Link	Beta-sitosterol, campferol-3,7-diramnosídeo e campferitrina	Silva e colaboradores, 2000.
<i>B. glauca</i> subsp. <i>Pernervosa</i>	6-metil Homoeriodictiol, bauhinasídeo A, bauhinasina, 2',4'-dihidroxi-4-metoxi dihidrochalcona-4'-O-beta-D-glucopyranosídeo, farferol, homoeriodictiol e 2',4'-dihidroxi-4-metoxi dihidrochalcona	Wu e colaboradores, 2009; Zhao e colaboradores, 2011.
<i>B. candidans</i>	Sitosterol; campesterol; estigmasterol; colesterol; estigmasta-3,5-dieno-7-ona; sitosterol 3-O- β -D-glucosídeo; sitosterol 3-O-D-xilurono-furanosídeo; kampferol 3-O- β -D-rutinosídeo; 7-O-rhamnopyranosídeo; trigonelina, triacantanol 3-O-metil-D-inositol (D-pinitol)	Iribarren e Pomilio, 1983, 1987.
<i>B. championii</i>	Ácido gálico, buahinina,	Silva e Chechinel Filho, 2002.
<i>B. guianensis</i>	Sitosterol; estigmasterol, 4-hidroxi-7-metoxiflavona	Silva e Chechinel Filho, 2002.

<i>B. manca</i>	Sitosterol-3-3-O-β-D-glucosídeo, estigmasta-4-eno-3-ona e -3,6-diona, ácido cinâmico; cinamoil-β-D-glicose; éster metílico do ácido (E)-4-hidroxi-cinâmico; éster metílico do ácido (E)-4-hidróxi-3-metoxi-cinâmico; ácido gálico, galato de metila; Éster metílico do Ácido 4-hidroxi-2-metoxibenzóico; éster metílico do Ácido 4-hidroxi-3-toxi-benzóico; éster metílico do Ácido 3,4-dihidroxibenzóico; hidroxipropioguaiacona; siringaresinol; (7S,8R,8'R)-5,5-dimetoxilarici-resinol.	Achenbach, Stocker e Constenla, 1988.
<i>B. megalandra</i>	5,7,5'-tri-hidroxi-2'-O-ramnosil-flavona; 5,7,2'-trihidroxi-5'-O-ramnosil-flavona	Silva e Cechinel Filho, 2002.
<i>B. purpurea</i>	5,6-di-hidroxi-7-metoxiflavona 6-O-β-D-xilopiranosídeo	Silva e Cechinel Filho, 2002.
<i>B. racemosa</i>	Pacharina, racemosol; des-O-metil racemosol	Gupta e colaboradores, 2005.
<i>B. reticulata</i>	Quercetina	Rabaté, 1938.
<i>B. rufescens</i>	5,6-di-hidro-11-metoxi-2,2,12-tri-metil-2H-nafto-[1,2] [1]-benzopirano-8,9-diol; 11-metoxi-2,2,12-trimetil-2H-nafto-[1,2] [1]-benzopirano-8,9-diol; 1,7,8,12b-tetra-hidro-2,2,4-trimetil-2H-benzo-[6,7]-ciclo-hepta-[1,2,3-de] [1]benzo pirano-5,10,11-triol	Maillard e colaboradores, 1991.
<i>B. splendens</i>	Sitosterol; estigmasterol; ácido esteárico, bausplendina, quercetina, rutina, galato de etila	Cechinel Filho e colaboradores, 1995.
<i>B. tarapotensis</i>	Ciclohexanona, derivado de ester de cafeoil, (-)-isolariciresinol 3-alfa-O-β-D-glucopiranosídeo, (+)-1-hidro xipinoresinol 1-O-β-glicopiranosídeo, isoacteoside, luteolin 4'-O-β-D-glucopiranosídeo e indolólico-3-carboxílico ácido 3 indólico	Braca e colaboradores, 2001.
<i>B. tomentosa</i>	Isoquercitrina; quercetina e rutina	Silva e Cechinel Filho, 2002.
<i>B. thonningii</i>	Grifonilida	Okwute e Ndukwe, 1986.
<i>B. uruguayensis</i>	Estigmasta-1,3,5-trieno; estigmasta 3,5-dieno; campesterol; estigmasterol; sitosterol; estigmasta-4,6-dien-3-ona; sitosterol-3-O-β-D-riburono-furanosídeo; sitosterol-3-O-β-D-xilopiranosídeo; Sitos terol-3-O-D-xiluronofuranosídeo; sitosterol-3-O-β-D-glicopirano sídio, quercetina-3-O-L-ramno-piranosídeo; kampferol-3-O-L-ram nopira-no-sídeo, ácido aspártico; treonina; serina; glutamato; prolina; glicina; alanina; valina; metionina; isoleucina; leucina; tirosina; fenilalanina; histidina; colina e álcoois lineares.	Silva e Cechinel Filho, 2002.
<i>B. vahlii</i>	Campesterol; estigmasterol; sitosterol, ácido betulínico, quercetina; quercetina-3-glucosídeo; kaempferol; agathisflavona	Sultana e colaboradores, 1985.
<i>B. variegata</i>	Sitosterol, lupeol, narigenina-5,7-dimetoxi-4-aminogluco-sídeo; kaempferol-3-galactosídeo; kaempferol-3-ramno-glicosídeo	Rahman e Begun, 1966.

2) Peptídeos e proteínas

Inibidores de proteases

Além dos metabólitos secundários, os inibidores de proteases (IPs) constituem uma importante classe de moléculas biologicamente ativas em plantas e

especialmente no gênero *Bauhinia*. Tais substâncias inibem uma grande variedade de enzimas proteolíticas, que incluem as proteases da própria planta e as proteases digestivas de mamíferos, insetos, bactérias e fungos, constituindo um importante mecanismo de defesa contra insetos herbívoros e patógenos de modo geral (Silva-López,

2009; Zhu-Salzman e Zeng, 2015). Os IPs e suas proteases estão amplamente distribuídos em todos os organismos vivos e desempenham papéis fundamentais em quase todos os fenômenos biológicos (Van der Hoorn, 2008).

A maioria dos IPs são polipeptídeos de 5 a 25 kDa, com estrutura compacta e muitas pontes de enxofre, que lhes confere estabilidade a variações de temperatura e pH (Gomes et al., 2011). São encontrados em tecidos de estoque como sementes, grãos e tubérculos (1-10% da proteína total), e estão especialmente distribuídos em sementes de espécies das famílias *Fabaceae* ou *Leguminosae*, *Brassicaceae*, *Poaceae* bem como em tubérculos de *Solanaceae* (De Leo et al., 2002; Nielsen et al., 2004; Van Der Hoorn e Jones, 2004; Oliva et al., 2011). São classificados como inibidores de serino, cisteíno, aspártico ou metalo-protease de acordo com o tipo catalítico da protease que inibem (Barret, 1994) e ainda, podem ser agrupados em famílias e clãs de acordo com a similaridade das suas estruturas primárias e terciárias (Rawlings, Barrett e Bateman 2010). Os inibidores de serino-proteases do tipo de tripsina são os mais abundantes em plantas particularmente das famílias *Leguminosae* e *Gramineae* (Bateman e James, 2011). Eles conferem à planta resistência a parasitos, insetos, larvas, micro-organismos e pragas. Estes IPs inibem as enzimas proteolíticas destes organismos, retardando a proteólise das paredes celulares e de proteínas da membrana da planta, reduzindo a desorganização celular e dificultando a penetração de patógenos e impedindo assim, a mobilização das proteínas de reserva (Silva-López, 2009).

Vários IPs foram isolados, purificados e caracterizados de diversas espécies de *Bauhinia*. Os primeiros inibidores isolados foram do tipo tripsina e obtidos das espécies *B. petandra* e *B. bauhinoides* (Oliva, 1986; Oliva, Sampaio e Sampaio, 1988). Posteriormente foram isolados quatro outros

inibidores de tripsina de *B. bauhinoides*: o BbTI-I, o BbTIII que inibe a calicreína pancreática (Oliva et al., 1999a), o BbKI, que inibe exclusivamente a calicreína e o BBCI que é um importante inibidor da atividade da cruzipaina. Esta enzima, é a cisteíno-protease mais importante de *Trypanosoma cruzi*, o causador da Doença de Chagas. Estudos demonstraram que o BBCI induziu morte seletiva deste parasito em cultura, podendo assim constituir uma nova alternativa no tratamento da Doença de Chagas (Bilgin et al., 2010). Em *B. unguata* também foi purificado um IP do tipo tripsina que inibe tanto a calicreína quanto o fator Xa da coagulação (Oliva et al., 1999b).

Em sementes de *B. purpurea* foram obtidos dois inibidores de tripsina, o BpuTI com 20 kDa e estrutura primária muito semelhante com BbTI-I e BdTIII (Silva-Luca et al., 2010) e o BPLTI que exibiu um amplo espectro de atividade anti-proliferativa e pró-apoptótica sobre células humanas de carcinoma hepatocelular HepG2. Constituindo assim um candidato promissor para o tratamento de carcinoma hepatocelular humano (Fang et al., 2012).

Os IPs de plantas já estão sendo empregados no tratamento de diversas patologias humanas, visto que inibem proteases que desempenham funções estratégicas nos organismos humano e animal. Alguns IPs atuam como agentes anti-fibrinolíticos, pois inibem os fatores da hemostasia (Vanassche et al., 2015), outros inibem proteases de células tumorais, demonstrando atrativo potencial anti-câncer (Roomi et al., 2014; Rakashanda et al., 2015).

Proteases

Também chamadas de peptidases (E.C. 3.4), são enzimas que hidrolisam ligações peptídicas em proteínas ou peptídeos. Em plantas, além de degradarem proteínas para reciclagem de aminoácidos, as proteases regulam processos

biológicos que incluem embriogênese, senescência, floração, formação e crescimento de pólen, estômatos, cloroplastos, caules, raízes, folhas e sementes, termotolerância, resistência a fatores ambientais, respostas de defesa que culminam com a morte dos agentes agressores, dentre outros processos fisiológicos e patológicos (Van der Hoorn, 2008). São expressas no tempo e espaço e acumulam-se em diferentes compartimentos subcelulares (van der Hoorn e Jones, 2004). As proteases estão presentes em todos os organismos vivos e em todas as organelas e são adaptadas aos ambientes onde atuam, por isso, são enzimas muito diversas. Classificam-se de acordo com o aminoácido catalítico do sítio ativo em serino, aspártico, cisteíno, treonino, glutâmico proteases e estas por sua vez, também estão distribuídas em clãs e famílias de acordo com suas sequências de aminoácidos e seus mecanismos de ação (Rawlings, Barrett e Bateman, 2012).

Diversas classes de proteases já foram descritas em plantas e especialmente em sementes de leguminosas (Demartini, Wlodawer e Carlini, 2007), contudo, estão presentes em todos os órgãos da planta e cada órgão possui um conjunto particular de enzimas (Pacheco e Silva-López, 2012). Embora muitos IPs tenham sido reportados em várias espécies de *Bauhinia*, apenas uma única protease de 30 kDa foi identificada e caracterizada em folhas de *B. forficata* (Andrade et al., 2011; Silva-Lucca et al., 2013). Esta enzima denominada de baupaina é uma cisteíno-protease capaz de clivar o cininogênio de alto peso molecular humano e liberar a bradiginina (Andrade et al., 2011), que por sua vez é um potente modulador do tônus da musculatura lisa de diversos órgãos (Kaplan, 2014).

Lectinas

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas com um ou mais sítio(s) de ligação de açúcares por

subunidade e de origem não imune. São aglutinantes seletivos de células e glicoconjugados, com capacidade de reconhecimentos específicos e de manter ligações reversíveis com carboidratos ou substâncias contendo açúcares, sem alterar suas estruturas covalentes (Sharon e Lis, 2004). São universalmente distribuídas na natureza, sendo principalmente encontradas nas sementes de leguminosas (Hivrale e Ingale, 2013). O primeiro reporte da presença de lectinas em *Bauhinia* foi em sementes de *B. purpurea* (Uhlebruck e Dahr, 1971) e demonstrou importante atividade estimulante sobre linfócitos em cultura (Imai e Osawa, 1983). Depois disso, outras lectinas foram identificadas e caracterizadas em diversas espécies de *Bauhinia* como em *B. carronii* (Flower et al., 1984), *B. malabarica* Roxb (Vijayakumari, Siddhuraju e Janardhanan, 1993), *B. monandra* (Andrade et al., 2005), *B. variegata* (Moreira et al., 2013), *B. bauhinoides* (Silva et al., 2011), *B. cheilantha* (Teixeira et al., 2013) e *B. forficata* (Silva et al., 2012). Todas as lectinas de *Bauhinia* apresentam características químicas distintas entre si, mas todas elas exibem importante atividade aglutinante sobre diversos tipos celulares, podendo inibir a adesão de bactérias ou células cancerosas aos tecidos e interferir no curso de uma infecção e na progressão tumoral (Silva et al., 2014).

Uso medicinal de *Bauhinia forficata*

A pata-de-vaca é uma das 71 plantas selecionadas pelo Ministério da Saúde como de interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS). É utilizada na medicina popular como hipoglicemiante, purgativa, diurética, antidiarreica, depurativa e tônica renal. Possui a propriedade peculiar de reduzir a excreção de urina, nos casos de poliúria e de glicosúria, regularizando a glicemia, sobretudo em portadores de diabetes mellitus (Engel et al., 2008). É indicada como adjuvante no tratamento de moléstias da pele,

úlceras e hipertensão, para aumentar a eliminação de ácido úrico, em dores na coluna, nas afecções vesicais, prisão de ventre e elefantíase. Possui propriedades mucilaginosas e adstringentes. Antigamente o seu uso medicinal era como diurética, tônica, estimulante, e também contra diabetes, blenorragias, tuberculose e anemia (Alice et al., 1995).

Na medicina popular, as folhas, a casca, o lenho e as raízes da pata-de-vaca são usados no tratamento das afecções urinárias. As flores novas possuem ação purgativa e seu chá é diurético, bom para rins, bexiga, garganta, tosses e bronquites (gargarejos), sífilis, verminoses. Já os chás das folhas possuem propriedades medicinais efetivas no tratamento do diabetes. Costa (1942) menciona propriedades estimulantes, expectorantes e adstringentes ligando-as muitas vezes às cascas do caule, propriedades diuréticas, antiblenorrágicas e vermífugas, às raízes e finalmente, propriedades purgativas às flores.

O chá das folhas apresentam propriedades semelhantes àquelas dos chás das flores e é usado para as mesmas finalidades. Além disso, atua favoravelmente em males do coração porque apresenta importante efeito na diminuição dos níveis séricos de colesterol (Alice et al., 1995). As folhas devem ser colhidas de preferência antes da floração, e secas ao sol. Contudo, as raízes são venenosas, mas se usada em decoto, funciona como vermífugo e ajuda a matar os micróbios (Pereira et al., 2004).

Embora a *Bauhinia* tenha seus usos populares no tratamento de várias enfermidades, pouco se conhece a respeito dos mecanismos de ação e das moléculas envolvidos em suas atividades farmacológicas. Um dos primeiros relatos de estudo clínico do uso de *B. forficata* foi justamente pela sua propriedade antidiabética (Juliani, 1941). Por este motivo, este gênero é mais frequentemente estudado quanto à sua possível ação hipoglicemiante, pois é

sabido que chás e infusões de suas folhas e cascas de caule são usados em diferentes preparações para diminuir níveis de glicose no sangue (Silva e Cechinel Filho, 2002; Salgueiro et al., 2013).

Muitos estudos têm demonstrado o efeito hipoglicemiante especialmente em modelos animais com diabetes induzido (Silva et al., 2002; Pepato et al., 2002 e 2004; Lino et al., 2004). A administração oral crônica do decoto da planta em ratos diabéticos, imitando o uso na medicina popular, foi obtida uma significativa diminuição da glicemia e também da glicosúria (Pepato et al., 2002 e 2004). Outros estudos comprovaram o efeito hipoglicemiante de *B. forficata*, contudo, o mecanismo de ação da planta e as moléculas responsáveis por este ainda estão sendo investigados. A baixa da glicemia também foi observada em ratas grávidas, cujo controle da glicemia é alterado devido ao aumento de progesterona e estrogênio durante o período de gravidez (Damasceno et al., 2004). Por este motivo, é comum a constatação de que gestantes diabéticas fazem uso de *B. forficata*. Preparações de um extrato de folhas secas de *B. forficata* obtido com etanol-água (1:2) foi administrado em ratos diabéticos e foi observado queda nos níveis de glicose. Esta observação reforçou o papel hipoglicemiante desta planta e este efeito pareceu ser dependente da presença da quercetina-3,7-di-O-a-L-rhamnopiranosídeo e de Kampferol-3,7-di-O-a-L-rhamnopiranosídeo (kampferitrina) (Da Cunha et al., 2010).

A ação diurética pôde ser comprovada através do teste geral de atividades. Nesta avaliação foi administrado o extrato bruto da tintura da planta e dez minutos após a administração, houve intensa diurese em modelos animais (Silva e Cechinel Filho, 2002). Pizzolatti e colaboradores (2003) relataram que a infusão das folhas de *B. forficata* utilizada na medicina popular brasileira, tem comprovado efeito diurético,

hipoglicemiante, tônico, depurativo, eficaz no combate à elefantíase, pois reduz importantemente o edema e na redução da glicosúria.

O potencial antioxidante do Kampferol-3,7-L-O-a-diraminosídeo, um dos produtos isolados a partir da fração n-butanólica de *B. forficata*, foi avaliado e demonstrou uma redução dos níveis de radicais livres no soro de modelos animais diabéticos (De Souza et al., 2004). É sabido que o aumento crônico dos níveis séricos de glicose no sangue, como no caso do diabetes, desencadeia a oxidação de lipídeos e proteínas acarretando dano celular (Oyenihi et al., 2015). O chá das folhas de *B. forficata* atua como potente antioxidante, visto que protegeu os grupos sulfidril de proteínas de ratos diabéticos contra oxidação e peroxidação de lipídeos (Salgueiro et al., 2013). A diminuição da produção de radicais livres foi observada também quando ratas diabéticas grávidas foram tratadas com o chá de folhas de *B. forficata* (Volpato et al., 2008). Além disso, foi observado que os flavonoides presentes nas folhas são também responsáveis pela expressiva atividade antioxidante observada em *B. forficata* (Miceli et al., 2015).

A atividade antimicrobiana dos extratos e frações de *B. forficata* também foi avaliada, através do método de difusão radial em Agar com espécies de bactérias e foi observada expressiva inibição do crescimento com cepas patogênicas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (De Souza et al. 2004), *Streptococcus mutans* e *sanguis* (Souza et al., 2014), *Bacillus cereus* e *subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus mirabilis* e *Salmonella typhimurium* (Pereira et al., 2014).

O extrato aquoso de *B. forficata* foi capaz de neutralizar a coagulação induzida por veneno das cobras *Bothrops* e *Crotalus*, demonstrando possuir

atividade anticoagulante e antifibrinogênica (Oliveira et al., 2005) e também do veneno de escorpião *Tityus serrulatus* (Vasconcelos et al., 2004).

Substâncias isoladas de *B. forficata* exibiram comprovada atividade anticâncer: um inibidor de proteína quinase ciclina-dependente que interfere no ciclo celular de células HeLa, inibindo sua proliferação (Lim et al., 2006); uma lectina obtida de sementes de *B. forficata* que induziu à morte de células de câncer de mama humano, por inibir a adesão integrina-dependente destas células à matriz extracelular, interferindo assim na progressão tumoral (Silva et al., 2014) e como já mencionado, o inibidor de proteases BPLTI que apresentou amplo espectro de atividade anti-proliferativa e pró-apoptótica sobre células humanas de carcinoma hepatocelular HepG2 (Fang et al., 2012). Embora o uso medicinal de *B. forficata* não seja para o tratamento de tumores, seus constituintes indicam seu potencial na terapia destas doenças.

Conclusão

Apesar de *B. forficata* ser uma planta medicinal bastante utilizada no Brasil e ter seu uso bem estabelecido, apenas há pouco tempo seus constituintes químicos foram estudados e seus efeitos farmacológicos comprovados, abrindo assim a possibilidade do desenvolvimento de fitoterápicos ou fitomedicamentos utilizando extratos, frações ou substâncias purificadas obtidos desta espécie vegetal.

Agradecimentos

Ao Departamento de Química de Produtos Naturais, Farmanguinhos, FIOCRUZ.

Referências bibliográficas

- ACHENBACH, H.; STOCKER, M.; CONSTENLA, M.A.F. 1988. Flavonoid and other constituents of *Bauhinia manca*. *Phytochemistry*, v. 27, p. 1835-1841.
- ALICE, C.B.; SIQUEIRA, N.C.S.; MENTZ, L.A.; SILVA G.A.A.B.; JOSÉ, K.F.D. 1995. *Plantas Medicinais de uso popular: Atlas farmacognóstico*. 1ª edição, Editora da Ulbra, Canoas.
- ANDRADE, C.A.; BASZKIN, A.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S.; COELHO L.C.; DE MELO C.P. 2005. Mixed monolayers of *Bauhinia monandra* and concanavalin A lectins with phospholipids, part II. *Journal of Colloid Interface Science*, v. 289, p.379-85.
- ANDRADE, S.S.; SILVA-LUCCA, R.A.; SANTANA, L.A.; GOUVEA, I.E.; JULIANO, M.A.; CARMONA, A.K.; ARAÚJO, M.S.; SAMPAIO, M.U.; OLIVA, M.L.V. 2011. Biochemical characterization of a cysteine proteinase from *Bauhinia forficata* leaves and its kininogenase activity. *Process Biochemistry*, v. 46, p. 572-578.
- BACKES P.; IRGANG B. 2004. *Mata Atlântica: as árvores e a paisagem*. Editora Paisagem do Sul, Porto Alegre.
- BARRET A.J. 1994. Classification of peptidases. *Methods in Enzymology*, v.244, p. 1-15.
- BATEMAN, K.S.; JAMES, M.N. 2011. Plant protein proteinase inhibitors: structure and mechanism of inhibition. *Current of Protein Peptide Science*, v.12, p.340-347.
- BILGIN, M.; NEUHOF, C.; DOERR, O.; BENSCHIED, U.; ANDRADE, S.S.; MOST, A.; ABDALLAH, Y.; PARAHULEVA, M.; GUENDUEZ, D.; OLIVA, M.L.; ERDOGAN, A. 2010. *Bauhinia bauhinioides* cruzipain inhibitor reduces endothelial proliferation and induces an increase of the intracellular Ca²⁺ concentration. *Journal of Physiological Biochemistry*, v.66, p. 283-290.
- BRACA, A.; DE TOMMASI, N.; DI BARI, L.; PIZZA, C.; POLITI, M.; MORELLI, I. 2001. Antioxidant principles from *Bauhinia tarapotensis*. *Journal of Natural Products*, v. 64, p. 892-895.
- CARVALHO, P.E.R. 2003. *Espécies arbóreas brasileiras*. 1ª edição. Informação Tecnológica, Embrapa, Brasília.
- COSTA O. A. 1971. *Bauhinia forficata* Link. Leandra, Rio de Janeiro.
- COSTA, O.A. 1942 - Estudo farmacodinâmico da unha de vaca. *Revista da flora medicinal RJ*, v.12, p. 179-189.
- DA CUNHA, A.M.; MENON, S.; MENON, R.; COUTO, A.G.; BÜRGER, C.; BIAVATTI, M.W. 2010. Hypoglycemic activity of extracts of *Bauhinia forficata* Link. *Phytomedicine*, v. 17, p. 37-41.
- CECHINEL FILHO, V.; BREVIGLIERI, E.; WILLAIN FILHO, A.; SANTOS A.R.S. 1995. Estudo fitoquímico e avaliação preliminar da atividade analgésica de *Bauhinia splendens*. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 76, p. 115-117.
- DAMASCENO, DC.; VOLPATO, G.T.; CALDERON, I.M.P.; AGUILAR, R.; CUNHA RUDGE, M.V. 2004. Effect of *Bauhinia forficata* extract in diabetic pregnant rats: maternal repercussions. *Phytomedicine*. v. 11, p. 196-201.
- DE LEO, F.; VOLPICELLA, M.; LICCIULLI, F.; LIUNI, S.; GALLERANI, R.; CECI, L.R. 2002. Plant-PIs: a database for plant protease inhibitors and their genes. *Nucleic Acids Research*, v. 30, p. 347-348.

- DE SOUZA, E.; ZANATTA, L.; SEIFRIZ, I.; CRECZNSKI-PASA, T.B.; PIZZOLATTI, M.G.; SZPOGANICZ, B.; SILVA, F.R., 2004. Hypoglycemic effect and antioxidant potential of kaempferol- 3,7-O-(alpha)-dirhamnoside from forficata leaves. *Journal of Natural Products*, v.67, p.829-832.
- DEMARTINI, D.R.; WLODAWER, A.; CARLINI C. R. 2007. A comparative study of the expression of serine proteinases in quiescent seeds and in developing *Canavalia ensiformis* plants. *Journal of Experimental Botanic*, v. 58, p. 521 – 532.
- ENGEL, I.C.; FERREIRA, R.A.; CECHINEL-FILHO, V.; MEYRE-SILVA C. 2008. Controle de qualidade de drogas vegetais a base de *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, p. 258-264.
- FANG, E.F.; BAH, C.S.; WONG, J.H.; PAN, W.L.; CHAN, Y.S.; YE, X.J.; NG, T.B. 2012. Potential human hepatocellular carcinoma inhibitor from *Bauhinia purpurea* L. seed: from purification on mechanism exploration. *Archives of Toxicology*, v. 86, p. 293-304.
- FERRERES F.; GIL-IZQUIERDO, A.; VINHOLES, J.; SILVA, S.T.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P.B. 2012. *Bauhinia forficata* Link authenticity using flavonoids profile: Relation with their biological properties. *Food Chemistry*, v. 134, p. 894-904.
- FLOWER, R.L.; WILCOX, G.E.; CHUGG, V.; NEAL J.R. 1984. Lectins from indigenous Australian wildflowers-detection of lectins from *Bauhinia carronii*, *Hardenbergia comptoniana*, *Ptilotis obovatus* and *Rhadogia crassifolia*. *Australian Journal of Experimental Biology and Medicinal Science*, v. 62, p. 763-769.
- FORTUNATO, R.H. 1986. *Revision dei genero Bauhinia (Cercideae, Caesalpinioidea, Fabaceae) para la Argentina*. Darwiniana, San Isidoro.
- GOMES, M.T.R.; OLIVA, M.L.; LOPES, M.T.P.; SALAS, C.E. 2011. Plant proteinases and inhibitors: An overview of biological function and pharmacological activity. *Current Protein Peptide Science*, v. 12, p. 417-436.
- GUPTA, M.; MAZUMDER, U.K.; KUMAR, R.S.; GOMATHI, P.; RAJESHWAR, Y.; KAKOTI B.B.; SELVEN, V.T. 2005. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of methanol extract from *Bauhinia racemosa* stem bark in animals. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 98, p 267-273.
- HAYASHI, A.H.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA B. 2009. Resprouting from roots in four Brazilian tree species. *Revista de Biologia Tropical*. v. 57, p. 789-800.
- HIVRALE, A.U.; INGALE, A.G. 2013. Plant as a plenteous reserve of lectin. *Plant Signaling Behavior*, v. 8, p. e26595.
- IMAI, Y.; OSAWA T. 1983. Enrichment of IL-2-producer T cells from mouse spleen by use of *Bauhinia purpurea* lectin. *Scandinavian Journal of Immunology*, v. 18, p. 217-224.
- IRIBARREN, A.M.; POMILIO, A.B. 1983. Components of *Bauhinia candicans*. *Journal of Natural Products*, v. 46, p. 752-753.
- IRIBARREN, A.M.; POMILIO, A.B.1987. Sitosterol 3-O-a-D-xyluronofuranoside from *Bauhinia candicans*. *Phytochemistry*, v. 26, p. 857-856.
- JULIANI, C. 1941. Ação hipoglicemiante da *Bauhinia forficata* Link. Novos estudos clínicos e experimentais. *Jornal dos Clínicos*, v.3, p. 93-112.
- KAPLAN, A.P. 2014. The bradykinin-forming cascade: a historical perspective. *Chemical Immunology of Allergy*, v. 100, p. 205-213.

- LIM, H.; KIM, M.K.; LIM, Y.; CHO, Y.H.; LEE, C.H. 2006. Inhibition of cell-cycle progression in HeLa cells by HY52, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor isolated from *Bauhinia forficata*. *Cancer Letters*, v.233, p. 89-97.
- LINO, C.S.; DIÓGENES, J.P.; PEREIRA, B.A.; FARIA, R.A.; ANDRADE NETO, A.; ALVES, R.S.; DE QUEIROZ, M.G.; DE SOUSA, F.C.; VIANA, G.S. 2004. Antidiabetic activity of *Bauhinia forficata* extracts in alloxan-diabetic rats. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, v. 27, p. 125-127.
- LORENZI, H. 2002. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil*. 4ª edição. Instituto Plantarum, Nova Odessa.
- MAILLARD, M.P.; RECIO IGLESIAS, M.C.; SAADOU, M.; STOELKLI EVANS, H.; HOSTETTMANN, K.1991. Novel antifungal tetracyclic compounds from *Bauhinia rufescens*. *Helvetica Chimica Acta*, v.74, p. 791-799.
- MICELI, N.; BUONGIORNO, L.P.; CELI, M.G.; CACCIOLA, F.; DUGO, P.; DONATO, P.; MONDELLO, L.; BONACCORSI, I.; TAVIANO, M.F. 2015. Role of the flavonoid-rich fraction in the antioxidant and cytotoxic activities of *Bauhinia forficata* Link. (Fabaceae) leaves extract. *Natural Products Research*, v. 29, p.1-11.
- MIYAKE, E.T.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K. 1986. Pharmacognostic characterization of pata-de-vaca *Bauhinia forficata*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.1, p. 58-68.
- MOREIRA, G.M.; CONCEIÇÃO, F.R.; MCBRIDE, A.J.; PINTO L.S. 2013. Structure predictions of two *Bauhinia variegata* lectins reveal patterns of C-terminal properties in single chain legume lectins. *PLoS One*, v. 19, p: e81338.
- NIELSEN, P.K.; BONSAGER, B.C.; FUKUDA, K.; SVENSSON, B. 2004. Barley alpha-amylase/subtilisin inhibitor: structure, biophysics and protein engineering. *Biochemistry et Biophysics Acta*, v. 1696, p. 157-164.
- OLIVA, M.L.V.; MENDES, C.R.; JULIANO, M.A.; CHAGAS, J.R.; ROSA, J.C.; GREENE, L.J.; SAMPAIO, M.U.; SAMPAIO, C.A.M. 1999a. Characterization of a tissue kallikrein inhibitor isolated from *Bauhinia bauhinoides* seeds: inhibition of the hydrolysis of kininogen related substrates. *Immunopharmacology*, v. 45, p. 163–169.
- OLIVA, M.L.V.; ANDRADE, S.; BATISTA, I.F.C.; SAMPAIO, M.U.; JULIANO, M.; FRITZ, H.; AUERSWALD, E.A.; SAMPAIO, C.A.M. 1999b. Human plasma kallikrein and tissue kallikrein binding to a substrate based on the reactive site of a factor Xa inhibitor isolated from *Bauhinia unguolata* seeds. *Immunopharmacology*, v. 45, p. 145–149.
- OLIVA, M.L.V.; FERREIRA, R.S., FERREIRA, J.G., DE PAULA, C.A.; SALAS, C.E.; SAMPAIO, M.U. 2011 Structural and functional properties of kunitz proteinase inhibitors from leguminosae: a mini review. *Current Protein Peptide Science*, v. 12, p. 348-57.
- OLIVA, M.L.V. 1986. *Isolamento e caracterização preliminar de inibidores de proteinase de sementes de Enterobium contotiliquum, Torresea cearenses, Bauhinia petandra e Bauhinia bahinoides*. Tese (Doutorado). Escola Paulista de Medicina, Universidade de São Paulo.
- OLIVA, M.L.V.; SAMPAIO, M.U.; SAMPAIO, C.A.M. 1988. Isolation and characterization of plant inhibitors directed against plasma kallikrein and factor XII. *Advances in Medical Biology*, v. 247, p. 467-471.
- OLIVEIRA, C.Z.; MAIORANO, V.A.; MARCUSSI, S.; SANT'ANA, C.D.; JANUÁRIO, A.H.; LOURENÇO,

- M.V.; SAMPAIO, S.V.; FRANÇA, S.C.; PEREIRA, P.S.; SOARES, A.M. 2005. Anticoagulant and antifibrinolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia forficata* against snake venoms. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 98, p. 213-216.
- OLIVEIRA, F.E.; SAITO, M.L. 1989. Alguns vegetais brasileiros empregados no tratamento da diabetes. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 2-4, p. 170-196.
- OLIVEIRA, F.; KATO, E.T.M.; RODRIGUES, R.F.O.; BASSO, S.L. 2001. Mitos e verdades sobre pata-de-vaca – *Bauhinia forficata* Link – Uma revisão. *Revista Lecta*, v.19, p. 7-20.
- OKWUTE, S. K.; NDUKWE, G.I. 1986. Isolation of Griffonilide from the Stem Bark of *Bauhinia thonningii*. *Journal of Natural Products*, v. 49, 716-717.
- OYENIHI, A.B.; AYELESO, A.O.; MUKWEVHO, E.; MASOLA, B. 2015. Antioxidant strategies in the management of diabetic neuropathy. *Biomedical Research International*, v. 2015, ID 515042.
- PACHECO, J.S.; SILVA-LÓPEZ, R.E. 2012 - Study of proteolytic activity of the tropical legume *Crotalaria spectabilis*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, v. 37, p. 495-509.
- PEPATO, M.T.; KELLER, E.H.; BAVIERA, A.M.; KETTELHUT, I.C.; VENDRAMINI, R.C.; BRUNETTI I.L., 2002. Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats *Journal of Ethnopharmacology*, v. 81, p. 191-197.
- PEPATO, M.T.; BAVIERA, A.M.; KETTELHUT, I.C.; VENDRAMINI, R.C.; BRUNETTI I.L., 2004. Evaluation of toxicity after one-month treatment with *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Complementary and Alternative Medicine*, v. 4, p. 1-7.
- PEREIRA, A.C.S.; RIBEIRO, G.E.; SOUZA, L.C.R.; RUFINO, L.R.A.; CABRAL, I.S.R.; BORIOLLO, M.F.G.; NOGUEIRA, D.A.; OLIVEIRA, N.M.S.; FIORINI, J.E. 2014. Biologic activity of the hydroalcoholic extract of *Bauhinia forficata* Link on *Herpetomonas Samuel pessoai*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 16, p. 585-592.
- PINHEIRO, T.S.D.B.; JOHANSSON, L.A.P.; PIZZOLATTI, M.G.; BIAVATTI M.W. 2006. Comparative assessment of kaempferitrin from medicinal extracts of *Bauhinia forficata* Link. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 41, p. 431-436.
- PIZZOLATTI, M.G.; CUNHA, J.R.; SZPOGANICZ, B.; SOUSA, E. 2003. Flavonoides glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia forficata* (Leguminosae). *Química Nova*, v. 26, p. 466-469.
- RAHMAN, W.; BEGUN, S.J. 1966. Flower pigments: flavonoids from the white flowers of *Bauhinia variegata* Linn. *Naturwissenschaften*, v. 53, p. 385-342.
- RAKASHANDA, S.; QAZI, A.K.; MAJEED, R.; ANDRABI, S.M.; HAMID, A.; SHARMA, P.R.; AMIN, S.; 2015. Plant-derived protease inhibitors LC-pi (*Lavatera cashmeriana*) inhibit human lung cancer cell proliferation in vitro. *Nutrition in Cancer*, v. 67, p. 156-166.
- RAWLING, N.D.; BARRETT, A.J.; BATEMAN, A. 2010. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research*, v. 38, p. 227-233.
- RAWLINGS, N.D.; BARRETT, A.J.; BATEMAN, A. 2012 - MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research*, v. 40, p. 343-350.
- RABATÉ, M.J. 1938. Sur la présence du quercitroside (quercitrin) dans les feuilles de *Bauhinia*

reticulata D.C. *Journal of Pharmaceutical Chemistry*, v. 28, 435-437.

ROOMI, M.W.; KALINOVSKY, T.; NIEDZWIECKI, A.; RATH, M. 2014. Modulation of uPA, MMPs and their inhibitors by a novel nutrient mixture in human glioblastoma cell lines. *International Journal of Oncology*, v. 45, p. 887-894.

SALGUEIRO, A.C.F.; LEAL, C.Q.; BIANCHINI, M.C.; PRADO, I.O.; MENDEZ, A.S.L.; PUNTEL, R.L.; FOLMER, V.; SOARES, F.A.; ÁVILA, D.S.; PUNTEL, G.O. 2013. The influence of *Bauhinia forficata* Link subsp. *pruinosa* tea on lipid peroxidation and non-protein SH groups in human erythrocytes exposed to high glucose concentrations. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 148, p. 81-87.

SHANG, X.Y.; LI, S.; WANG, S.J.; YANG, Y.C.; SHI, J.G. 2007. Dihydroflavonol glycosides and flavan-3-ols from *Bauhinia aurea*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, v. 32, p. 815-818.

SHARON, N.; LIS, H. 2004 - History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, v. 14, p. 53-62.

SILVA, K.L.; BIAVATTI, M.W.; LEITE, S.N.; YUNES, R. A.; DELLE MONACHE, F.; CECHINEL FILHO, V. 2000. Phytochemical and pharmacognostic investigation of *Bauhinia forficata* Link (Leguminosae). *Zeitschrift Naturforschung*, v. 55, p. 478-480.

SILVA, K.L.; CECHINEL FILHO V. 2002. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. *Química Nova*, v. 25, p. 449-454.

SILVA, F.R.M.B.; SZPOGANICZ, B.; PIZZOLATTI, M.G.; WILLRICH, M.A.V.; Sousa E. 2002. Acute effect of *Bauhinia forficata* on serum glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 83, p. 33-37.

SILVA, H.C.; BARI, A.U.; PEREIRA-JÚNIOR, F.N.; SIMÕES, R.C.; BARROSO-NETO, I.L.; NOBRE, C.B.; PEREIRA, M.G.; NASCIMENTO, K.S.; ROCHA, B.A.; DELATORRE, P.; NAGANO, C.S.; ASSREUY, A.M.; CAVADA, B.S. 2011. Purification and partial characterization of a new pro-inflammatory lectin from *Bauhinia bauhinoides* Mart (Caesalpinoideae) seeds. *Protein Peptide Letters*, v.18, p. 396-402.

SILVA, M.C.C.; SANTANA, L.A.; MENTELE, R.; FERREIRA, R.S.; MIRANDA, A.; SILVA-LUCCA, R.A.; SAMPAIO, M.U.; CORREIA, M.T.S.; OLIVA M.L.V. 2012. Purification, primary structure and potential functions of a novel lectin from *Bauhinia forficata* seeds. *Process Biochemistry*, v. 47, p. 1049-1059.

SILVA, M.C.C.; DE PAULA, C.A.A.; FERREIRA, J.G.; PAREDES-GAMERO, E.J.; VAZ, A.M.S.F.; SAMPAIO, M.U.; CORREIA, M.T.S.; OLIVA M.L.V. 2014. *Bauhinia forficata* lectin (BfL) induces cell death and inhibits integrin-mediated adhesion on MCF7 human breast cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* v.1840, p. 2262-2271.

SILVA-LÓPEZ, R.E. 2009. Proteases Inhibitors Originated from Plants: Useful Approach for Development of New Drug. *Revista Fitos*, v.4, p.108-119.

SILVA-LUCCA, R.A.; FANECA, H.M.; DE LIMA, M.C.; DE CAROLI, F.P.; ASSIS, M.L.; SAMPAIO, M.U.; OLIVA, M.L. 2010. Interaction of proteinase inhibitors with phospholipid vesicles is modulated by pH. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.47, p. 551-557.

SILVA-LUCCA, R.A.; ANDRADE, S.S.; FERREIRA, R.S.; SAMPAIO, M.U.; OLIVA, M.L. 2013. Unfolding studies of the cysteine protease baupain, a papain-like enzyme from leaves of *Bauhinia forficata*: effect

- of pH, guanidine hydrochloride and temperature. *Molecules*, v. 19, p. 233-246.
- SOUZA, M.M.F.; DAMASCENO, P.V.D.; BARROS, M.C.G.; LOIOLA, C.O.L.; MONTEIRO, A.S.; CORRÊA, G.F.F. 2014. Avaliação in vitro das atividades antimicrobianas de extratos etanólicos de *Arnica montana* L., *Bauhinia forficata* e *Plantago major* sobre *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguis*. *Journal of Applied Pharmaceutical Sciences*, v.21, p.18-28.
- SULTANA, S.; ILYAS, M.; MOHAMMED, K.; SHAIDA, W.A. 1985. Chemical Investigation of *Bauhinia vahlii*. *Journal of Indian Chemistry Society*, v. 8, p. 337-338.
- TEIXEIRA, D.C.; FARIAS, D.F.; CARVALHO, A.F.; ARANTES, M.R.; OLIVEIRA, J.T.; SOUSA, D.O.; PEREIRA, M.L.; OLIVEIRA, H.D.; ANDRADE-NETO, M.; VASCONCELOS, I.M. 2013. Chemical composition, nutritive value, and toxicological evaluation of *Bauhinia cheilantha* seeds: a legume from semiarid regions widely used in folk medicine. *Biomedical Research International*, v. 2013, p. 578781-578790.
- TROJAN-RODRIGUES, M.; ALVES, T.L.; SOARES, G.L.; RITTER, M.R. 2012. Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, South Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 139, p. 155-163.
- UHLENBRUCK, G.; DAHR, W. 1971. Studies on lectins with a broad agglutination spectrum. XII. N-acetyl-D-galactosamine specific lectins from the seeds of *Soja hispida*, *Bauhinia purpurea*, *Iberis amara*, *Moluccella laevis* and *Vicia graminea*. *Vox Sanguinis*, v.21, p 338-351.
- VAN DER HOORN, R.A.; JONES, J.D. 2004. The plant proteolytic machinery and its role in defense. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 7, p. 400-407.
- VAN DER HOORN R.A. 2008. Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. *Annual Review in Plant Biology*, v.59, p. 191-223.
- VANASSCHE, T.; VANDENBRIELE, C.; PEERLINCK, K.; VERHAMME P. 2015. Pharmacotherapy with oral Xa inhibitors for venous thromboembolism. *Expert Opinion in Pharmacotherapy*, v.16, p. 645-58.
- VASCONCELOS, F.; SAMPAIO, S.V.; GARÓFALO, M.A.R.; GUIMARÃES, L.F.L.; GIGLIO, J.R.; ARANTES E.C. 2004. Insulin-like effects of aqueous extract upon *Tityus serrulatus* scorpion envenoming. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 95, p. 385-392.
- VAZ, A.; TOZZI, A. 2005. Synopsis of *Bauhinia* sect. *Pauletia* (Cav.) DC. (Leguminosae: Caesalpinioideae: Cercideae) in Brazil. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 28, p. 477-491.
- VAZ, A.M.S.F. 2013. *Bauhinia*. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB082666>).
- VIJAYAKUMARI, K.; SIDDHURAJU, P.; JANARDHANAN, K. 1993. Chemical composition and nutritional potential of the tribal pulse (*Bauhinia malabarica* Roxb). *Plant Foods in Human Nutrition*, v.44, p. 291-298.
- VOLPATO, G.T.; DAMASCENO, D.C.; RUDGE, M.V.C.; PADOVANI, C.R.; CALDERO, I.M.P. 2008. Effect of *Bauhinia forficata* aqueous extract on the maternal-fetal outcome and oxidative stress biomarkers of streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v.116, p. 131-137.
- WU, U.; ZHAO, Y.Y.; YANG, X.W.; LIANG, H. 2009. Flavonoids from *Bauhinia glauca* subsp. *pernervosa*. *Chemical Pharmacological Bulletin*, v. 57, p. 628-631.

ZHAO, Q.L.; WU, Z.B.; ZHENG, Z.H.; LU, X.H.; LIANG, H.; CHENG, W.; ZHANG, Q.Y.; ZHAO, Y.Y. 2011. Phenolic acid derivatives from *Bauhinia glauca* subsp. *Pernervosa*, v. 46, p. 946-950.

ZHU-SALZMAN, K.; ZENG, R. 2015. Insect response to plant defensive protease inhibitors. *Annual Reviews of Entomology*, v.60, p. 233-252.

Estudo do desempenho comercial dos insumos farmacêuticos vegetais sob a ótica do Comércio Exterior

Study of commercial performance of pharmaceutical drugs vegetables in a Foreign Trade optics

¹Terra Junior, O. N.; ²Maldonado, J.V.; ¹Arnobio, A.

¹Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Departamento de Patologia e Laboratórios.

²Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca/ Fiocruz. Departamento de Administração e Planejamento.

* Correspondência: orlando_ntj@hotmail.com

Resumo

Os medicamentos fitoterápicos são produtos naturais obtidos de plantas medicinais a partir de um conhecimento a respeito das atividades terapêuticas destes. As vendas desta indústria crescem através do surgimento de novos produtos e medicamentos inovadores. Entretanto, a dificuldade do Brasil em promover inovação a partir dos fitoterápicos se mostra conflitante em um país de grande potencial em biodiversidade e excelentes condições ambientais. Desta maneira, o objetivo do estudo foi avaliar o desempenho comercial dos insumos farmacêuticos vegetais no Brasil. Para proceder à investigação, foram utilizados dados secundários de exportação/importação disponíveis no Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior via Internet (ALICEweb, 2015). Os valores analisados de exportação e importação de insumos farmacêuticos vegetais no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2014 demonstram que o Brasil apresenta grande dependência externa. Diversos são os elementos que condicionam tal comportamento. No âmbito deste artigo é dada ênfase ao perfil produtivo, P&D e aparato regulatório. Portanto, a partir desta reflexão é observada a necessidade do desenvolvimento de políticas públicas para o estímulo da produção dos insumos farmacêuticos vegetais de alto valor agregado e a adoção de estratégias para o fortalecimento da sua base produtiva. Além da necessidade de flexibilização nos marcos regulatórios explanados de maneira que priorizem a segurança e a qualidade dos fitoterápicos provenientes destes insumos.

Palavras-chave: medicamentos fitoterápicos; insumos farmacêuticos; exportação de produtos; importação de produtos.

Abstract

Herbal medicines are natural products derived from medicinal plants from knowledge of the therapeutic activities of these. Sales of this industry grow through the emergence of new products and innovative medicines. However,

the difficulty of Brazil to promote innovation from herbal is conflicting in a country of great potential in biodiversity and excellent environmental conditions. Thus, the aim of the study was to evaluate the trade performance of active pharmaceutical ingredients plant in Brazil. To conduct research, secondary data of exportation / importation were used and they are available in the Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior via Internet (Aliceweb, 2015). The analyzed values of exports and imports of vegetable pharmaceutical ingredients from January 2002 to December 2014 show that Brazil has great external dependence. There are several elements that influence such behavior. Within this article is emphasized the productive profile, P&D and regulatory apparatus. Therefore, from this reflection is observed the need to develop public policies to stimulate the production of vegetables pharmaceutical ingredients with high added value and the adoption of strategies to strengthen its production base. Besides the need for flexibility in the regulatory framework explained in ways that prioritize the safety and quality of herbal medicines from these inputs.

Key-words: phytotherapeutic drugs; pharmaceutical raw material; exportation of products; importation of products.

Introdução

O mercado farmacêutico se consolida como um dos mais dinâmicos, lucrativos e competitivos da economia mundial. Apenas no Brasil, seu faturamento foi de aproximadamente R\$ 64,4 bilhões em 2014, um crescimento de 14% em relação ao ano anterior (Valécio, 2015). Esta indústria é estratégica para os países, tanto pelo seu caráter social - ao responder às permanentes necessidades sanitárias da população, como pelo caráter econômico - considerando-se que suas atividades produtivas são intensivas em ciência, tecnologia e inovação. Ademais, possui uma complexa cadeia tecnológica articulada com empresas, universidades, instituições de pesquisa e governo (Queiroz, 2011). A premissa estratégica de competição da indústria se sustenta na diferenciação de produtos baseada na intensidade de gastos em pesquisa e desenvolvimento (P&D), para o lançamento constante de produtos inovadores, e em propaganda e marketing.

A indústria é altamente concentrada em nível mundial, tendo um número relativamente pequeno de grandes empresas multinacionais e um elevado

número de pequenas e médias firmas atuando de maneira complementar aos grandes laboratórios.

No Brasil, a atuação das empresas farmacêuticas brasileiras é principalmente direcionada a produtos de menor complexidade tecnológica, como por exemplo, medicamentos genéricos, similares e fitoterápicos. Estes últimos, oriundos da biodiversidade, têm sido inseridos no portfólio de algumas empresas, como oportunidade de inovação, diferenciação de produtos, de menores custos em P&D, etc., e já chamam a atenção de laboratórios públicos, que também compõem parte do mercado farmacêutico brasileiro (Gadelha e Maldonado, 2008).

O consumo dos medicamentos fitoterápicos cresce tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento (Santos et al, 2011). Alguns fatores explicam o incremento dos fitoterápicos no contexto econômico da indústria farmacêutica: aumento da preferência dos consumidores por esta forma de terapia, preocupação com os efeitos colaterais dos medicamentos sintéticos (fruto da crença equivocada que os fitoterápicos não possuem efeitos colaterais), benefício de custo ao consumidor final e confiança dos profissionais da saúde (Yunes e Calixto, 2001). Tal

importância se reflete no mercado mundial de fitoterápicos dimensionado em cerca de US\$ 44 bilhões, tornando-se um importante nicho da indústria farmacêutica (Miotto, 2010).

Porém, sua representatividade na economia brasileira permanece insatisfatória, o que se mostra conflitante em um país de grande potencial em biodiversidade e excelentes condições ambientais, onde é possível adaptar inúmeras espécies vegetais (Zuanazzi e Mayorga, 2010).

O objetivo deste trabalho foi o de analisar o desempenho dos insumos farmacêuticos vegetais na balança comercial brasileira e, à luz dos dados obtidos, identificar os principais elementos que vêm promovendo tal comportamento. Deve-se salientar que uma contribuição primordial deste trabalho foi de fornecer dados quantitativos sobre uma atividade econômica nacional para a qual existem muitos poucos trabalhos que os sistematizem, restrição observada inclusive pela própria Associação Brasileira de Empresas do Setor Fitoterápico (Abifisa, 2015).

Além desta introdução, o presente artigo é composto por mais quatro itens. No primeiro são apresentadas as principais iniciativas governamentais no que tange às políticas públicas e aspectos regulatórios brasileiros nos últimos anos, elementos absolutamente essenciais no que tange ao desempenho da indústria de fitoterápicos. O segundo item ressalta os métodos adotados. O terceiro, resultados e discussão, discorre sobre os principais elementos que vêm condicionando o comportamento da balança comercial de insumos farmacêuticos vegetais, nomeadamente, perfil produtivo, P&D e aparato regulatório. O quarto e último item apresenta as considerações finais.

Referencial Normativo

Assistiu-se no Brasil nos anos 2000 a mudanças significativas no que tange ao papel do Estado

enquanto formulador de políticas e estratégias de desenvolvimento nacional. As novas orientações concretizaram-se num conjunto de ações governamentais que buscaram reforçar a estrutura produtiva e inovativa do tecido industrial brasileiro em geral, e das indústrias da saúde em particular.

No âmbito dos fitoterápicos, saliente-se a atuação do Ministério da Saúde. Em 2006 foi instituída a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS (PNIC), a fim de estimular e promover o acesso da população a serviços de oferta à saúde (Brasil, 2006a). Tal política propôs a inclusão de plantas medicinais e fitoterápicos entre outras práticas médicas complementares como opções terapêuticas no Sistema Único de Saúde. A inclusão de 12 medicamentos fitoterápicos na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) disponíveis no SUS (Espinheira-santa, Guaco, Alcachofra, Aroeira, Cáscara-sagrada, Garra-do-diabo, Isoflavona-de-soja, Unha-de-gato, Hortelã, Babosa, Salgueiro, Plantago) ocorreu em 2007 (Brasil, 2012).

Também em 2006 foi aprovada a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos (PNPMF), uma das mais impactantes normatizações do setor. A mesma estabelece diretrizes em torno de objetivos voltados à garantia de acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, contemplando desde a minimização da dependência tecnológica até melhoria de atenção à saúde, uso sustentável da biodiversidade, fortalecimento das cadeias e arranjos produtivos, geração de emprego e renda, desenvolvimento industrial e tecnológico, perspectiva de inclusão social e regional e participação popular (Brasil, 2006b).

Em 2008 foi aprovado o Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos e o Comitê Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos, com o objetivo de regular a produção, uso e distribuição

das plantas medicinais afim de “garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional” (Brasil, 2008). O Comitê, composto por 26 representantes e respectivos suplentes e coordenado pelo Ministério da Saúde através da Secretaria de Ciência e Tecnologia e Insumos Estratégicos, tem como função monitorar e avaliar o Programa.

Em 2009 foi divulgada a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), contemplando 71 plantas medicinais indicadas para uso terapêutico da população, que tem como finalidade nortear estudos e pesquisas em plantas medicinais que apresentam potencial para gerar produtos de interesse ao SUS, com o intuito de desenvolvimento e inovação na área de plantas medicinais e fitoterápicos (Brasil, 2009).

Em 2010, por meio da Portaria nº 886, o Ministério da Saúde instituiu no âmbito do SUS a Farmácia Viva, que tem como atribuições realizar todas as etapas, iniciando pelo cultivo, abrangendo a coleta, o processamento, o armazenamento de plantas medicinais, a manipulação e a dispensação de preparações magistrais e oficinais de plantas medicinais e produtos fitoterápicos (Batista e Valença, 2012).

Em 2012, o Ministério da Saúde publicou nos Cadernos de Atenção Básica “Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica”, no qual se destaca o caráter estratégico da oferta de ações e serviços de fitoterapia na atenção básica (Batista e Valença, 2012).

No âmbito da ANVISA, a RDC nº 17 de 2010 estabeleceu os requisitos mínimos a serem seguidos na fabricação de medicamentos para padronizar a verificação do cumprimento das Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos (BPF) de uso humano

durante as inspeções sanitárias (Brasil, 2010a). Em 2010, considerando os diversos assuntos que são pertinentes à agência, a Coordenação de Fitoterápicos, Dinamizados e Notificados (COFID), elaborou um consolidado o qual disponibiliza as normas mais utilizadas no registro ou notificação dos medicamentos fitoterápicos (Brasil, 2010b).

Por sua vez, a RDC nº 18 de 2013, dispôs sobre as boas práticas de processamento e armazenamento de plantas medicinais, preparação e dispensação de produtos magistrais e oficinais de plantas medicinais e fitoterápicos em farmácias vivas no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) (Brasil, 2013).

Já a RDC nº 26 de 2014 definiu as categorias de medicamento fitoterápico e produto tradicional fitoterápico e estabeleceu os requisitos mínimos para o registro e renovação de registro de medicamento fitoterápico, e para o registro, renovação de registro e notificação de produto tradicional fitoterápico (Brasil, 2014). Medicamentos fitoterápicos são aqueles cuja segurança e eficácia estão baseadas em evidências clínicas, e produtos tradicionais fitoterápicos são aqueles cuja segurança e efetividade estão fundamentadas na tradicionalidade de uso por período mínimo de 30 anos, concebidos para serem utilizados sem necessidade de supervisão médica, em condições clínicas brandas (Brasil, 2014).

Outra novidade da regulação é a possibilidade da notificação para os fitoterápicos previstos no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira e que possuam monografia específica de controle da qualidade publicada em farmacopeia reconhecida pela ANVISA. A notificação possibilita a imediata fabricação, importação ou comercialização do produto (COFID, 2015).

Este conjunto de medidas reflete o crescente interesse do ponto de vista governamental em estabelecer

estratégias que visam promover o acesso aos fitoterápicos bem como o desenvolvimento produtivo e inovativo da indústria de fitoterápicos.

Materiais e Métodos

Para elaboração deste artigo foram adotadas três abordagens metodológicas principais.

Para a pesquisa bibliográfica, que serviu de base para o desenvolvimento deste trabalho, foi efetuado criterioso levantamento da literatura científica a partir da compilação de trabalhos publicados em revistas, livros especializados e artigos integrados nas bases de dados LILACS e Medline, além de documentos e relatórios oficiais, legislação, teses e dissertações.

Para a coleta dos dados referentes ao comércio exterior foi utilizado o Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior via Internet (ALICEweb, 2015) que é um sistema online desenvolvido pelo Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (2015) visando o acesso aos dados de comércio exterior do Brasil. Realizou-se então uma coleta abrangendo o período de 01 de janeiro de 2002 a 31 de dezembro de 2014.

Para proceder à pesquisa utilizou-se a Nomenclatura Comum do MERCOSUL (NCM), que se trata de uma numeração adotada pelo governo brasileiro para identificar a natureza das mercadorias e facilitar a coleta e análise das estatísticas do comércio exterior. Foram contemplados na investigação os seguintes códigos de NCM:

12.11- plantas, partes de plantas, sementes e frutos, das espécies utilizadas principalmente em perfumaria, medicina ou como inseticidas, parasiticidas e semelhantes, frescos ou secos, mesmo cortados, triturados ou em pó.

13.02- insumos utilizados na produção de medicamentos fitoterápicos, respectivamente, capítulos 12 (Sementes e frutos oleaginosos; grãos, sementes e frutos diversos; plantas industriais ou medicinais; palhas e forragens) e 13 (Gomas, resinas e outros sucos e extratos vegetais).

Deve-se salientar que a principal limitação na coleta de dados residiu na dificuldade para dimensionar a evolução de alguns produtos em particular, tais como planta medicinal *in natura*, sucos e extratos, princípios ativos e medicamentos advindos de plantas medicinais, devido à existência de categorias bastante genéricas na atual NCM, aspecto já mencionado por Rodrigues e Nogueira (2008). Por exemplo, algumas matérias vegetais, tais como raízes de Ginseng (código n. 1211.20.00) possuem uma nomenclatura (NMC) específica, enquanto que outras plantas como ipecacuanha (*Cephaelis ipecacuanha*) e fava-d'anta (*Dimorphandra mollis*) estão incluídas no código 1211.90.90, que corresponde a outras (plantas e partes, para perfumaria, medicina e semelhantes), que dificulta uma análise pontual de um determinado insumo, caso ele não tenha sido discriminado em uma subposição.

No âmbito do tratamento dos dados, os mesmos foram organizados e tabulados em planilha utilizando o software Microsoft® Excel e, em seguida, agrupados de acordo com as posições (12.11 e 13.02). Para facilitar a análise dos resultados, estes foram transformados em **FIGURAS**.

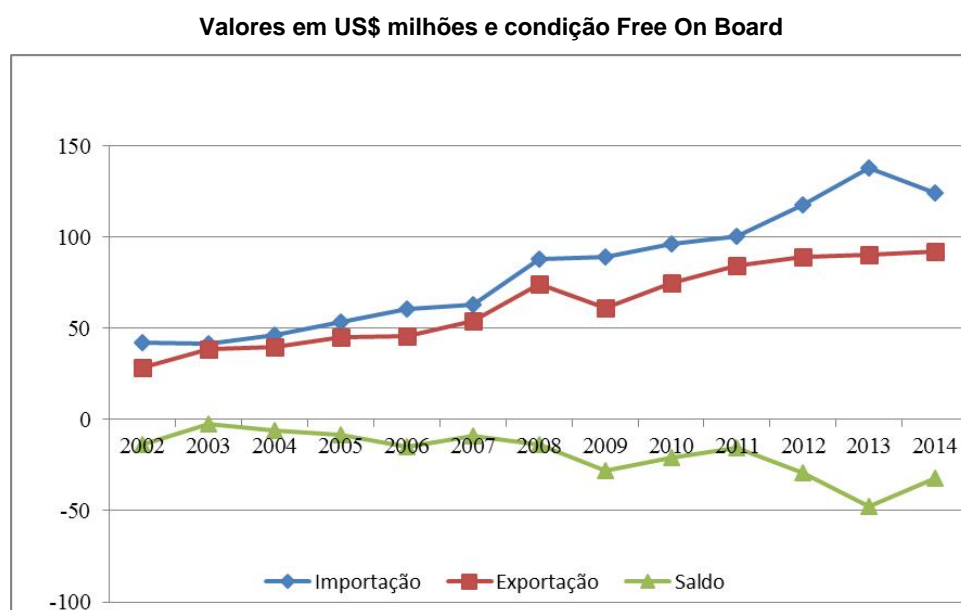
Resultados e Discussão

O mercado mundial de medicamentos fitoterápicos movimentou cerca de US\$ 44 bilhões por ano, sendo a Alemanha considerada o país líder desta indústria, seguida da França e Itália. No Brasil não existem dados oficiais acerca do tamanho deste mercado, mas estima-se que varie entre US\$ 350 milhões e US\$ 550 milhões (Miotto, 2010). Tal estimativa

evidencia um mercado nacional relativamente pequeno, ao se considerar que representa apenas 3% do mercado farmacêutico brasileiro que é o sexto maior do mundo, em um país com uma biodiversidade ímpar (Velani, 2013). No entanto, vem apresentando taxas de crescimento superiores a 10% a.a. (Gadelha, 2010) e um comércio exterior em ascensão. De 2012 a 2013, por exemplo, as vendas

no mercado brasileiro apresentaram taxa de crescimento de 12%, mesmo percentual dos dois anos anteriores (Valécio, 2014).

A **FIGURA 1** apresenta a evolução do comércio exterior brasileiro de insumos farmacêuticos vegetais de 2002 a 2014.



Fonte: Elaboração própria a partir de levantamento efetuado no Sistema ALICEWeb, 2015, (SECEX/MDIC).

FIGURA 1. Evolução do comércio exterior de insumos farmacêuticos vegetais na posição 12.11 e 13.02, 2002-2014

No período considerado, as exportações tiveram um aumento de 222%, enquanto que as importações cresceram aproximadamente 227%, o que representou um déficit comercial de 2002 a 2014. Em 2014, o déficit comercial foi de US\$ 32 milhões. Ambas as categorias apresentaram uma tendência crescente no período, com duas flutuações mais significativas: uma queda das exportações e das importações de 2008 a 2009, em função da crise mundial, e uma queda das importações de 2013 para 2014, que correspondeu ao baixo desempenho da economia brasileira e já sinalizava a crise atual.

O crescimento das exportações por sua vez, reflete um aumento do mercado consumidor exterior, principalmente da Europa onde se concentra 50% do mercado global de fitoterápicos, sobretudo da Alemanha, que é o atual maior produtor de medicamentos fitoterápicos no mundo (Ribeiro e Scaramuzzo, 2009).

Em relação ao consumo, cerca de 80% da população europeia consome medicamentos fitoterápicos e, na Ásia, esse percentual é de mais de 40% (Global Industry Analysts, 2011). Na Austrália e nos EUA, por exemplo, quase metade da população utiliza

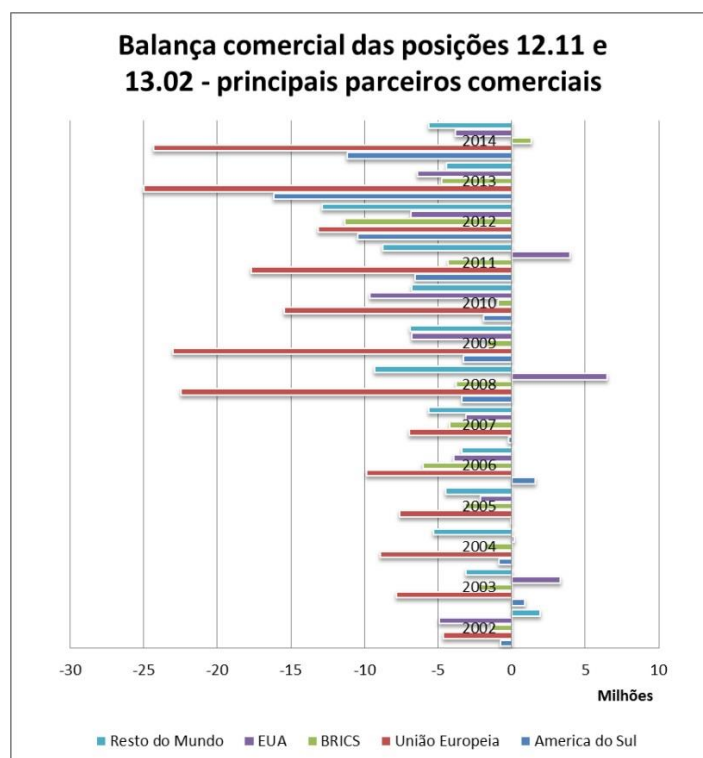
tratamentos não convencionais, incluindo a fitoterapia. No Brasil, entretanto, apesar do crescimento registrado nos últimos anos, estima-se que apenas 10% das pessoas consumam esse tipo de produto. Isso se explica tanto pelo fato de o mercado brasileiro de fitoterápicos ainda ser recente em comparação aos europeus e asiáticos que consomem o produto há muitos anos, como pela pouca credibilidade dos medicamentos fitoterápicos pela população e pelos médicos prescritores.

Estes dados corroboram os apresentados por Rodrigues e Nogueira (2008) que ao analisarem a cadeia produtiva das plantas medicinais no Brasil entre 1996-2006 observaram aumento do déficit comercial em 55,2%, bem como reforçam os achados de Mota, Cassiolato e Gadelha (2012) relativamente

à evolução do comércio exterior de insumos farmacêuticos. Em ambos os casos fica evidente a situação de dependência externa do país em relação não apenas aos insumos farmacêuticos (produtos químicos orgânicos), mas também frente a produtos acabados fabricados no exterior (produtos farmacêuticos). A rigor, esta dependência reflete uma base endógena de inovação extremamente frágil, não apenas em fitoterápicos, mas em relação a toda a indústria farmacêutica nacional (Gadelha, Maldonado e Costa, 2012).

Esta situação fica ainda mais evidente ao se analisar a evolução do saldo comercial de 2002 a 2014 por principais parceiros comerciais, conforme é apresentado na **FIGURA 2**.

Valores em US\$ milhões e condição Free On Board



Fonte: Elaboração própria a partir de levantamento efetuado no Sistema ALICEWeb, 2015, (SECEX/MDIC).

FIGURA 2. Balança comercial de insumos farmacêuticos vegetais na posição 12.11 e 13.02: principais parceiros comerciais, 2002-2014

Diversas são as causas que conduzem a esta situação. No que tange à estrutura produtiva, o cultivo de plantas medicinais no Brasil está relacionado à agricultura familiar, ou seja, é feito em pequenas propriedades rurais. O país não tem uma infraestrutura adequada de cultivo e processamento das plantas. Se a planta não for bem cultivada e se o extrato não for bem preparado, a indústria não pode usá-lo, privilegiando o produto importado. Atualmente, 80% dos extratos utilizados pela indústria na fabricação de medicamentos provêm do exterior (Marçal, 2011).

De um modo geral, os produtores têm baixo índice de associativismo, falta de assistência técnica, baixa produtividade, ausência de infraestrutura, carência de linhas de crédito, condições precárias para o escoamento da produção e pouco poder de barganha na hora da comercialização. Os agricultores mais isolados têm grandes problemas para escoar sua produção e, mesmo os que possuem certificação de produção orgânica, devido à falta de um local exclusivo para esse tipo de produto, vendem seus produtos junto com os agricultores convencionais. Estes fatores contribuem para transformar esta atividade pouco atrativa e economicamente pouco viável (Ricardo, 2009).

A produção de plantas medicinais se estende desde a produção até o empacotamento, extração de óleo essencial, indústrias de alimentos e bebidas, de cosméticos, de fitoterápicos, corantes, entre outros. Deve-se ainda ressaltar, que por falta de desenvolvimento de ações integradas com o objetivo de agregação de valor, a produção destes agricultores é quase toda transferida *in natura* para a etapa seguinte da cadeia de valor, isto é, transformação do produto. O Estado de São Paulo é considerado o grande centro de comercialização e um grande consumidor de plantas medicinais, tanto pelos consumidores finais de plantas secas, quanto pelas

indústrias processadoras/laboratórios que estão, em sua maioria, nele localizados (Corrêa e Alves, 2008).

A indústria brasileira de fitoterápicos é constituída por um grande número de empresas, mais de centena e meia, de tamanho variado, de capital estrangeiro e nacional, mais voltadas para a produção de medicamentos acabados, do que de insumos (Torres, 2013). Hasenclever (2009), ao destacar o alto grau de concentração nesta indústria, salienta a baixa propensão das empresas em investir em P&D. Esta perspectiva é reforçada, segundo a autora, pela fraca e descontínua interação com instituições de pesquisa, no perfil dos produtos comercializados - os baseados em plantas nativas estão fundamentados apenas no uso popular e os de origem exótica tiveram pesquisas para comprovação de sua segurança e eficácia realizadas em seus países de origem – e do número reduzido de patentes por empresas brasileiras o que, mais uma vez, privilegia a importação de insumos.

A baixa propensão em investimentos em P&D no país é decorrente ainda das dificuldades impostas pela Medida Provisória n° 2186 de 2001 que objetivou coibir a biopirataria. A mesma criou no âmbito do Ministério do Meio Ambiente o Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN), órgão normativo e deliberativo responsável pela avaliação dos projetos de pesquisa que envolve acesso ao patrimônio genético e ao conhecimento tradicional associado para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico (Silva e Spindola, 2011). A instituição que está interessada em pesquisar e utilizar ativos da biodiversidade brasileira em seus estudos deverá providenciar a documentação necessária antes de iniciar às pesquisas, e solicitar a autorização junto aos órgãos competentes. O principal problema relacionado ao CGEN advém da dificuldade em se regulamentar a repartição dos benefícios gerados, tanto com base no acesso aos recursos genéticos quanto nos conhecimentos tradicionais sobre propriedades de

animais e plantas (Saccaro e Nilo 2011). Segundo vários críticos, esta questão burocratizou e tolheu a pesquisa de produtos naturais por pesquisadores brasileiros, restringindo o desenvolvimento da fitoterapia no país (Palma e Palma, 2012).

Na última década do século passado e primeiros anos do atual, houve grandes avanços na pesquisa de fitoterápicos no país, com crescente interesse da indústria. Depois, com as dificuldades de acesso ao patrimônio genético brasileiro, ocorreu um retrocesso e desestimulou a atividade de pesquisa, já que muitas empresas têm dificuldades em atender às normas do CGEN. Vários projetos em desenvolvimento em parceria entre institutos públicos e empresas foram descontinuados e, de um modo geral, as pesquisas acadêmicas prevalentes não têm direcionamento para o sistema produtivo (Biodiversidade Brasileira, 2014). Com isso, as empresas têm preferido trabalhar com medicamentos preparados com espécies exóticas adaptadas. Até hoje, só um fitoterápico baseado na flora brasileira foi desenvolvido em território nacional. Trata-se do anti-inflamatório Acheflan do laboratório Aché (Mito, 2010).

No que se refere aos aspectos legais, como consequência da publicação da RDC 17 de 2010, que trouxe novos critérios para o registro dos medicamentos fitoterápicos, parte importante das empresas tem dificuldade de se adequar às exigências das novas regulamentações da ANVISA. Neste sentido, Carvalho, Perfeito e Silva (2011) apontam que das solicitações de registro de fitoterápicos de 2005 a 2010, 45% foram indeferidas. Entre as razões salienta-se o não cumprimento das exigências determinadas pela ANVISA, bem como a ausência de comprovação de qualidade, segundo requisitos da legislação sanitária brasileira. Desta forma, as empresas brasileiras vêm sendo obrigadas a ampliar sua importação de matérias-primas com o consequente aumento em seus custos de fabricação (ANVISA, 2006).

Outro problema é a falta de padronização da matéria-prima e a qualidade da mesma. Existem muitos produtos com nomes iguais, mas de espécies diferentes. Composições químicas diferentes possuem efeitos farmacológicos distintos. Nesta perspectiva a Embrapa assinou convênio com a Universidade do Mississippi, EUA, em 2010, justamente para padronizar os extratos de plantas, além de descobrir novos compostos químicos e fármacos no Cerrado e na Caatinga. A parceria visa ainda desenvolver métodos para autenticar e padronizar os fitoterápicos, além de fornecer dados de manejo adequado. Acredita-se que ao se tomar medidas para estabelecer normas de cultivo e processamento de plantas medicinais, ocorrerão melhoras na qualidade dos fitoterápicos (EMPRAPA, 2010). Para Alves e colaboradores (2008), a qualidade dos insumos tem obrigado o país a importá-los e a fazê-lo anualmente em maiores proporções, uma vez que a demanda no segmento de fitoterápicos vem aumentando. A indústria produtora brasileira de fitoterápicos tem tido dificuldade em se adequar aos padrões de produção e qualidade, dentro de suas próprias regulamentações e normatizações, dificultando assim o acesso a insumos ou matérias primas de qualidade para produção em escala industrial.

Conclusão

Em fitoterápicos, o Brasil tem grande potencial de se tornar um polo de plantas medicinais no mundo, se colocando no mercado farmacêutico de substâncias processadas de alto valor agregado e não apenas servindo como mero fornecedor de matéria-prima. O país dispõe de grande biodiversidade, o que significa matéria-prima abundante, além de possuir produção científica, profissionais capacitados, órgãos públicos e privados com competência e recursos técnicos e financeiros, base produtiva, políticas públicas para a área, aparato regulatório, entre outros elementos sistêmicos fundamentais à inovação. Todavia, o Brasil

ainda não conseguiu desenvolver uma indústria fitoterápica forte e competitiva, sendo grande importador de insumos e de produtos acabados.

A saúde, conforme expresso por Gadelha (2003) comporta duas dimensões essenciais: a social e a econômica. A primeira constitui um valor humano e um direito de cidadania, garantido na Constituição Federal de 1988. A dimensão econômica leva em conta que todos os produtos e serviços da saúde são gerados a partir de uma base produtiva, pública e privada.

Sob este olhar, a saúde constitui-se em espaço de tensão e de negociação entre os interesses sanitários e econômicos, coletivos e privados, evidenciando-se a necessidade de atuação do Estado no que se relaciona à mediação e acomodação entre a dimensão econômica, vinculada ao processo de inovação, de acumulação e de eficiência econômica, e a dimensão socio sanitária, vinculada aos interesses da população e à equidade, a partir da compreensão da saúde como direito de cidadania.

Entretanto, assiste-se claramente a uma não convergência de interesses entre as duas dimensões no campo dos fitoterápicos. Por um lado, a legislação brasileira vem reforçando os critérios de segurança e eficácia que validem cientificamente os medicamentos fitoterápicos ao estabelecer requisitos para o seu registro. Por outro, em função do perfil da estrutura produtiva desta indústria no Brasil, as normas reguladoras acabam funcionando como barreiras à produção e desenvolvimento de novos produtos, uma vez que para a obtenção de registro de um medicamento fitoterápico, é necessária a realização de diferentes testes para validação com a finalidade de garantir a segurança e a eficácia na utilização e na qualidade do produto. Para grande parte das empresas, os custos de validação que passam por etapas que vão desde a bioprospecção até os testes pré-clínicos e clínicos representam sérios obstáculos.

Relativamente à legislação sobre o acesso ao patrimônio genético, a mesma vem sofrendo diversas críticas por pesquisadores, empresários e mesmo autoridades, no sentido de que o marco legal atual não favorece estudos e desenvolvimento de produtos com plantas nativas, além de não coibir a biopirataria.

Crescentes restrições sanitárias e de acesso à biodiversidade brasileira acabam privilegiando, de algum modo, a inclusão no mercado nacional de insumos e plantas medicinais consideradas exóticas, uma vez que a maioria dos trabalhos de referência na literatura, não contemplam estudos clínicos de plantas nativas utilizadas na medicina popular. Ao mesmo tempo, vêm justificando crescentes déficits comerciais de insumos farmacêuticos vegetais.

Impõe-se, portanto uma atuação qualificada do Estado no sentido da adoção de ações que estabeleçam um adequado *trade-off* entre as dimensões social e econômica, isto é, algum tipo de flexibilização no marco regulatório que priorize a segurança e a eficácia dos fitoterápicos e, ao mesmo tempo, promova o desenvolvimento da indústria nacional. Ademais, tal atuação deve necessariamente envolver a adoção de visões sistêmicas que levem em conta as diferentes dimensões da criação/reforço de vantagens competitivas das empresas – industrial, tecnológica, comércio exterior, recursos humanos, tributária, entre outras.

Deve-se mencionar que as atividades produtivas da saúde compartilham entre si alto grau de inovação e apresentam elevado dinamismo em termos de taxa de crescimento e de competitividade. Neste sentido, constituem um espaço no qual se geram oportunidades de investimento, renda, emprego e inovação, ou seja, é um *locus* essencial de desenvolvimento econômico. Dessa forma, o Brasil poderia se apropriar da fitoterapia como uma grande oportunidade de desenvolvimento nacional, considerando todos os aspectos naturais e culturais que o beneficiariam, tornando-se um dos maiores

produtores nesta indústria. Entretanto, políticas e normativas que se debruçam sobre o país impedem o alcance de um desempenho econômico e inovativo da fitoterapia no país mais efetivo.

Sugere-se, portanto, a partir desta reflexão a necessidade do desenvolvimento de políticas públicas para o estímulo da produção dos insumos farmacêuticos vegetais de alto valor agregado e a adoção de estratégias para o fortalecimento da sua base produtiva, além da já mencionada necessidade de flexibilização nos marcos regulatórios explanados de maneira que priorizem a segurança e a qualidade dos fitoterápicos provenientes destes insumos.

Referências

ABIFISA 2015. Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde. Disponível em <<http://www.abifisa.org.br>>. Acesso 09 ago. 2015.

ALICEweb 2015. SECRETARIA DE COMÉRCIO EXTERIOR, MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR. 2015. Sistema de análise das informações de comércio exterior via Internet. Disponível em <<http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/>> Acesso 04 de abr. 2015.

ANVISA 2006. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Pharmaceutical input. Revista Saúde Pública, v.40, n. 2, p. 369-60. Disponível em <<http://www.scielo.br/pdf/rsp/v40n2/28546.pdf>>. Acesso 02 abr. 2013.

ALVES, N.D.C.; SANTOS, T.C.; RODRIGUES C.R.; SANTOS, T. C.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C.; LIRA, L. M.; DORNELAS, C. B.; CABRAL, L. M. 2008. Assessment of the technical adequacy of phytotherapeutics and officinal medicine

manufacturers in the State of Rio de Janeiro. *Ciência & Saúde Coletiva*, v.13(Sup), p. 745-753.

BATISTA, L.; VALENÇA, A. 2012. A Fitoterapia no Âmbito da Atenção Básica no SUS: Realidades e Perspectivas. Disponível em <<http://revista.uepb.edu.br/index.php/pboci/article/viewFile/1604/848> 2012>. Acesso 10 set. 2015.

BIODIVERSIDADE BRASILEIRA. 2014. Especial Fitoterápico. Ano XXI, nº 256. Disponível em <<http://issuu.com/guidafarmacia/docs/especialfito/23?e=3957405/10579617>>. Acesso 10 set. 2015.

BRASIL 2006a. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria nº 971, de 3 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 4 mai. 2006. Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/portari_afito.pdf >. Acesso 02 set. 2013.

BRASIL 2006b. Ministério da Saúde. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 22 jun.2006. Disponível em <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/decretofitoterapicos.pdf>> Acesso 02 abr. 2013.

BRASIL 2008. Portaria Interministerial nº 2.960. Aprova o Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos e cria o Comitê Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 10 dez. 2008. Seção 1, nº 240, p. 56.

BRASIL 2009. Ministério da Saúde. Direção de Administração e Finanças. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. RENISUS - Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS. 2009. 1p. Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENI_SUS.pdf>. Acesso 02 abr. 2013.

- BRASIL 2010a. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 17, de abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. Disponível em <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/sau-delegis/anvisa/2010/res0017_16_04_2010.html>. Acesso 02 abr. 2013.
- BRASIL 2010b. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consolidado de normas da COFID Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2009/pdf/051109_normas.pdf>. Acesso 02 abr. 2013.
- BRASIL 2012. Ministério da Saúde. Portaria GM/MS nº 533, de 28 de março de 2012. Estabelece o elenco de medicamentos e insumos da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS).
- BRASIL 2013. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO-RDC Nº 14, DE 14 DE MARÇO DE 2013. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Insumos Farmacêuticos Ativos de Origem Vegetal.. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 14. mar. 2013.
- BRASIL 2014. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 26, de 13 de maio de 2014. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Published in DOU 14.05.2014.
- CARVALHO, A.C.B.; PERFEITO J.P.S.; SILVA L.V.C. 2011. Regulation of herbal medicines in Brazil: advances and perspectives. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 47(3), p. 467-473.
- COFID 2015. Orientação sobre a Notificação Simplificada de Produto Tradicional Fitoterápico (PTF). ANVISA. Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/9b3b5b80482293e390d7b5bdc15bfe28/Notifica%C3%A7%C3%A3o+de+PTF.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso 10 set. 2015.
- CORRÊA, C.; ALVES, A. 2008. *Plantas medicinais como alternativa de negócios: caracterização e importância*. XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural. Disponível em <http://www.sober.org.br/palestra/9/418.pdf>.
- EMBRAPA 2010. Convênio entre Brasil e Estados Unidos busca avanços em pesquisas com fitoterápicos. Disponível em <<http://www.cnpma.embrapa.br/nova/mostra2.php3?id=595>>. Acesso 10 set. 2015.
- GADELHA, C.A.G. 2003. O complexo industrial da saúde e a necessidade de um enfoque dinâmico na economia da saúde. *Ciência e Saúde Coletiva*, v.8, n.2, p.521-535.
- GADELHA, C.A.G. 2006. Desenvolvimento, complexo industrial da saúde e política industrial. *Revista de Saúde Pública*; v.40, n. p.11-23.
- GADELHA, C.A.G.; MALDONADO, J. 2008. *O papel da inovação na indústria farmacêutica: uma janela de oportunidade no âmbito do complexo industrial da saúde*. In: BUSS, P.M., CARVALHEIRO, J.R.; CASAS, C.P.R. Medicamentos no Brasil: inovação e acesso, 1.ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz.
- GADELHA, C.A.G. 2010. O Complexo Econômico-Industrial da Saúde. *Informe CEIS*, Rio de Janeiro, n. 1, ano I, ago. 2010.
- GADELHA, C.A.G.; MALDONADO, J.M.S.V.; COSTA, L.S. 2012. *O complexo produtivo da saúde e sua relação com o desenvolvimento: um olhar sobre a dinâmica da inovação em saúde*. IN: GIOVANELLA, L. ESCOREL, S.; LOBATO, L. V. C.; NORONHA, J. C.; CARVALHO, A. I. Políticas e Sistemas de Saúde no Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz.
- GIA 2011. Herbal supplements and remedies: a global strategic business report. Global Industry

- Analysts; Disponível em <<http://www.companiesandmarkets.com/Market-Report/herbal-supplements-and-remedies-a-global-strategic-business-report-524533.asp>> Acesso 04 de abr. 2014.
- HASENCLEVER, L. 2009. *Diagnóstico dos desafios e oportunidades no mercado de Plantas Medicinais e Fitoterápicos brasileiro*. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos - CGEE. Ciência, Tecnologia e Inovação. Resumo Executivo.
- MARÇAL, T. 2011. A vez dos fitoterápicos. *Revista Herbarium*. Disponível em <<http://www.revistaherbarium.com.br/?p=203>>. Acesso 04 de abr. 2014.
- MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR. 2015. Comércio Exterior. Códigos e Descrições - NCM. Disponível em <<http://www.mdic.gov.br/portalmdic/sitio/interna/interna.php?area=5&menu=1095&refr=605>> Acesso 04 de abr. 2015.
- MIOTO, R. 2010. País deixa de gerar 5 bilhões por ano com fitoterápicos. *Folha UOL*, 7 de Junho de 2010. Disponível em <<http://www1.folha.uol.com.br/ciencia/746386-pais-deixa-de-gerar-us-5-bi-por-ano-com-fitoterapicos.shtml>>. Acesso 04 de jul. 2015.
- MOTA, F.B.; CASSIOLATO, J.E.; GADELHA, C.A.G. 2012. Articulação da indústria farmacêutica brasileira com o exterior: há evidências de especialização regressiva?. *Cadernos de Saúde Pública*, v.28, n.3, p. 527-536.
- PALMA, C.; PALMA, M. 2012. Bioprospecção no Brasil: análise crítica de alguns conceitos. *Ciência e Cultura*, v.64, n° 3. Disponível em <http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?pid=S0009-67252012000300009&script=sci_arttext>. Acesso 17 de jul. 2015.
- QUEIROZ, S. 2011. Obstáculos ao investimento em P&D de empresas estrangeiras no Brasil. *Revista USP*, n.89, p. 244-255.
- REUTERS 2002. Brasil terá primeiro banco de dados de plantas medicinais. Folha Online, Brasil. Disponível em <<http://www1.folha.uol.com.br/folha/reuters/ult112u12329.shtml>> Acesso 17 de jul. 2015.
- RIBEIRO, I.; SCARAMUZZO, M. 2009. *EMS investe para reforçar liderança*. Valor Econômico, São Paulo.
- RICARDO, R. 2009. *Pesquisa incentiva cultivo de plantas medicinais em Vargem Grande*. Faperj. Disponível em <<http://www.faperj.br/?id=1516.2.3>> Acesso 17 de jul. 2015.
- RODRIGUES, W.; NOGUEIRA, J.M. 2008. Competitividade da cadeia produtiva de plantas medicinais no Brasil: uma perspectiva a partir do comércio externo. *Informe GEPEC, Toledo*, v.12, n. 2, p. 91-105.
- SACCARO, J.R.; NILO L. 2011. A regulamentação de acesso a recursos genéticos e repartição de benefícios: disputas dentro e fora do Brasil. *Ambiente & Sociedade*, v.14, n.1, p. 229-244.
- SANTOS, R. L.; GUIMARAES, G.P.; NOBRE, M.S.C.; Portela, A.S. 2011. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*. v.13, n.4, p. 486-491.
- SILVA, F.A.; ESPINDOLA, L.S. 2011. Access legislation on genetic resources patrimony and traditional knowledge. *Revista brasileira de farmacognosia*. v.21, n.1.
- TORRES, K.R. 2013. Os arranjos produtivos locais (APLs) no contexto da implementação da Política e do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Dissertação (Mestrado). Escola

Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz.

VALÉCIO, M. 2014. Fitoterápicos mantêm média de crescimento anual. *Especial Fitoterápicos*. Disponível em <<http://www.guiadafarmacia.com.br/suplementos-especiais/fito/fito-2014>> Acesso 17 de jul. 2015.

VALÉCIO, M. 2015 Setor se mantém descolado da crise. *Guia da Farmácia*. <<http://www.guiadafarmacia.com.br/suplementos-especiais/anuario/anuario-2015/9251-setor-se-mantem-descolado-da-crise>>. Acesso 17 de jul. 2015.

VELANI, E. 2013. Guia da Farmácia. *Fitoterápicos crescer e aparecer*. Disponível em <<http://www.guiadafarmacia.com.br/suplementos-especiais/fito/fito-2013/6025-fitoterapicos-crescer-e-aparecer>>. Acesso 17 de jul. 2015.

YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. 2001. Plantas Mediciniais: Sob a ótica da Química Medicinal Moderna. Chapecó: Argos.

ZUANAZZI, J.A.S.; MAYORGA, P. 2010. Fitoprodutos e Desenvolvimento Econômico. *Química Nova*, v.33, n.6, p.1421-1428.

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

A revista Fitos publica artigos com elevado mérito científico relativos a Plantas Medicinais, que contribuam para os campos temáticos: pesquisa, desenvolvimento e inovação de medicamentos da diversidade vegetal e para estudos e aprofundamentos de temas e disciplinas afins.

A Revista publica trabalhos nas seguintes áreas do conhecimento:

- Agroecologia
- Botânica
- Etnofarmacologia
- Farmacologia
- Inovação (gestão e CTI em saúde)
- Química

Os autores devem ler atentamente as instruções abaixo antes de submeterem seus artigos à Revista Fitos. Na submissão, os autores devem indicar em que área do conhecimento se enquadra seu artigo e **enviar título resumido**, com no máximo 100 caracteres, incluindo os espaços.

1. A REVISTA FITOS aceita trabalhos para as seguintes seções:

1.1 Revisão: revisão crítica da literatura sobre temas pertinentes ao estudo de plantas medicinais; da gestão da inovação e desenvolvimento de medicamentos da biodiversidade brasileira e de temas e disciplinas afins;

1.2 Artigos: resultado de pesquisa de natureza empírica, experimental ou conceitual;

1.3 Comunicação Breve: relatando resultados preliminares de pesquisa, ou ainda resultados de estudos originais que possam ser apresentados de forma sucinta;

1.4 Debate: artigo teórico que se faz acompanhar de cartas críticas assinadas por autores de diferentes instituições, convidados pela equipe editorial, seguidas de resposta do autor do artigo principal;

1.5 Fórum: seção destinada à publicação de 2 a 3 artigos coordenados entre si, de diferentes autores, e versando sobre tema de interesse atual. Os interessados em submeter trabalhos para essa seção devem consultar o Conselho Editorial da Revista Fitos;

1.6 Perspectivas: análises de temas conjunturais, de interesse imediato e sobre a importância das plantas medicinais; da gestão da inovação e desenvolvimento de medicamentos da biodiversidade brasileira e de temas e disciplinas afins, em geral a convite da equipe editorial;

1.7 Questões Metodológicas: artigo completo, cujo foco é a discussão, comparação e avaliação de aspectos metodológicos importantes para o campo, seja na área de desenho de estudos, análise de dados ou métodos qualitativos;

1.8 Resenhas: resenha crítica de livro relacionado aos campos temáticos da REVISTA FITOS, publicado nos últimos dois anos;

1.9 Cartas: crítica a artigo publicado em fascículo anterior da REVISTA FITOS;

2. Diretrizes para autores

2.1 A REVISTA FITOS publica somente artigos inéditos e originais, e que não estejam em avaliação em nenhum outro periódico simultaneamente. Os autores devem declarar essas condições no processo de submissão. Caso seja identificada a publicação ou submissão simultânea em outro periódico o artigo será desconsiderado. A submissão

simultânea de um artigo científico a mais de um periódico constitui grave falta de ética do autor.

2.2 Uma vez aceito, os direitos autorais de todos os artigos, incluindo a sua reprodução por qualquer meio, seja eletrônico ou impresso, pertencerá à Revista Fitos. O autor deverá preencher uma declaração de cessão de direitos autorais enviada pela Revista Fitos.

2.3 Serão aceitas contribuições de artigos escritos em Português, Inglês, Francês ou Espanhol.

2.4 Todos os trabalhos envolvendo estudos em humanos ou animais deverão estar acompanhados dos Pareceres dos Comitês de Ética de Pesquisa em Seres Humanos ou em Animais das instituições a que pertencem os autores, autorizando tais estudos.

2.5 Qualquer conceito emitido nos trabalhos publicados será de responsabilidade exclusiva dos autores.

2.6 Os autores deverão manter uma cópia dos manuscritos em seu poder, em caso de eventual extravio daquele enviado à revista.

2.7 As figuras, tabelas, quadros, estruturas químicas, fotografias, gráficos, desenhos etc. deverão ser inseridas pelos próprios autores nos locais adequados e numeradas consecutivamente em algarismos arábicos. As respectivas legendas deverão ser claras, concisas, sem abreviaturas e localizadas na parte superior das mesmas. As tabelas não podem ser fechadas por linhas laterais.

2.8 Notas de rodapé não serão aceitas.

2.9 Fontes de financiamento

2.9.1 Os autores devem declarar todas as fontes de financiamento ou suporte, institucional ou privado, para a realização do estudo.

2.9.2 Fornecedores de materiais ou equipamentos, gratuitos ou com descontos, também devem ser descritos como fontes de financiamento, incluindo a origem (cidade, estado e país).

2.9.3 No caso de estudos realizados sem recursos financeiros institucionais e/ou privados, os autores devem declarar que a pesquisa não recebeu financiamento para a sua realização.

2.10 Conflito de interesses

2.10.1 Os autores devem informar qualquer potencial conflito de interesse, incluindo interesses políticos e/ou financeiros associados a patentes ou propriedade, provisão de materiais e/ou insumos e equipamentos utilizados no estudo pelos fabricantes.

2.11 Formatação Inicial do Trabalho

2.11.1 Os originais deverão ser redigidos na ortografia oficial e digitados em papel tamanho A4, espaço duplo, fonte tipo Times New Roman, tamanho 12, com texto justificado, margem de 2 cm em cada um dos quatro lados, e perfazendo o total de, no máximo, 20 e, no mínimo, 5 páginas, incluindo figuras, tabelas e quadros.

2.11.2 Título e subtítulo: deverão estar de acordo com o conteúdo do trabalho, levando em conta o âmbito da Revista. Estes deverão estar escritos em negrito com a primeira letra da palavra em maiúscula, fonte tipo Times New Roman, tamanho 14. Deverão também estar em versão para a língua inglesa, com as mesmas características, mas em fonte tamanho 12.

2.11.3 Autores: o primeiro nome de cada autor deve vir abaixo do título, à esquerda. O nome e o último sobrenome devem ser por extenso. Os demais sobrenomes devem conter apenas a primeira letra inicial (ex. José Carlos F. P. Oliveira.). No caso de vários autores, seus nomes deverão ser separados por ponto e vírgula.

2.11.4 Filiação dos autores: antes do nome de cada autor deverá constar um número arábico, sobrescrito, indicando seu local de trabalho, com endereço completo (inclusive CEP) e deverá aparecer logo abaixo dos nomes dos autores, também à esquerda. Deve-se assinalar o nome do autor principal com um asterisco sobrescrito, para o qual toda correspondência deverá ser enviada.

2.11.5 Resumo em português: deverá apresentar concisamente o trabalho, destacando as informações de maior importância, expondo metodologia, resultados e conclusões. Permitirá avaliar o interesse pelo artigo, prescindindo de sua leitura na íntegra. Dever-se-á dar destaque ao Resumo como tópico do trabalho, (máximo de 200 palavras).

2.11.6 Abstract: versão do resumo para a Língua Inglesa. Evitar traduções literais. Quando não houver domínio deste idioma, consultar pessoas qualificadas. Providenciar também versão do título para a língua inglesa.

2.11.7 Palavras-chave: deverão identificar/representar o conteúdo do artigo. Observar o limite máximo de 6 (seis). São importantes para levantamentos em banco de dados, com o objetivo de localizar e valorizar o artigo em questão. Deverão vir separados por ponto e vírgula.

2.12 Formatação do Trabalho

2.12.1 Introdução: deverá estabelecer com clareza o objetivo do trabalho e sua relação com outros trabalhos na mesma área. Extensas revisões da literatura deverão ser substituídas por referências às publicações mais recentes, onde estas revisões tenham sido apresentadas.

2.12.2 Materiais e Métodos: a descrição dos materiais e dos métodos usados deverá ser breve, porém suficientemente clara para possibilitar a perfeita compreensão e a reprodução do trabalho.

Processos e técnicas já publicados, amenos que tenham sido extensamente modificados, deverão ser referenciados por citação.

2.12.3 Resultados: deverão ser apresentados com o mínimo possível de discussão ou interpretação pessoal e, sempre que possível, ser acompanhados de tabelas e figuras adequadas. Os dados, quando pertinentes, deverão ser submetidos a uma análise estatística.

2.12.4 Discussão: deverá ser restrita ao significado dos dados obtidos e resultados alcançados, evitando-se inferências não baseadas nos mesmos. Obs.: Eventualmente, Resultados e Discussão poderão ser apresentados num único item.

2.12.5 Agradecimentos: Possíveis menções em agradecimentos incluem instituições que de alguma forma possibilitaram a realização da pesquisa e/ou pessoas que colaboraram com o estudo, mas que não preencheram os critérios para serem coautores. Este item é opcional e deverá vir antes das Referências.

2.13 Referências: baseadas nas normas da ABNT

2.13.1 Referência dentro do texto:

No início da citação. Nome do(s) autor (es) em caixa baixa, seguido do ano entre parênteses. Ex. 'Pereira (1999) descreveu a atividade ansiolítica de *Lippia alba*'. Quando houver dois autores, deverá obedecer a ordem alfabética dos autores e seguido o seguinte padrão: 'Castro e Silva (1998) analisaram a toxicologia do extrato de *Psidium guajava*'. Para três autores, a regra será semelhante à anterior, separando os dois primeiros autores por meio de vírgula. Por exemplo, 'Amoroso, Costa e Soares (1997) descreveram a propriedade analgésica de toxicologia da *Lippia alba*'. No caso de mais de três autores, deverá ser mencionado apenas o nome do primeiro, seguido de e colaboradores e do ano entre

parênteses. Por exemplo, Silva e colaboradores (1999) confirmaram o efeito broncodilatador de *Mikania glomerata*.

No final da citação. Autor em caixa baixa seguido do ano. Ex. (Silva, 1999). Quando houver dois autores, estes deverão ser separados pela partícula 'e' e ser obedecida a ordem alfabética. Ex. (Castro e Silva, 1998). No caso de três autores, a regra será (Albuquerque, Lima e Sousa, 2000). Quando houver mais de três autores, deverá ser mencionado apenas o nome do primeiro, seguido de et al. e do ano. Por exemplo, (Silva et al., 1999) ou (Silva et al., 1995a,b).

2.13.2 Citação textual: colocar, também, a página. Ex. (Silva, 1999, p.24)

2.13.3 As Referências no final do artigo deverão ser ordenadas alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, em caixa baixa e em ordem crescente de data de publicação, com o ano de publicação sempre após o nome do último autor. Devem-se levar em consideração as seguintes ocorrências:

2.13.3.1 Livro com um autor:

Autor, ano, título do livro em itálico, editora, cidade.

COSTA, A.F. 1996. *Farmacognosia*. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa.

2.13.3.2 Livro com dois ou mais autores:

Autores, ano, título do livro em itálico, editora, cidade.

SANTOS, I.F.; PEREIRA, F.L. 1995. *Criando um Novo Mundo*. Atheneu, São Paulo.

2.13.3.3 Livro editado

Deverão ser citados os nomes de todos os editores ou **organizadores**. Editor(es) ou organizador(es), ano, título do livro em itálico, editora, cidade.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; PALAZZO DE MELO, J.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (org.) 2003. *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*. Editora da UFRGS/Editora da UFSC. Porto Alegre/Florianópolis.

YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B (ed.) 2001. *Plantas Medicinais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna*. Editora Argos. Chapecó.

2.13.3.4 Capítulo de livro:

Autor(es), ano, título do capítulo, editor (ou organizador), título do livro em itálico, páginas inicial e final, editora, cidade.

FURLAN, M.; BERGAMO, D.C.B.; KATO, M.J. 2009. Biossíntese de Produtos Naturais: Atualidades e Perspectivas no Desenvolvimento de Novos Fármacos. In: YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. (org.), *Química de Produtos Naturais: Novos Fármacos e a Moderna Farmacognosia*, p. 83-102. Editora da Universidade do Vale do Itajaí. Itajaí.

2.13.3.5 Tese ou Dissertação:

Autor, ano, título da tese ou dissertação em itálico, nome da Faculdade ou Instituto, nome da Universidade, cidade.

LIMA, N. 1991. *Influência da ação dos raios solares na germinação do nabo selvagem*. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Campinas.

2.13.3.6 Artigo de periódico:

Deverão ser citados os nomes de todos os autores, ano, título do artigo, nome completo do periódico em itálico, volume, página inicial e final.

CARLINI, E.A.; DUARTE-ALMEIDA, J.M.; RODRIGUES, E.; Tabach, R. 2010. Antiulcer effect of

the pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-da-praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão, Anacardiaceae (aroeira-do-sertão). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.20, p.140-146.

2.13.3.7 Citação indireta:

As duas citações devem ser mencionadas de maneira completa, com autor, ano, título do livro ou do periódico.

CARBALLO, S.A. 1995. Plantas medicinales del Escambray cubano. Apuntes científicos. TRAMIL VII. Islã San Andrés, Colômbia. apud GERMOSÉN-ROBINEAU, L. G., (ed) 1996. Farmacopea Vegetal Caribeña, p.127-130. Editions Emile Désormeaux, Fort-de-France, Martinica.

2.13.3.8 Eventos científicos (Congressos, Seminários, Simpósios e outros):

Autor(es). Título do trabalho, ano, nome do evento, nº do evento, identificação do trabalho ou resumo, cidade de realização do evento.

OLIVEIRA, J.P.C.; FERREIRA, E.L.F.; CHAVES, M.H. 2009. Fenóis totais e atividade antioxidante e citotóxica de extratos das folhas de *Lecythis pisonis*. 32ª Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química, PN-003, Fortaleza.

2.13.3.9 Patentes

Devem ser identificadas conforme modelo abaixo. Ichikawa, M.; Ogura, M. e Iijima, T. 1986. Antiallergic flavone glycoside from *Kalanchoe pinnatum*. Jpn. Kokai Tokyo Koho JP 61,118,396, apud Chemical Abstracts 105: 178423q.

2.13.3.10 Leis, Resoluções e demais documentos

BRASIL, 2003. Decreto nº 4.946 de 31 de dezembro de 2003. Altera, revoga e acrescenta dispositivos ao

Decreto no 3.945, de 28 de setembro de 2001, que regulamenta a Medida Provisória no 2.186-16, de 23 de agosto de 2001.

2.13.3.11 Banco/Base de Dados

BIREME. Centro Latino-Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde. Lilacs – Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde. Disponível em: <<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IscScript=iah/iah.xis&base=LILACS&lang=p>>. Acesso em: 27 ago. 2009.

2.13.3.12 Homepage/Website

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO Guidelines for Pharmacological Management of Pandemic (H1N1) 2009 Influenza and other Influenza Viruses. 20 August 2009. 91 p. Disponível em: <http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1_guidelines_pharmaceutical_mngt.pdf>. Acesso 28 ago. 2009.

2.14 Nomenclatura

Devem ser observadas as regras de nomenclatura botânica e zoológica, assim como abreviaturas e convenções adotadas em disciplinas especializadas.

3. Submissão de Artigos

3.1 Os artigos deverão ser encaminhados para submissão através do site <http://revistafitos.far.fiocruz.br/>, com indicação da área do conhecimento à qual o artigo pertence (Agroecologia, Botânica, Etnofarmacologia, Farmacologia, Inovação, Química e Monografia).

3.2 Todos os manuscritos serão submetidos à apreciação de consultores ad hoc, cujos nomes permanecerão em sigilo absoluto, e que dispõem de plena autoridade para decidir sobre a pertinência de

sua aceitação, podendo, inclusive, rerepresentá-los aos autores com sugestões para que sejam feitas as alterações necessárias e/ou para que os mesmos sejam adequados às normas editoriais da Revista. Os trabalhos que não forem selecionados para publicação serão devolvidos aos autores.

3.3 Os artigos aceitos para a publicação deverão ser devolvidos ao Editor Coordenador com as recomendações feitas pelos referees no prazo máximo de dois meses, caso contrário a aceitação do mesmo será cancelada.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

