



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
ESCOLA DE ENFERMAGEM E FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENFERMAGEM



KÁTIA MAYUMI TAKARABE CAFFARO

AVALIAÇÃO BIOLÓGICA *in vitro* DE ESPÉCIES VEGETAIS DA CAATINGA:
Bauhinia cheilantha* E *Lippia gracilis

MACEIÓ

2014

KÁTIA MAYUMI TAKARABE CAFFARO

**AVALIAÇÃO BIOLÓGICA *in vitro* DE ESPÉCIES VEGETAIS DA CAATINGA:
Bauhinia cheilantha E *Lippia gracilis***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Alagoas, como requisito do Programa de Pós-graduação em Enfermagem para obtenção do título de Mestre em Enfermagem.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Maria Lysete de Assis Bastos

Co-orientadora: Prof^ª Dr^ª Eliane Aparecida Campesatto

MACEIÓ

2014

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico Bibliotecária
Bibliotecário: Maria Auxiliadora G. da Cunha

C129a Caffaro, Kátia Mayumi Takarabe.
Avaliação biológica in vitro de espécies vegetais da Caatinga : *Bauhinia cheilantha* E *Lippia gracilis* / Kátia Mayumi Takarabe Caffaro. – 2014.
69 f. : il.

Orientadora: Maria Lysete de Assis Bastos.
Co-orientadora: Eliane Aparecida Campesatto
Dissertação (Mestrado em Enfermagem) – Universidade Federal de Alagoas.
Escola de Enfermagem e Farmácia. Maceió, 2014.

Bibliografia: f. 58-69.

1. *Bauhinia cheilantha*. 2. *Lippia gracilis*. 3. Plantas medicinais. 4. Caatinga.
5. Atividade antimicrobiana. 6. Atividade antioxidante. 7. Enfermagem. I. Título.

CDU: 616-083:633.88

KÁTIA MAYUMI TAKARABE CAFFARO

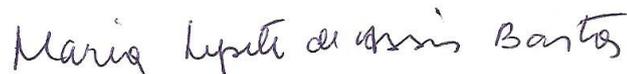
AVALIAÇÃO BIOLÓGICA *in vitro* DE ESPÉCIES VEGETAIS DA CAATINGA:

Bauhinia cheilantha* E *Lippia gracilis

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Alagoas, como requisito do Programa de Pós-graduação em Enfermagem para obtenção do título de Mestre em Enfermagem.

Maceió, 20 de fevereiro de 2014.

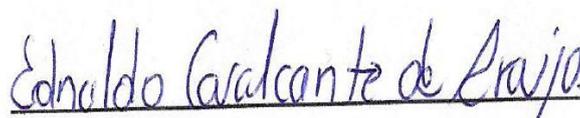
Membros componentes da banca examinadora:



Prof^a Dr^a Maria Lysete de Assis Bastos – UFAL (Orientadora)



Prof^a Dr^a Eliane Aparecida Camposatto – UFAL (Co-orientadora)



Prof. Dr. Edinaldo Cavalcante de Araújo - UFPE (Membro externo)



Prof. Dr. Paulo Vitor Farago - UEPG (Membro externo)

Dedico esse trabalho a todos àqueles que buscam a arte de uma ciência ética, liberta de alienação, que seja capaz de transformar a sociedade, diminuindo as desigualdades sociais, com amor e empatia ao próximo (PRÓPRIA AUTORA, 2013).

AGRADECIMENTOS

A Deus, que renova a minha fé todas as manhãs e me deu o privilégio de alcançar esta etapa.

Ao melhor amigo e companheiro desta vida, Beto, pelo amor incondicional, pela paciência e por cada uma das orientações recebidas.

Às minhas bênçãos mais preciosas, Gabriela e João, por não terem deixado de exigir meu tempo durante esta fase, lembrando-me sempre do que realmente importa nesta vida.

Aos meus pais e irmãos, por vibrarem com esta vitória.

À minha querida orientadora, Lysete Bastos, que ao longo dos grandes desafios desta jornada, tornou-se uma grande amiga.

À minha co-orientadora, Eliane Campesatto, por toda a ajuda e incentivo.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Enfermagem, pela grande oportunidade de aprendizado durante todo o mestrado.

Aos queridos colegas pós-graduandos que muito colaboraram no andamento deste estudo, Cinthia Lima, Jayran Almeida, Jésus Costa, Regina Sales e Valter Alvino, por todos os conselhos, orientações e disponibilidade.

Aos colaboradores e amigos do LpTF e LpQPN, por toda a ajuda durante os ensaios antimicrobianos e antioxidantes e pelos momentos descontraídos, pela amizade e consideração.

Aos pós-graduandos do LaFI e ao mestrando Alex Wanderley, pela valiosa ajuda e perseverança nas várias tentativas durante os ensaios de citotoxicidade.

Ao doutorando Pedro Aquino, pela sua importante ajuda na prospecção fitoquímica.

A pós-doutoranda Adriana Todaro e ao Prof. Dr. Luiz Carlos Caetano, pela execução dos ensaios fitoquímicos na University of London.

Aos professores, Célia Rozendo, Ingrid Lúcio, João Xavier e Lúcia Conserva e ao secretário, Charles Zabala, pela ajuda tão fundamental em importantes etapas desta jornada.

A meus queridos colegas mestrandos da turma de 2012, pela riqueza do aprendizado alcançado, pelos momentos alegres e difíceis que passamos juntos.

À querida Anie Dalboni e aos futuros enfermeiros ingressantes da turma 2.2012, por terem sido alunos tão carinhosos e por todo aprendizado e encorajamento durante o estágio docência.

A minha ajudante Cícera, por seu importante trabalho em casa e na assistência com as crianças, sempre quando precisei.

Ao guia Adalberto Inácio de França pelo auxílio na coleta das amostras no município de Delmiro Gouveia.

À Profª Rosângela Pereira de Lyra Lemos do IMA/AL, pela identificação e catalogação das exsiccatas.

Às agências de fomento CAPES e FAPEAL pela bolsa concedida para a concretização desta pesquisa.

*“... avanço para o que está na minha frente.
Corro direto para a meta a fim de conseguir o
prêmio da vitória...”*

*(Carta de Paulo aos Filipenses 3.13-14, Bíblia
Sagrada – Tradução na Linguagem de Hoje)*

RESUMO

As plantas medicinais vêm se destacando pela sua importância social, cultural e econômica no Brasil, o qual detém a maior biodiversidade do planeta. A Caatinga é o principal ecossistema da região Nordeste e o único bioma exclusivamente brasileiro. Há uma grande diversidade de espécies utilizadas popularmente de forma medicinal em comunidades do semiárido de Alagoas. No entanto, pesquisas que comprovem sua eficácia terapêutica são ainda incipientes. Extratos etanólicos de duas espécies endêmicas da Caatinga, *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud. e *Lippia gracilis* Schauer, conhecidas popularmente como “mororó” e “alecrim-da-chapada”, foram submetidos à ensaios *in vitro* para avaliação de seu potencial antimicrobiano e antioxidante, além da identificação da classe dos constituintes através de prospecção fitoquímica. As cepas bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e a cepa fúngica *Candida albicans* foram utilizadas no método de difusão em Agar e na microdiluição em caldo, o qual determinou a concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos. Para a avaliação da capacidade sequestradora de radicais livres por antioxidantes presentes nos extratos, foi utilizado o método de mensuração da redução do radical sintético 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). Os resultados demonstraram o potencial antioxidante das folhas, casca do caule e caule de *B. cheilantha* e o potencial antimicrobiano das partes aéreas e caule da espécie *L. gracilis*, com valores de CIM menores que constituintes de óleos essenciais de outras espécies de *Lippia* já estudadas, em uma avaliação comparativa. Esses achados podem ser atribuídos à presença de flavonoides, taninos e esteroides e flavonoides e terpenos, respectivamente, evidenciados na prospecção fitoquímica realizada. Os resultados obtidos oferecem suporte ao uso popular de *B. cheilantha* para o tratamento do diabetes e *L. gracilis* para processos infecciosos, e fornecem direção para estudos fitoquímicos que identifiquem os constituintes responsáveis pelas atividades biológicas verificadas.

Palavras-chave: *Bauhinia cheilantha*. *Lippia gracilis*. Plantas medicinais. Caatinga. Atividade antimicrobiana. Atividade antioxidante. Enfermagem.

ABSTRACT

Medicinal plants have been growing in their social, cultural and economic importance in Brazil, which has the greatest biodiversity of the planet. Caatinga is the main ecosystem in the northeastern region and the only biome exclusively Brazilian. There is a great diversity of species popularly used for medicinal purposes in communities in the semiarid region of Alagoas. However, research proving their therapeutic efficacy is still insufficient. Ethanol extracts of two endemic species of the Caatinga, *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud. and *Lippia gracilis* Schauer, known popularly as "mororó" and "alecrim-da-chapada", underwent *in vitro* assays to evaluate its antimicrobial and antioxidant potential, as well as identification of the class of its constituents through phytochemical screening. The bacterial strains *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and the fungal strain *Candida albicans* were used in the Agar diffusion method and broth microdilution, which determined the minimum inhibitory concentration (MIC) of extracts. For the evaluation of the scavenging capacity of antioxidants free radicals present in the extracts, the method of measuring the reduction of the synthetic radical 2,2- diphenyl - 1 - picryl - hidrazila (DPPH) was used. The results demonstrated the antioxidant potential of the leaves, stem bark and stem of *B. cheilantha* and antimicrobial potential of stem and aerial parts of the specie *L. gracilis* with MIC values comparatively lower than essential oils from other species of *Lippia* already studied. These findings can be attributed to the presence of flavonoids, tannins and steroids and flavonoids and terpenes, respectively, detected in phytochemical screening. Results support the popular use of *B. cheilantha* for the treatment of diabetes and *L. gracilis* for infectious processes, and provide direction for phytochemical studies to identify the constituents responsible for the verified biological activities.

Keywords: *Bauhinia cheilantha*. *Lippia gracilis*. Medicinal plants. Caatinga. Antimicrobial activity. Antioxidant activity. Nursing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|------------------|--|-----------|
| Figura 1 | Caatinga nas estações seca e chuvosa (Reserva Natural Serra das Almas)..... | 19 |
| Figura 2 | Partes aéreas da espécie <i>Bauhinia cheilantha</i> (Bongard) Steudel..... | 24 |
| Figura 3 | Partes aéreas da espécie <i>Lippia gracilis</i> Schauer..... | 29 |
| Figura 4 | Município de Delmiro Gouveia, AL..... | 33 |
| Figura 5 | Plantas secas trituradas, maceração e extratos brutos..... | 34 |
| Figura 6 | Fluxograma do preparo dos extratos brutos..... | 35 |
| Figura 7 | Método de difusão em meio sólido a partir de cavidade..... | 38 |
| Figura 8 | Medição dos halos de inibição..... | 39 |
| Figura 9 | Técnica de microdiluição em caldo..... | 40 |
| Figura 10 | Ensaio qualitativo do DPPH..... | 42 |
| Figura 11 | Cromatoplacas dos extratos etanólicos de <i>Bauhinia cheilantha</i> e <i>Lippia gracilis</i> após reação com DPPH..... | 52 |
| Gráfico 1 | Curva do DPPH x absorbância..... | 43 |

LISTA DE QUADROS E TABELAS

| | | |
|-----------------|--|-----------|
| Quadro 1 | Levantamento bibliográfico sobre o uso medicinal de plantas do gênero <i>Bauhinia</i> | 25 |
| Quadro 2 | Levantamento bibliográfico sobre a atividade farmacológica de plantas do gênero <i>Bauhinia</i> | 27 |
| Tabela 1 | Massas das plantas trituradas e dos extratos etanólicos..... | 36 |
| Tabela 2 | Resultado da prospecção fitoquímica de <i>Bauhinia cheilantha</i> e <i>Lippia gracilis</i> | 46 |
| Tabela 3 | Atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos de <i>Bauhinia cheilantha</i> frente a cepas bacterianas e fúngica, avaliados por meio dos métodos de difusão em meio sólido e de microdiluição em caldo..... | 48 |
| Tabela 4 | Atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos de <i>Lippia gracilis</i> frente a cepas bacterianas e fúngica, avaliados por meio dos métodos de difusão em meio sólido e de microdiluição em caldo..... | 50 |
| Tabela 5 | Concentração de DPPH remanescente dos extratos <i>B. cheilantha</i> e <i>L. gracilis</i> em diferentes concentrações..... | 52 |
| Tabela 6 | Atividade dos extratos de <i>B. cheilantha</i> e <i>L. gracilis</i> , frente ao radical DPPH..... | 53 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|----------------------------------|---|
| AcOEt | Acetato de etila |
| AMH | Agar Müller Hinton |
| ASD | Agar Sabraud Dextrose |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| BaSO ₄ | Sulfato de bário |
| BC-C | Extrato etanólico do caule de <i>Bauhinia cheilantha</i> |
| BC-CC | Extrato etanólico da casca do caule de <i>Bauhinia cheilantha</i> |
| BC-F | Extrato etanólico das folhas de <i>Bauhinia cheilantha</i> |
| BHT | Butylated hydroxytoluene (Hidroxitolueno butilado) |
| C ₂ H ₅ OH | Etanol |
| CHCl ₃ | Clorofórmio |
| CI ₅₀ | Concentração de inibidor necessária para inibir 50% de um parâmetro |
| CIM | Concentração inibitória mínima |
| CMH | Caldo Müller Hinton |
| CSR | Capacidade sequestradora de radicais livres |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DPPH | 2,2-difenil-1-picril-hidrazila |
| DPPH _{REM} | DPPH remanescente |
| ESENFAR | Escola de Enfermagem e Farmácia |
| ESF | Estratégia Saúde da Família |
| FDA | Food and Drug Administration |
| ICBS | Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde |
| IQB | Instituto de Química e Biotecnologia |
| LaFI | Laboratório de Farmacologia e Imunologia |
| LG-C | Extrato etanólico do caule de <i>Lippia gracilis</i> |
| LG-PA | Extrato etanólico das partes aéreas de <i>Lippia gracilis</i> |

| | |
|------------|--|
| LPqPN | Laboratório de Pesquisa de Química de Produtos Naturais |
| LpTF | Laboratório de Pesquisa em Tratamento de Feridas |
| Mc Farland | Escala padrão para determinar a intensidade da multiplicação em meios cultivo líquidos |
| MeOH | Metanol |
| MS | Ministério da Saúde |
| PNPIC-SUS | Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS |
| PNPMF | Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos |
| PNPMF | Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos |
| q.s.p. | quantidade suficiente para |
| RENAME | Relação Nacional de Medicamentos Essenciais |
| RENISUS | Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS |
| SUS | Sistema Único de Saúde |
| TTC | Cloreto de trifetil tetrazólio |
| UFC | Unidades formadoras de colônias |

Sumário

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 15 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA..... | 17 |
| 2.1 Iniciativas governamentais no Brasil relacionadas às plantas medicinais..... | 17 |
| 2.2 A riqueza de um bioma exclusivo e único..... | 18 |
| 2.3 Abordagem etnodirigida como ponto de partida para estudos farmacológicos..... | 20 |
| 2.4 Seleção das espécies estudadas e delineamento dos ensaios biológicos..... | 21 |
| 3 ESPÉCIES VEGETAIS ESTUDADAS..... | 22 |
| 3.1 <i>Bauhinia cheilantha</i> (Bongard) Steudel..... | 22 |
| 3.2 <i>Lippia gracilis</i> Schauer..... | 28 |
| 4 A ENFERMAGEM E A PESQUISA COM PLANTAS MEDICINAIS..... | 30 |
| 5 OBJETIVOS..... | 32 |
| 5.1 Objetivo geral..... | 32 |
| 5.2 Objetivos específicos..... | 32 |
| 6 MATERIAL E MÉTODOS..... | 33 |
| 6.1 TIPO DE ESTUDO E LOCAIS DOS EXPERIMENTOS..... | 33 |
| 6.2 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS VEGETAIS..... | 33 |
| 6.3 PREPARO DOS EXTRATOS BRUTOS..... | 34 |
| 6.4 ENSAIOS <i>IN VITRO</i> | 37 |
| 6.4.1 Avaliação da atividade antimicrobiana..... | 37 |
| 6.4.2 Avaliação da atividade antioxidante por meio da capacidade sequestradora de radicais livres (CSR)..... | 41 |
| 6.4.3 Prospeção fitoquímica para identificação de classes de compostos bioativos..... | 43 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 46 |
| 7.1 Prospeção fitoquímica para a identificação de classes de compostos bioativos..... | 46 |
| 7.2 Avaliação da atividade antimicrobiana..... | 47 |

| | |
|--|----|
| 7.2.1 Extratos de <i>B. cheilantha</i> | 47 |
| 7.2.2 Extratos de <i>L. gracilis</i> | 49 |
| 7.3 Avaliação da atividade antioxidante por meio da capacidade sequestradora de radicais livres (CSR)..... | 51 |
| 7.3.1 Ensaio qualitativo do DPPH..... | 51 |
| 7.3.1 Ensaio quantitativo do DPPH..... | 52 |
| 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS | 56 |
| REFERÊNCIAS | 58 |
| ANEXOS | 69 |
| Anexo 1 – Registro das espécies vegetais | 69 |

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais sempre foram utilizadas tradicionalmente por povos de todo o mundo, sendo fontes valiosas para a prevenção, tratamento e cura de muitas doenças. O consumo de espécies vegetais com fins medicinais remonta a tempos imemoriais, sendo essa prática o principal recurso terapêutico em muitas comunidades (PASQUALE, 1984; RATES, 2001; SILVA, 2011).

A descoberta de métodos científicos que possibilitaram a síntese de compostos orgânicos na era da Revolução Industrial culminou com a fabricação de diversos medicamentos sintéticos. Entretanto, efeitos colaterais causados por esse tipo de fármaco e a falta de acesso ao tratamento farmacológico para uma grande parte da população, aliadas ao alto custo das mesmas, foram algumas das razões que promoveram o resgate pela opção terapêutica com produtos naturais, em especial àqueles derivados de plantas (RATES, 2001).

A crescente busca na utilização de plantas medicinais e fitoterápicos a partir da década de 80 foi reforçada por diretrizes da Organização Mundial de Saúde (OMS) no início dos anos 90, sugerindo que produtos naturais, em particular os derivados de plantas, poderiam conduzir ao descobrimento de novas substâncias terapêuticas. Desde então, o interesse global pelas plantas medicinais e fitoterápicos tem aumentado significativamente segundo a OMS, não somente para as autoridades de saúde como também para o poder público e a indústria farmacêutica, com importantes iniciativas como por exemplo, a busca da segurança e qualidade dos fitoterápicos (WHO, 1991; 2003; 2007).

Dos mais de 200 fármacos considerados básicos e essenciais pela OMS, 11% são exclusivamente originários de plantas e um número significativo são fármacos sintéticos obtidos de precursores naturais. Estudos científicos sobre plantas utilizadas na etnomedicina levaram à descoberta de diversos medicamentos valiosos, tais como a dígoxina, (obtida a partir da *Digitalis* spp.), quinina e quinidina (*Cinchona* spp.), vincristina e vinblastina (*Catharanthus roseus*), atropina (*Atropa belladonna*) e morfina e codeína (*Papaver somniferum*). Moléculas naturais têm sido a base do surgimento de moléculas protótipo, possibilitando o delineamento e o planejamento racional de novos fármacos e, também, a descoberta de novas ações terapêuticas, não atribuídas a compostos já conhecidos. Adicionalmente, substâncias como a muscarina, fisostigmina, canabinoides, ioimbina, forskolina, colchicina e ésteres de forbol, todas obtidas de vegetais, são importantes

ferramentas de pesquisa em farmacologia, fisiologia e bioquímica (RATES, 2001; SHU, 1998).

No âmbito do interesse na utilização de extratos de plantas como agentes terapêuticos, encontra-se a busca de novas substâncias provenientes de espécies vegetais capazes de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos, no tratamento de infecções bacterianas e fúngicas. Isso se deve a inúmeros fatores como o aumento a resistência a múltiplos antibióticos, o impacto das doenças infecciosas na morbidade e mortalidade, o alto custo dos antibióticos convencionais, a busca pelas terapias naturais, entre outros (WILKINSON, 2007).

A importância que as plantas têm alcançado na prevenção, tratamento e cura de doenças com sua crescente demanda, tem sido demonstrada por iniciativas governamentais específicas no Brasil (MING; FERREIRA; GONÇALVES, 2012). Sendo o país com a maior biodiversidade do planeta (BRASIL, 2006), é imprescindível que espécies vegetais endêmicas da Caatinga, único bioma exclusivamente brasileiro, sejam submetidas à bioprospeções, considerando a riqueza desse ecossistema que apresenta características climáticas tão peculiares (BRASIL, 2013; TRENTIN et al., 2011). Além disso, a participação da enfermagem, enquanto ciência relacionada ao cuidado e à assistência à saúde, é de fundamental importância no envolvimento dessas importantes iniciativas.

Bauhinia cheilantha e *Lippia gracilis*, duas espécies endêmicas da Caatinga foram selecionadas para o presente estudo, na busca de confirmar sua utilização popular terapêutica, não havendo relatos de investigações dessa natureza na literatura científica que utilizaram extratos brutos das mesmas. O levantamento bibliográfico a respeito dessas espécies evidenciou a necessidade de mais estudos sobre as propriedades terapêuticas que possam existir em seus extratos e compostos isolados, diante das citações nas diversas indicações etnobotânicas e etnofarmacológicas, podendo se tornar possibilidades promissoras na descoberta de novos fitoterápicos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Iniciativas governamentais no Brasil relacionadas às plantas medicinais

O Brasil é detentor da maior biodiversidade do planeta, possuindo em torno de 15 a 20% do total mundial, com destaque para as plantas superiores, nas quais detém aproximadamente 24% da biodiversidade (BRASIL, 2006), patrimônio potencialmente capaz de lhe render enormes benefícios econômicos. Nesse contexto, iniciativas governamentais e privadas têm sido geradas devido à importância social, econômica e cultural que as plantas medicinais têm alcançado com sua crescente demanda, com a finalidade de fortalecer as diversas atividades da cadeia produtiva. Além disso, órgãos de fomento passaram a financiar projetos com a temática das plantas medicinais havendo uma grande atividade no país em torno delas (MING; FERREIRA; GONÇALVES, 2012).

Um exemplo dessas iniciativas é a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos - PNPMF, aprovada pelo Ministério da Saúde (MS), por meio do Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006, na perspectiva da integralidade da atenção à saúde e uso sustentável da biodiversidade brasileira, ressaltando ainda o estabelecimento de uma posição de destaque do Brasil no cenário internacional (BRASIL, 2006).

Para o alcance dos objetivos dessa importante política, o governo federal aprovou, por meio da Portaria Interministerial nº 2960, de 9 de dezembro de 2008, o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos que, em conformidade com as diretrizes e linhas prioritárias da Política Nacional, visa ampliar as opções terapêuticas aos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS), com garantia de acesso a plantas medicinais e aos fitoterápicos. Para a elaboração do programa foi instituído o Grupo de Trabalho Interministerial, e a criação do Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, a fim de monitorar e avaliar o referido programa (BRASIL, 2009a). No mesmo ano, o MS elaborou e publicou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), onde listou 71 espécies de plantas medicinais utilizadas pela população brasileira com alguma evidência para indicação de uso na atenção básica de saúde (BRASIL, 2009b). No entanto, estudos científicos para a maioria das espécies ainda são necessários, para confirmar a terapêutica e a segurança na utilização das mesmas, para que somente assim possam ser listadas na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) e prescritas oficialmente (BRASIL, 2012).

A RENAME aprovada pela Portaria nº 533, de 29 de março de 2012, conta com 810 itens, ampliando a lista oficial de medicamentos do Sistema Único de Saúde (SUS) em 260 itens, contendo atualmente 12 extratos de plantas financiados pelo Ministério da Saúde para disponibilização na rede pública de saúde. São fitoterápicos aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária em critérios de segurança e eficácia e nessa nova lista foram incluídas espécies presentes na RENISUS, como a babosa (*Aloe vera*) para queimaduras e psoríase, a hortelã (*Mentha piperita*) para o tratamento de doenças intestinais e controle de náuseas e flatulência e o salgueiro (*Salix Alba*) para lombalgia (BRASIL, 2012).

Apesar do avanço nas pesquisas com plantas medicinais, ainda há muito a percorrer, sobretudo nos estudos clínicos de seus efeitos em seres humanos, que vão muito além da comprovação de efeitos farmacológicos de determinada espécie, verificando seu uso popular.

2.2 A riqueza de um bioma exclusivo e único

O principal ecossistema da região Nordeste do Brasil é a Caatinga, único bioma exclusivamente brasileiro e que ocupa a área equivalente a 11% do território nacional. Se de um lado abriga cerca de 27 milhões de pessoas, sendo a maioria carente e dependente dos recursos do bioma para sobreviver, de outro possui um imenso potencial de bioprospecção que, se bem explorado, é fator decisivo para o desenvolvimento da região e do país (BRASIL, 2013).

A Caatinga é caracterizada pelas altas temperaturas, baixa umidade e precipitação anual em torno de 250 a 500 mm (BASSO et al., 2005). A estação seca dura sete meses ou mais e o inverno, ou estação das chuvas, não possui temperaturas baixas como em outros biomas. Essas características fazem da Caatinga um tipo peculiar de vegetação em que as plantas desenvolveram adaptações exclusivas diante das condições climáticas locais (TRENTIN et al., 2011) (Figura 1).

As espécies vegetais semiáridas são parte da cultura de muitas comunidades desse bioma onde suas valiosas informações terapêuticas sempre foram passadas de geração a geração, apesar da considerável diminuição dessa prática ao longo dos anos, devido às inúmeras mudanças no estilo de vida contemporâneo e a escassez de muitas espécies (AGRA et al., 2007).

Figura 1 – Caatinga nas estações seca e chuvosa (Reserva Natural Serra das Almas)



Fonte: <http://meliponariodosertao.blogspot.com.br/2012/09/o-meliponario-da-reserva-natural-serra.html>; <http://blogdasilvaniaclaudino.wordpress.com/2013/09/12/projeto-da-associacao-caatinga-recebe-premio-da-fundacao-banco-do-brasil/>

Estudos etnofarmacológicos em comunidades do semiárido já listaram diversas espécies vegetais utilizadas para múltiplos propósitos medicinais e com potencial fitoquímico e farmacológico, mas que ainda não possuem estudos científicos para a comprovação dos efeitos terapêuticos relatados (CARTAXO; SOUZA; ALBUQUERQUE, 2010).

Agra, Freitas e Barbosa-Filho (2007) realizaram uma revisão da literatura a respeito da utilização terapêutica de espécies de plantas nativas na região Nordeste e registraram o uso de 483 plantas com potenciais propriedades bioativas. Eles demonstraram que dessa lista, 96,5% são utilizadas para fins medicinais, enfatizando a importância da investigação de muitas espécies que ainda não foram objetos de estudos farmacológicos que comprovem sua crença popular. Outra investigação realizada pelo levantamento etnobotânico no Semiárido do Nordeste registrou 119 espécies usadas no tratamento de 92 problemas de saúde, demonstrando a existência de espécies indicadas para estudos de bioprospecção (CARTAXO; SOUZA; ALBUQUERQUE, 2010). Almeida et al. (2011) realizaram um estudo comparativo em duas áreas do Nordeste do Brasil, onde avaliaram a atividade antimicrobiana de 34 espécies vegetais da Caatinga e da Floresta Atlântica, a partir de levantamento etnobotânico de plantas utilizadas para o tratamento de infecções. Extratos da Caatinga mostraram uma tendência de atividade antimicrobiana superior em comparação com os extratos da Floresta Atlântica, embora as espécies de ambos tenham inibido grande variedade dos microrganismos testados.

Segundo Albuquerque e Andrade (2002), estudos etnobotânicos no semiárido brasileiro são ainda muito escassos diante de sua produtividade, refletindo a falta de interesse por esse rico ecossistema o qual possui muitas espécies vegetais ameaçadas de extinção por inúmeras razões, principalmente pela forte pressão extrativista de madeira. Em seu trabalho onde buscaram explorar a relação pessoas / plantas no ecossistema Caatinga, concluem que, para o desenvolvimento da região, uma das medidas necessárias são estudos que investiguem e comprovem o uso tradicional de inúmeras espécies e sua efetividade terapêutica seja avaliada para uso em programas de assistência primária a saúde.

2.3 Abordagem etnorientada como ponto de partida para estudos farmacológicos

Um dos princípios que orientam o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), além da participação popular e controle social, é a busca no reconhecimento, valorização e preservação do conhecimento tradicional das comunidades e povos, quanto às suas práticas populares e tradicionais de uso de plantas medicinais (BRASIL, 2009b). O conhecimento popular adquirido pela tradição familiar a respeito do uso e efeito terapêutico de espécies vegetais é sem dúvida uma das maiores contribuições na descoberta de fármacos pela divulgação de seus benefícios terapêuticos, podendo ser o ponto de partida para estudos farmacológicos com plantas medicinais.

No contexto da etnobotânica, que estuda a relação dos diferentes grupos étnicos com as plantas, a etnofarmacologia consiste na busca de combinar informações adquiridas junto a comunidades locais que fazem uso da flora medicinal com estudos científicos, com o intuito de investigar e comprovar seu uso popular (ELISABETSKY; SOUZA, 2004). O método de abordagem etnofarmacológica na seleção de espécies vegetais favorece com maior probabilidade a descoberta de novas substâncias bioativas, comparando-a com outras abordagens, como a randômica (a qual consiste na sua disponibilidade, sem uso de critério) e a quimiotaxonômica (seleção da planta de acordo com a classe química presente em seu gênero ou espécie) (MACIEL et al., 2002).

Estudos etnorientados (BARROS et al., 2007; SANTOS; LIMA; FERREIRA, 2008; SOUZA et al., 2006) podem contribuir à medida que listam plantas medicinais já conhecidas e utilizadas em determinadas regiões, com potencial para serem inseridas em sistemas públicos de saúde.

2.4 Seleção das espécies estudadas e delineamento dos ensaios biológicos

Considerando a riqueza do bioma Caatinga que, apesar de ser pouco estudado sob ponto de vista etnobiológico, é um habitat único no mundo, Almeida et. al. (2006a) realizaram um estudo na região de Xingó, estado de Alagoas, o qual visou contribuir para o conhecimento das plantas medicinais utilizadas pelos habitantes rurais da região de Caatinga, nos municípios de Piranhas e Delmiro Gouveia, onde listaram e identificaram 187 espécies vegetais que são utilizadas de forma terapêutica pelas comunidades pesquisadas.

Nesse estudo, Almeida et. al. (2006a) ressaltaram que apesar da Caatinga possuir grande diversidade de plantas medicinais, estudos que comprovem suas indicações populares são insuficientes. A maioria das espécies listadas não possui ainda investigações biológicas ou não há aparentemente nenhuma publicação focalizada nas atividades terapêuticas atribuídas às espécies citadas nesse levantamento (ALMEIDA et al., 2006a). Espécies valorizadas nesse estudo não mostraram importância em outros estudos dessa natureza realizadas no Semi-árido, enquanto outras menos valorizadas nesse levantamento, como *Myracrodruon urundeuva*, *Schinopsis brasiliensis* e *Anadenanthera colubrin*, já se mostraram de grande importância em outras comunidades entrevistadas (ALBUQUERQUE; ANDRADE, 2002; ALMEIDA; ALBUQUERQUE, 2002; SILVA; ALBUQUERQUE, 2005).

Esse estudo pioneiro de Almeida et. al. (2006a) realizado em comunidades do Semi-árido alagoano, foi o ponto de partida na escolha das espécies vegetais para a elaboração do presente estudo. Duas das 187 plantas identificadas nessas comunidades, *Bauhinia cheilantha* e *Lippia gracilis*, possuem seus gêneros na lista da RENISUS, sendo então selecionadas para a presente avaliação biológica, uma vez que a relação divulgada pelo Ministério da Saúde enumera espécies com alguma evidência para indicação de uso na atenção básica de saúde, possuindo assim maior probabilidade em seu potencial terapêutico.

Considerando estudos etnodirigidos e investigações farmacológicas sobre a avaliação antimicrobiana e antioxidante de espécies dos gêneros *Bauhinia* e *Lippia*, foi delimitada a busca nessas duas avaliações biológicas das espécies selecionadas.

3 ESPÉCIES VEGETAIS ESTUDADAS

3.1 *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel

As plantas do gênero *Bauhinia* (Fabaceae), que compreendem aproximadamente 300 espécies, são conhecidas popularmente como “pata-de-vaca” devido ao formato de suas folhas. Muitas dessas espécies são utilizadas na medicina tradicional em várias regiões tropicais ao redor do mundo, incluindo a África, Ásia, América Central e do Sul. As partes mais utilizadas são as folhas, a casca do caule, o caule e a raiz, para o tratamento de diversas doenças, principalmente infecções, processos inflamatórios e dolorosos e diabetes (ACHENBACH, 1988 apud SILVA; CECHINEL FILHO, 2002; CECHINEL FILHO, 2009; GUPTA, 2010; SILVA; CEQUINEL FILHO, 2002; TESKE; TRENTINI, 2001).

Índios brasileiros e nativos de outros países sul-americanos já usavam as folhas de *B. forficata* como cicatrizantes em ferimentos e para outros fins como diuréticos, digestivos, expectorantes, analgésicos e anti-inflamatórios (ALONSO, 1998 apud OLIVEIRA et al., 2001).

Estudos experimentais a respeito das atividades farmacológicas de espécies do gênero *Bauhinia* já foram relatados na literatura, como a atividade anti-inflamatória e analgésica de extratos da casca do caule de *B. guianensis* (CARVALHO et al., 1999); atividade analgésica de extratos das folhas, caules, cascas e raízes de *B. splendens*, os quais demonstraram maior eficácia que fármacos utilizados na clínica (CECHINEL FILHO et al., 1995); atividade antiulcerogênica do extrato de flores de *B. racemosa* por meio da indução de úlceras gástricas em ratos, as quais apresentaram significativa redução com o emprego do extrato testado (AKHTAR; AHMAD, 1995), dentre outras.

O gênero *Bauhinia* é mais frequentemente estudado quanto à possível ação hipoglicemiante, já demonstrada em pesquisas com as espécies *B. candicans*, *B. cheilantha*, *B. divaricata*, *B. megalandra*, *B. monandra*, sendo *B. forficata* a que apresenta maior número de estudos que já avaliaram seu efeito antidiabético (SILVA; CEQUINEL FILHO, 2002), como na investigação de Pepato et al. (2002) que demonstrou redução significativa no nível de glicose sanguínea e urinária a longo prazo com a administração de decocção de folhas de *B. forficata*, como substituto da água potável.

O estado hiperglicêmico do diabetes pode induzir o estresse oxidativo por meio de vários mecanismos, tais como a auto-oxidação da glicose, a formação de produtos finais da

glicação avançados (AGEs) e ativação da via do poli-ol, os quais geram espécies reativas de oxigênio (ROS), que incluem os radicais livres (BARBOSA, OLIVEIRA e SEARA, 2008; WOLF, 1987). Martín-Gallán et al. (2003) associaram o aumento dos níveis de marcadores de lesão induzida por radicais livres circulantes com a redução das defesas antioxidantes em pacientes diabéticos, enfatizando a importância do desenvolvimento de agentes de proteção envolvendo antioxidantes, além dos tratamentos clássicos para a doença, evitando reações em cadeia de oxidação e consequente redução nos danos vasculares. Sabu e Kuttan (2002) verificaram que alguns extratos vegetais utilizados popularmente como hipoglicêmicos possuem atividade antioxidante significativa, relacionando esses dois efeitos, e alguns trabalhos já avaliaram o potencial antioxidante de extratos de espécies do gênero *Bauhinia*, como *B. forficata* (KHALIL; PEPATO; BRUNETTI, 2008) e *B. racemosa* (KUMAR et al., 2005), com resultados que indicam o seu potencial antioxidante.

Sendo fato que os flavonoides possuem propriedades antioxidantes (URQUIAGA; LEIGHTON, 2000) e se encontram dentre as substâncias fenólicas nas folhas da espécie *B. cheilantha* (PEIXOTO SOBRINHO et al., 2008; 2009; 2010), é muito provável que essa espécie tenha atividade antioxidante, apoiando ainda mais sua utilização popular para o tratamento do diabetes.

A utilização popular de espécies do gênero *Bauhinia* para o tratamento de doenças infecciosas também tem sido comprovada por meio de inúmeros estudos experimentais, na busca de confirmar seu potencial antimicrobiano, em especial contra microrganismos patogênicos. Achenbach et al. (1988) evidenciaram o potencial antifúngico de *B. manca* pelos resultados onde vários metabólitos, particularmente os flavonoides, inibiram de forma significativa várias espécies fúngicas patogênicas. Savi et al. (1996) comprovaram que a espécie *B. splendens* possui princípios ativos contra bactérias patogênicas, em especial cepas Gram-positivas como *Streptococcus* sp. e *Staphylococcus aureus*. Pokhrel, Adhikari e Baral (2002) avaliaram a atividade antibacteriana do extrato etanólico de *B. variegata*, onde as amostras testadas apresentaram inibição tanto para as bactérias Gram-positivas como Gram-negativas, sendo a concentração bactericida mínima (CBM) de 0,39 mg/mL para *Bacillus subtilis*. O extrato metanólico de *B. racemosa* foi avaliado por Kumar et al. (2005) quanto ao potencial antimicrobiano e antioxidante, demonstrando atividade de amplo espectro contra todos os microrganismos testados, bem como fonte potencial de agente antioxidante. Dugasani et al. (2010) descreveram pela primeira vez a atividade antimicrobiana de raízes de *B. tomentosa* e *B. vahlii* contra quatro cepas Gram-positivas, três Gram-negativas e três fungos, e atribuíram as inibições apresentadas pela presença de flavonoides e taninos.

Esses estudos demonstram que o uso medicinal de plantas do gênero *Bauhinia* por comunidades em diferentes partes do mundo, tem encontrado respaldo em estudos científicos os quais tem constatado, ainda que parcialmente, seus efeitos terapêuticos com investigações em modelos experimentais. No entanto, para a devida utilização terapêutica e indicação na atenção à saúde, estudos a respeito da toxicidade são extremamente importantes. Martínez et al. (2011) avaliaram a citotoxicidade de alcaloides de extratos etanólicos de folhas de *B. variegata*, os quais apresentaram níveis altos de toxicidade, destacando a necessidade de busca pelos princípios ativos para a determinação das propriedades antitumorais desses compostos, bem como estudos para determinar a atividade antiparasitária (leishmaniose, malária e doença de Chagas), utilizando-se sistemas *in vitro* com células não tumorais, como culturas primárias de macrófagos humanos ou de ratos.

Bauhinia cheilantha (Bongard) Steudel, Fabaceae, também conhecida como “mororó” é uma espécie endêmica da Caatinga e que possui ampla utilização na medicina popular (ALMEIDA et al., 2010a; PEIXOTO SOBRINHO et al., 2008; 2009). Estudos etnodirigidos em comunidades do Semi-árido demonstram os diversos fins terapêuticos dessa espécie como analgésico, antiasmático, anticoagulante, antidiabético, antiinflamatório, antireumático, expectorante, depurativo, sedativo, tônico, entre outros, sendo as folhas e a casca do caule as partes mais utilizadas (AGRA et al., 2008; ALMEIDA et al., 2006a; ALBUQUERQUE et al., 2006; 2007a; 2007b; CARTAXO; SOUZA; ALBUQUERQUE, 2010) (Figura 2).

Figura 2 – Partes aéreas da espécie *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel



Fonte: Própria autora (2012)

Um levantamento de estudos etnodirigidos sobre espécies do gênero *Bauhinia* publicados no Brasil, demonstrou que das catorze espécies citadas, somente *Bauhinia*

forficata se encontra na lista das plantas de interesse ao SUS – RENISUS (BRASIL 2009b) (Quadro 1). Outro levantamento de artigos sobre investigações farmacológicas de espécies do referido gênero demonstrou que *B. forficata* possui o maior número de publicações. Das outras duas espécies listadas na RENISUS encontrou-se apenas um estudo sobre *B. variegata*, sendo constatada sua propriedade cicatrizante (NASCIMENTO NETO et al., 2011) e nenhum a respeito da *B. affinis*, a qual não foi citada nem encontrada em nenhuma das publicações de ambos os levantamentos realizados, revelando a necessidade de mais estudos para essa espécie (Quadros 1 e 2).

A espécie *B. cheilantha* é uma das mais citadas nos artigos, após *B. forficata*, dentre as demais do mesmo gênero nas pesquisas etnodirigidas (Quadro 1). Apesar disso, no outro levantamento, foram encontrados apenas dois estudos a respeito da espécie *B. cheilantha*. Almeida et al. (2006b) investigaram o seu potencial hipoglicêmico, onde extratos metanólicos de folhas dessa espécie, nas doses de 300, 600 e 900 mg/kg evidenciaram significativa atividade hipoglicêmica. Luna et al. (2005) avaliaram a atividade larvicida utilizando extratos brutos da folha e do caule e larvas do mosquito *Aedes aegypti*, na perspectiva de controles naturais contra esse vetor. O extrato das folhas não teve atividade, porém o caule apresentou atividade significativa na mortalidade dos mosquitos (Quadro 2).

Quadro 1 – Levantamento bibliográfico sobre o uso medicinal de plantas do gênero *Bauhinia**

| Espécies | Artigos (nº) | Uso medicinal | Referências |
|----------------------|--------------|--|--|
| <i>B. forficata</i> | 8 | Diabetes / doença nos rins e bexiga / cistite / diurética / colesterol / câncer / coração / doenças endócrinas, nutricionais, metabólicas, geniturinárias e na coluna / anti-hemorrágico / inchaço no corpo | TROJAN-RODRIGUES, 2012; BARROS, 2007; SOUZA, 2004; COSTA, 2011; SANTOS, 2008; GIRALDI, 2010; ZUCHIWSCHI, 2010; SOUZA, 2006 |
| <i>B. cheilantha</i> | 7 | Gripe / tosse / dores em geral / diabetes / dor na coluna / hemostáticos / problemas intestinais / problemas de estômago / anti-inflamatória / tonificante / depurativa / antidiabética / antilipidêmico / doença nos rins / dor de cabeça / tosse / catarro | CARTAXO, 2010; FERREIRA JÚNIOR, 2011; AGRA, 2007; PAULINO, 2012; COSTA, 2011; ROQUE, 2010; ALBUQUERQUE, 2006 |
| <i>B. spp.</i> | 4 | Hipoglicemiante / antidiabética / antilipidêmica / renal / hipotensora | FEIJÓ, 2012; MACEDO, 2007; ALBUQUERQUE, 2007; PILLA, 2006 |

| Espécies | Artigos (nº) | Uso medicinal | Referências |
|----------------------|---------------------|--|---|
| <i>B. rufa</i> | 3 | Antihiperlipidemia / anorexígena / antidibética / diurética / antiobesidade / adstringente / hipoglicemiante | SILVA, 2010; RODRIGUES, 2007; MACEDO, 2004 |
| <i>B. rufa</i> | 3 | Antihiperlipidemia / anorexígena / antidibética / diurética / antiobesidade / adstringente / hipoglicemiante | SILVA, 2010; RODRIGUES, 2007; MACEDO, 2004 |
| <i>B. acuruana</i> | 1 | Diabetes | OLIVEIRA, 2010 |
| <i>B. candicans</i> | 1 | Problemas renais / pedras nos rins / cistite / diabetes | MERÉTIKA, 2010 |
| <i>B. dúbia</i> | 1 | Diabetes / colesterol alto | OLIVEIRA, 2010 |
| <i>B. glabra</i> | 1 | Hipoglicemiante | MACEDO, 2004 |
| <i>B. holophylla</i> | 1 | Antidibética / diurética / antiobesidade / adstringente | RODRIGUES, 2007 |
| <i>B. nítida</i> | 1 | Rins / diabetes | PASA, 2008 |
| <i>B. pentandra</i> | 1 | Inflamação / cicatrizante | ROQUE, 2010 |
| <i>B. purpúrea</i> | 1 | Diabetes / diurético | SOUSA, 2010 |
| <i>B. radiata</i> | 1 | Doenças das glândulas endócrinas / nutrição / metabolismo | CHRISTO, 2010 |
| <i>B. ungulata</i> | 1 | Diabetes / derrame / prisão de ventre | OLIVEIRA, 2010 |

* Levantamento bibliográfico utilizando-se as bases de dados: SciELO, LILACS, PubMed e Scopus e descritores indexados na lista dos sistemas DeCS: *Bauhinia*; Brazil; ethnobotany; folk medicine; medicinal plants; bioassay e anti-infective agents, adotando a estratégia de agrupar o descritor *Bauhinia* e/ou Brazil com os demais (PRÓPRIO AUTOR, 2012).

Quadro 2 - Levantamento bibliográfico sobre a atividade farmacológica de plantas do gênero *Bauhinia**

| Espécies | Artigos (nº) | Atividade farmacológica | Referência (s) |
|------------------------|--------------|---|---|
| <i>B. forficata</i> | 10 | Hipoglicêmica / antioxidante / hipolipidêmica / antitumoral / propriedades anticoagulantes | KHALIL, 2008; SOUSA, 2004; LINO, 2004; MELO, 2011; PRÍNCIPE, 2009; MENEZES, 2007; CURCIO, 2012; OLIVEIRA, 2005; SILVA, 2002; PEPATO, 2002 |
| <i>B. microstachya</i> | 5 | Analgésica / antioxidante / antinociceptiva / imunomodulatória de células mononucleares humanas | MACHADO JUNIOR, 2006; SILVA, 2001; MENEZES, 2004; SILVA, 2007b; GADOTTI, 2005 |
| <i>B. monandra</i> | 3 | Hipoglicêmica / antioxidante / inseticida | MENEZES, 2007; MACEDO, 2007; ARGOLO, 2004 |
| <i>B. variegata</i> | 1 | Potencial cicatrizante | NASCIMENTO NETO, 2011 |
| <i>B. cheilantha</i> | 2 | Hipoglicêmica / larvicida / citotóxica | LUNA, 2005; ALMEIDA, 2006 |
| <i>B. splendens</i> | 1 | Antinociceptiva | WILLAIN FILHO, 1997 |
| <i>B. acuruana</i> | 1 | Antibacteriana | TRENTIN, 2011 |
| <i>B. bauhinioides</i> | 1 | Propriedades anti-inflamatórias | OLIVEIRA, 2010 |
| <i>B. outimouta</i> | 1 | Propriedades anticonvulsivantes | QUINTANS JÚNIOR, 2002 |
| <i>B. platypetala</i> | 1 | Ansiolítica | SANTOS, 2012 |

* Levantamento bibliográfico utilizando-se as bibliotecas virtuais: SciELO, LILACS, PubMed e Scopus e descritores indexados na lista dos sistemas DeCS: *Bauhinia*; Brazil; ethnobotany; folk medicine; medicinal plants; bioassay e anti-infective agents, adotando a estratégia de agrupar o descritor *Bauhinia* e/ou Brazil com os demais (PRÓPRIA AUTORA, 2012).

A compilação de informações como essas demonstra a necessidade de mais estudos a respeito das propriedades terapêuticas que possam existir nos extratos e compostos isolados de muitas espécies do gênero *Bauhinia* e que podem se tornar possibilidades promissoras na descoberta de novos fitoterápicos sendo incluídas na RENISUS, como é o caso de *B. cheilantha*, que foi umas das espécies mais citadas nos estudos etnobotânicos, porém, ainda sem respaldo científico para a sua indicação e uso na atenção básica de saúde, devido a falta de pesquisas que comprovem suas atividades biológicas.

3.2 *Lippia gracilis* Schauer

Dentre as plantas medicinais utilizadas popularmente, destacam-se as espécies da Família Verbenaceae, que compreendem 35 gêneros e mais de 1.000 espécies, muitas exclusivamente brasileiras. O gênero *Lippia* é o segundo maior da família Verbenaceae, possuindo aproximadamente 200 espécies de espécies herbáceas, arbustos e pequenas árvores, cujos maiores centros de dispersão se encontram em países das Américas do Sul e Central, como também em territórios da África tropical (JUDD et al., 2007; PASCUAL et al., 2001; TERBLANCHÉ; KORNELIUS, 1996).

No Brasil, existem aproximadamente 120 espécies de *Lippia*, distribuídas no Cerrado e na Caatinga, onde se destacam pelo aspecto chamativo no período da floração e por seu aroma forte e geralmente agradável. Dessas espécies, *L. alba* (Mill.) N. E. Brown (erva-cidreira ou falsa-melissa) é a mais conhecida e utilizada devido as suas propriedades medicinais. Na região Nordeste as espécies de *Lippia* são usadas na medicina popular para diversos fins, como no tratamento de bronquites, gripes, resfriados, tosse, entre outros. As partes mais utilizadas são as folhas e as flores na forma de infusão ou decocção por via oral ou como emplastos (OLIVEIRA et al., 2007; PASCUAL et al., 2001).

Como resultado do emprego das inúmeras espécies para diversos fins terapêuticos, muitas dessas espécies já foram investigadas do ponto de vista farmacológico, o que revelou importantes propriedades tais como, ação sedativa, antiespasmódica, estomáquica, anti-inflamatória e antipirética de *L. Alba* (GOMES et al., 1993); ação contra a malária, no tratamento de hipertensão e combate à sarna de *L. multiflora* (OLADIMEJI et al., 2000; VALENTIN et al., 1995) e tratamento da tosse e bronquite de *L. dulcis* (COMPADRE; ROBBINS; KINGHORN, 1986).

Lippia gracilis Schauer é uma planta aromática, também endêmica do Nordeste brasileiro, da vegetação semi-árida, conhecida popularmente como alecrim-da-chapada ou alecrim-de-serrote. Apresenta-se como um arbusto de aproximadamente 2,5 m de altura, bem ramificada, de folhas pequenas e flores brancas, ambas bastante odoríferas (LORENZI; MATOS, 2002) (Figura 3).

Figura 3 – Partes aéreas da espécie *Lippia gracilis* Schauer



Fonte: Própria autora (2012).

As folhas de *L. gracilis* são ricas em óleo essencial com significativa atividade contra bactérias e fungos (ALBUQUERQUE, 2006; NETO et al., 2010).

As pesquisas referentes à composição química das espécies de *Lippia* evidenciam, principalmente, os seus constituintes voláteis nos óleos essenciais. Sobre a espécie *Lippia gracilis* Schauer, estudos de seus constituintes voláteis apresentam como principais compostos o timol e carvacrol, que têm forte atividade antimicrobiana contra fungos e bactérias (GOMES; NOGUEIRA; MORAES, 2011). No entanto, pesquisas sobre os constituintes fixos são incipientes, evidenciando a necessidade de trabalhos que enfoquem nas outras classes de compostos.

4 A ENFERMAGEM E A PESQUISA COM PLANTAS MEDICINAIS

No contexto da importância que as plantas medicinais têm alcançado nas últimas décadas, torna-se imprescindível que a Enfermagem, enquanto ciência relacionada ao cuidado e à assistência à saúde esteja também envolvida e inserida na busca de consolidar os objetivos de importantes iniciativas governamentais que visam integrar o uso de plantas medicinais e fitoterápicos no SUS, como a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS – PNPIC-SUS (BRASIL, 2006), a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos - PNPMF (BRASIL, 2006) e o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos - PNPMF (BRASIL, 2009a).

A atuação do enfermeiro no resgate do conhecimento popular sobre as práticas integrativas de cuidado, dentre elas a utilização terapêutica das plantas, demonstra grande importância uma vez que o mesmo é o principal promotor do cuidado, no incentivo à prática do autocuidado e a busca da integralidade. A busca em compreender o cuidado em saúde pelo uso das plantas poderá fomentar a aproximação da pesquisa na prática, além de fortalecer o vínculo serviços de saúde e usuários (CEOLIN et al., 2011; HEISLER et al., 2012).

Estudos sobre a valorização do conhecimento popular a respeito das plantas medicinais em comunidades brasileiras (BADKE et al., 2011; CEOLIN et al., 2011; HEISLER et al., 2012; REZENDE; COCCO, 2002) têm sido publicados por enfermeiros, na tentativa de integrar o importante instrumento da sabedoria popular no cuidado à saúde, em especial nos programas como o da ESF (Estratégia Saúde da Família), que lhes possibilitam o conhecimento acerca desse saber.

Heisler et al. (2012) realizaram um estudo sobre os saberes e usos da espécie *Anredera cordifolia* (folha gorda) por moradores de um município no estado do Rio Grande do Sul, destacando que o levantamento realizado fornece subsídios para o desenvolvimento de novas pesquisas sobre plantas medicinais. Badke et al. (2011) analisaram o cotidiano popular de moradores atendidos por uma Unidade de Saúde da Família em um município do Rio Grande do Sul sobre o emprego terapêutico de plantas medicinais no cuidado à saúde, demonstrando a imprescindível aproximação entre o saber popular e o científico, bem como a necessidade de um maior domínio desse saber pelos profissionais da enfermagem. Rezende e Cocco (2002) analisaram o uso da fitoterapia em uma comunidade rural do estado de Minas Gerais, identificando as plantas mais frequentemente utilizadas bem como seu uso terapêutico,

constatando seus fins semelhantes aos descritos na literatura e destacando a importante participação do enfermeiro na orientação ao uso das plantas medicinais de maneira racional.

Algumas das publicações de pesquisadores enfermeiros em estudos voltados para o uso de plantas medicinais ressaltam a importante necessidade de realização de estudos científicos que comprovem o conhecimento popular coletado sobre as plantas medicinais, a fim de garantir os benefícios na utilização das mesmas, além de evitar os malefícios decorrentes do uso indevido (CEOLIN et al., 2011; FEIJÓ et al., 2012; HEISLER et al., 2012).

Apesar da existência de pesquisas com plantas medicinais por meio de estudos etnodirigidos, são escassas as publicações de enfermeiros na área da pesquisa básica experimental, na busca de iniciar a comprovação científica do saber popular a respeito da terapêutica das plantas. Além disso, raramente os periódicos de enfermagem publicam manuscritos dessa natureza, uma vez que o enfoque dos estudos em enfermagem pouco tem se voltado para a pesquisa básica, de um modo geral e mais especificamente, com plantas medicinais.

Uma das prováveis causas da dificuldade ou ausência de translação da pesquisa básica experimental dentro da área assistencial, e até mesmo na academia, é o desconhecimento do enfermeiro quanto ao poder e multiplicidade de utilização da ciência fundamental e/ou experimental para o delineamento de suas investigações. A integração da enfermagem com disciplinas como biologia, farmácia e química, em pesquisas com plantas medicinais na descoberta de novos fitoterápicos é apenas uma das muitas contribuições da enfermagem na intersecção da pesquisa básica com a área assistencial, uma vez que é o principal facilitador do cuidado (ALVES et al., 2004).

Bastos et al. (2009) avaliaram pela primeira vez a atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos e compostos isolados de *Zeyheria tuberculosa*, utilizada popularmente para o tratamento de câncer e doenças de pele, onde alguns resultados puderam justificar parcialmente o uso popular desta espécie. Almeida et al. (2012) realizaram um estudo experimental *in vitro* que investigou o potencial antimicrobiano do extrato do óleo de coco na perspectiva da prevenção da infecção e tratamento de feridas, utilizando três extratos do coco alagoano frente a 14 microrganismos, onde todos os extratos testados apresentaram atividade contra *Staphylococcus aureus*, confirmando o seu potencial na utilização popular. Apesar das limitações inerentes, esses estudos demonstram a importância na atuação da enfermagem nas pesquisas básicas pelo fato da melhor conexão com a assistência e o cuidado, havendo assim a necessidade de um enfoque maior de pesquisas de enfermeiros na área das ciências básicas.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade biológica *in vitro* de extratos etanólicos das espécies vegetais *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud. e *Lippia gracilis* Schauer.

5.2 Objetivos específicos

Realizar a prospecção fitoquímica para a identificação das classes de compostos bioativos presentes nos extratos etanólicos.

Avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos etanólicos;

Determinar a atividade antioxidante por meio da capacidade sequestradora de radicais livres dos extratos etanólicos;

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 TIPO DE ESTUDO E LOCAIS DOS EXPERIMENTOS

Estudo experimental delineado nos moldes de pesquisa quantitativa, realizado nos seguintes laboratórios da Universidade Federal de Alagoas/UFAL: Laboratório de Pesquisa em Tratamento de Feridas/LpTF da Escola de Enfermagem e Farmácia/ESENFAR; Laboratório de Farmacologia e Imunologia/LaFI do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde/ICBS e Laboratório de Pesquisa de Química de Produtos Naturais/LPqPN do Instituto de Química e Biotecnologia/IQB.

6.2 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS VEGETAIS

As amostras vegetais das espécies *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud. e *Lippia gracilis* Schauer foram coletadas na Reserva Ecológica do Castanho, situada no município de Delmiro Gouveia, região de Xingó e estado de Alagoas (S09°30'51.6" W037°54'30.3" e S09°31'49.4" W037°54'12.4"), no mês de outubro de 2012, com auxílio do guia turístico Adalberto Inácio de França (Figura 4).

Figura 4 – Município de Delmiro Gouveia, AL



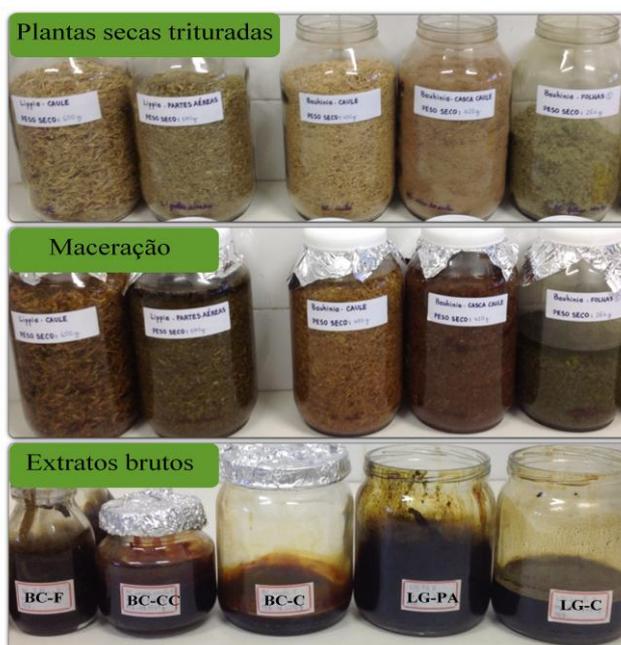
Fonte: <http://www.baixarmapas.com.br/mapa-de-alagoas-mesorregioes/>

A identificação das espécies foi confirmada pela Profa. Dra. Rosângela Pereira de Lyra Lemos do Instituto do Meio Ambiente do estado de Alagoas (IMA/AL), no qual as exsicatas encontram-se catalogadas sob o nº MAC 56123 (*Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud.) e 56124 (*Lippia gracilis* Schauer) (número de catálogo no Herbário do IMA/AL).

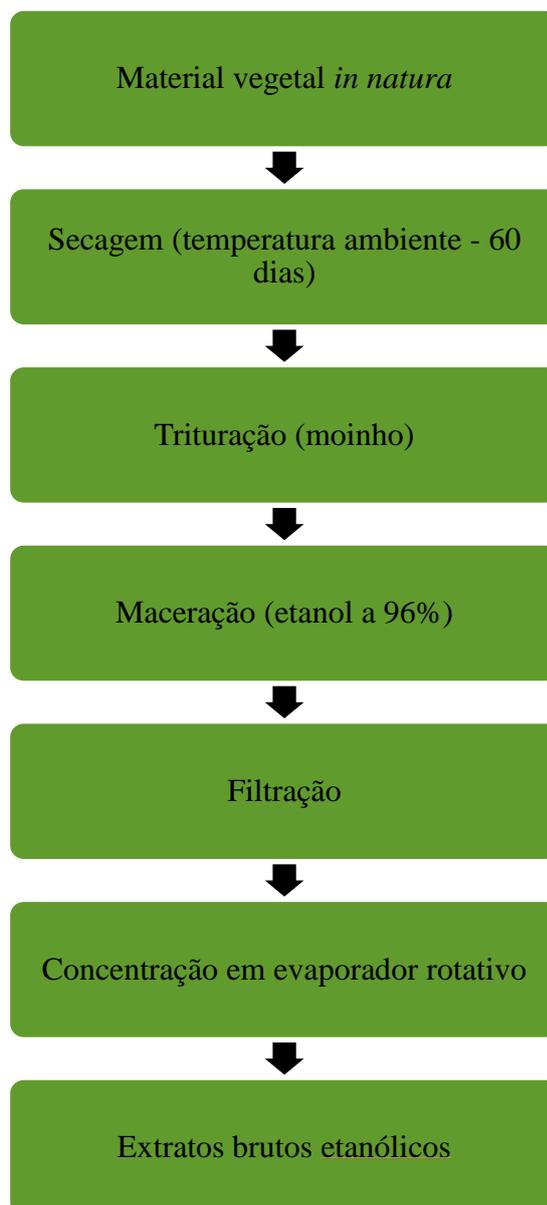
6.3 PREPARO DOS EXTRATOS BRUTOS

As partes utilizadas para o preparo dos cinco extratos etanólicos foram: folhas (BC-F), casca do caule (BC-CC) e caule (BC-C) da espécie *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud. e partes aéreas (caule, galhos, folhas e flores) (LG-PA) e caule (LG-C) da espécie *Lippia gracilis* Schauer. As mesmas foram secas à temperatura ambiente durante 60 dias e, após esse período, foram trituradas separadamente em moinho e pesadas separadamente. As diferentes partes foram então submetidas à maceração com etanol a 96% (C₂H₅OH) durante 15 dias em recipiente fechado e em temperatura ambiente, sendo filtradas e remaceradas por três vezes consecutivas durante um intervalo de sete dias. A cada filtração realizada, a solução com extrato foi concentrada em evaporador rotativo para a obtenção dos cinco extratos brutos (Figuras 5 e 6).

Figura 5 - Plantas secas trituradas, maceração e extratos brutos



Fonte: Própria autora (2012)

Figura 6 – Fluxograma do preparo dos extratos brutos

Fonte: Própria autora (2013)

A escolha do etanol (C_2H_5OH) como solvente utilizado na extração se deve ao baixo custo do mesmo, em comparação com outros solventes como a acetona e o metanol, ao menor impacto ambiental e, especialmente a baixa toxicidade, sendo fator determinante na extração de compostos ativos com finalidade de fabricação de fitomedicamentos (PEIXOTO SOBRINHO et al., 2010). As quantidades utilizadas para a obtenção dos extratos etanólicos encontram-se na tabela 1.

Tabela 1 – Massas das plantas trituradas e dos extratos etanólicos

| Amostras vegetais | Massa seca (g) | Massa final (g) |
|--------------------------|----------------------------|------------------------------|
| | (partes trituradas) | (extratos etanólicos) |
| BC-F | 264 | 71,1317 |
| BC-CC | 420 | 48,3531 |
| BC-C | 450 | 18,2202 |
| LG-PA | 570 | 112,2411 |
| LG-C | 600 | 84,0166 |

Fonte: Própria autora (2013)

6.4 ENSAIOS *IN VITRO*

6.4.1 Avaliação da atividade antimicrobiana

6.4.1.1 Cepas microbianas e preparação do inóculo

Para a avaliação da atividade antimicrobiana foram utilizadas as seguintes cepas bacterianas ATCC[®] (American Type Culture Collection - centro de distribuição de culturas de microrganismos de referência padrão): *Staphylococcus aureus* (25923), *Staphylococcus epidermidis* (12228), *Enterococcus faecalis* (29212), *Escherichia coli* (25922), *Klebsiella pneumoniae* (700603), *Pseudomonas aeruginosa* (27853) e a cepa fúngica *Candida albicans* (24433).

As cepas bacterianas e fúngica liofilizadas foram cultivadas em meio Caldo Müeller Hinton (CMH) e a cultura incubada por 24 horas a 35 °C. Após esse período, foram semeadas com auxílio de uma alça sobre a superfície de placas de Petri contendo meio Agar Müller Hinton (AMH) para bactérias e Agar Sabouraud Dextrose (ASD) para fungos, e reincubadas nas mesmas condições, para o ajuste da turbidez da cultura em solução salina estéril a 0,9% (9 g/L de cloreto de sódio) (diluição 1:1000) (CLSI, 2008; 2012a).

Para a padronização da densidade do inóculo, foi utilizado o controle de turbidez óptica de bário (BaSO₄), equivalente a uma solução da escala padrão de turvação de Mc Farland do tubo 0,5, que resulta em uma suspensão contendo aproximadamente 1,5 x 10⁸ UFC/mL (unidades formadoras de colônias por mililitro) de bactérias e 1-5 x 10⁶ UFC/mL de leveduras (CLSI, 2008; 2012a).

6.4.1.2 Método de difusão em meio sólido a partir de cavidade

O método de difusão em meio sólido a partir de cavidade ou técnica de perfuração em ágar é um dos métodos de difusão onde há a remoção do meio de cultura sólido com auxílio de cilindros de 6-8 mm de diâmetro para a formação de poços, nos quais é possível aplicação das substâncias a serem analisadas (ALVES et al., 2000; OSTROSKY et al., 2008; PINTO; KANEKO; OHARA, 2010).

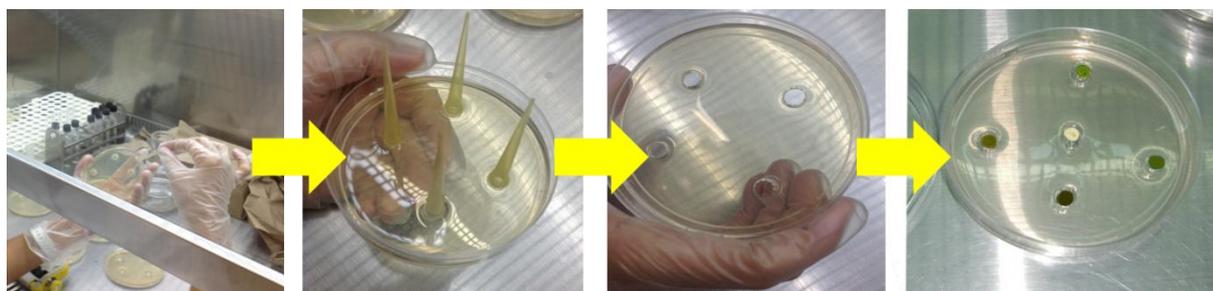
Os inóculos foram padronizados em solução salina estéril para uma concentração de 1,5 x 10⁸ UFC/mL de bactérias e 1-5 x 10⁶ UFC/mL de leveduras, de acordo com a turbidez

do tubo 0,5 da escala de Mc Farland, sendo o inóculo final necessário de aproximadamente 10^6 UFC/mL e 10^3 UFC/mL para bactérias e leveduras, respectivamente (CLSI, 2008; 2012a).

Os extratos etanólicos BC-F, BC-CC e BC-C foram solubilizados em DMSO (composto utilizado como solvente polar) a 10% e os extratos LG-PA e LG-C em Cremophor[®] (Sigma-Aldrich) a 10% e q.s.p. de solução salina estéril, obtendo-se uma solução com concentração final de 100 mg/mL. Para a confecção das quatro cavidades por placa de Petri, foram utilizadas as bases de ponteiros de 7 mm de diâmetro, de forma invertida, sobre uma fina camada de ágar (Müeller Hinton para bactérias e Sabouraud Dextrose para fungos). Em seguida, verteu-se uma solução contendo 1 mL da suspensão microbiana e 20 mL de AMH ou ASD fundido e resfriado a 45-50 °C, nas placas de Petri, ainda com as ponteiros invertidas para a formação das cavidades. Após a solidificação do ágar, as ponteiros foram retiradas e 50 µL dos extratos solubilizados foram depositados em cada cavidade confeccionado pelas ponteiros (AYRES et al., 2008; KARAMAN et al., 2003; LIMA et al., 2006) (Figura 7).

Para o controle de sensibilidade das cepas ensaiadas frente à ação dos solventes, foram utilizados 50 µL de DMSO (10%) ou Cremophor[®] (10%) como controles negativos. Os discos de antibióticos, Ceftriaxona (CRO 30 µg) e Ciprofloxacina (CIP 5 µg), e o antifúngico Fluconazol (50 µg/mL), utilizados como controles positivos foram selecionados de acordo com o grupo de agentes antimicrobianos sugeridos pelo FDA Clinical Indications por meio dos Laboratórios de Microbiologia Clínica dos Estados Unidos (CLSI, 2008; 2012b).

Figura 7 – Método de difusão em meio sólido a partir de cavidade

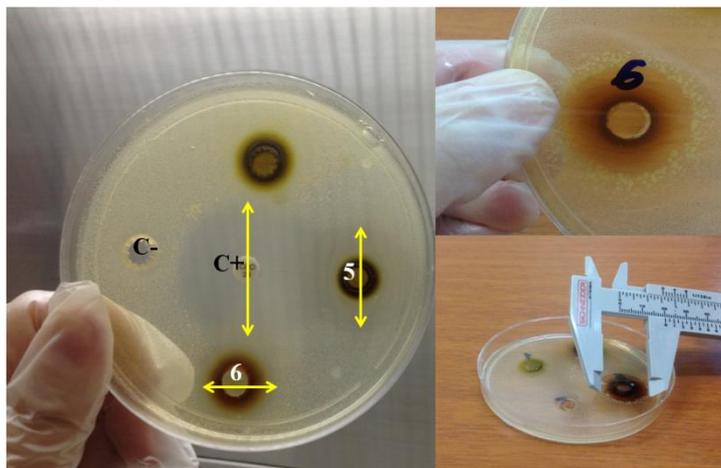


Fonte: Própria autora (2013)

O sistema foi incubado em estufa a 35 °C por 24 h para as bactérias e por 48 h para o fungo (CLSI, 2008; 2012a). Após o término do período de incubação, foram medidos os halos de inibição de crescimento com auxílio de um paquímetro (Figura 8).

De acordo com o diâmetro dos halos de inibição, os extratos foram classificados dentro de três categorias: atividade forte – espécies com halos iguais ou maiores que 16 mm, atividade moderada – espécies com halos iguais ou maiores que 13 mm e iguais ou menores que 15 mm e atividade baixa – espécies com halos iguais ou menores que 12 mm (ALMEIDA et al., 2011).

Figura 8 – Medição dos halos de inibição



Fonte: Própria autora (2013)

6.4.1.3 Técnica de microdiluição em caldo para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

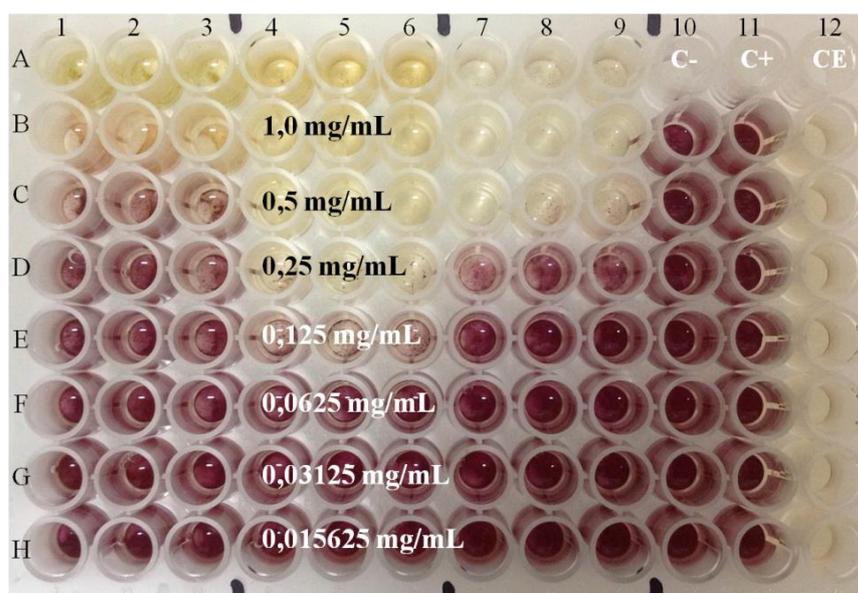
Os cinco extratos etanólicos foram submetidos ao teste de microdiluição em caldo para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) (AYRES et al., 2008).

Este método é denominado “microdiluição”, porque envolve o uso de pequenos volumes de caldo colocados em placas de plástico estéreis, próprias para microdiluição, que possuem poços de fundo redondo ou cônico (CLSI, 2012b).

Os inóculos foram padronizados em solução salina estéril e a suspensão bacteriana Mc Farland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) foi diluída 1:10 para se conseguir uma diluição 10^7 UFC/mL, sendo a concentração final de bactérias de 5×10^5 UFC/mL (ou 5×10^4 UFC/poço), ao inocular 5 μ L dessa suspensão no caldo. A suspensão fúngica Mc Farland 0,5 ($1-5 \times 10^6$ UFC/mL) foi diluída 1:50 para se conseguir uma diluição 2×10^4 UFC/mL, sendo a concentração final desejada de 0,5 a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL ao inocular 50 μ L dessa suspensão em cada poço (CLSI, 2012b).

Este ensaio foi realizado em microplacas estéreis de 96 orifícios. Um volume de 200 μL dos extratos vegetais, preparados na concentração de 2,0 mg/mL, empregando-se DMSO a 10% (para os cinco extratos testados), foram inoculados nas colunas de 1 a 9 da linha A. Os demais orifícios foram preenchidos com 100 μL de Caldo Müeller Hinton (CMH) duas vezes concentrado. Em seguida, uma alíquota de 100 μL do conteúdo de cada orifício da linha A foi transferido para os orifícios da linha B, e após homogeneização, o mesmo volume foi transferido para a linha C, repetindo-se este procedimento até a linha H, e desprezando-se após homogeneização o excesso da diluição, obtendo-se assim concentrações decrescentes dos extratos a partir de 1,0 mg/mL-linha B; 0,5 mg/mL-linha C; 0,25 mg/mL-Linha D, e assim por diante. Um volume de 5 μL (5×10^4 UFC/poço) e de 50 μL (10^3 UFC/poço) dos inóculos bacterianos e fúngicos diluídos, respectivamente, foram depositados em cada um dos orifícios das linhas A-H (Figura 9).

Figura 9 – Técnica de microdiluição em caldo



Fonte: Própria autora (2013)

Os orifícios das colunas 10, 11 e 12 foram destinados para os testes de controle do experimento. Os orifícios da coluna 10 foram reservados para o controle negativo da atividade inibitória do diluente DMSO, utilizado na preparação dos extratos. Nesta coluna, a solução de DMSO a 10% foi diluída em caldo Müeller Hinton até a linha H e o mesmo inóculo microbiano foi acrescido. Os orifícios da coluna 11 receberam apenas caldo Müeller Hinton e o inóculo microbiano, possibilitando o controle positivo da viabilidade microbiana e os orifícios da coluna 12 receberam apenas caldo Müeller Hinton para a verificação da

esterilidade da placa (Figura 9). As microplacas foram seladas com tampas de plástico e incubadas a 35 °C por 18 horas (CLSI, 2012a).

Decorrido este intervalo de tempo, foi acrescido a cada um dos orifícios 20 µL de uma solução aquosa de cloreto de trifetil tetrazólio a 0,5% (TTC – VETEC), corante que promove a coloração das colônias sem comprometer sua viabilidade. As microplacas foram novamente re-incubadas por mais três horas a 35 °C, e após esse período, a presença de coloração vermelha nos orifícios foi interpretada como prova negativa do efeito inibitório do extrato, enquanto a ausência da coloração vermelha foi considerada prova positiva da ação inibitória do extrato sobre os microrganismos testados (AYRES et al., 2008; CLSI, 2012a).

O teste foi considerado válido na constatação de crescimento microbiano nos poços destinados ao controle positivo e a CIM foi definida como a menor concentração do extrato em mg/mL capaz de inibir completamente o crescimento microbiano nos poços de microdiluição conforme detectado a olho nu, ou seja, o aparecimento da coloração vermelha (CLSI, 2012a) (Figura 9).

6.4.2 Avaliação da atividade antioxidante por meio da capacidade sequestradora de radicais livres (CSR)

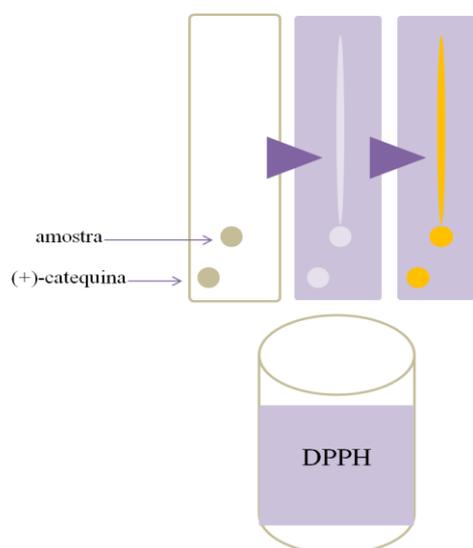
A determinação da atividade antioxidante foi realizada por meio da avaliação da capacidade de antioxidantes presentes nos extratos vegetais em sequestrar o radical sintético 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), que é um composto de moléculas de radicais livres estáveis (SOLER-RIVAS; ESPÍN; WICHERS, 2000). O DPPH reage com substâncias antioxidantes doadoras de hidrogênio (AH), incluindo compostos fenólicos: $DPPH\cdot + AH \leftrightarrow DPPH-H + A\cdot$ (GOVIDARAJAN et al., 2003a e 2003b). Esse é um dos métodos mais confiáveis, além da sua facilidade a rapidez, dentre as metodologias que avaliam a CSR e permite a avaliação de várias amostras em um curto período de tempo.

6.4.2.1 Ensaio qualitativo do DPPH

As amostras dos cinco extratos etanólicos (BC-F, BC-CC, BC-C, LG-PA e LG-C) passaram por dissolução em Clorofórmio (CHCl₃) e alíquotas de 2 µL de cada amostra solubilizada foram aplicadas por meio de capilares de vidro em cromatoplasmas 5 x 20 (silicagel 60 F254, Merck) e eluídas em sistemas de solventes adequados. Após evaporação

dos solventes em temperatura ambiente foi aplicado o controle positivo (+)-catequina (2 μ L, 1 mg/mL em CHCl_3) e as cromatoplasmas foram imersas durante 10 segundos em solução metanólica do radical sintético DPPH (Sigma, St. Louis, MO, EUA) a 0,4 mM e, em seguida, secas a temperatura ambiente. O surgimento de manchas amarelas sobre o fundo roxo das cromatoplasmas das substâncias testadas sugeriu a possível CSR. A intensidade da cor amarela depende da quantidade e natureza do sequestrador de radical livre presente na substância (SOLER-RIVAS; ESPÍN; WICHERS, 2000) (Figura 10).

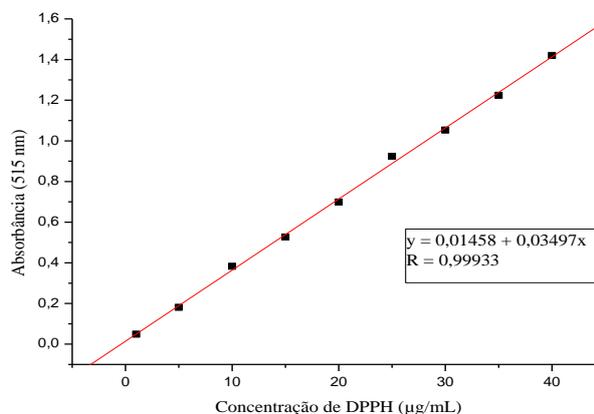
Figura 10 – Ensaio qualitativo do DPPH



Fonte: Própria autora (2013)

6.4.2.2 Ensaio quantitativo do DPPH

Para a realização do ensaio quantitativo, foi elaborada uma curva de calibração do radical DPPH (100 μ mol/L) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) a partir de uma solução inicial de 40 μ g/mL, a qual foi diluída obtendo-se nove concentrações diferentes (1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 μ g/mL). Alíquotas de cada uma das concentrações das soluções de DPPH foram transferidas para cubetas de vidro para a leitura em espectrofotômetro a 515 nm e o MeOH espectroscópico foi utilizado como branco para a devida calibração. A curva foi calculada utilizando o programa estatístico Microcal Origin 6.0[®] (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Curva do DPPH x absorvância

Subsequentemente, os cinco extratos foram solubilizados em MeOH espectroscópico obtendo-se concentrações de 25 a 200 µg/mL (25; 50; 100; 150 e 200 µg/mL). Alíquotas de 0,1 mL de cada uma dessas concentrações foram diluídas em 0,9 mL de solução metanólica do radical DPPH (100 µmol/L). A leitura da absorvância de cada uma das cinco concentrações em triplicata contra a solução de MeOH espectroscópico (branco) foi realizada em um intervalo de 15 minutos, durante o período de 60 minutos em espectrofotômetro a 515 nm.

A concentração inibitória da amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do DPPH (CI₅₀), foi calculada utilizando o programa estatístico Microcal Origin 6.0[®]. A percentagem de DPPH remanescente (DPPH_{REM}) no meio reacional (% DPPH_{REM} = [DPPH]₆₀ / [DPPH]₀ x 100) foi obtida a partir de equação matemática da curva de calibração pré-determinada ($y = 0,01458 + 0,03497x$), dos valores de absorvância (média) obtidos após 60 minutos para cada uma das cinco concentrações testadas (y) e da concentração de DPPH no tempo 60 minutos (x), sendo [DPPH]₀ (concentração de DPPH no tempo 0) de 40 µg/mL

Os valores de CI₅₀ foram expressos como média ± erro padrão. As diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste ANOVA (p<0,05) (FABRI et al., 2011).

6.4.3 Prospecção fitoquímica para identificação de classes de compostos bioativos

A prospecção fitoquímica para identificação de classes de constituintes químicos presentes nos cinco extratos etanólicos foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Matos (1997), onde os métodos utilizados nessa abordagem são qualitativos e a presença de um constituinte pode mascarar a cor indicativa do outro.

Os extratos foram solubilizados em etanol na concentração de 1 mg/mL e um volume de 3-4 mL foi depositada em cada um dos tubos de ensaio numerados de 1 a 7 para cada uma das cinco amostras.

Tubo 1: fenóis e taninos

No tubo de número 1 foi adicionado às amostras três gotas de solução alcoólica de cloreto de ferro (III) e após agitação, a coloração adquirida indicou a classe de substâncias presentes: variação entre azul e vermelho é indicativo de fenóis; azul escuro indica a presença de taninos pirogálicos (hidrolisáveis) e verde, a presença de taninos flobabênicos (condensados ou catéquicos).

Tubo 2-4: antocianinas, antocianidinas e flavonoides

A solução do tubo de número dois foi acidulada com ácido clorídrico a um pH 3,0 e as dos tubos três e quatro foram alcalinizadas, respectivamente, a pH 8,5 e 11, utilizando-se hidróxido de sódio. A combinação das colorações apresentadas pelos três tubos indica as classes de substâncias presentes, sendo que a coloração vermelha, lilás e azul-púrpura são indicativos de antocianinas e antocianidinas e a coloração vermelha e amarela ou laranja indica a presença de flavonoides.

Tubo 5 e 6: Leucoantocianidinas, catequinas e flavononas

O pH do tubo cinco foi acidulado até 1-3 e o do tubo seis alcalinizado a um pH 11, utilizando-se, ácido clorídrico e hidróxido de sódio, respectivamente. Os mesmos foram aquecidos e comparados com os tubos correspondentes utilizados no teste anterior. A alteração da solução acidificada (tubo 5) para cor vermelha é indicativo de leucoantocianidinas e para a cor pardo-amarelada de catequinas, sem alterar a coloração da solução alcalinizada e a alteração da solução alcalinizada para vermelho ou laranja é indicativo da presença de flavononas, sem alteração da solução acidificada.

Tubo 7: flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas

À solução presente no tubo sete foram adicionados alguns miligramas de magnésio e 0,5 mL de ácido clorídrico concentrado, no qual foi observada efervescência dentro do tubo. Ao final dessa reação, o aparecimento ou intensificação da cor vermelha é indicativo da presença dos constituintes supracitados.

Para os outros métodos, um volume de 10 mL de cada uma das cinco soluções etanólicas foi submetido à rotoevaporação.

Esteroides e triterpenoides

O resíduo seco foi extraído três vezes com porções de até 3 mL de clorofórmio, o qual foi filtrado em um funil com um algodão contendo sulfato de sódio anidro (desidratante) em um tubo de ensaio seco. Adicionou-se 1 mL de anidrido acético e após agitação suave foram adicionadas três gotas de ácido sulfúrico concentrado e o tubo novamente agitado. O aparecimento da coloração azul seguida da verde permanente é indicativo da presença de esteroides, enquanto o aparecimento da parda até vermelha é indicativo de triterpenoides pentacíclicos.

Saponinas

Os resíduos insolúveis em clorofórmio do teste anterior foram solubilizados em água destilada, transferidos para um tubo de ensaio e agitados fortemente por dois minutos. A formação de uma espuma persistente e abundante na forma de uma espécie de “colarinho” é indicativa da presença de saponinas.

Alcaloides, antraquinonas, antronas e cumarinas

Os testes para alcaloides, antraquinonas, antronas e cumarinas foram realizados utilizando a cromatografia em camada delgada (CCD). Para o teste de indicativo de alcaloides, os extratos foram solubilizados em metanol, aplicados na placa de CCD e eluídos com uma mistura clorofórmio/metanol na proporção de 9/1. Após a eluição, borrifou-se o reagente de Dragendorff. O aparecimento de coloração laranja é indicativo da presença de alcaloides. Para as outras substâncias borrifou-se hidróxido de potássio a 10% e após secagem, foi observada a presença das cores indicativas em luz ultravioleta no comprimento de onda de 365 nm, sendo azul indicativo de cumarina, vermelho de antraquinona e amarelo de antrona.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Prospecção fitoquímica para a identificação de classes de compostos bioativos

De acordo com os resultados experimentais, a prospecção evidenciou a presença de classes de constituintes químicos nas amostras vegetais, como resumido na tabela 2.

Tabela 2 – Resultado da prospecção fitoquímica de *Bauhinia cheilantha* e *Lippia gracilis*

| Classe de constituintes químicos | Extratos etanólicos | | | | |
|----------------------------------|---------------------|-------|------|-------|------|
| | BC-F | BC-CC | BC-C | LG-PA | LG-C |
| Fenóis | - | - | - | - | - |
| Taninos | + | + | + | + | + |
| Flavonoides | + | + | + | + | + |
| Catequinas | - | - | - | - | - |
| Esteroides | + | + | + | + | - |
| Terpenos | - | - | - | - | + |
| Saponinas | - | - | - | + | - |
| Alcaloides | - | - | - | - | - |
| Antraquinonas | - | + | + | - | - |
| Antronas | + | - | - | + | - |

BC-F: folhas de *Bauhinia cheilantha*; BC-CC casca do caule de *B. cheilantha*; BC-C: caule de *B. cheilantha*; LG-PA: partes aéreas de *Lippia gracilis*; LG-C: caule de *L. gracilis* (PRÓPRIA AUTORA, 2014)

Nos três extratos da espécie *Bauhinia cheilantha*, os resultados evidenciaram a presença de taninos (possivelmente do grupo dos taninos condensados), flavonoides e esteroides, sendo identificadas também antraquinonas e antronas em BC-CC / BC-C e BC-F, respectivamente.

Uma revisão da literatura sobre a composição química de espécies do gênero *Bauhinia*, demonstrou a predominância de terpenos, esteroides, alcaloides e especialmente

flavonoides, sendo *B. manca*, *B. candicans*, *B. uruguayensis*, *B. purpurea*, *B. forficata* e *B. splendens* as espécies mais estudadas fitoquimicamente (SILVA; CECHINEL FILHO, 2002).

As propriedades terapêuticas de diferentes espécies de *Bauhinia* têm sido atribuídas principalmente à presença de flavonoides, sendo a espécie *B. forficata* a mais estudada sob ponto de vista biológico (CECHINEL FILHO, 2009). Estudos sobre a quantificação de flavonoides foliares da espécie *B. cheilantha* confirmaram essa classe de constituinte presente em uma triagem realizada (PEIXOTO SOBRINHO et al., 2008; 2009; 2010). Uma análise fitoquímica realizada por Silva et al. (2007a) também evidenciou a presença de flavonoides, taninos e antraquinonas em folhas de *B. cheilantha* e não identificou a presença de alcaloides e esteroides. No entanto, esta última classe foi encontrada nos três extratos avaliados neste estudo.

Nos extratos da espécie *Lippia gracilis*, a prospecção fitoquímica evidenciou a presença de taninos e flavonoides, além de esteroides, saponinas e antranas em LG-PA e terpenos em LG-C.

Estudos fitoquímicos das espécies de *Lippia* evidenciam, principalmente, os constituintes voláteis, mas flavonoides também já foram citados em estudos com *L. citriodora* e *L. nodiflora*, existindo 56 ocorrências dessa classe no gênero *Lippia* (GOMES; NOGUEIRA; MORAES, 2011), correlacionando-se às evidências aqui encontradas. Alcaloides foram identificados nas espécies *L. dulcis*, *L. germinata*, *L. nodiflora* e *L. turbinata* (GOMES; NOGUEIRA; MORAES, 2011), porém não foram identificados nos extratos de *L. gracilis* estudados. Taninos, triterpenos e derivados de esteroides já foram relatados em *L. alba* (GOMES; NOGUEIRA; MORAES, 2011) e também foram encontrados na prospecção realizada neste estudo.

7.2 Avaliação da atividade antimicrobiana

7.2.1 Extratos de *B. cheilantha*

No ensaio com o método da difusão em meio sólido, o extrato etanólico do caule (BC-C) inibiu todas as cepas bacterianas testadas, apresentando média de diâmetro de halo de 17 ± 1 mm para *S. aureus*, sendo essa a maior média em relação às outras cepas e extratos testados. O extrato da casca do caule (BC-CC), com prováveis compostos no caule, apresentou halos de inibição para todas as cepas Gram-positivas e não inibiu nenhuma das cepas Gram-negativas.

Já o extrato da folha (BC-F) apresentou halo somente para *E. faecalis*, demonstrando baixa atividade. A resistência das cepas Gram-negativas pode ser devido à presença da membrana externa nessas bactérias como uma barreira de permeabilidade. Já a cepa fúngica *C. albicans* foi resistente para todos os três extratos de *B. cheilantha* testados, não apresentando halos de inibição (Tabela 3).

Tabela 3 - Atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos de *Bauhinia cheilantha* frente a cepas bacterianas e fúngica, avaliados por meio dos métodos de difusão em meio sólido e de microdiluição em caldo

| Cepas / Extratos e controles | <i>S. aureus</i> | <i>S. epidermidis</i> | <i>E. faecalis</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>E. coli</i> | <i>K. pneumoniae</i> | <i>C. albicans</i> |
|---|------------------|-----------------------|------------------------|----------------------|----------------|----------------------|--------------------|
| <u>Método da difusão em meio sólido</u> | | | | | | | |
| BC-F | - ^a | - | 10 ± 1 mm ^b | - | - | - | - |
| BC-CC | 16 ± 1 mm | 15 ± 0 mm | 15 ± 1 mm | - | - | - | - |
| BC-C | 17 ± 1 mm | 15 ± 1 mm | 14 ± 1 mm | 11 ± 1 mm | 12 ± 1 mm | 14 ± 1 mm | - |
| Controle - ^c | - | - | - | - | - | - | - |
| Controle + ^d | 30 mm (CRO) | 32 mm (CRO) | 40 mm (CIP) | 31 mm (CIP) | 32 mm (CIP) | 36 mm (CIP) | 31 mm (FLU) |
| <u>Microdiluição em caldo</u> | | | | | | | |
| BC-F | > 1,0 | > 1,0 | > 1,0 | > 1,0 | > 1,0 | > 1,0 | > 1,0 |
| BC-CC | 1,0 | 1,0 | > 1,0 | > 1,0 | > 1,0 | > 1,0 | > 1,0 |
| BC-C | 1,0 | 1,0 | > 1,0 | > 1,0 | > 1,0 | > 1,0 | > 1,0 |

BC: *Bauhinia cheilantha*; -^a Ausência de halo de inibição; ^bMedidas dos halos de inibição de crescimento em mm (média de triplicata ± desvio padrão); ^cSolvente utilizado na solubilização das amostras vegetais (DMSO a 10%); ^dDiscos de antimicrobianos referência utilizados; CIP Ciprofloxacina 5µg, CRO Ceftriaxona 30µg, FLU Fluconazol 50 µg/mL; Os valores da microdiluição em caldo são expressos em concentração inibitória mínima do extrato etanólico em mg/mL (PRÓPRIA AUTORA, 2013).

Apesar dos halos com atividade forte e moderada apresentados pelos extratos BC-CC e BC-C, no ensaio da microdiluição em caldo, a maioria dos valores de CIM para essa espécie foram maiores que 1,0 mg/mL, exceto no teste de BC-CC e BC-C contra *S. aureus* e *S. epidermidis*, os quais mostraram-se sensíveis com CIM de 1,0 mg/mL, o que pode indicar a presença de compostos antibacterianos nessas partes (Tabela 3). Esse dado se assemelha com o estudo realizado por Mishra et al. (2011) que demonstraram a inibição do crescimento de *S. aureus* com extratos benzênicos de *B. variegata*, os quais apresentaram halos de inibição de

10 mm e concentração bactericida mínima de 60 mg/mL, concentração alta em comparação com os extratos testados neste estudo.

Dados de estudos realizados com outras espécies de *Bauhinia* mostraram forte atividade antimicrobiana da casca do caule e da raiz, enquanto fraca ou nenhuma atividade nas folhas, havendo uma relação com os resultados aqui obtidos (DUGASANI, 2010; KUMAR et al., 2005; MARTÍNEZ et al., 2011).

Martínez et al. (2011) testaram extratos etanólicos e frações de alcaloides de folhas de *B. variegata* quanto ao seu potencial antibacteriano, onde todas as amostras apresentaram CIM com valores acima de 1,0 mg/mL, assim como o extrato BC-F testado no presente estudo, o que constata a fraca atividade antimicrobiana foliar.

Outro ensaio, que avaliou a atividade antimicrobiana de extratos metanólicos da casca do caule de *B. racemosa*, mostrou um amplo espectro de atividades contra todas as cepas bacterianas testadas com valores de CIM de 25 a 200 µg/mL (KUMAR et al., 2005), evidenciando um potencial antibacteriano nas partes da casca do caule desta espécie.

Dugasani et al. (2010) avaliaram extratos hexânicos, acetato de etila e metanólicos de raízes de *B. tomentosa* e *B. vahlii* e concluiu que todos os extratos acetato de etila e metanólicos apresentaram CIM com valores abaixo de 62,5 µg/mL e 250 µg/mL, respectivamente. O autor atribuiu esses achados a presença de flavonoides (extratos acetato de etila) e taninos (extratos metanólicos), o que poderia justificar a provável ação desses constituintes nos extratos BC-CC e BC-C, considerando as evidências sobre flavonoides e taninos presentes nessas partes (SILVA et al., 2007a).

7.2.2 Extratos de *L. gracilis*

Os extratos etanólicos das partes aéreas e do caule de *L. gracilis* (LG-PA e LG-C) inibiram todas as três cepas Gram positivas testadas. Em geral, essas amostras apresentaram halos de inibição significativos com forte atividade para as cepas Gram-positivas, evidenciando a presença de constituintes com propriedades antibacterianas.

A cepa *S. aureus* mostrou-se sensível com média de diâmetro de halo de 20 ± 2 mm para LG-C e 27 ± 4 mm para LG-PA, sendo esse último o valor mais aproximado do controle positivo utilizado (Tabela 4).

Tabela 4 - Atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos de *Lippia gracilis* frente a cepas bacterianas e fúngica, avaliados por meio dos métodos de difusão em meio sólido e de microdiluição em caldo.

| Cepas / Extratos e controles | <i>S. aureus</i> | <i>S. epidermidis</i> | <i>E. faecalis</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>E. coli</i> | <i>K. pneumoniae</i> | <i>C. albicans</i> |
|---|------------------------|-----------------------|--------------------|----------------------|----------------|----------------------|--------------------|
| <u>Método da difusão em meio sólido</u> | | | | | | | |
| LG-PA | 27 ± 4 mm ^b | 17 ± 0 mm | 13 ± 1 mm | - ^a | - | 12 ± 0 mm | 10 ± 1 mm |
| LG-C | 20 ± 2 mm | 13 ± 1 mm | 19 ± 1 mm | - | 10 ± 1 mm | 13 ± 0 mm | 11 ± 0 mm |
| Controle - ^c | - | - | - | - | - | - | - |
| Controle + ^d | 30 mm (CRO) | 32 mm (CRO) | 40 mm (CIP) | 31 mm (CIP) | 32 mm (CIP) | 36 mm (CIP) | 31 mm (FLU) |
| <u>Microdiluição em caldo</u> | | | | | | | |
| LG-PA | 0,125 ^f | 0,25 | 0,5 | > 1,0 | > 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| LG-C | 0,5 | 0,125 | 0,25 | > 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |

LG: *Lippia gracilis*; -^a Ausência de halo de inibição; ^bMedidas dos halos de inibição de crescimento em mm (média de triplicata ± desvio padrão); ^cSolvente utilizado na solubilização das amostras vegetais (DMSO a 10%); ^dDiscos de antimicrobianos referência utilizados; CIP Ciprofloxacina 5µg, CRO Ceftriaxona 30µg, FLU Fluconazol 50 µg/mL; Os valores da microdiluição em caldo são expressos em concentração inibitória mínima do extrato etanólico em mg/mL (PRÓPRIA AUTORA, 2013).

Dentre as cepas Gram-negativas, *E. coli* e *K. pneumoniae* foram sensíveis a LG-C, e LG-PA inibiu somente a *K. pneumoniae*, com provável presença de compostos ativos do caule. Já a cepa *P. aeruginosa* foi resistente às amostras testadas de *L. gracilis* (Tabela 4). Esses resultados podem ser relacionados com o estudo de Sarrazin et al. (2012) que testou o óleo essencial de *L. grandis*, quanto ao seu potencial antimicrobiano, no qual todas as cepas Gram-positivas utilizadas foram sensíveis, ao passo que *P. aeruginosa* também mostrou resistência ao óleo testado.

Sob as condições experimentais do presente estudo, os extratos brutos apresentaram halos de inibição ao crescimento de *C. albicans*, diferentemente do óleo essencial testado por Sarrazin et al. (2012), que não apresentou inibição do crescimento para essa levedura. Nessa relação, a inibição apresentada pode indicar a possível presença de constituintes que não estão

presentes nos óleos essenciais, porém outros estudos com espécies do mesmo gênero (*L. sidoides* e *L. origanoides*) já demonstraram inibição contra essa levedura (BOTELHO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2007).

No ensaio da microdiluição em caldo com as cepas Gram-positivas, todos os valores de concentração inibitória mínima dos extratos ficaram abaixo de 0,5 mg/mL. Os extratos de LG-PA apresentaram atividade antibacteriana com valores de CIM de 0,125 mg/mL para *S. aureus* e 0,25 mg/mL para *S. epidermidis*, e os extratos de LG-C apresentaram valores de CIM de 0,125 mg/mL para *S. epidermidis* e 0,25 mg/mL para *E. faecalis*. Já com as cepas Gram-negativas, os valores de CIM foram iguais ou acima de 1,0 mg/mL, sendo que LG-C para *E. coli* e os dois extratos para *K. pneumoniae* apresentaram valores de 1,0 mg/mL, resultados consistentes com estudo que avaliou as mesmas cepas Gram-negativas testadas (SARRAZIN et al., 2012). Os valores de CIM para todas as bactérias testadas foram menores dos que os resultados de Sarrazin et al. (2012) para o óleo essencial de *L. grandis*. Quanto a atividade contra a levedura *C. albicans*, ambos os extratos apresentaram valores de CIM de 1,0 mg/mL, demonstrando maior atividade que o óleo essencial de *Lippia sidoides* (2,5 mg/mL) e seus principais compostos fenólicos, timol (0,625 mg/mL) e carvacrol (1,25 mg/mL) no estudo de Botelho et al. (2007). O solvente utilizado como controle negativo não apresentou atividade em todos os microrganismos testados.

Esses resultados podem estar relacionados com a presença de compostos fenólicos, uma vez que estudos a respeito dos constituintes voláteis de *L. gracilis*, atribuíram a forte atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos à presença de compostos como o timol e o carvacrol, principais componentes da espécie. No entanto, a presença de terpenos evidenciada na prospecção também pode justificar a atividade antimicrobiana apresentada (ALBUQUERQUE et al., 2006; NEVES et al., 2007).

7.3 Avaliação da atividade antioxidante por meio da capacidade sequestradora de radicais livres (CSR)

7.3.1 Ensaio qualitativo do DPPH

Todas as cinco amostras dos extratos vegetais testadas sugeriram uma possível CSR, indicadas com a presença de manchas amareladas sobre o fundo roxo das cromatoplasas, quando comparado com o controle positivo (+)-catequina, conforme mostra a figura 11.

Figura 11 - Cromatoplasas dos extratos etanólicos de *Bauhinia cheilantha* e *Lippia gracilis* após reação com DPPH



Fonte: Própria autora (2013)

7.3.1 Ensaio quantitativo do DPPH

As cinco amostras com resultados positivos nos ensaios qualitativos foram submetidas à avaliação quantitativa. A tabela 5 mostra os valores de percentagem de DPPH remanescente ($DPPH_{REM}$) das cinco concentrações testadas de cada um dos extratos etanólicos.

A partir dos valores de percentagem, determinou-se a concentração da amostra necessária para diminuir a concentração inicial do DPPH em 50% (CI_{50}), que é a medida de eficiência das amostras analisadas. Assim, os valores de CI_{50} são inversamente proporcionais à atividade, sendo que, quanto menor o valor, maior é a capacidade antioxidante.

Tabela 5 – Concentração de DPPH remanescente dos extratos *B. cheilantha* e *L. gracilis* em diferentes concentrações

| Extratos / Concentração ($\mu\text{g/mL}$) | BC-F | BC-CC | BC-C | LG-PA | LG-C |
|--|---|---------|---------|---------|---------|
| | <u>% $DPPH_{REM}$ para cada extrato etanólico</u> | | | | |
| 25 | 87,4621 | 65,3310 | 76,2137 | 83,6955 | 96,8455 |
| 50 | 79,4552 | 52,9368 | 64,6206 | 84,1490 | 99,7173 |
| 100 | 66,8015 | 0,6393 | 40,6181 | 77,4229 | 94,5027 |
| 150 | 51,1452 | -2,5347 | 2,7891 | 69,2608 | 85,2826 |
| 200 | 35,7034 | 1,6218 | 2,0752 | 54,1460 | 87,9277 |

(PRÓPRIA AUTORA, 2013)

Como padrões positivos foram utilizados o ácido ascórbico ($CI_{50} 37,37 \pm 3,18 \mu\text{g/mL}$) que possui cinética rápida e o BHT ($CI_{50} 97,86 \pm 2,52 \mu\text{g/mL}$) de cinética lenta.

Os valores de CI_{50} encontrados para as amostras testadas variaram de $39,19 \pm 19,09$ a $685,38 \pm 3,44 \mu\text{g/mL}$. As amostras que apresentaram $CI_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$ foram consideradas inativas (Tabela 6).

Tabela 6 - Atividade dos extratos etanólicos de *Bauhinia cheilantha* e *Lippia gracilis*, frente ao radical DPPH

| Amostras vegetais | DPPH (Qualitativo) | DPPH $CI_{50} \pm DP (\mu\text{g/mL})$ |
|-------------------|-----------------------|---|
| BC-F | + | $153,15 \pm 0,99$ |
| BC-CC | + | $38,19 \pm 19,09$ |
| BC-C | + | $77,60 \pm 9,51$ |
| LG-PA | + | $246,01 \pm 3,84$ |
| LG-C | + | $685,38 \pm 3,44$ |
| Catequina* | + | NR |
| Ácido ascórbico* | NR | $37,37 \pm 3,18$ |
| BHT* | NR | $97,86 \pm 2,52$ |

(-): negativo; (+): positivo; NR: não realizado; *Padrões positivos utilizados (PRÓPRIA AUTORA, 2013)

Kumar et al. (2005) avaliaram a atividade antioxidante do extrato metanólico da casca do caule de *B. racemosa* por meio de vários sistemas e no ensaio do DPPH, o valor obtido de CI_{50} foi de $152,29 \mu\text{g/mL}$, que apesar do resultado ter sido estatisticamente significativo, a diferença entre as espécies avaliadas com a mesma parte da planta utilizada, ressalta o potencial antioxidante do extrato da casca do caule de *B. cheilantha*.

Sowndhararajan e Kang (2013) determinaram a atividade antioxidante de extratos de folha de *B. vahlii* utilizando diferentes solventes nas extrações e obtiveram valores de CI_{50} abaixo de $80 \mu\text{g/mL}$, demonstrando o maior potencial antioxidante das folhas dessa espécie em comparação com o resultado do extrato BC-F testado.

Argolo et al. (2004) demonstrou o potencial antioxidante de extratos de folhas de *B. monandra* frente ao DPPH, quando comparada ao grupo tratado com catequinas, atribuindo

esses resultados aos esteroides e flavonoides, constituintes evidenciados na prospecção realizada nesse estudo.

Outros métodos que avaliam a capacidade antioxidante, como a atividade de quelação de metais, tem também demonstrado o potencial de algumas espécies do gênero *Bauhinia*. Esse método mostra a capacidade de desativar (quelar) metais de transição, como no estudo de Sowndhararajan e Kang (2013) que comprovaram um nível moderado de capacidade quelante em todos os extratos de *B. vahlii*. Mishra et al. (2013) avaliou o potencial antioxidante de extratos de *B. variegata*, por meio da quelação de íons FeCl_2 e os extratos polares dessa espécie mostraram atividade quelante em concentrações de 10-40 $\mu\text{g/mL}$.

Os flavonoides são um grupo de compostos fenólicos que têm potencial antioxidante e desempenha um importante papel na proteção contra o estresse oxidativo (MISHRA et al., 2013) e parecem ser o principal princípio ativo nas espécies do gênero *Bauhinia* (CECHINEL FILHO, 2009). A presença de flavonoides e taninos pode justificar a atividade sequestradora de radicais livres apresentadas pelos extratos BC-F, BC-CC e BC-C.

Estudos fitoquímicos e quantificação do teor de flavonoides são necessários na ordem de comprovar a atividade encontrada, considerando também a influência da polaridade na extração dos princípios ativos como no estudo de Mishra et al. (2013) que quantificou os flavonoides de extratos de folha de *B. variegata* e mostrou uma maior quantidade de teor de flavonoides totais nos extratos de média polaridade (clorofórmio, acetato de etila e acetona).

Os dois extratos de *L. gracilis*, apresentaram $\text{CI}_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$, sendo que as partes aéreas apresentaram o valor aproximado de CI_{50} de $246,01 \pm 3,84$, havendo a possibilidade da existência de constituintes bioativos com atividade antioxidante em meio à mistura complexa de compostos, caso sejam avaliados separadamente.

Apesar dos óleos essenciais das espécies de *Lippia* serem mais estudados quanto ao seu potencial antimicrobiano, estudos que confirmaram o potencial antioxidante existente nos óleos essenciais e substâncias isoladas do gênero *Lippia* já foram relatados. Como o óleo essencial de *L. gracilis* são ricos em timol e carvacrol, que são compostos fenólicos que por sua vez são potentes antioxidantes, a possibilidade de investigação dos constituintes fixos desses extratos têm sua importância.

Damasceno et al. (2008) avaliaram extratos metanólicos de folhas e ramos de *L. grandis* quanto a capacidade sequestradora de radicais frente ao DPPH e obtiveram CI de $20,1 \pm 1,4 \mu\text{g/mL}$, o qual foi justificado pela presença de compostos fenólicos. Já Alves et al. (2010) avaliaram a atividade antioxidante frente ao DPPH ($45 \mu\text{g/mL}$) de componentes dos

óleos essenciais de *L. gracilis* e *L. sidoides* onde a espécie *L. gracilis* (CI₅₀ 5.290 µg/mL) apresentou atividade de sequestro do DPPH superior a *L. sidoides* (CI₅₀ 12.340 µg/mL), sendo ambos os resultados maiores que os dos extratos avaliados, ou seja, com menor capacidade antioxidante do que as amostras testadas.

Almeida et al. (2010b) encontraram uma alta atividade antioxidante de extratos etanólicos foliares (CI₅₀ 43 µg/mL) e compostos isolados (CI₅₀ 2,5 a 16,3 µg/mL) de *L. sidoides* por meio do ensaio do DPPH, atribuindo esse resultado à presença de substâncias flavonoídicas, sendo esse o primeiro registro desta atividade em alguns compostos inéditos identificados da espécie.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Apesar do crescimento nas investigações sobre o potencial biológico de compostos presentes no gênero *Bauhinia*, a avaliação antimicrobiana e antioxidante com espécies desse gênero ainda é incipiente. Além do estudo de Almeida et al. (2006b), o qual testou extrato metanólico de folhas da espécie *B. cheilantha* quanto a sua atividade hipoglicêmica, não foi encontrada nenhuma outra avaliação farmacológica com essa espécie na literatura. Sendo assim, esse é o primeiro relato a respeito da atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos brutos de *B. cheilantha*, além da prospecção fitoquímica realizada da casca do caule e do caule.

Embora um número de componentes químicos descritos para o gênero *Bauhinia* também foram encontrados em outras espécies, os metabólitos secundários produzidos por esse gênero, particularmente os flavonoides, demonstraram o potencial medicinal dessas plantas.

Os resultados deste estudo indicam que os extratos etanólicos de folhas, casca do caule e caule de *Bauhinia cheilantha* são fontes potenciais de antioxidantes naturais, podendo ser úteis na condição de estresse oxidativo induzido pela hiperglicemia, uma vez reconhecida a importante ação antioxidante na prevenção dessa complicação diabética.

A respeito da espécie *Lippia gracilis*, estudos sobre seus constituintes voláteis, principalmente o timol e o carvacrol, já foram relatados quanto a sua forte atividade antimicrobiana. No entanto, pesquisas sobre os constituintes fixos da espécie não foram encontrados, evidenciando a necessidade de estudos que enfoquem outras classes de compostos e demonstrando a contribuição do presente estudo.

Os resultados da atividade antimicrobiana de *L. gracilis* demonstraram potencial antibacteriano e antifúngico de ambos os extratos testados, com valores de CIM menores que constituintes de óleos essenciais de outras espécies de *Lippia* estudadas, em uma avaliação comparativa. Esses achados podem ser atribuídos à presença de flavonoides e terpenos, presentes nos extratos.

A avaliação da toxicidade desses extratos, associados às atividades biológicas, são fundamentais para o estabelecimento de índices terapêuticos, determinando sua aplicabilidade. Um ensaio de citotoxicidade será o próximo passo, uma vez que é um fator limitante na liberação e consumo de fitofármacos.

A continuação desses estudos também envolve a identificação e quantificação das classes de compostos responsáveis pelas atividades biológicas observadas. No momento a investigação fitoquímica está sendo realizada pelo Prof. Dr. Luiz Carlos Caetano na Universidade de Londres (University of London / UK). Portanto, os resultados do presente estudo oferecem suporte, ainda que parcialmente, ao uso popular das espécies semiáridas *B. cheilantha* para o tratamento do diabetes e *L. gracilis* para o tratamento de processos infecciosos. A valiosa relação entre o saber tradicional e a busca na comprovação científica possibilitam que as plantas utilizadas popularmente sejam estudadas e, sendo sua eficácia comprovada, benefícios econômicos e também desenvolvimento científico podem ser gerados.

REFERÊNCIAS

- ACHENBACH, H. et al. **Phytochemistry**, v. 27, n. 1835, 1988 apud SILVA, K.L.; CECHINEL FILHO, V. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 449-54, 2002.
- ACHENBACH, H.; STOCKER, M.; CONSTENLA, M.A. Flavonoid and other constituents of *Bauhinia manca*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 6, p. 1835-1841, 1988.
- AGRA, M.F et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 18, n. 3, p. 472-508, set. 2008.
- AGRA, M.F. et al. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 383–95, 2007.
- AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 17, n. 1, p. 114-140, mar. 2007.
- AKHTAR, A.H.; AHMAD, K.U. Anti-ulcerogenic evaluation of the methanolic extracts of some indigenous medicinal plants of Pakistan in aspirin-ulcerated rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 46, n. 1, p. 1-6, 1995.
- ALBUQUERQUE, C.C. et al. Antimicrobial Action of the Essential Oil of *Lippia gracilis* Schauer. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 4, p. 527-535, jul. 2006.
- ALBUQUERQUE, U.P. et al. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 1, p. 76–91, 2007b.
- ALBUQUERQUE, U.P. et al. Medicinal plants of the Caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p. 325-354, dez. 2007a.
- ALBUQUERQUE, U.P. Re-examining hypotheses concerning the use and knowledge of medicinal plants: a study in the Caatinga vegetation of NE Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 26, n. 2, p. 30, 2006.
- ALBUQUERQUE, U.P.; ANDRADE, L.H.C. Uso de recursos vegetais da caatinga: o caso do agreste do Estado de Pernambuco (nordeste do Brasil). **Interciência**, v. 27, n. 7, p. 336-346, jul. 2002.

- ALMEIDA, C.F.C.B.R. et al. A comparison of knowledge about medicinal plants for three rural communities in the semi-arid region of northeast of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 3, p. 674-684, fev. 2010a.
- ALMEIDA, C.F.C.B.R. et al. Comparative study of the antimicrobial activity of native and exotic plants from the Caatinga and Atlantic Forest selected through an ethnobotanical survey. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 2, p. 201-208, dez. 2011.
- ALMEIDA, C.F.C.B.R. et al. Medicinal plants popularly used in the Xingó region – a semi-arid location in Northeastern Brazil. **Jornal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 2, n. 15, p. 1-9, 2006a.
- ALMEIDA, C.F.C.B.R.; ALBUQUERQUE, U.P. Uso e conservação de plantas e animais medicinais no estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil): um estudo de caso. **Interciência**, v. 27, n. 6, p. 276-285, jun. 2002.
- ALMEIDA, E.R. et al. Hypoglycemic effect of *Bauhinia cheilandra* in rats. **Fitoterapia**, v. 77, n. 4, p. 276-8, 2006b.
- ALMEIDA, L.C.T. et al. Potencial antimicrobiano do óleo de coco no tratamento de feridas. **Revista da Rede de Enfermagem do Nordeste**, v. 13, n. 4, p. 880-887, dez. 2012
- ALMEIDA, M.C.S. et al. Flavonoides e outras substâncias de *Lippia sidoides* e suas atividades antioxidantes. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1877-1881, 2010b.
- ALONSO, J. Tratado de Fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas. Buenos Aires: ISIS Ediciones, 1998, p. 805-806 apud OLIVEIRA, F. et al. Mitos e verdades sobre pata-de-vaca - *Bauhinia forficata* Link - uma revisão. **Lecta-USF**, v. 19, n. 1-2, p. 7-20, 2001.
- ALVES, L.M.M. et al. Pesquisa básica na enfermagem. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 12, n. 1, p. 122-127, fev. 2004.
- ALVES, P.B. et al. Atividade antioxidante do óleo essencial de duas espécies de Lippia: *Lippia sidoides* e *Lippia gracilis*. In: **33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2010, Águas de Lindoia. Resumos... São Paulo: Sociedade Brasileira de Química (SBQ), 2010. Disponível em: <http://sec.s bq.org.br/cdrom/33ra/resumos/T1990-1.pdf>
- ALVES, T.M.A. et al. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 3, p. 367-373, jun. 2000.
- ARGOLO, A.C. et al. Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra*. **Bioresource Technology**, v. 95, n. 2, p. 229-33, 2004.
- AYRES, M.C.C. et al. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 90-97, 2008.
- BADKE, M.R. et al. Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. **Escola Anna Nery**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 1, p. 132-139, mar. 2011.
- BARBOSA, J.H.P.; OLIVEIRA, S.L.; SEARA, L.T. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. **Arquivos**

Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, São Paulo, v. 52, n. 6, p. 940-950, ago. 2008.

BARROS, F.M.C. et al. Plantas de uso medicinal no Município de São Luiz Gonzaga, RS, Brasil. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 5, p. 652-62, 2007.

BASSO, L.A. et al. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 6, p. 475-506, out. 2005.

BASTOS, M.L.A. et al. Studies on the antimicrobial activity and brine shrimp toxicity of *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bur. (Bignoniaceae) extracts and their main constituents. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v.8, n. 16, p. 1-6, mai. 2009.

BOTELHO, M.A. et al. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 40, n. 3, p. 349-356, mar. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Direção de Administração e Finanças. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **RENISUS - Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. 2009b. 1p. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>>. Acesso em: 16 out. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Direção de Administração e Finanças. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **RENAME - Relação Nacional de Medicamentos Essenciais**. 2012. 129p. Disponível em: <<http://www.crfms.org.br/upload/relacao-nacional-de-medicamentos-essenciais-2012.pdf>>. Acesso em: 17 dez. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60p. Disponível em: <[http://portal.mda.gov.br/portal/saf/arquivos/view/Pol%C3%ADtica Nacional de Plantas M edicinais e Fitoter%C3%A1picos.pdf](http://portal.mda.gov.br/portal/saf/arquivos/view/Pol%C3%ADtica%20Nacional%20de%20Plantas%20Medicinais%20e%20Fitoter%C3%A1picos.pdf)>. Acesso em: 16 out. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Programa Nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. Brasília: Ministério da Saúde, 2009a. 136p. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/plantas_medicinais.pdf>. Acesso em: 16 out. 2012.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Biomás Caatinga**. Ministério do Meio Ambiente, 2013 em: <<http://www.mma.gov.br/biomass/caatinga>>. Acesso em: 23 out. 2013.

CARTAXO, S.L.; SOUZA, M.M.; ALBUQUERQUE, U.P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, n. 2, p. 326-342, jul. 2010.

CARVALHO, J.C.T. et al. Anti-inflammatory and Analgesic Activities of the Crude Extracts from Stem Bark of *Bauhinia Guianensis*. **Pharmaceutical Biology**, v. 37, n. 4, p. 281-28, 1999.

CECHINEL FILHO, V. Chemical composition and biological potential of plants from the genus *Bauhinia*. **Phytotherapy Research**, v. 23, n. 10, p. 1347-54, 2009.

CECHINEL FILHO, V. et al. Estudo fitoquímico e avaliação preliminar da atividade analgésica de *Bauhinia splendens*. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 76, p. 115-117, 1995.

CEOLIN, T. et al. Plantas medicinais: transmissão do conhecimento nas famílias de agricultores de base ecológica no Sul do RS. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, São Paulo, v. 45, n. 1, mar. 2011.

CHRISTO, A.G.; GUEDES-BRUNI, R.R.; SILVA, A.G. Local knowledge on medicinal plant gardens in a rural community near the Atlantic Rain Forest, southeastern Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 494-501, 2010.

CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. 3. ed. **CLSI document M07-A9**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012a.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 22. ed. Informational Supplement. **CLSI document M100-S22**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012b.

CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Tests of Yeasts; Approved Standard. 9. ed. **CLSI document M27-A3**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

COMPADRE, C.M.; ROBBINS, E.F.; KINGHORN, A.D. The intensely sweet herb, *Lippia dulcis* Trev.: historical uses, field inquiries, and constituents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 15, n. 1, p. 89-106, jan. 1986.

COSTA, V.P.; MAYWORM, M.A.S. Plantas medicinais utilizadas pela comunidade do bairro dos Tenentes - município de Extrema, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 3, p. 282-92, 2011.

CURCIO, S.A. et al. Hypoglycemic effects of an aqueous extract of *Bauhinia forficata* on the salivary glands of diabetic mice. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 25, n. 3, p. 493-9, 2012.

DAMASCENO, E.I.T. Capacidade antioxidante de extratos de *Lippia grandis* Schau. Com ocorrência na Serra de Carajás, PA. In: **31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2008, Águas de Lindoia. Resumos... São Paulo: Sociedade Brasileira de Química (SBQ), 2008. Disponível em: <http://sec.sbq.org.br/cdrom/31ra/resumos/T1465-2.pdf>

DUGASANI, S. et al. Antimicrobial activity of *Bauhinia tomentosa* and *Bauhinia vahlii* roots. **Pharmacognosy Magazine**, v. 6, n. 23, p. 204-207, jul. 2010.

ELISABETSKY, E.; SOUZA, G.C. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Orgs). **Farmacognosia: da planta ao**

medicamento. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFCS, 2004, p. 107-122.

FABRI, R.L. et al. Potencial antioxidante e antimicrobiano de espécies da família Asteraceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 2, p. 183-189, 2011.

FEIJÓ, A.M. et al. Plantas medicinais utilizadas por idosos com diagnóstico de *Diabetes mellitus* no tratamento dos sintomas da doença. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. 1, p. 50-56, 2012.

FERREIRA JÚNIOR, W.S.; LADIOC, A.H.; ALBUQUERQUE, U.P. Resilience and adaptation in the use of medicinal plants with suspected anti-inflammatory activity in the Brazilian Northeast. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, n. 1, p. 238-252, 2011.

GADOTTI, V.M. et al. Antinociceptive action of the extract and the flavonoid quercitrin isolated from *Bauhinia microstachya* leaves. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 57, n. 10, p. 1345-51, 2005.

GIRALDI, M.; HANAZAKI, N. Uso e conhecimento tradicional de plantas medicinais no Sertão do Ribeirão, Florianópolis, SC, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 2, p. 395-406, 2010.

GOMES, E.C. et al. Constituintes do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E.BR. - Verbenaceae. **Revista Brasileira de Informação Bibliográfica em Ciências Sociais**, Rio de Janeiro, v. 74, n.2, p. 29-32, 1993.

GOVINDARAJAN, R. et al. Free radical scavenging potential of *Picrorhiza kurrooa* royleex Benth. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 41, n. 8, p. 875-879, ago. 2003a.

GOVINDARAJAN, R. et al. Studies on the antioxidant activities of *Desmodium gangeticum*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. v. 26, n. 10, p. 1424-1427, out. 2003b.

GUPTA, M.P. **Plantas medicinales iberoamericanas**. 1. ed. Itajaí: Editora Univali, 2010, 1003 p.

HEISLER, E.V. et al. Saber popular sobre a utilização da planta *Anredera cordifolia* (folha gorda). **Texto & Contexto - Enfermagem**, Florianópolis, v. 21, n. 4, p. 937-944, dez. 2012.

JUDD, W.S. et al. **Plant Systematics: A Phylogenetic Approach**. 3. ed. Sunderland, UK: Sinauer, 2007, 565 p.

KARAMAN, I. et al. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 85, p. 231-235, 2003.

KHALIL, N.M.; PEPATO, M.T.; BRUNETTI I. L. Free Radical Scavenging Profile and Myeloperoxidase Inhibition of Extracts from Antidiabetic Plants: *Bauhinia forficata* and *Cissus sicyoides*. **Biological Research**, Santiago, v. 41, n. 2, p. 165-171, 2008.

- KUMAR, R.S. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of *Bauhinia racemosa* L. stem bark. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 7, jul. 2005.
- LIMA, I.O. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 1970201, abr./jun. 2006.
- LINO, C.S. et al. Antidiabetic activity of *Bauhinia forficata* extracts in alloxan-diabetic rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 1, p. 125-7, 2004.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002, 512 p.
- LUNA, J.S. et al. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 199-206, 2005.
- MACEDO, A.F.; OSHIWA, M.; GUARIDO, C.F. Ocorrência do uso de plantas medicinais por moradores de um bairro do município de Marília-SP. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 123-28, 2007.
- MACEDO, M.; FERREIRA, A.R. Plantas hipoglicemiantes utilizadas por comunidades tradicionais na Bacia do Alto Paraguai e Vale do Guaporé, Mato Grosso – Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 1, p. 45-47, 2004.
- MACEDO, M.L. et al. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 146, n. 4, p. 486-98, 2007.
- MACHADO JUNIOR, J.C. et al. A citometria de fluxo como instrumento de avaliação da atividade imunomodulatória de extratos e substâncias isoladas de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. Supl., p. 645-55, 2006.
- MACIEL, M.A.M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.
- MARTÍNEZ, M.M. et al. Actividad antibacteriana y citotoxicidad in vivo de extractos etanólicos de *Bauhinia variegata* L. (Fabaceae). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, Ciudad de la Habana, v. 16, n. 4, dez. 2011.
- MARTÍN-GALLÁN, P. et al. Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 34, n. 12, p. 1563-1574, jun. 2003.
- MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2. ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997, p.36-39.
- MELO, J.G. et al. Phytochemical and pharmacological notes of plants indicated to treat tumors in Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 4, p. 744-53, 2011.

MENEZES, F.S. et al. Hypoglycemic activity of two Brazilian *Bauhinia* species: *Bauhinia forficata* L. and *Bauhinia monandra* Kurz. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 8-13, 2007.

MENEZES, P.R.; SCHWARZ, E.A.; SANTOS C.A. *In vitro* antioxidant activity of species collected in Paraná. **Fitoterapia**, v. 75, n. 3-4, p. 398-400, 2004.

MERÉTIKA, A.H.C.; PERONI, N.; HANAZAKI, N. Local knowledge of medicinal plants in three artisanal fishing communities (Itapoá, Southern Brazil), according to gender, age, and urbanization. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 2, p. 386-94, 2010.

MING, L.C.; FERREIRA, M.I.; GONÇALVES, G.G. Pesquisas agronômicas das plantas medicinais da Mata Atlântica regulamentadas pela ANVISA. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. esp., p. 131-7, 2012.

MISHRA, A. et al. *Bauhinia variegata* leaf extracts exhibit considerable antibacterial, antioxidant, and anticancer activities. **Biomed Research International**, v. 2013, ID 915436, 10 p., set. 2013.

MISHRA, A. et al. Studies on *in vitro* antioxidant and antistaphylococcal activities of some important medicinal plants. **Cellular and Molecular Biology**, v. 57, n. 1, p. 16-25, fev. 2011.

NASCIMENTO NETO, L.G. et al. Effect of the lectin of *Bauhinia variegata* and its recombinant isoform on surgically induced skin wounds in a murine model. **Molecules**, v. 16, n. 11, p. 9298-315, 2011.

NETO, R.M. et al. The essential oil from *Lippia gracilis* Schauer, Verbenaceae, in diabetic rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 261-266, abr. / mai. 2010.

OLADIMEJI, F.A. et al. **Pediculocidal and scabidical properties of *Lippia multiflora*** essential oil. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 72, n. 1-2, p. 305-311, set. 2000.

NEVES, I.A. et al. Composição química do óleo das folhas de *Lippia gracilis* Schauer de duas localidades de Pernambuco. In: **30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2007, Águas de Lindoia. Resumos... São Paulo: Sociedade Brasileira de Química (SBQ), 2007. Disponível em: <http://sec.s bq.org.br/cdrom/30ra/resumos/T0239-1.pdf>

OLIVEIRA, C. et al. Effect of plant neutrophil elastase inhibitor on leucocyte migration, adhesion and cytokine release in inflammatory conditions. **British Journal of Pharmacology**, v. 161, n. 4, p. 899-910, 2010.

OLIVEIRA, C.Z. et al. Anticoagulant and antifibrinolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia forficata* against snake venoms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, n. 1-2, p. 213-6, 2005.

OLIVEIRA, D.R. et al. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia organoides* H.B.K. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 236-240, 2007.

OLIVEIRA, F. et al. Mitos e verdades sobre pata-de-vaca - *Bauhinia forficata* Link - uma revisão. **Lecta-USF**, v. 19, n. 1-2, p. 7-20, 2001.

OLIVEIRA, F.C.S.; BARROS, R.F.M.; MOITA NETO, J.M. Plantas medicinais utilizadas em comunidades rurais de Oeiras, semiárido piauiense. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 3, p. 282-301, 2010.

OSTROSKY, E.A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 18, n. 2, p. 301-307, abr. / jun. 2008.

PASA, M.G. Saber local e medicina popular: a etnobotânica em Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi Ciências Humanas**, v.6, n.1, p.179-96, 2011.

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

PASQUALE, A. Pharmacognosy: The oldest modern science. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 11, n. 1, p. 1-16, jun. 1984.

PAULINO, R.C. et al. Medicinal plants at the Sítio do Gois, Apodi, Rio Grande do Norte State, Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 1, p. 29-39, 2012.

PEIXOTO SOBRINHO, T.J.S. et al. Análise da pluviosidade e do efeito de borda sobre os teores de flavonóides em *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud., Fabaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 19, n. 3, p. 740-745, set. 2009.

PEIXOTO SOBRINHO, T.J.S. et al. Otimização de metodologia analítica para o doseamento de flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (BONGARD) STEUDEL. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 288-291, jan. 2010.

PEIXOTO SOBRINHO, T.J.S. et al. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonóides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, p. 683-689, out. / dez. 2008.

PEPATO, M.T. et al. Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n. 2, p. 191-197, jul. 2002.

PEREIRA, R.S. et al. Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. **Revista de Saúde Pública da USP**, São Paulo, v. 38, n. 2, abr. 2004.

PILLA, M.A.C.; AMOROZO, M.C.M.; FURLAN, A. Obtenção e uso das plantas medicinais no distrito de Martim Francisco, Município de Mogi-Mirim, SP, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 4, p. 789-802, 2006.

PINTO, T.J.A.; KANEKO T.M.; OHARA, M.T. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos**, Correlatos e Cosméticos. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2010, 325 p.

POKHREL, N.R.; ADHIKARI, R.P.; BARAL, M.P. *In-vitro* evaluation of the antimicrobial activity of *Bauhinia variegata*, locally known as koiralo. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 69-71, fev. 2002.

PRÍNCIPE, C.R.; SPIRA, B. The effect of sixteen medicinal plants used in the Brazilian pharmacopoeia on the expression and activity of glutathione S-transferase in hepatocytes and leukemia cells. **Pharmaceutical Biology**, v. 47, n. 12, p. 1192-7, 2009.

QUINTANS JÚNIOR, L.J. et al. Avaliação da Atividade Anticonvulsivante de Plantas do Nordeste Brasileiro. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 21, n. 3, p. 79-84, 2002.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603-613, mai. 2001.

RENZI, D.; VALTOLINA, M.; FORSTER, R. The evaluation of a multi-endpoint cytotoxicity assay system. **Alternatives to laboratory animals: ATLA**, v. 21, n. 1, p. 89-96, 1993.

REZENDE, H.A.; COCCO, M.I.M. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, São Paulo, v. 36, n. 3, set. 2002.

RODRIGUES, V.E.G.; CARVALHO, D.A. Ethnobotanical survey of medicinal plants in the dominion of meadows in the region of the Alto Rio Grande - Minas Gerais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 2, p. 17-35, 2007.

ROQUE, A.A.; ROCHA, R.M.; LOIOLA, M.I.B. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (nordeste do Brasil). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 1, p. 31-42, 2010.

SABU, M.C.; KUTTAN, R. Anti-diabetic activity of medicinal plants and its relationship with their antioxidant property. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n. 2, p. 155-160, jul. 2002.

SANTOS, F.J.B. et al. Chemical composition and anxiolytic-like effects of the *Bauhinia platypetala*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 3, p. 507-16, 2012.

SANTOS, M.R.A.; LIMA, M.R.; FERREIRA, M.G. Uso de plantas medicinais pela população de Ariquemes, em Rondônia. **Horticultura brasileira**, v. 26, n. 2, p. 244-50, 2008.

SARRAZIN, S.L.F. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia grandis* Schauer (Verbenaceae) from the western Amazon. **Food Chemistry**, v. 134, n. 3, p. 1474-1478, out. 2012.

SAVI, A.O.S. et al. Antibacterial activity of *Bauhinia splendens* leaves (Leguminosae). **Revista de Biología Tropical**, v. 44/45, p. 601-603, 1996.

SHU, Y. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 8, p. 1053-71, ago 1998.

SILVA M.I.G. et al. Bioactivity and potential therapeutic benefits of some medicinal plants from the Caatinga (semi-arid) vegetation of Northeast Brazil: a review of the literature. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 1, p. 193-207, 2012.

SILVA, A.C.O.; ALBUQUERQUE, U.P. Woody medicinal plants of the caatinga in the state of Pernambuco (northeast Brazil). **Acta Botanica Basílica**, São Paulo, v. 19, n. 1, p.17-26, mar. 2005.

SILVA, C.M. et al. Phytochemical and pharmacological analysis of *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr. (Leguminosae). **Zeitschrift für Naturforschung C**, v.56, n.11-12, p.939-42, 2001.

- SILVA, E.G. et al. Antioxidant activities and free radical scavenging potential of *Bauhinia microstachya* (RADDI) MACBR. (Caesalpinaceae) extracts linked to their polyphenol content. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 8, p. 1488-96, 2007b.
- SILVA, F.R. et al. Acute effect of *Bauhinia forficata* on serum glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, n. 1-2, p. 33-7, 2002.
- SILVA, F.S. et al. Dynamics of traditional knowledge of medicinal plants in a rural community in the Brazilian semi-arid region. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 3, p. 382-391, 2011.
- SILVA, K.L.; CECHINEL FILHO, V. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 449-54, 2002.
- SILVA, M.A.B. et al. Levantamento etnobotânico de plantas utilizadas como anti-hiperlipidêmicas e anorexígenas pela população de Nova Xavantina-MT, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 549-62, 2010.
- SILVA, T.C.L. et al. Triagem fitoquímica foliar de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel (pata-de-vaca). In: **Congresso Brasileiro de Química**, 47, 2007, Natal. Resumos... Rio Grande do Norte: Associação Brasileira de Química (ABQ-RN), 2007a. Disponível em: <http://www.abq.org.br/cbq/2007/trabalhos/7/7-85-220.htm>
- SOLER-RIVAS, C.; ESPÍN, J.C.; WICHERS, H.J. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of food stuffs. **Phytochemical Analysis**, v. 11, p. 330-338, 2000.
- SOUSA, M.J.M. et al. Medicinal plants used by Itamaraty community nearby Anápolis, Goiás State, Brazil. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 32, n. 2, p. 177-84, 2010.
- SOUZA, C.D.; FELFILI, J.M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 1, p. 135-42, 2006.
- SOUZA, G.C. et al. Farmácias caseiras comunitárias do município de Maquiné (RS): Uma avaliação etnofarmacológica. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, n. 2, p. 83-91, 2004.
- SOWNDHARARAJAN, K.; KANG, S.C. Free radical scavenging activity from different extracts of leaves of *Bauhinia vahlii* Wight & Arn. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 20, n. 4, p. 319–325, out. 2013.
- TERBLANCHÉ, F.C.; KORNELIUS G. Essential Oil Constituents of the Genus *Lippia* (Verbenaceae) - A Literature Review. **Journal of Essential Oil Research**, v. 8, n. 5, p. 471-485, 1996.
- TESKE, M.; TRENTINI, A.M.M. **Herbarium Compendio de Fitoterapia**. 4. ed. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico, 2001, 318 p.

TRENTIM, D.S. et al. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 327-335, set. 2011.

TROJAN-RODRIGUES, M. et al. Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 1, p. 155-63, 2012.

URQUIAGA, I.; LEIGHTON, F. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. **Biological Research**, v. 33, n. 2, p. 55-64, 2000.

VALENTIN, A. et al. Composition and antimalarial activity *in vitro* of volatile components of *Lippia multiflora*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1439-1442, nov. 1995.

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

WILKINSON, J.M. Methods for Testing the Antimicrobial Activity of Extracts. In: AHMAD, I.; AQIL, F.; OWAIS, M. (Ed.). **Modern Phytomedicine: Turning Medicinal Plants into Drugs**. 1. ed. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2007, p. 157-171.

WILLAIN FILHO, A. et al. Antinociceptive effect of the hydroalcoholic extract of *Bauhinia splendens* stems in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 49, n. 8, p. 823-7, 1997.

WOLFF, S.P.; DEAN, R.T. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. **Biochemical Journal**, v. 245, n. 1, p. 243-250, jul. 1987.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants**. Geneva, 2003. 80 p. Disponível em: <<http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s4928e/s4928e.pdf>>. Acesso em: 22 out. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines on good manufacturing practices (GMP) for herbal medicines**. Geneva, 2007. 92 p. Disponível em: <<http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s14215e/s14215e.pdf>>. Acesso em: 22 out. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Programme on Traditional Medicines. **Guidelines for the assessment of herbal medicines**. Geneva, 1991. Disponível em: <http://www.ncarboretum.org/assets/File/PDFs/Research/WHO_TRM_91.4.pdf>. Acesso em: 22 out. 2013.

ZUCHIWSCHI, E. et al. Limitações ao uso de espécies florestais nativas pode contribuir com a erosão do conhecimento ecológico tradicional e local de agricultores familiares. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 1, p. 270-82, 2010.

ANEXOS

Anexo 1 – Registro das espécies vegetais



INSTITUTO DO MEIO AMBIENTE DO ESTADO DE ALAGOAS – IMA

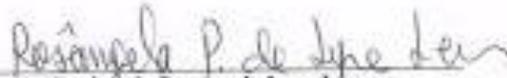
HERBÁRIO MAC

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins, que as amostras de plantas coletadas no município de Delmiro Gouveia nos dias 23 e 24/10/2012 por Kátia Mayumi Caffaro, sob responsabilidade da Profa. Maria Lysete de Assis Bastos da Universidade Federal de Alagoas – UFAL foram depositadas no Herbário MAC do Instituto do Meio Ambiente do Estado de Alagoas e tratam-se de:

| Registro MAC | Nº Coletor | Família | Espécie | Determinador |
|-----------------|---------------|-------------|--|--------------|
| 56123 | 02 | Fabaceae | <i>Bauhinia cheilantha</i> (Bong.) Steud. | M.C.S. Mota |
| 56124 | 05 | Verbenaceae | <i>Lippia gracilis</i> Schauer. | M.C.S. Mota |

Maceió, 24 de março de 2014.


 Rosângela Pereira de Lyra Lemos
 Curadora do Herbário MAC